

Aus dem Institut für Pharmakologie der
Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

**Analyse der Transportfunktion und Proteinexpression des
kationischen Aminosäure-Transporters hCAT-3 und des
verwandten Proteins SLC7A4**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Nicole Vékony
geboren am 15.08.1971
in Frankfurt am Main

Mainz, 2006

Diese Arbeit ist Maria und Friedrich Jungkunst gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis	9
Abkürzungsverzeichnis	10
I Einleitung	12
I.1 Physiologische Bedeutung von basischen Aminosäuren.....	12
I.2 Aminosäuretransport durch die Plasmamembran	14
I.3 Einteilung von verschiedenen Transportsystemen für basische Aminosäuren	15
I.4 Identifizierung von Transportern für basische Aminosäuren (CATs) und ihrer Transporteigenschaften.....	17
I.5 Regulation der CAT-Proteine.....	23
II Ziele der Arbeit	26
III Material und Methoden	27
III.1 Materialien.....	27
III.1.1 Laborgeräte.....	27
III.1.2 Plastikwaren	29
III.1.3 Verbrauchsmaterialien	29
III.1.4 Photomaterialien.....	30
III.1.5 Chemikalien	30
III.1.6 Restriktionsenzyme	30
III.1.7 Allgemeine Lösungen und Puffer	30
III.2 Methoden.....	32
III.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	32
III.2.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Geweben oder kultivierten Zellen	32
III.2.1.2 Photometrische Bestimmung von RNA-und DNA-Konzentrationen	33
III.2.1.3 Agarosegelelektrophorese	33
III.2.1.4 Extraktion von Nukleinsäuren mit Phenol	35
III.2.1.5 Restriktion von Plasmiden	36
III.2.1.6 Ligation	36
III.2.1.7 Klonierung von PCR-Produkten	37
III.2.1.8 Herstellung und Transformation kompetenter <i>E.coli</i> -Bakterien	38
III.2.1.9 Plasmid-Präparationen aus <i>E.coli</i> -Zellen	41
III.2.1.10 Reverse Transkription	42
III.2.1.11 Polymerasekettenreaktion (PCR)	42
III.2.1.12 DNA-Sequenzierung	43
III.2.2 Untersuchungen in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	44
III.2.2.1 Gewinnung und Behandlung der Oozyten	44
III.2.2.2 Synthese der cRNA durch in vitro-Transkription	45
III.2.2.3 Insertion von hCAT-3 in den Vektor pSP64T (HC3.pSP64T)	47
III.2.2.4 Injektion von cRNA in die Oozyten.....	47

III.2.2.5	Influxstudien mit Tritium-markierten Aminosäuren.....	48
III.2.2.6	Trans-Stimulations-Experimente (Efflux-Studien).....	50
III.2.2.7	Lysate aus <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	50
III.2.3	Zellkultur-Methoden	52
III.2.3.1	Allgemeine Bedingungen, Kulturmedien und Lösungen.....	52
III.2.3.2	Kultivieren von Zellen	53
III.2.3.3	Verwendete Zelllinien und transfizierte Zellen.....	54
III.2.3.4	Behandlung von Zellen mit PMA	55
III.2.3.5	Lysate aus humanen Zellen	55
III.2.4	Biochemische Methoden	57
III.2.4.1	Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen	57
III.2.4.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford	59
III.2.4.3	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	59
III.2.4.4	Western-Blot-Analyse.....	62
III.2.4.5	RNase-Verdauungsschutzanalyse	64
III.2.4.6	Dot-blot Analyse	70
III.2.5	Herstellung und Aufreinigung polyklonaler Antikörper.....	73
III.2.5.1	Klonierung von Konstrukten für die Expression von CAT/Tryptophan E (TrpE)-Fusionsproteinen.....	73
III.2.5.2	Expression von TrpE-Fusionsproteinen.....	76
III.2.5.3	Aufarbeitung der Fusionsproteine zur Immunisierung durch präparative SDS-PAGE.....	78
III.2.5.4	Immunisierung von Kaninchen	78
III.2.5.5	Klonierung von Konstrukten für die Expression von Glutathion-S- Transferase (GST) Fusionsproteinen zur Aufreinigung der Antikörper	79
III.2.5.6	Expression von CAT/GST-Fusionsproteinen.....	80
III.2.5.7	Aufreinigung der GST-Fusionsproteine über HiTrap™ Affinitätssäulen	80
III.2.5.8	Konzentrierung von Proteinlösungen durch Dialyse gegen Polyethylenglykol 20.000	81
III.2.5.9	Herstellung der Affinitätsmatrix zur Aufreinigung der Immunplasmen.....	82
III.2.5.10	Aufreinigung der Immunplasmen	82
III.2.6	Auswertung und Berechnung.....	84
IV	Ergebnisse	85
IV.1	<i>Charakterisierung der Transporteigenschaft des humanen kationischen Aminosäuretransporters CAT-3.....</i>	85
IV.1.1	Substratspektrum von hCAT-3.....	85
IV.1.2	Hemmung des hCAT-3-vermittelten L-Arginin-Transports	88
IV.1.3	Kinetik des hCAT-3 vermittelten Transports für kationische Aminosäuren	89
IV.1.4	Transportaktivität von hCAT-3 für L-Arginin bei unterschiedlichen pH- Werten	91
IV.1.5	Na ⁺ -Abhängigkeit des hCAT-3 vermittelten L-Arginin-Transports.....	92
IV.1.6	Abhängigkeit des hCAT-3 vermittelten Transports von Substrat auf der Trans-Seite	93

IV.2	<i>Expression von hCAT-3 in verschiedenen humanen Geweben und Zelllinien</i>	95
IV.3	<i>Gewinnung polyklonaler Antikörper gegen den kationischen Aminosäure-Transporter CAT-3 und das verwandte Protein SLC7A4</i>	100
IV.3.1	Generierung und Induktion von CAT/Tryptophan E (TrpE)-Fusionsproteinen	100
IV.3.2	Überprüfung des gewonnenen Präimmunplasmas	102
IV.3.3	Überprüfung der gewonnenen, noch nicht affinitäts-aufgereinigten Immunplasmen	104
IV.3.4	Generierung und Induktion von GST-FP und Affinitätsaufreinigung der Antikörper	105
IV.3.5	Nachweis der Spezifität des murinen CAT-3-Antikörpers	108
IV.3.6	Aufreinigung der gewonnenen Antikörper	109
IV.3.7	Spezifität der affinitäts-aufgereinigten Antikörper	115
IV.3.8	Nachweis des endogenen hCAT-3 in NT2-Teratokarzinom-Zellen	117
IV.4	<i>Subzelluläre Verteilung des hCAT-3-Proteins in humanen Zellen</i>	118
IV.4.1	Vergleich der subzellulären Verteilung von hCAT-3 und hCAT-1-EGFP-Fusionsproteinen in U373MG-Glioblastom-Zellen	118
IV.4.2	Endogene hCAT-3-Expression in NT2-Teratokarzinom-Zellen.....	119
IV.4.3	Einfluss der PKC-Aktivierung auf die subzelluläre Verteilung von hCAT-3.....	121
V	Diskussion	124
V.1	<i>Vergleich des Substratspektrums und der Transportkinetik</i>	125
V.1.1	Vergleich der hCAT-3-Transportaktivität für L-Arginin bei unterschiedlichen pH-Werten.....	129
V.1.2	Vergleich der Na ⁺ -Abhängigkeit und der Trans-Stimulierbarkeit von hCAT-3.....	129
V.2	<i>Expression von hCAT-3 in Geweben und Zelllinien</i>	130
V.3	<i>Generierung polyklonaler Antikörper gegen hCAT-3 und das verwandte Protein SLC7A4</i>	132
V.3.1	Endogene Expression in NT2-Teratokarzinom-Zellen	135
V.4	<i>Subzelluläre Verteilung des hCAT-3 in humanen Zellen</i>	136
V.4.1	PKC-vermittelte Regulation der hCAT-3 Expression.....	137
VI	Ausblick	141
VII	Zusammenfassung	143
	Literaturverzeichnis	145

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Beteiligung basischer Aminosäuren an Stoffwechsel-Prozessen.....	14
Abbildung 2	Modell des hCAT-3-Proteins in der Membran.....	20
Abbildung 3	Schematische Darstellung der humanen CAT-Proteine und des SLC7A4-Proteins mit potentiellen PKC-Erkennungsstellen	25
Abbildung 4	Transportaktivität von hCAT-3 für basische Aminosäuren	86
Abbildung 5	Transportaktivität von hCAT-3 für L-Glutaminsäure.....	86
Abbildung 6	Transportaktivität von hCAT-3 für neutrale Aminosäuren	87
Abbildung 7	Transportaktivität von hCAT-3 und hCAT-1 für L-Histidin bei verschiedenen pH-Werten	87
Abbildung 8	Hemmung des hCAT-3 vermittelten L-Arginin-Transports.....	88
Abbildung 9	Konzentrations-abhängige Aufnahme von kationischen Aminosäuren in hCAT-3 exprimierenden Oozyten	90
Abbildung 10	Transportaktivität von hCAT-3 für L-Arginin bei unterschiedlichen pH-Werten	92
Abbildung 11	Na⁺-Abhängigkeit des hCAT-3 vermittelten L-Arginin-Transports.....	93
Abbildung 12	Abhängigkeit des hCAT-3 vermittelten Transports von Substrat auf der Trans-Seite	94
Abbildung 13	Expression von CAT-Isoformen und nNOS in verschiedenen humanen Geweben und Zelllinien (Dot-Blot-Analyse).....	97
Abbildung 14	Nachweis von hCAT-3-mRNA in Brustgewebe, Uterus, Ovar, Testis und Plazenta (RNase-Verdauungsschutzanalyse).....	99
Abbildung 15	Schematische Darstellung der Generierung der trpE-FP mit den C-Termini der CAT-Proteine	100
Abbildung 16	Induktion der Expression der trpE-Fusionsproteine (SDS-PAGE)	102
Abbildung 17	Überprüfung des gewonnenen Präimmunplasmas (Western-Blot).....	103
Abbildung 18	Überprüfung des gewonnenen anti-hCAT-3-Immunkomplexes (Western-Blot)	104
Abbildung 19	Schematische Darstellung der Generierung von Fusionsproteinen zwischen GST und C-Termini der CAT-Proteine zur Aufreinigung der immunplasmen.....	105
Abbildung 20	Überprüfung der Induktion der Expression der GST-Fusionsproteine (SDS-PAGE)	107

Abbildung 21	Überprüfung der Affinitätsaufreinigung der überexprimierten GST-Fusionsproteine (SDS-PAGE)	108
Abbildung 22	Nachweis der Spezifität der Antikörper gegen den C-Terminus von hCAT-3 unter Verwendung hCAT-3-überexprimierender U373MG Glioblastom-Zellen (Western-Blot)	111
Abbildung 23	Nachweis der Spezifität der Antikörper gegen den C-Terminus von hCAT-3 unter Verwendung hCAT-3 exprimierender Oozyten (Western-Blot)	112
Abbildung 24	Nachweis der Spezifität der Antikörper gegen den C-Terminus von SLC7A4 unter Verwendung SLC7A4.GFP überexprimierender U373MG-Glioblastom-Zellen (Western-Blot)	113
Abbildung 25	Nachweis der Spezifität der Antikörper gegen den C-Terminus von SLC7A4 unter Verwendung SLC7A4.GFP-exprimierender Oozyten (Western-Blot)	114
Abbildung 26	Isoform-Spezifität der aufgereinigten Antikörper	116
Abbildung 27	Detektion des endogenen hCAT-3 in NT2-Teratokarzinom-Zellen	117
Abbildung 28	Subzelluläre Verteilung des hCAT-3 und hCAT-1-Proteins in stabil transfizierten U373MG Glioblastom-Zellen (Biotinylierung und Western-Blot).....	119
Abbildung 29	Nachweis der Expression von Zelloberflächen-Proteinen in NT2-Teratokarzinom-Zellen (Biotinylierung und Western-Blot).....	120
Abbildung 30	Nachweis der Expression von hCAT-3.EGFP in stabil transfizierten U373MG Glioblastom-Zellen (Biotinylierung und Western Blot).....	122

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Übersicht über die CAT-Isoformen.....	22
Tabelle 2	Sequenzvergleich zwischen dem humanen CAT-3 und den anderen hCATs.....	22
Tabelle 3	Verwendete Plasmide für die in vitro-Transkription von cRNA.....	46
Tabelle 4	Verwendete Radiobiochemika	49
Tabelle 5	Plasmide für Master-Blot-Hybridisierung.....	70
Tabelle 6	Verwendete Oligonukleotide zur Herstellung und Sequenzierung der Fusionsproteine.....	74
Tabelle 7	Halbmaximale Transportaktivität (K_M) und maximale Transportgeschwindigkeit (V_{max}) von hCAT-3	91
Tabelle 8	Fusionsproteine (FP) zwischen TrpE und den C-Termini von hCAT-3, SLC7A4 und mCAT-3 zur Immunisierung von Kaninchen	101
Tabelle 9	Fusionsproteine zur Generierung und Aufreinigung von Antikörpern gegen die C-Termini von hCAT-3, SLC7A4 und mCAT-3.....	106
Tabelle 10	Sequenzvergleich von hCAT-3 zu der CAT-3-Isoform aus den Spezies Maus und Ratte und den anderen humanen CAT-Proteinen (Closs und Mann 1999)	125
Tabelle 11	Vergleich der Transporteigenschaften der CAT-Isoformen.....	128

Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
as	nicht kodogener Strang (antisense)
BAS	basische Aminosäure
BIM I	Bisindolylmaleimid I
bp	Basenpaare
CAT	kationischer AS-Transporter (cationic amino acid transporter) (h für human, m für murin, r für Ratte)
cDNA	codierende DNA
cpm	Zählrate pro Minute (counts per minute)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	mit DEPC behandeltes Aqua bidest.
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
dpm	Zerfälle pro Minute (desintegrations per minute)
DTT	Dithiothreitol
E	Einheit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	verstärkt grün fluoreszierendes Protein (enhanced green fluorescent protein)
FBS	fötales Rinderserum (feta. bovine serum)
4F2hc	schwere Kette des 4F2 Oberflächenantigens (4F2 heavy chain)
GFP	grün fluoreszierendes Protein (green fluorescent protein)
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
HAT	hetero(di)mere Aminosäure-Transporter
hCAT	humaner CAT
IAA	Indolacrylsäure
IMDM	Iscove's modifiziertes Dulbecco's Medium
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galactisid
kb	Kilo Basenpaare
kDa	Kilodalton
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
Km	Kaninchen zur Gewinnung von Antikörpern
l	Liter

LAT	System L-Aminosäuretransporter
LPI	Lysinabhängige Proteinintoleranz
LPS	Lipopolysaccharid
MCS	multiple Klonierungsstelle (multiple cloning side)
Min.	Minute
MuLV	murine Leukämieviren
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
ns	nicht signifikant
nt	Nukleotide
NT2	humane Zelllinie aus einem Teratokarzinom
NTPs	Nucleosidtriphosphate
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphat buffered saline)
PBS-CM	PBS mit Ca ⁺⁺ und Mg ⁺⁺
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
rBAT	verwandt zu Aminosäure-Transporter b ^{0,+}
ReTr	Reverse Transkription
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardfehler (standard error of the mean)
ss	kodogener Strang (sense strand)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA
TM	Transmembrandomäne
TrpE	Tryptophan E
ü.N.	über Nacht
U373MG	humane Glioblastom-Zelllinien
UTR	untranslatierte Region
V _{max}	maximale Transportgeschwindigkeit

I Einleitung

I.1 Physiologische Bedeutung von basischen Aminosäuren

In vielen Stoffwechsel-Prozessen spielen basische Aminosäuren (BAS) eine wichtige Rolle (Abbildung 1). Für Säugetiere ist L-Lysin eine essentielle Aminosäure (AS). Diese dient als Baustein in der Proteinsynthese. Eine ausreichende Lysinversorgung ist für die Proliferation von Zellen wichtig. L-Arginin zählt wie L-Lysin zu den proteinogenen AS, gilt aber als semi-essentiell. Es kann durch die Enzyme des Harnstoffzyklus aus L-Ornithin über das Zwischenprodukt L-Citrullin synthetisiert werden. Entsprechend kann L-Arginin durch die Wirkung von Arginase in L-Ornithin umgewandelt werden. L-Ornithin kann auch aus der nicht essentiellen AS L-Glutamat oder L-Prolin durch *de-novo* Synthese hergestellt werden. Die endogene Erzeugung von L-Arginin kann unter bestimmten Umständen wie Wachstum oder Regeneration nicht ausreichend sein, um den Bedarf des Säuger-Organismus zu decken. Daher führt eine unzureichende Zufuhr von L-Arginin über die Nahrung bei Kindern zu Wachstumsstörungen (Jenkinson *et al.*, 1996). Auch die Wundheilung bei Erwachsenen kann durch den Mangel an L-Arginin in der Nahrung verlangsamt sein. L-Ornithin ist das Ausgangsprodukt für die Synthese von Polyaminen, die ihrerseits wichtige Regulatoren von Zellproliferation und -differenzierung sind (Janne *et al.*, 1991; Morgan, 1994). Außerdem stellt L-Ornithin, welches selbst nicht proteinogen ist, die Vorstufe zu den AS L-Prolin und L-Glutamin dar, die für die Proteinsynthese benötigt werden.

Von Granger und Hibbs wurde gezeigt, dass die durch Zytokine und bakterielle Zellwände hervorgerufene Zytotoxizität von Makrophagen L-Arginin-abhängig ist (Granger *et al.*, 1988; Hibbs *et al.*, 1987). Daraus resultierte die Entdeckung der Stickstoffmonoxid (NO)-Synthasen (NOS), einer Enzym-Familie mit drei Isoformen (NOS I - NOS III), denen L-Arginin als Substrat dient. Diese Enzyme produzieren Stickstoffmonoxid (NO) durch Oxidation des Guanidin-Stickstoffes von L-Arginin unter Beteiligung molekularen Sauerstoffs (Übersichten siehe Förstermann *et al.*, 1994; Förstermann *et al.*, 1995a, Förstermann *et al.*, 1995b). Die drei NO-Synthasen unterscheiden sich in ihrem Expressionsmuster, der Induzierbarkeit und Aktivierbarkeit. Während die Isoform NOS I in Nervenzellen gefunden wurde, wird die Isoform NOS II in Makrophagen exprimiert. Das Enzym NOS III ist hauptsächlich in Endothelzellen exprimiert. Das gebildete NO besitzt eine Vielzahl physiologischer Wirkungen (Moncada und Higgs, 1993). Als Vasodilatator spielt es eine wichtige Rolle bei der Regulation des Blutflusses und des Blutdrucks (Förstermann *et al.*, 1995). So ist z.B. der starke Blutdruckabfall bei einem septischen Schock durch eine NO-vermittelte Vasodilatation bedingt (Förstermann *et al.*, 1994; Förstermann *et al.*, 1995). Außerdem stellt NO im

Zentralnervensystem einen wichtigen retrograden Botenstoff für das Langzeitgedächtnis dar (Musleh *et al.*, 1993).

Eine Störung des Transports von basischen AS liegt der autosomal vererbten lysinbedingten Proteinintoleranz (LPI) zu Grunde (Übersicht siehe Simell, 1994). Dabei werden große Mengen von basischen AS mit dem Urin ausgeschieden. Bei einer hohen Aufnahme von Proteinen wird Ammoniak im Blut angereichert, was zu einer Vergiftung mit den Symptomen Übelkeit und Erbrechen führt. Dadurch wird eine Aversion gegen Proteine hervorgerufen (Palacin, 2000). Es kommt außerdem zu Entwicklungsstörungen, Hepatomegalie, Osteoporose, Nierenschädigungen und geistiger Retardierung. Oft kommt es zur Ausbildung einer lebensbedrohlichen alveolaren Proteinose. Bei der Cystinurie kommt es zu hohen Konzentrationen von Cystin und basischen AS im Urin (Tate, 1996; Palacin, 2000).

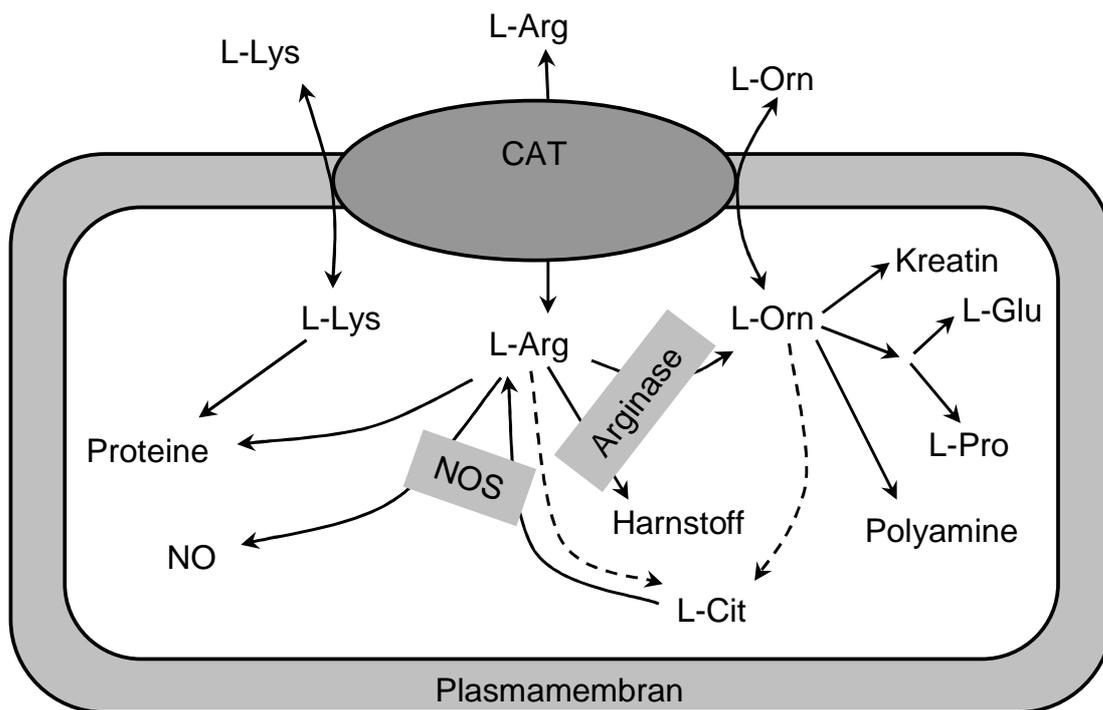


Abbildung 1 **Beteiligung basischer Aminosäuren an Stoffwechsel-Prozessen**

Die kationischen Aminosäuren L-Arginin, L-Lysin und L-Ornithin sind in der Zelle an wichtigen Stoffwechsel-Prozessen beteiligt. Für derart große polare Moleküle wie BAS ist es nur möglich mit Hilfe spezifischer Transportproteine, sogenannter Carrier, die Zellmembran zu passieren. L-Arginin ist das Substrat der Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS I - III), die in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff unter Verwendung der Guanidinogruppe des L-Arginins NO synthetisieren.

I.2 Aminosäuretransport durch die Plasmamembran

Der Transport großer polarer Moleküle, wie z.B. Aminosäuren, durch biologische Membranen erfordert spezielle Träger-Proteine, sogenannte Carrier (Stein, 1990). Im Gegensatz zu einem Membrankanal, bei dem Moleküle wie durch eine Pore diffundieren können, bindet bei dem Transport die AS mit dem Carrier-Protein. Hierbei kommt es zu einer Konformationsänderung des Carriers und die Substratbindestelle wandert auf die andere Seite der Membran (Barnett *et al.*, 1974; Closs, Habilitationsschrift 1998). Aufgrund der begrenzten Anzahl von Carrier-Molekülen erreicht der Carrier-vermittelte Transport sein Maximum, wenn alle Carrier besetzt sind. Er ist also sättigbar. Dies kann auch in Konkurrenz durch bestimmte chemische Analoga geschehen. In Hinsicht ihrer Kinetik ähneln die Carrier den

Enzymen. Zum einen ist die Bindung des Substrates an den Carrier für den Transport geschwindigkeitsbestimmend, was durch die Michaelis-Menten Konstante (K_M) als Maß für die Affinität des Carriers zu seinem Substrat angegeben wird. Zum anderen gibt die maximale Geschwindigkeit (V_{max}) die Geschwindigkeit der Konformationsänderung des Carriers beim Transport an. Für energieunabhängige Carrier ist die Trans-Stimulierbarkeit d.h. die Erhöhung der Transportrate durch Substrat auf der Trans-Seite (Plasmamembran-Seite, zu der hintransportiert wird) ein weiteres Merkmal, was sie von Kanälen und Poren unterscheidet. Zudem kann der Carrier-vermittelte Transport, im Gegensatz zum Transport durch Kanäle, gegen ein Konzentrationsgefälle erfolgen. Die Energie dafür wird bei Ionenpumpen durch Hydrolyse von ATP bereitgestellt (primär aktiver Transport, z.B. die Na^+/K^+ -ATPase). Von den energieabhängigen Transportern gibt es entweder H^+ , Na^+ - bzw Cl^- gekoppelte Symporter oder K^+ , H^+ und OH^- -gekoppelte Antiporter. Den einwärts gerichteten Na^+ -Gradienten liefert die Na^+/K^+ -ATPase. Diese Art von Transportern werden als sekundär aktiv bezeichnet (Castagna *et al.*, 1997). Außerdem gibt es Transporter, die H^+ -gekoppelt transportieren (Thwaites *et al.*, 1993). Der dafür notwendige H^+ -Gradient wird durch den in der Bürstensaummembran gelegenen Na^+/H^+ Austauscher, der durch die basolaterale Na^+/K^+ -ATPase angetrieben wird, geliefert. Dies wird als tertiär aktiver Transport bezeichnet.

I.3 Einteilung von verschiedenen Transportsystemen für basische Aminosäuren

Die ersten Arbeiten zum Thema Transportsysteme für basische AS wurden in den 60er Jahren veröffentlicht. Christensen zeigte hierbei, dass L-Arginin das gleiche Transportsystem verwendet wie L-Lysin und L-Ornithin (Oxender und Christensen, 1963), das sogenannte γ^+ -System (Christensen, 1964; Christensen und Antonioli, 1969). Das γ^+ -System transportiert basische AS pH- und Na^+ -unabhängig. Der Transport ist trans-stimulierbar, d.h. erhöht, wenn Substrat auf der Seite vorhanden ist, zu der hintransportiert wird. Die Aktivität zeichnet sich durch eine K_M für basische AS aus, die im Bereich der Plasmakonzentration von ca. 0,2mM liegt (White *et al.*, 1982; White, 1985). γ^+ -Aktivität kommt mit Ausnahme der Leber in allen untersuchten Geweben vor (White und Christensen, 1982). In den letzten Jahren wurden weitere Na^+ -unabhängige Transporter für basische AS durch molekulare Klonierung identifiziert (Übersicht: Palacin *et al.*, 1998; Hyde *et al.*, 2003). Sie unterscheiden sich vom System γ^+ durch die Interaktion mit neutralen AS.

Das System y^+L , was zuerst in humanen Erythrozyten (Devés *et al.*, 1992) und später in Plazenta und humanen Fibroblasten (Fei *et al.*, 1995; Palacin *et al.*, 1998) beschrieben wurde, zeichnet sich durch eine hohe Affinität für basische AS aus (K_M für L-Lysin liegt bei $10\mu M$). Sind Na^+ oder Li^+ vorhanden, ist die Affinität zu neutralen (wie z.B. L-Leucin, L-Methionin oder L-Glutamin) und basischen AS ähnlich. Im Gegensatz zum y^+ -System kann die Transportaktivität im y^+L -System durch N-Ethylmaleimid (NEM) nicht gehemmt werden. Dadurch können die beiden Transportsysteme in intakten Zellen unterschieden werden (Devés *et al.*, 1993), wobei NEM in höheren Dosen toxisch wirkt.

Die Eigenschaften des Systems $b^{0,+}$ wurden zuerst in murinen Blastocysten beschrieben (Van Winkle, 1993), später auch in der Niere und in Trophoblasten der Plazenta (Van Winkle *et al.*, 1988; Furesz *et al.*, 1991). Es transportiert basische und neutrale AS Na^+ -unabhängig und mit gleicher Affinität.

Die Transportsysteme b_1^+ und b_2^+ , die in unbefruchteten und befruchteten Eizellen der Maus beschrieben wurden, unterscheiden sich zu den anderen Systemen durch den Umstand, dass sie eine höhere Affinität zu L-Arginin zeigen (Affinität von $b_1^+ < b_2^+$) als zu den anderen basischen AS. Beide sind auch in Anwesenheit von Natriumionen nicht durch neutrale AS (Homoserin und L-Leucin) hemmbar (Van Winkle und Camione, 1990).

Ebenfalls in murinen Blastocysten wurde mit dem $B^{0,+}$ System auch das einzige Transportsystem beschrieben (Van Winkle, 1985), das Na^+ -abhängig basische und kleine neutrale AS (L-Alanin, L-Serin) transportiert.

In den letzten Jahren ist eine Vielzahl von cDNAs aus Säugerzellen kloniert worden, die für die beschriebenen Transportsysteme von basischen AS kodieren. Beispielsweise wurden Glykoprotein-assoziierte Aminosäure-Transporter beschrieben. Es handelt sich um die leichten Ketten der heteromeren Aminosäure-Transporter (HATs) (Systeme y^+L und $b^{0,+}$). Sie besitzen 12 putative Transmembran-Domänen (TMs) und assoziieren mit den Glykoproteinen 4F2hc (4F2 heavy chain cell surface antigen) oder rBAT (related to $b^{0,+}$ amino acid transporter) (Übersicht: Palacin *et al.*, 2000). Die schweren Ketten sind mit den leichten Ketten kovalent über eine Disulfidbrücke verbunden.

Desweiteren wurden in Säugerzellen cDNAs für Transportproteine beschrieben, die y^+ -Aktivität zeigen. Sie transportieren spezifisch basische AS und werden aufgrund dessen als CAT für cationic amino acid transporter bezeichnet. Wie die zuvor beschriebenen leichten

Ketten der HATs werden sie zur Familie der Carrierproteine SLC7 (für solute carrier family 7) gerechnet. Mit den leichten Ketten sind die CAT-Proteine zu ca. 25% in der Aminosäure-Sequenz identisch. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wird ein Mitglied der CAT-Familie, hCAT-3, charakterisiert.

I.4 Identifizierung von Transportern für basische Aminosäuren (CATs) und ihrer Transporteigenschaften

Innerhalb der vergangenen Jahre wurden 5 verschiedene Isoformen der CAT-Proteinfamilie identifiziert. Der erste Aminosäure-Transporter wurde zunächst als Rezeptor für ekotrope Maus-Leukämie-Viren (MuLV) entdeckt (Albritton *et al.*, 1989). Bei der Analyse des Proteins zeigte sich, dass es sich um ein integrales Membranprotein mit 12-14 möglichen TMs handelt. Ein gegen die Genbank durchgeführter Identitätsvergleich erbrachte keine Sequenzhomologie. Es wurde aber eine strukturelle Ähnlichkeit des MuLV-Rezeptors mit der L-Arginin-Permease aus *Saccaromyces cerevisiae* festgestellt. Nachfolgend durchgeführte Aufnahmestudien in *Xenopus laevis* Oozyten mit radioaktiv markierten Substanzen offenbarten die Funktion des MuLV-Rezeptors als die eines Na^+ -unabhängigen Transporters für basische AS (Kim *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1991). Es folgte die Umbenennung des MuLV-Rezeptors in mCAT-1. Desweiteren wurde eine Kompetition durch andere basische AS gezeigt (Kim *et al.*, 1991). Die Transstimulierbarkeit, die einen charakteristischen Parameter des γ^+ -Systems darstellt, ist bei mCAT-1 stark ausgeprägt.

Kurz nach der Isolation der für mCAT-1 kodierenden cDNA wurden humane orthologe cDNAs kloniert, die eine Homologie von 87,6% zum mCAT-1 aufweisen (Albritton *et al.*, 1992; Yoshimoto *et al.*, 1991). Wie bereits für den mCAT-1 beschrieben, konnte in Transportstudien in *X. laevis* Oozyten eine für das γ^+ -System spezifische Transportaktivität nachgewiesen werden (Closs *et al.*, 1997). Die CAT-1 Isoform ist also spezifisch für basische AS, Na^+ -unabhängig, trans-stimulierbar und zusätzlich pH-unabhängig (Kim *et al.*, 1991). Sie stellt einen hochaffinen Transporter dar, dessen K_M -Werte für basische AS zwischen 70-250 μM liegen. Die Arbeitsgruppe Wang konnte in mit mCAT-1 cRNA injizierten Oozyten zeigen, dass in Anwesenheit von Na^+ -Ionen auch kleine neutrale AS wie L-Cystein und Homoserin mit niedriger Affinität transportiert werden (Wang *et al.*, 1991). Dieses Ergebnis konnte in unserer Arbeitsgruppe nicht bestätigt werden. CAT-1 wird ubiquitär exprimiert, mit Ausnahme der Leber (Kim *et al.*, 1991). Jedoch nach partieller Hepatektomie wird CAT-1 für 2h in der Leber exprimiert und kann zusätzlich durch Hormone (Insulin, Glukokortikoide) induziert werden (Wu *et al.*, 1994; Liu und Hatzoglou, 1998).

Ein Fragment einer cDNA, die für eine weitere Isoform kodierte, wurde auf der Suche nach Genen, die an der Aktivierung von T-Zellen beteiligt sind, gefunden. Sie wurde aus einer murinen T-Lymphomzelllinie (T-cell early activation und als Tea bezeichnet) isoliert. Mit dem Tea-Fragment konnten wenig später gesamte cDNAs aus Leber (Closs *et al.*, 1993a; Kavanaugh *et al.*, 1993), aus T-Lymphomen (Reizer *et al.*, 1993) und Makrophagen, die mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert worden waren (Closs *et al.*, 1993b), isoliert werden. Die parallel identifizierten cDNAs zeigten sich bei einem Sequenzvergleich identisch bis auf einen Bereich, der für 42 AS in der vierten intrazellulären Schleife kodiert (nach dem 14 TM-Modell). Die beiden unterschiedlichen Isoformen entstehen durch differentielles Spleissen nach der Transkription desselben Gens. Der aus der Leber isolierte Transporter wurde mCAT-2A, der aus T-Lymphomzellen bzw. Makrophagen isolierte, mCAT-2B genannt. Die humanen Orthologen zu den murinen Transportern wurden kloniert und charakterisiert (Closs *et al.*, 1997). Dabei wurde hCAT-2A durch Hybridisierung einer humanen Leber cDNA-Bank isoliert, während die hCAT-2B cDNA aus der Hepatom-Zelllinie HepG2 stammt. CAT-2B stellt einen Transporter dar, der y^+ -Aktivität zeigt, d.h. er ist hochaffin für basische AS, Na^+ -unabhängig, stereoselektiv und trans-stimulierbar. CAT-2A dagegen ist ein niederaffiner Transporter mit K_M -Werten von 2-5mM, der außerdem nicht trans-stimulierbar ist (Closs *et al.*, 1993; Closs *et al.*, 1997; Habermeier *et al.*, 2003), und sich damit vom y^+ -System unterscheidet.

Eine weitere Isoform (CAT-3) wurde 1997 in den Spezies Maus und Ratte identifiziert. In der Ratte wurde CAT-3 durch das Absuchen von cerebralen cDNA-Banken mit einer rCAT-1 Sonde detektiert (Hosokawa *et al.*, 1997). Kurze Zeit später wurde aus einer cDNA-Bank aus embryonalem Mesoderm das murine Orthologe (mCAT-3) isoliert (Ito und Groudine, 1997). Die in Oozyten nachgewiesene Transportaktivität von mCAT-3 für basische AS war nur wenig höher als die Basalaktivität der Oozyten. Ähnliche Werte, nämlich einen zweifachen Anstieg des Transports wurden von Hosokawa *et al.* in COS7 Zellen gemessen, die transient mit rCAT-3 transfiziert wurden. Nicht nur basische AS sondern auch L-Methionin, L-Cystein, L-Aspartat, L-Glutamat (Hosokawa *et al.*, 1997), D-Arginin und L-Citrullin (Ito und Groudine, 1997) scheinen den CAT-3-vermittelten L-Arginin-Transport zu hemmen. Zudem weist mCAT-3 eine deutliche Divergenz der K_M -Werte für die beiden Substrate L-Arginin (40-60 μ M) und L-Lysin (115-165 μ M) auf. Die Ergebnisse, die zum einen von Hosokawa und zum anderen von Ito für den CAT-3 erhoben wurden, stehen in deutlichem Gegensatz zu den Transportaktivitäten für basische AS, die für die Isoformen CAT-1 und -2B erhoben wurden. Für unsere Arbeitsgruppe stellte sich die Frage, warum CAT-3, der wie CAT-1 und -2B y^+ -

Transporteigenschaften zeigt, in der Substratspezifität und den K_M -Werten für basische AS so deutlich von den anderen Isoformen abweicht.

Sollten die Ergebnisse reproduzierbar sein, zeigen sich die Unterschiede möglicherweise nur im murinen bzw. im Rattensystem. Interessant war also die Fragestellung, ob CAT-3 auch im humanen System diese Divergenz zu den anderen Isoformen aufweist. Um dies zu untersuchen, habe ich im Rahmen meiner Diplomarbeit das humane Orthologe zu mCAT-3 bzw. rCAT-3 kloniert (Diplomarbeit Vékony, 1999). Ein Sequenzvergleich zwischen dem dort klonierten hCAT-3 und übrigen humanen CATs erbrachte die höchste Identität (60%) der Aminosäuresequenz zu hCAT-1 (Tabelle 2). Auch die wahrscheinliche Anordnung in der Membran stimmt mit dem 12-14 TM-Modell, das für die anderen CATs vorgeschlagen wird, überein (siehe Abbildung 2).

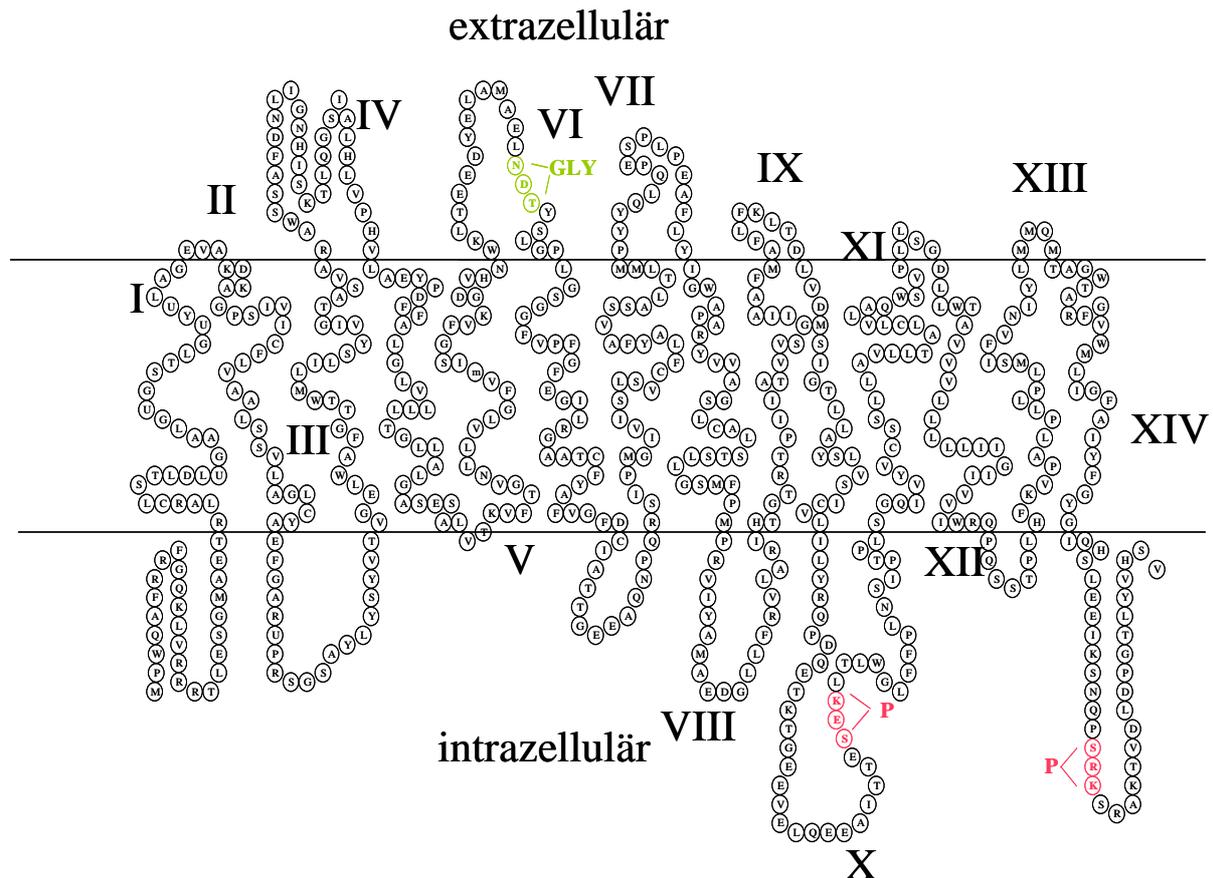


Abbildung 2 **Modell des hCAT-3-Proteins in der Membran**

Das Modell zeigt die möglichen Transmembrandomänen (TM) des hCAT-3-Proteins (nummeriert I-XIV) nach dem TMPred-Programm. Der Amino- und der Carboxyterminus werden intrazellulär vermutet. Zwei mögliche PKC-Phosphorylierungsstellen befinden sich in der sechsten intrazellulären Schleife und am Carboxyterminus (rot und mit einem "P" markiert). Die putative Glykosylierungsstelle befindet sich in der dritten extrazellulären Schleife (grün und mit der Abkürzung "GLY" markiert).

Die Aminosäuresequenz von hCAT-1 wurde verwendet, um mit dem Computerprogramm BLAST eine EST (expressed sequence tag)-Datenbank abzusuchen. Dies erbrachte einen EST, der Homologie zu hCAT-1 zeigt. Mit diesem Klon wurde durch das Absuchen von humanen Plazenta-cDNA-Banken der SLC7A4-Klon (der auch als hCAT-4 bezeichnet wurde) gefunden (Sperandeo *et al.*, 1998). SLC7A4 weist zwar deutliche Homologie zur CAT-Familie auf. Eine Transportaktivität für basische AS nach Expression in Oozyten oder Säugerzellen konnte aber nicht gezeigt werden (Wolf *et al.*, 2002). Da nicht endgültig geklärt ist, ob es sich wirklich um einen CAT handelt wird im weiteren Verlauf der Arbeit vom SLC7A4 gesprochen. Eine endogene Expression von SLC7A4 wurde in NT2-

Teratokarzinom-Zellen gefunden, die mit Retinsäure behandelt wurden. Doch auch in diesen Zellen konnte keine SLC7A4-vermittelte Transportaktivität für L-Arginin festgestellt werden. Überlegungen, dass dies auf einer fehlenden Expression des Proteins in der Plasmamembran zurückzuführen sein könnte, wurden mit der Generierung von Konstrukten zwischen SLC7A4 und dem grün fluoreszierenden Protein EGFP widerlegt (Wolf *et al.*, 2001; Wolf, Dissertation 2001). In transfizierten U373MG Glioblastom-Zellen war SLC7A4.GFP in der Plasmamembran zu sehen, aber eine starke Fluoreszenz war zudem innerhalb der Zelle in vesikulären Kompartimenten zu beobachten (Wolf *et al.*, 2001). In *Xenopus laevis* Oozyten konnte bestätigt werden, dass SLC7A4.GFP in der Plasmamembran und zu einem geringen Anteil im Cytoplasma exprimiert wird. Möglicherweise benötigt SLC7A4 ein Partnerprotein, das die Transportaktivität induziert. Northern-Blot Analysen mit Poly(A)⁺-RNA verschiedener Gewebe zeigen Expression in Hirn, Testis und Plazenta (Vekony *et al.*, 2001). Da die (SLC7A4) mRNA in der Plazenta vorhanden ist, wird vermutet, dass SLC7A4, neben CAT-1, für die γ^+ -Aktivität dort mitverantwortlich ist (Ayuk *et al.*, 2000; Jansson 2001).

Protein-Name	Gen-Name	Transport-system	K_M (mM) für Arg. in Oozyten	Trans-Stimulation	Untersuchte Spezies	Referenzen
CAT-1	SLC7A1	y ⁺	0,10-0,16	ja	h, m, r	Albritten <i>et al.</i> , 1989 Yoshimoto <i>et al.</i> , 1991
CAT-2A	SLC7A2	nicht definiert	2,0-5,0	nein	h, m, r	Closs <i>et al.</i> , 1993a Closs <i>et al.</i> , 1997
CAT-2B	SLC7A2	y ⁺	0,25-0,70	leicht	h, m, r	Reizer <i>et al.</i> , 1993 Closs <i>et al.</i> , 1993b Schwartz <i>et al.</i> , 2002
CAT-3	SLC7A3	y ⁺	0,20-0,50	leicht	h, m, r	Ito und Groudine, 1997 Hosokawa <i>et al.</i> , 1997 Vekony <i>et al.</i> , 2001
SLC7A4 (CAT-4)	SLC7A4	ungeklärt	ungeklärt	ungeklärt	h	Sperandeo <i>et al.</i> , 1998 Wolf <i>et al.</i> , 2002

Tabelle 1 Übersicht über die CAT-Isoformen

Die Tabelle enthält die Gen-Namen und einige Transportcharakteristika der bisher identifizierten CATs.

	hCAT-1	hCAT-2A	hCAT-2B	SLC7A4
hCAT-3	66%	57%	59%	50%

Tabelle 2 Sequenzvergleich zwischen dem humanen CAT-3 und den anderen hCATs

In der Tabelle sind % Identität der AS-Sequenz von hCAT-3 zu den drei weiteren hCAT-Isoformen bzw. SLC7A4 aufgeführt.

I.5 Regulation der CAT-Proteine

Von den CAT-Proteinen wurde vor allem die Regulation von CAT-1 untersucht. rCAT-1 wird sowohl auf transkriptionelle als auch komplexe translationale Weise reguliert (Yaman *et al.*, 2003). Auch auf posttranslationaler Ebene kann die CAT-1-Aktivität reguliert werden (Übersicht: Closs, 2002; Hatzoglou *et al.*, 2004). Am häufigsten kommt die posttranslationale Modifikation von Proteinen in Form von Glykosylierungen und Phosphorylierungen vor.

Die CAT-Proteine sind integrale Membranproteine, die die Membran vermutlich 12-14 mal durchspannen (siehe TM-Modell von hCAT-3 in Kapitel I.2). Der N- und der C-Terminus kommen dabei intrazellulär zu liegen. Die Aminosäure-Sequenz von hCAT-1 weist demnach drei potentielle N-Glykosylierungsstellen auf, von denen 2 in der dritten und 1 in der vierten extrazellulären Schleife liegen. hCAT-2A und -2B besitzen ebenfalls 3 potentielle N-Glykosylierungsstellen, von denen 2, wie bei CAT-1 in der dritten extrazellulären Schleife liegen. Die dritte befindet sich in der zweiten extrazellulären Schleife. Bei hCAT-3 existiert nur eine potentielle N-Glykosylierungsstelle in der dritten extrazellulären Schleife. Die drei potentiellen N-Glykosylierungsstellen von SLC7A4 liegen in der zweiten, dritten und sechsten extrazellulären Schleife.

Die Phosphorylierung von Proteinen bedeutet einen der wichtigsten Regulationsmechanismen in höheren Zellen. Durch sie werden z.B. Prozesse des Fett- und Zuckerstoffwechsels beeinflusst. Ebenso spielt sie bei der Übermittlung hormoneller Signale, der Regulation der Genexpression und der Kontrolle des Wachstums eine bedeutende Rolle. Proteine können entweder durch eine direkte Phosphorylierung oder über Phosphorylierung eines zwischengeschalteten regulatorisch wirkenden Proteins reguliert werden. Es kann durch die Phosphorylierung zu einer Inaktivierung des Proteins kommen oder auch zu einer Aktivierung. Darüber hinaus kann ein Membranprotein auch internalisiert werden und dadurch seine Funktion nicht mehr ausüben. Phosphorylierungen werden durch Proteinkinasen bewerkstelligt, von denen die Proteinkinase A (PKA) und C (PKC) zu den am besten untersuchten Kinasen gehören. Die Aktivierung der Proteinkinase C reguliert die Aktivität einer Vielzahl von Transportproteinen direkt oder indirekt. Beispiele sind der Dopamin-Transporter (DAT) (Huff *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 1997), der Glutamat-Transporter (GLAST-1) (Conradt und Stoffel, 1997) oder der GABA-Transporter (GAT-1) (Corey *et al.*, 1994). In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass es sowohl in *X. laevis* Oozyten als auch in humanen endothelialen EA.hy 926-Zellen zu einer signifikanten Reduktion der L-Arginin-Aufnahmeaktivität kommt, wenn durch den aktiven Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) die PKC aktiviert wurde (Gräf *et al.*, 2001). Die Reduktion ging

allerdings nicht mit einer Abnahme der Gesamtprotein-Expression einher. Ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe konnte im Folgenden gezeigt werden, dass die PKC-vermittelte Reduktion der hCAT-1-Transportaktivität auf einer Reduktion der hCAT-Expression an der Zelloberfläche beruht (Rotmann *et al.*, 2004). Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit dem endogen in humanen DLD-1 Kolonkarzinom Zellen exprimierten hCAT-1 erzielt (Rotmann, Dissertation 2003; Rotmann *et al.*, 2004). Die Transportaktivität kann in DLD-1 Zellen durch das Auswaschen von PMA wieder normalisiert werden. Da der PKC-Effekt auch nach dem Entfernen der putativen PKC-Erkennungssequenzen am hCAT-1-Protein unverändert blieb und es durch PMA zu keiner Zunahme der hCAT-1-Phosphorylierung (*in vivo* Phosphorylierung) kam, reguliert die PKC die hCAT-1-Transportaktivität wahrscheinlich über einen indirekten Mechanismus d.h. nicht über eine direkte Phosphorylierung des hCAT-1-Proteins. Von Krotova *et al.* konnte gezeigt werden, dass die Reduktion der hCAT-1-Transportaktivität durch die klassischen PKC-Isoformen vermittelt wird. Von den klassischen Isoformen wiederum scheint die PKC α die dafür verantwortliche Isoform zu sein (Krotova *et al.*, 2003). Vergleicht man das Vorkommen des Sequenzmotivs (**RXXS/TXRX**, wobei X für eine beliebige AS steht) für eine Phosphorylierung durch die PKC bei den hCATs und mCATs, so fällt auf, dass die humanen CAT-Proteine je eine zusätzliche potentielle PKC-Bindestelle aufweisen. Die putativen Phosphorylierungsstellen der einzelnen hCAT-Proteine sind in Abbildung 3 aufgeführt. Der SLC7A4 besitzt zwei Erkennungssequenzen für die Proteinkinase C, die nicht mit denen der anderen hCATs übereinstimmen. In den Isoformen hCAT-1, -2A und 2B kommt eine Phosphorylierungsstelle vor, die in ihrer Lokalisation konserviert ist (AS 476 für hCAT-1 und AS 474 für hCAT-2A und -2B). Da diese Position im Bereich der fünften intrazellulären Schleife liegt, wäre es eine mögliche Stelle für eine Phosphorylierung durch die PKC. Eine weitere konservierte PKC-Bindestelle kommt in der Nähe der oben genannten konservierten Position vor, nämlich an Position 454 für hCAT-2A und 2B bzw. AS 453 für hCAT-3. Die starke Verwandtschaft zwischen den CATs wirft die Frage auf, ob die CATs durch die PKC in gleicher Weise reguliert werden. Möglicherweise zeigt hCAT-3, der noch eine zusätzliche PKC-Erkennungsstelle am C-Terminus besitzt, eine andere Regulation der Transportaktivität nach PKC-Aktivierung als hCAT-1.

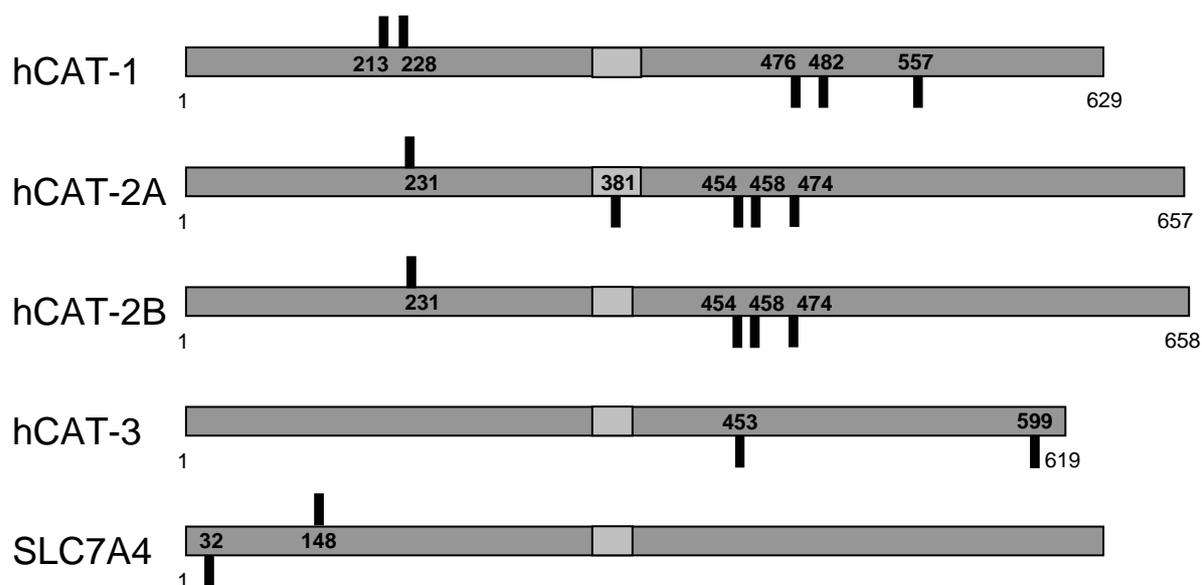


Abbildung 3 Schematische Darstellung der humanen CAT-Proteine und des SLC7A4-Proteins mit potentiellen PKC-Erkennungsstellen

Die vier hCAT-Proteine sind jeweils schematisch als Balken dargestellt. Die putativen PKC-Phosphorylierungsstellen sind als kleine Balken eingezeichnet und die jeweiligen Aminosäurepositionen angegeben: fünf bei hCAT-1 und -2A, vier bei hCAT-2B und zwei bei hCAT-3 und SLC7A4, wobei intrazellulär bzw. extrazellulär liegende PKC-Erkennungsstellen jeweils nach unten bzw. nach oben gezeichnet sind. Ein Bereich von 40 AS in der vierten intrazellulären Schleife (als helles Rechteck dargestellt) stellt die putative „funktionelle Domäne“ dar. hCAT-2A unterscheidet sich hier in 20 AS von hCAT-2B.

II Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung des von mir im Rahmen meiner Diplomarbeit klonierten hCAT-3 und die Analyse der Proteinexpression des verwandten Proteins SLC7A4.

- Um die Transporteigenschaften von hCAT-3 zu charakterisieren, sollte dieser in einen für die *in vitro*-Transkription geeigneten Vektor (pSP64T-Vektor) kloniert und in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert werden. Durch Transportstudien sollte dann die Zugehörigkeit des hCAT-3 zum γ^+ -Transportsystem überprüft werden (Na⁺-Unabhängigkeit, pH-Unabhängigkeit, Trans-Stimulation, Substratspektrum).
- Mit einer geeigneten Sonde für alle CAT-Isoformen und die NOS I sollte die Gewebeverteilung untersucht und verglichen werden. Da der CAT-3 in den Spezies Maus und Ratte als Gehirn-spezifische Isoform beschrieben wurde, könnte hCAT-3 eine Rolle bei der Substratversorgung der neuronalen NOS (nNOS) spielen. Hierzu sollten vergleichende Untersuchungen auf RNA-Ebene durchgeführt werden.
- Ein wichtiger Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Generierung von Antikörpern gegen den humanen und murinen CAT-3 und gegen den humanen SLC7A4.
- Die subzelluläre Verteilung von hCAT-3 sollte in humanen Zellen sowohl durch Überexpression in U373MG Glioblastom-Zellen als auch endogen mit Hilfe der neuen gewonnenen Antikörper in NT2 Teratokarzinom Zellen untersucht werden und mit der von hCAT-1 verglichen werden.
- In diesen Zellen sollte die Regulation von hCAT-3 nach PKC-Aktivierung untersucht werden.

III Material und Methoden

III.1 Materialien

III.1.1 Laborgeräte

Begasungsbrutschränke (5%)	Funktion Line (Heraeus, Hanau)
Brutschrank	Funktion Line (Heraeus, Hanau)
ELISA-Reader	EL 340 Biokinetics Reader Biotek™ Instruments, Reiskirchen)
Filmkassetten mit Screen	Biomax MS Intensifying Screen (Amersham Kife Science, Freiburg)
Gelelektrophoresekammern für analytische und präparative Proteintrennung	Mini-Protean® und Protean® II XI (Bio-Rad, München)
Geltrockner	Modell 583 und 543 Gel-Dryer (Bio-Rad, München)
Gleichstromquellen	GPS 200/400 Elektrophoresis PowerSupply EPS 3.500 (Pharmacia, Freiburg)
Heizplatte mit Magnetrührer	Ikamag® RCT (Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen i. Breisgau)
Hochgeschwindigkeitszentrifugen	J2-MC mit Rotoren J13.1 und J14 Avanti TM J-301 Performance-Zentrifuge mit Rotoren JA 25.50 und JLA 16.250 (Beckmann, Dreieich-Buchsschlag)
Hybridisierungsöfen mit Hybridisierungsröhren	Biometra Hybridisierungsöfen OV1 (biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen)Kühlfalle Vapor Trap (Bio-Rad, München)
Kaltlichtquelle	KL 1500 electronic (Schott, Mainz)
Kapillarziehmaschine	World Precision Instruments, Berlin
Kühlgerät	UKS 3602 (Liebherr)
Kreisschüttler	Function Line (Heraeus, Hanau) KS 250 basic und KS 501 digital (Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen i. Breisgau)
Kühlschrank (18°C)	7080900 (Liebherr)
Kühlzentrifuge	Megafuge 1.0 R (Heraeus, Hanau)
Laborwaage	Sartorius (Werner Wolfinger)
Metallblock-Thermostat	Techne DRI-Block DB 2A (Bio-Rad, München)
Mikroskop	Leitz (Wetzlar über Leica, Bensheim)
Multipipette	Multipipette 4780 Dispenser (Eppendorf, Hamburg)

Nanoliterinjektor	A 203XVY und A203XVZ (4,6nl-73,6nl) (World Precisions Instruments, Berlin)
PCR-Geräte	DNA Terminal Cycler TC1 (Perkin Elmer) DNA Thermo Cycler TR3 (Hybaid, Omni Gene Heidelberg) i-Cycler (Bio-Rad, München)
pH-Elektrode	Ingold (Schott Geräte, Hofheim)
pH-Meter	µp-pH-Meter CG 809 (Schott Geräte, Hofheim)
Photometer	Uvikon 941 Spectrophotometer (Kontron, Neufahrn)
Pipetten, verstellbar	1-10µl, 10-100µl, 50-250µl, 200-1000µl (Eppendorf, Hamburg) Gilson Modell P2, P10, P100, P1000 (Abimed Analysen-Technik GmbH, Lagenfeld)
Pipettierhilfe	Pipetus, Hirschmann Laborgeräte (Merck)
Präzisionsküvette aus Quarzglas	Suprasil®, Schichtdicke 10mm, Hellma (Merck)
Rotationspumpe	Mini puls 2 (Gilson, Abimed Analysen-Technik GmbH, Lagenfeld)
Sterile Werkbank	Biohazard (BDK, Sonnenbühl Genkingen Reagiergefäßschüttler MS 1 Minishaker (Janke & Kunkel
Szintillationszähler (β-Strahlung)	Tri Carb 460CD Liquid Scintillation System (Packard, Frankfurt)
Taumlergerät	Heidolph Reax.3 (Heidolph, Kelkheim)
Tischzentrifugen	Biofuge 13 (Heraeus, Hanau) Eppendorf 5417C (Eppendorf)
UV-Leuchttisch	Mini-Transilluminator (Bio-Rad, München)
Ultra Turrax	Typt25 (Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen i. Breisgau)
Ultraschall	Semicator ultrasonic Processor XL (Heat Systems incorporated, Formingdale NY, USA)
UV-Sterilisationskammer	GS Gene Linker (Bio-Rad, München)
Vakuumzentrifuge	Speed Vac® SC 110 (Savant Instruments Inc. über Thermo Electron GmbH Bioscience Technologies, Dreieich)
Wasseraufbereitungsanlage	Milli-Q-Plus Millipore/Waters, (Eschborn)
Wasserbad mit Badthermostat	Thermomix R BU mit FrigomixR B (B.Braun).

III.1.2 Plastikwaren

Die Plastikwaren wurden, wenn nicht gesondert aufgeführt, von den Firmen Sarstedt (Nürnbrecht-Rommelsdorf) und Greiner (Frickenhausen) bezogen. Die für die Zellkultur verwendeten Plastikwaren wurden steril bezogen (siehe Kapitel Zellkultur).

Chromatographie-Säulen mit Verschlusskappe	PolyPrep Chromatography Columns (Bio-Rad, München)
Einweg-Auslaufpipetten	1ml, 5ml, 10ml, 25ml (Sarstedt, Nürnbrecht)
Einmalküvetten	1/2 Mikro Einmalküvetten (1x 0,4x 4,5cm) (Ratiolab, Dreieich)
Einmalspritzen	Injekt F 1ml Solo Omnifix 2,5ml, 5ml, 10ml (Braun Melsungen AG, Melsungen)
ELISA-Platten	96-Loch Platten mit Rundboden oder abgeflachtem Boden (Sarstedt, Nürnbrecht)
Infusionsset mit Flügelkanüle (steril)	Wing-Flo™ 21Gx3/4,(0,8x20mm) (Cora, Harxheim)
Kanülen	StericanR 0,70x33mm, 22Gx 11/4 „Luer-Lock“; 45x25mm, 22Gx1 Luer-Lock“ (Braun Melsungen AG, Melsungen)
Pipettenspitzen	0.5-10µl, 10-100µl, 50-1000µl (Sarstedt, Nürnbrecht)
Reaktionsgefäße	0.5ml Safe-Lock, 1,5ml, 2ml, 1.5ml mit Schraubdeckel (Sarstedt, Nürnbrecht)
Szintillationsröhrchen	Polyethylene (PE) Vials (Packard, Frankfurt)
Transformationsröhrchen	14ml Rundboden Polypropylenreagenzröhrchen (Falcon)
Zentrifugenröhrchen	14ml Rundboden, 15ml und 50ml Spitzboden (Sarstedt, Nürnbrecht)

III.1.3 Verbrauchsmaterialien

Affi-Gel® 10	(Bio-Rad, München)
Chirurgisches Nahtmaterial	Vicryl R 2/0 (3-metric) V-6, resorbierbar Prolene® 3-0 usp (2-metric) V-7 (Ethicon, Johnson & Johnson)
Dialyseschlauch	Servapor® 16mm (medicell International LTD, London)
Glaskapillaren	Glas replacement 3,5nl (World precision Instruments, Berlin)
HiTrap Affinitätssäulen (GSTRap™ FF Säulen)	(Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

Nitrocellulose Transfer Membran 0,2µm	ProtranR 83 (Schleicher und Schüll, Dassel Whatman 3MM Papier (Schleicher und Schüll, Dassel)
Pasteur-Kapillarpipetten	„Volvac“ (Schuch, Langgöns)
Parafilm® "M"	(Schuch, Langgöns)
Sepharose 6B®	(Sigma, Deisenhofen)
Sephadex® G-25 Säulen	(Pharmacia, Freiburg)

III.1.4 Photomaterialien

Film-Entwickler	LX 24 Verdünnung 1:5 mit H ₂ O (Kodak, Stuttgart)
Film-Fixierer	AL4 Verdünnung 1:5 mit H ₂ O (Kodak, Stuttgart)
Röntgenfilme	X-ray film (Agfa, Leverkusen)

III.1.5 Chemikalien

Soweit nicht gesondert aufgeführt, wurden die Chemikalien von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Deisenhofen) oder Merck Eurolab GmbH (Darmstadt) bezogen. Die für die Zellkultur benötigten Utensilien wurden von der Firma Gibco BRL (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe; PAA Cell Culture Corpay, Cölbe) in Zellkulturqualität bezogen.

III.1.6 Restriktionsenzyme

Die Restriktionsenzyme für molekularbiologische Methoden wurden von den Firmen Phamacia (Freiburg), New England Biolabs (Schwalbach), Roche Diagnostik (Mannheim) oder Promega (Mannheim) bezogen.

III.1.7 Allgemeine Lösungen und Puffer

10x TBE

0,9M Tris Base (Trishydroxymethylaminomethan)	108g
0,9M Borsäure	55g
0,2M EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) pH 8,0 in 1L Aqua bidest. lösen	400 ml einer 0,5M EDTA Lösung

10xPBS (Phosphatgepufferte Salzlösung) pH 7,4

17,6mM KH ₂ PO ₄	2,4g
26,8 mM KCL	2,0g
1,4 mM NaCl	80,0g
101mM Na ₂ HPO ₄	14,4g

wurde in 1L Aqua bidest. gelöst

10xTAE (Tris-Acetat-EDTA-Puffer)

0,4 M Tris Base	48,4g
1,13% (V/V) Essigsäure konz.	11,42ml
0,01M EDTA	7,44g

Die Substanzen wurden in 800ml Aqua bidest. gelöst. Der pH-Wert wurde mit 1N NaOH auf 8,5 eingestellt und auf 1L mit Aqua bidest. aufgefüllt.

DEPC-H₂O

500ml Aqua bidest. wurden mit 100µl Diethylpyrocarbonat (DEPC) (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) versetzt und für 8 Stunden auf einem Kreisschüttler inkubiert. Danach folgte 60minütiges Autoklavieren zur Entfernung des restlichen DEPC.

Tris-EDTA (TE)-Puffer (1x)pH 8,0

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

III.2 Methoden

III.2.1 Molekularbiologische Methoden

III.2.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Geweben oder kultivierten Zellen

Verwendete Lösungen und Puffer

H₂O gesättigtes Phenol

Phenol wurde mit DEPC-H₂O gemischt und bei 40°C im Wasserbad geschmolzen.

2M Natriumacetat pH 4

41g Natriumacetat wurden in 125ml DEPC-H₂O gelöst. Nachdem der pH-Wert mittels Eisessig auf pH 4,0 eingestellt wurde, folgte 60minütiges Autoklavieren.

GIT-Puffer (Guanidinisothiocyanat) 500ml

Guanidinisothiocyanat	4M
Natriumcitrat pH 7,0	25mM
Natriumlaurylsarcosin	0,5%

Die Lösung war drei Monate haltbar. Vor dem Gebrauch wurden 180µl 2-Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt)/ 25ml hinzugefügt. Diese Lösung war nur vier Wochen haltbar.

Bei der sauren Phenolextraktion nach Chomczynski und Sacchi (Chomczynski P. & Sacchi N., 1987) wurden Zellen auf 10cm² Kulturplatten bis zur Konfluenz kultiviert, zweimal mit 1xPBS gespült und mit 1ml GIT-Puffer lysiert. Das Lysat wurde mit einem Zellschaber abgeschabt und in ein 14ml Rundboden-Zentrifugenröhrchen überführt.

Gewebe wurde direkt aus flüssigem Stickstoff kommend mit Hilfe eines Skalpells zerkleinert und mit GIT-Puffer in einem 14ml Rundboden-Röhrchen mit Hilfe eines Ultra Turrax homogenisiert. Zum jeweiligen Rundboden-Röhrchen wurden 400µl 2M Natriumacetat pH 4, 4ml H₂O gesättigtes Phenol und 800µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) hinzugefügt, gemischt und für 15Min. während wiederholtem Durchmischen auf Eis inkubiert. Zur Trennung der Phasen wurde zentrifugiert (20Min., 4°C, 8200rpm, JA-25.50 Rotor J-30I). In der oberen, wässrigen Phase befand sich die RNA, die in ein neues 14ml Rundboden-Röhrchen überführt wurde. Falls es zu keiner deutlichen Phasentrennung kam, wurde erneut 800µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugefügt und zentrifugiert. Durch Zugabe von 4ml eiskaltem Isopropanol und anschließender Inkubation bei 20°C für 1h wurde die RNA gefällt.

Danach wurden die Proben zentrifugiert (30Min., 4°C, 8200rpm, JA-25.50 Rotor J 30I). Das gewonnene Pellet wurde in 80%igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (20Min., 4°C, 8200rpm, JA-25.50 Rotor J 30I) wurden die Proben getrocknet, in 100µl DEPC-H₂O gelöst und 1µl zur Messung der optischen Dichte (OD) (III.2.1.2) bei 260nm entnommen. Der Rest wurde bei -70°C gelagert.

III.2.1.2 Photometrische Bestimmung von RNA-und DNA-Konzentrationen

Durch die Messung der (OD) bei einer Wellenlänge von 260nm ist es möglich, den Gehalt von Nukleinsäuren in einer Lösung zu bestimmen.

Es gilt dabei: DNA: 1 OD_{260nm} entspricht 50µgDNA/ml

RNA: 1 OD_{260nm} entspricht 40µgRNA/ml

Zusätzlich wurde die OD auch bei 280nm und 320nm gemessen. Auf diese Weise ist eine Verunreinigung mit Proteinen (280nm) und Phenol (320nm) feststellbar. Das Verhältnis von OD_{260nm}/OD_{280nm} sollte 1,8 für DNA und für RNA 2,0 sein. Ein niedrigerer Quotient weist auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin. Oft wurde die ermittelte DNA-Konzentration zusätzlich mittels eines Agarosegels kontrolliert (III.2.1.3). Zu diesem Zweck wurde die DNA linearisiert und auf das Gel aufgetragen. Dann wurde die Intensität der Bande mit den Banden eines Größenmarkers, dessen Konzentration bekannt war, verglichen.

III.2.1.3 Agarosegelelektrophorese

Verwendete Puffer und Marker

6xDNA-Ladepuffer

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

Molekulargewichtsmarker

Lambda DNA mit Eco 47III und Eco 91I geschnitten (0,5µg/µl, MBI Fermentas, ST.Leon-Roth)

pcDNAI Amp (Invitrogen, Leek, Niederlande) mit Hinf I geschnitten (0,5µg/µl)

Restringiert man ein DNA-Molekül mit Restriktionsenzymen, entstehen Nukleinsäurefragmente. Diese können mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt werden. Wird

elektrischer Strom durch das Gel geschickt, wandern die Nukleinsäuren mit ihren vielen geladenen Phosphatgruppen mit einer Geschwindigkeit, die umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes ist, zu der positiven Elektrode (Helling *et al.*, 1974). Trägt man DNA-Fragmente bekannter Größe (Molekulargewichtsmarker) gleichzeitig auf das Gel auf, ist es möglich, die Größe einer zu untersuchenden Bande zu ermitteln. Eine eindeutige Aussage über die Größe der DNA kann allerdings nur gemacht werden, wenn die DNA in linearisiertem Zustand vorliegt, da superhelicale ringförmige, entspiralisierte ringförmige und linearisierte DNA mit gleichem Molekulargewicht unterschiedlich schnell durch das Agarosegel laufen (Thorne, 1966).

Für ein Agarosegel wurde 0,5-2,0% (m/V) Agarose (Roth, Karlsruhe) in 1xTAE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Die Agarosekonzentration wurde je nach Molekulargewicht der zu untersuchenden DNA-Fragmente gewählt, wobei ein höheres Molekulargewicht ein niedrigprozentigeres Gel verlangte. Der aufgekochten Gelmatrix wurde der DNA-interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5µg/100ml Lösung zugegeben. So konnte die DNA unter UV-Licht (Wellenlänge 254nm) sichtbar gemacht werden. Die etwas abgekühlte, noch flüssige Gelmatrix wurde in einen vorbereiteten Kunststoff-Träger gegeben, in welchem sie aushärtete. Danach wurden die Kunststoff-Kämme für die Probenaschen entfernt. Den Proben wurde vor dem Auftragen 6-fach konzentrierter Ladepuffer zugesetzt. Die in dem Probenpuffer enthaltenen Farbmarker Xylencyanol (als hellblaue Bande ca. 4kb) und Bromphenolblau (als dunkelblaue Bande ca. 300bp) erlaubten, die zurückgelegte Strecke im Gel abschätzen zu können. Die Agarosegelelektrophorese wurde mit einer Spannung von 50-100V (0,5-1V/cm²) durchgeführt.

Präparative Agarosegelelektrophorese

Ein präparativer Elektrophoreseansatz wurde gewählt, wenn ein oder mehrere DNA-Fragmente aufgereinigt werden sollten. Die Versuchsanordnung wurde ebenso aufgebaut wie bei einem nichtpräparativen Ansatz. Aber es wurde eine geringere Spannung gewählt und die Menge der eingesetzten DNA erhöht. Außerdem wurde in besonderem Maße darauf geachtet, DNA-Kontaminationen und -Schäden auszuschließen. Um die DNA nicht durch kurzwelliges UV-Licht (254nm) zu schädigen, wurde zum Sichtbarmachen längerwelliges UV-Licht (302nm) für möglichst kurze Zeit eingesetzt. Das gewünschte Fragment wurde mit einem sterilen Skalpell in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und mit einem Puffer des NucleoSpin[®] Kits (NucleoSpin[®] Extract, Macherey & Nagel, Düren) bei 50°C in einem

Wasserbad geschmolzen. Auf eine im Kit enthaltene Säule wurde die Probe pipettiert und nach Angaben des Herstellers gewaschen und eluiert.

III.2.1.4 Extraktion von Nukleinsäuren mit Phenol

Verwendete Lösung

Tris gepuffertes Phenol pH 7,8

Phenol 1l

Hydroxyquinolin 0,1% (m/V)

Das Phenol wurde bei 68°C geschmolzen und solange mit 0,5M Tris-Base pH 8,0 versetzt, bis ein pH-Wert von 8,0 erreicht war. Die Lösung wurde dann mit 100ml 100mM Tris-HCL pH 8,0 überschichtet und gelagert.

Um Proteine aus einer Nukleinsäure-Präparation entfernen zu können, wurde ein Gemisch aus Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) verwendet. Chloroform diente dabei zum einen der Denaturierung der Proteine, zum anderen erleichterte es die Trennung der wässrigen und organischen Phase. Durch Isoamylalkohol wird die Schaumbildung während der Extraktion verhindert (Sambrook *et al.*, 1989). Proben mit der zu untersuchenden Nukleinsäure wurden mit dem gleichen Volumen Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol versetzt. Der Ansatz wurde gemischt und anschließend zentrifugiert (10 Min., Raumtemperatur (RT), 14.000rpm Tischzentrifuge). Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um eine Verunreinigung mit Phenol möglichst gering zu halten, wurde zur Probe das gleiche Volumen Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) gegeben. Dann gemischt, zentrifugiert (10 Min., RT, 14.000rpm Tischzentrifuge) und die obere Phase abgenommen. Daran schloss sich eine Präzipitation der Nukleinsäuren mittels Ethanol an (siehe unten).

Präzipitation von Nukleinsäuren mit Ethanol

Um Nukleinsäuren zu konzentrieren wurde eine Präzipitation mit monovalenten Kationen und Ethanol durchgeführt. Die Art und Konzentration dieser Kationen kann unterschiedlich sein. Am meisten verwendet werden Ammoniumacetat (2,0-2,5M), Lithiumchlorid (0,8M), Natriumchlorid (0,2M) oder Natriumacetat (0,3M pH 5,2) (Sambrook *et al.*, 1989). Dem Ansatz wurde die jeweilige Salzlösung in entsprechender Konzentration zugefügt und das 2,5 fache Volumen Ethanol. Die Fällung erfolgte bei -70°C für 1h oder bei -20°C über Nacht (ü.N.). Das bei der anschließenden Zentrifugation (20Min., 4°C, 14.000rpm, Tischzentrifuge) entstandene Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen. Danach wurde das

Reaktionsgefäß mit geöffnetem Deckel schräg auf ein Zellulosetuch gestellt, um den Ethanol verdampfen zu lassen. Das getrocknete Pellet wurde in sterilem Aqua bidest. oder TE-Puffer aufgenommen.

III.2.1.5 Restriktion von Plasmiden

DNA-Moleküle können an bestimmten Nukleotidsequenzen durch Restriktionsendonukleasen aufgespalten werden. Durch die Restriktionsschnitte ist es möglich, ein Plasmid zu charakterisieren. Jedes Restriktionsenzym erkennt definierte DNA-Sequenzen und schneidet dort die beiden DNA-Stränge. Dabei können glatte Enden (z.B. durch EcoR V) oder überhängende Enden (z.B. durch Hind III) entstehen. Sollte ein Plasmid mit zwei Enzymen verdaut werden, die nicht unter den gleichen optimalen Bedingungen schneiden, so musste der Verdau nacheinander durchgeführt werden und die DNA nach dem ersten Schnitt gefällt werden (III.2.1.4). Für analytische Zwecke, wie die Überprüfung einer Insertion von Fremd-DNA in ein Plasmid, wurde 1µg Plasmid DNA mit zwei Einheiten des Enzyms und mit dem dazugehörigen 10fach Restriktionspuffer (ein Zehntel des Restriktionsansatzes) für ca. 1h bei seinem Temperaturoptimum in einem 20µl Ansatz inkubiert. Um noch eventuell vorhandene RNA zu entfernen, wurde der Ansatz mit 1µl RNaseA (1µg/µl) versetzt und 15Min. bei 37°C inkubiert.

III.2.1.6 Ligation

Verwendeter Puffer

Ligationspuffer (10x)

Tris-HCL pH 7,6	500mM
MgCl ₂	100mM
Dithiothreitol (DTT)	100mM
Bovines Serumalbumin (BSA)	500µg/ml

DNA-Ligasen wie die T4-Phagen-DNA-Ligase (New England Biolabs, Schwalbach) sind Enzyme, die DNA-Ketten während der Replikation, Reparatur und Rekombination miteinander verbinden, indem sie zwischen den 5'-Phosphat- und den 3'-Hydroxyl-Gruppen benachbarter Nukleotide Phosphatbrücken bilden. Die Effizienz der Ligation ist bei DNA-Fragmenten mit überhängenden Enden („sticky ends“), die komplementär zueinander sind, größer als bei glatten Enden („blunt ends“). Es wurde ein molares Verhältnis von Vektor und

einzufügendem DNA-Fragment von 1:3 gewählt. In einen 10µl Ansatz wurden außerdem 1µl Ligationspuffer (10x), 1µl 10mM ATP und 1µl (1E) T3 DNA-Ligase pipettiert. Als Kontrolle wurde der Ansatz ohne Zugabe des DNA-Fragmentes ligiert. Die Inkubation erfolgte ü.N. bei 16°C im Wasserbad. Die ligierten Plasmide wurden danach in Bakterien transformiert und vermehrt (III.2.1.8, III.2.1.9).

III.2.1.7 Klonierung von PCR-Produkten

Zur Klonierung von PCR-Produkten wurde ein Kit der Firma Amersham Pharmacia Biotech Freiburg verwandt (sure clone ligation).

Einige hitzestabile Polymerasen (Expand™-DNA-Polymerase) koppeln dATPs an die 3' Enden von DNA-Fragmenten. Dieser 3' Überhang von Adenin kann die Klonierung von PCR-Produkten in einen Vektor erschweren, wenn glatte Enden kloniert werden sollen. Aus diesem Grund wurde das PCR-Produkt nach Aufreinigung durch eine präparative Gelelektrophorese (III.2.1.3) mit Hilfe der 3'→5' Exonuklease-Aktivität des Klenow-Fragmentes der Expand™-DNA-Polymerase an den 3' überhängenden Enden abgebaut. Begleitend dazu wurden die 5' Enden des PCR-Produktes durch die T4 Polynukleotidkinase phosphoryliert, damit sie später mit einem vorbereiteten dephosphorylierten Vektor ligieren konnten.

Ansatz der Reaktion

PCR-Produkt (60ng-100ng)	1-16µl
Klenow Fragment	1µl
10x Kinase Puffer	2µl
Polynukleotid-Kinase	1µl

mit sterilem Aqua bidest. wurde auf 20µl aufgefüllt.

Der Reaktionsansatz wurde nach vorsichtigem Mischen bei 37°C für 30 Minuten inkubiert und danach eine Phenol/Chloroform Extraktion (III.2.1.4) durchgeführt. Die nach der anschließenden Zentrifugation (5Min., 14.000rpm, RT, Tischzentrifuge) erhaltene obere wässrige Phase wurde auf eine Sephacryl S-200 HR Säule (Amersham Pharmacia, Biotech Freiburg) pipettiert, zentrifugiert und das Eluat in einem 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß aufgefangen.

Ein Vektor kann religieren, wenn er kompatible Enden besitzt. Um dies zu verhindern, wurde eine Behandlung mit alkalischer Phosphatase angeschlossen. Dabei wurde in den Ansatz nach

der Restriktion die alkalische Phosphatase (aus Kälberdarm, 1E/Ansatz, Roche Diagnostik, Mannheim) pipettiert und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Da die Phosphatase ein äußerst reaktives Enzym darstellt, welches die anschließende Ligation stören kann, musste es durch eine zweimalige Extraktion mit Phenol/Chloroform entfernt und der Ansatz durch ein präparatives Gel aufgereinigt werden.

Ligationsansatz

PCR-Produkt (MicroSpin-Eluat)	2µl
Dephosphorylierter Vektor	1µl (entspricht 50ng)
2x Ligationspuffer mit ATP	10µl
DTT	1µl
T4 DNA Ligase	1µl

mit Aqua bidest wurde auf 20µl aufgefüllt.

Anschließend wurde der Ligationsansatz in kompetente Bakterien transformiert (III.2.1.8).

III.2.1.8 Herstellung und Transformation kompetenter *E.coli*-Bakterien

Um für molekularbiologische Techniken genügend DNA zu besitzen, muss diese vermehrt werden. Hierzu werden Bakterien mit der DNA transformiert und kultiviert. Für die Einschleusung der DNA in die Bakterienzelle ist es nötig, die Bakterienmembran kompetent zu machen. Diese Fähigkeit wird durch CaCl₂-Lösungen erreicht (Mandel und Higa., 1970; Hanaham 1983). Nach erfolgtem Gentransfer besteht der nächste Schritt darin, diejenigen Bakterien zu selektieren, die das gesuchte Gen enthalten. Dies wird dadurch ermöglicht, dass man Plasmide verwendet, die ein oder mehrere Resistenzgene gegen Antibiotika (z.B. Ampicillin) tragen. Setzt man dem Medium das betreffende Antibiotikum zu, wachsen nur Bakterien, die das Plasmid enthalten.

Präparation CaCl₂ kompetenter Bakterien (Inoue *et al.*,1990)

Verwendete Medien und Puffer

LB-Agar

Caseinhydrolysat Pepton 140	10g
NaCl	10g
Hefeextrakt	5g
Select Agar	15g

Mit Aqua bidest. wurde auf 1l aufgefüllt und der pH-Wert von 7,0 mit 1N NaOH eingestellt. Nach 20minütigem Autoklavieren und anschließendem Abkühlen auf 60°C wurde dem Medium Ampicillin in einer Konzentration von 50µg/ml zugesetzt. Danach wurde das Medium in 10cm² Petrischalen gegossen und nach dem Erstarren bei 4°C gelagert.

SOB-Medium

Caseinhydrolysat (Casein)	20g
NaCl	5g
Hefeextrakt	5g

Alle Substanzen wurden in 800ml Aqua bidest gelöst und mit 5N NaOH auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt. Danach wurden 10ml 250mM KCl zugegeben, auf 1l mit Aqua bidest. aufgefüllt und anschließend autoklaviert.

TB-Puffer

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

Vor der Zugabe von MnCl₂ wurde der pH-Wert mit KOH auf 6,7 eingestellt. Danach wurde die Lösung steril filtriert (0,45µm Filter).

Von bereits kompetenten Bakterien (Epicurian Coli[®] XL1-Blue oder DH5α[™] superkompetente Zellen) wurde ein Aliquot mittels einer Impföse auf einer LB-Agar Platte ausgestrichen und ü.N. in einem Brutschrank bei 37°C inkubiert. Von dieser Platte wurden 10-12 große Kolonien in 250ml SOB-Medium in einem 2l Kolben angeimpft. Die Kultur wurde bei 18°C unter Schütteln (200-250rpm, Kreisschüttler) inkubiert bis eine OD_{600nm} von 0,6 erreicht war. Der Kolben wurde für 10Min. auf Eis abgekühlt und anschließend die Bakterien abzentrifugiert (10Min., 4°C, 3.000rpm, JLA 16.250 Rotor, Avanti J-30I). Das entstandene Pellet wurde in 80ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert (10Min., 4°C, 3.000rpm, JLA 16.250 Rotor, Avanti J-30I) und das Pellet in 20ml TB-Puffer resuspendiert. Unter leichtem Schütteln wurde DMSO bis zu einer Endkonzentration von 7% zugefügt und erneut 10Min. auf Eis inkubiert. Währenddessen wurden 1,5ml-Reaktionsgefäße bei -70°C vorgekühlt und dann je 200µl Aliquots der Bakterien hineinpipettiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Um die Kompetenz der Bakterien zu überprüfen, wurde eine

Kontrolltransformation (siehe unten) mit definierter Plasmid-Menge durchgeführt. Die Kompetenz sollte bei mindestens 5×10^7 bis 5×10^6 liegen.

Transformation kompetenter Bakterien

Verwendete Medien

SOC-Medium

Das Medium wurde ebenso wie das SOB-Medium angesetzt (siehe oben). Zugesezt wurden zu 1l außerdem:

2M MgCl ₂ (autoklaviert)	250µl
1M steril filtrierte Glucose- Lösung	20ml

LB-Medium

Caseinhydrolysat Pepton 140	10g
NaCl	10g
Hefeextrakt	5g

Mit Aqua bidest. wurde auf 1l aufgefüllt und der pH-Wert von 7,0 mit 1N NaOH eingestellt

Die kompetenten Bakterien wurden langsam auf Eis aufgetaut. Zu 10µl eines Ligationsansatzes oder 10ng Plasmid-DNA wurden 50µl kompetente Bakterien pipettiert. Als Negativkontrolle wurden 10µl Aqua bidest. eingesetzt. Es folgte eine 30minütige Inkubation auf Eis, während der sich die DNA an die Bakterienmembran anlagern konnte. Anschließend wurde für 45sec. bei 42°C inkubiert, während der die DNA in die Bakterienzelle eindringen konnte. Bei der anschließenden Lagerung auf Eis konnte sich die Zellmembran zusammenziehen. Der Ansatz wurde dann mit 1ml LB- oder SOC-Medium vermischt und unter leichtem Schütteln für 1h bei 37°C inkubiert. 100µl der Suspension wurden auf antibiotikahaltigen LB-Agar Platten ausgestrichen. Danach wurde die Suspension bei 2.000rpm (2Min., 4°C, Megafuge 1.0) zentrifugiert und aus dem Bodensatz der dort konzentrierten Bakterien erneut 100µl ausgestrichen. Die Platten wurden ü.N. bei 37°C in den Brutschrank gestellt. Aus den gewachsenen Kolonien wurden einzelne in jeweils 5ml LB-oder SOC-Medium mit Ampicillin überführt und ü.N. unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Aus den ü.N.-Kulturen konnten Plasmide isoliert werden, die dann für weitere Analysen verwendet wurden.

III.2.1.9 Plasmid-Präparationen aus *E.coli*-Zellen

Wenn Plasmid-DNA aus *E.coli*-Zellen für einen analytischen Restriktionsverdau isoliert oder eine größere Menge hergestellt werden sollte, wurde die alkalische Lyse nach Birnboim und Doly durchgeführt (Birnboim und Doly, 1979).

Minipräparation

Eine Bakterienkultur, die von einer LB-Agar Platte gepickt wurde, wurde in 5ml antibiotikahaltigem LB- oder SOB-Medium im 37°C Brutschrank unter Schütteln (180rpm, Kreisschüttler) ü.N. inkubiert. Von der 5ml ü.N.-Kultur wurden 1,5ml in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, abzentrifugiert (5Min., RT, 6.000rpm, Tischzentrifuge) und der Überstand an Medium abgesaugt. Das Pellet wurde in 100µl vorgekühltem SET-Puffer resuspendiert. Die Lyse der Bakterien erfolgte durch Zugabe von 200µl 0,2N NaOH/1% SDS (m/V). Nach vorsichtigem Schwenken wurde die Probe 5Min. lysiert. Auf die lysierten Zellen wurden 150µl 3M K-Acetatpuffer pH 4,8 gegeben und 5Min. inkubiert, um Proteine zu fällen. Die Proteine und alles andere wie z.B. Bakterien-DNA, wurden bei 14.000rpm (10Min., 4°C, Tischzentrifuge) pelletiert. Die im Überstand vorhandene DNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 1xVolumen Tris-gesättigtem Phenol pH 7,8/Chloroform extrahiert und anschließend zentrifugiert (5Min., RT, 14.000rpm, Tischzentrifuge). Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 2,5xVolumen 96%igem Ethanol gefällt. Dazu wurde die Probe gut gemischt und zur Bildung des Niederschlages 5Min. bei RT inkubiert. Nach 1-2maligem Waschen mit 70%igem Ethanol wurde zentrifugiert (5Min., RT, 14.000rpm, Tischzentrifuge) und das getrocknete Pellet in 50µl TE-Puffer aufgenommen. Wurde eine Plasmid-Menge von besonderer Reinheit benötigt, so wurde die DNA mit Hilfe des Qiagen-Spin-Minipräp Kit (Qiagen, Hilden) oder des Minipräp NucleoSpin (Macherey & Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers präpariert.

Midipräparation

Wurde eine größere Plasmid-Menge (200-500µg) benötigt, wurde 1ml der ü.N.-Kultur einer Minipräparation in 200ml antibiotikahaltigem LB-Medium ü.N. im 37°C Brutschrank unter leichtem Schütteln (200rpm, Kreisschüttler) kultiviert. Am nächsten Tag wurde die DNA über den Nucleobond[®] PC100 Kit nach den Angaben des Herstellers (Macherey & Nagel, Düren) isoliert.

III.2.1.10 Reverse Transkription

Dem Enzym Reverse Transkriptase, einer aus Retroviren stammenden RNA-abhängigen DNA-Polymerase, ist es möglich, komplementäre DNA (cDNA) aus RNA zu bilden. Da mRNA am 3'-Ende meist eine Poly (A)-Sequenz trägt, kann man Oligo-(dT) als Primer verwenden, von dem aus dann der antisense-Strang synthetisiert werden kann. Die gewonnene einzelsträngige DNA kann anschließend zur Amplifikation in eine PCR-Reaktion eingesetzt werden.

Reaktionsansatz:

		Endkonzentration
RNA	1-8µl	2µg
Oligo (dT) 12-18 (5 A260 E, Pharmacia)	2µl	250ng
Hexamer pd (N) 6 (50°260, Pharmacia)	2µl	80ng

Mit Aqua bidest. wurde auf 12µl aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde bei 70°C für 10Min. inkubiert und anschließend für 5Min. auf Eis abgekühlt und dem Reaktionsansatz dann folgende Komponenten hinzugefügt:

0,1M DTT	2µl
10mM dNTP	1µl
5xSuperScript™ Puffer	4µl

Der Ansatz wurde für 2Min. bei 37°C inkubiert und darauf 1µl des Enzyms SuperScript™ II Reverse Transcriptase (RNase⁻, Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe) zugegeben. Die anschließende Synthesereaktion wurde für 30Min. bei 37°C durchgeführt und weitere 30Min. bei 45°C inkubiert. Eine bestimmte Menge dieses Ansatzes wurde als Matrize in eine Polymerasekettenreaktion (III.2.1.11) eingesetzt.

III.2.1.11 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Verwendeter Puffer

Tricine-EDTA Puffer

Tricine-KOH pH 8,5	10mM
EDTA	0,1mM

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion können enzymatisch DNA-Segmente amplifiziert werden. Jeder Verdopplungszyklus besteht aus zeitlich aufeinander abgestimmten Reaktionen, für die verschiedene Temperaturen erforderlich sind. Zunächst erfolgt die

Denaturierung des zu vermehrenden DNA-Abschnittes bei 94°C für 1Min. (initial für 5Min.), dann Abkühlung und Hybridisierung mit den Oligonukleotiden bei 5°C unter deren jeweiliger Schmelztemperatur. Der dritte Schritt beinhaltet die DNA-Synthese mittels hitzestabiler DNA-Polymerase und den 4 Desoxyribonukleotid-Triphosphaten bei 72°C (Elongation). Die Anzahl der Verdopplungszyklen lag je nach Ansatz zwischen 30-40 Zyklen. Als Matritze für die PCR wurde entweder durch Reverse Transkription (III.2.1.10) erhaltene einzelsträngige cDNA verwendet (mit Tricine-EDTA (1:50) verdünnt, daraus je 1µl, 2µl, 5µl oder 10µl) oder 10-500ng der Plasmid-DNA. In ein steriles 0,5ml Reaktionsgefäß wurden Puffer, dNTPs, Primer, DNA und schließlich Enzym pipettiert.

Beispiel für einen Reaktionsansatz:

DNA	1-25µl
Expand™ Puffer (10x)	10µl
10mM dNTP	2µl
je Oligonukleotid 10pmol/µl	2,5µl
Expand™-DNA-Polymerase 5E/µl	0,5µl

Mit sterilem Aqua bidest. wurde auf 100µl aufgefüllt.

Ein Reaktionsgefäß mit Aqua bidest. anstelle von DNA wurde ebenfalls eingesetzt, um eine Kontamination mit Fremd-DNA ausschließen zu können. Die Reaktionsansätze wurden sofort in das PCR-Gerät gestellt. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte mittels Gelelektrophorese. Wenn sich dort keine Bande zeigte, wurden die Hybridisierungsbedingungen oder auch die Menge der eingesetzten DNA verändert.

III.2.1.12 DNA-Sequenzierung

Um Klonierungsergebnisse zu kontrollieren und sicherzustellen, dass Fragmente im richtigen Leserahmen eingesetzt wurden, erfolgte die Sequenzierung nach der Didesoxyterminationsmethode von Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Die Sequenzierung wurde von der Firma GENterprise in Mainz durchgeführt. Benötigt wurden dafür 5µg der zu analysierenden DNA in einer Konzentration von 0,5µg/µl. Die Oligonukleotide, die in die Sequenzierung eingesetzt wurden, hatten eine Konzentration von 10pmol/µl. Die Sequenzen wurden mit Hilfe der MacDNASIS® Software (Hitachi Software Ltd.) ausgewertet.

III.2.2 Untersuchungen in *Xenopus laevis* Oozyten

III.2.2.1 Gewinnung und Behandlung der Oozyten

Eine Vielzahl von Proteinen wurden mittels Expression in Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* identifiziert und charakterisiert. Die Oozyten bieten Vorteile, wie z.B. ihre Stecknadelkopfgröße, wodurch die Handhabung und Injektion erleichtert wird. Sie verfügen über eine aktive Proteinsynthese und besitzen die Fähigkeit Proteine translational zu modifizieren. Zusätzlich tolerieren sie gut die Überexpression von hydrophoben Proteinen.

Verwendete Puffer und Medien

Ca⁺⁺-freier Puffer

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

Angesetzt wurde der Puffer in Aqua bidest.

Ca⁺⁺-haltiger Puffer

NaCl	96mM
KCl	2mM
MgCl ₂	1mM
Hepes (pH 7,6)	5mM
CaCl ₂	1,8mM

Angesetzt wurde der Puffer in Aqua bidest.

Kulturmedium

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

Zur Gewinnung der Oozyten wurde ein geschlechtsreifes *Xenopus laevis* Weibchen für 25Min. in eine eiskalte Lösung aus 0,1% 3-Aminobenzoessäureethylester gesetzt. Der nicht

nur durch das Narkosemittel, sondern auch durch die Kälte der Lösung anästhesierte Frosch wurde mit dem Rücken in eine mit Eis gefüllte Wanne gelegt. Durch einen 1cm langen Schnitt durch die Haut und Bauchwand wurde die Bauchhöhle im Bereich der Ovarien geöffnet. Mit einer sterilen Pinzette wurden Ovarianteile behutsam aus der geöffneten Bauchhöhle gezogen, abgeschnitten und in Ca^{++} -freien Puffer gegeben. Mit je drei Stichen wurde die Bauchwand und die Haut mit resorbierbarem, sterilem chirurgischen Nahtmaterial zugenäht. Nach dem Eingriff wurde der Frosch in frisches Wasser gesetzt, wobei darauf geachtet wurde, dass der Kopf bis zum Aufwachen über Wasser gehalten wurde. Um eine Infektion der Wunde zu verhindern, wurde das Wasser mit Kaliumpermanganat versetzt. Da sich die Ovarien bei der Entnahme noch im Bindegewebeverband befanden und die Oozyten zur Injektion vereinzelt werden mussten, wurden die Ovarienstücke mit einer Schere grob zerkleinert und in ein 15ml Schraubdeckel-Röhrchen überführt. Ovarienstücke, die nicht sofort verwendet wurden, konnten bei täglichem Wechsel des Mediums 1-2 Wochen bei 4°C aufbewahrt werden. Die zerkleinerten Ovarienstücke wurden mit Ca^{++} -freiem Puffer gewaschen. Danach wurden die Oozyten mit Kollagenase TypII (Roche Diagnostik, Mannheim, 2mg/ml in Ca^{++} -freiem Puffer) behandelt, wodurch die Follikelzellen entfernt und die Oozyten vereinzelt wurden. Die Oozyten wurden für 20Min. unter leichtem Rotieren bei RT inkubiert. Hierbei war es nötig, den Zustand der Oozyten immer wieder zu überprüfen, da eine zu starke Behandlung mit Kollagenase die Oozyten schädigt. Nach der Behandlung wurden die Oozyten zur Entfernung der Kollagenase 15mal mit Ca^{++} -freiem Puffer gewaschen und danach in Ca^{++} -haltigen Puffer überführt. Unter einem Lichtmikroskop wurden die zur Injektion geeigneten Oozyten mit einer Pasteurpipette aussortiert. Für die Injektion geeignet sind Oozyten im Dumont-Stadium V oder VI (Dumont, 1972). Diese Oozyten zeichnen sich dadurch aus, dass sie groß (1000-1300 μm) und rund sind und der animale (braun) und vegetative (hellbeige) Pol deutlich durch eine Linie getrennt erscheinen. Die ausgesuchten Oozyten wurden in eine Petrischale mit Kulturmedium gesetzt und so ü.N. bei 4°C aufbewahrt. Am nächsten Tag wurden sie mit cRNA injiziert.

III.2.2.2 Synthese der cRNA durch in vitro-Transkription

Bei der Herstellung von RNA muss besonders darauf geachtet werden, dass es nicht zu RNase-Kontaminationen kommt. Deshalb sollte möglichst steril gearbeitet werden, also Handschuhe getragen, sterile Gefäße und Pipettenspitzen benutzt, DEPC- H_2O und RNase-Inhibitoren verwendet werden.

Das Plasmid (siehe Tabelle 3) wurde mit einem Restriktionsenzym (III.1.6), das hinter der codierenden Sequenz schneidet, linearisiert. Geeignet ist dafür ein Restriktionsenzym, das entweder zu einem 5'-Überhang oder zu einem glatten Ende führt. Ein überhängendes 3'-Ende dient als Erkennungsstelle für die RNA-Polymerase und würde so zur Synthese von antisense-RNA führen (Goldin, 1992).

In Tabelle 3 sind die verwendeten Plasmide mit den entsprechenden Enzymen zur Linearisierung aufgeführt.

Name des Plasmids	Enzyme zur Linearisierung
pSP ϕ CAT1-AB1C	SaI, XbaI, BamHI, XmaI, <u>EcoRI</u> , AflIII
hCAT-1.GFP-pSP64T	SaI, XbaI, <u>EcoRI</u> , AflIII
HC3.pSP64T	<u>SaI</u> , AflIII
hCAT-3.GFP-pSP64T	AflIII
hCAT-4-pSP64T	<u>AccI</u> , HindII, SaI, XbaI, EcoRI, XbaI,
hCAT-4.GFP-pSP64T	<u>XbaI</u> , EcoRI,

Tabelle 3 **Verwendete Plasmide für die *in vitro*-Transkription von cRNA**

Fett gedruckt und unterstrichen sind die Restriktionsenzyme, die am häufigsten zur Linearisierung verwendet wurden.

Die linearisierte DNA wurde durch Phenolextraktion (III.2.1.4) gereinigt, mit Ethanol präzipitiert und in DEPC-H₂O resuspendiert. Die cRNA *in vitro*-Transkription erfolgte nach der Anleitung des mMessage mMachine™ SP6-Kits.

Reaktionsansatz:

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

Aufgefüllt wurde mit DEPC-H₂O auf 20µl.

Der Ansatz wurde gemischt, abzentrifugiert und für 2h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurde 1µl RNase-freie DNaseI (2E/µl) zugesetzt, gemischt, abzentrifugiert und für 15Min. bei 37°C inkubiert. Es folgte die Zugabe von 30µl DEPC-H₂O und 25µl Lithiumchlorid-Präzipitationslösung und Fällung der RNA für 30Min. bei -20°C. Nach der Zentrifugation (20Min., 4°C, 14.000rpm, Tischzentrifuge) wurde der Überstand entfernt und

das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde in DEPC-H₂O resuspendiert und 1µl zur Bestimmung der RNA-Konzentration (III.2.1.2) eingesetzt. Um die gewonnene RNA-Menge auf den Reinheitsgrad zu prüfen, wurde ein Aliquot auf ein Agarosegel aufgetragen. Anschließend wurde die restliche cRNA bei -70°C gelagert.

III.2.2.3 Insertion von hCAT-3 in den Vektor pSP64T (HC3.pSP64T)

Um *in vitro*-Transkripte von hCAT-3 für die Injektion in *Xenopus laevis* Oozyten herstellen zu können, wurde hCAT-3 in den Vektor pSP64T (Melton *et al.*, 1984) kloniert. Als Ausgangsdiente das HC3.pCR.ges.-Konstrukt, in welchem sich hCAT-3 im pCR-Script-Vektor (pCR-Script™ SK(+), Stratagene, Heidelberg) befindet (Vékony, Diplomarbeit 1999). Im pSP64T-Vektor wurde eine Bgl II Stelle zwischen den SP6-Promotor und der Polylinker-Sequenz eingeführt, 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 dem Polylinker 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 ein Resistenzgen gegen Ampicillin und eine Ori-Stelle (origin of replication). Das HC3.pCR.ges.-Konstrukt wurde mit Bgl II restringiert und in die Bgl II-Schnittstelle des Vektors pSP64T eingefügt. Zu diesem Zweck wurde das mit Bgl II restringierte HC3.pCR.ges.-Konstrukt über eine präparative Gelelektrophorese aufgetrennt und das hCAT-3-Insert ausgeschnitten und aufgereinigt (NucleoSpin Extract Kit, Macherey & Nagel). Der mit Bgl II restringierte und Phosphatase behandelte pSP64T-Vektor wurde durch eine Phenol/Chloroform Extraktion (III.2.1.4) aufgereinigt. Es folgte eine Ligation (III.2.1.6), Transformation (III.2.1.8), und anschließend wurde eine Minipräparation (III.2.1.9) durchgeführt (resultierendes Konstrukt: HC3.pSP64T). Der in der anschließenden Kontrollrestriktion mit dem Enzym Bst EII als richtig ausgewiesene Klon wurde in eine Midipräparation (III.2.1.9) eingesetzt. Danach stand für die *in vitro*-Transkription (III.2.1.10) ausreichend HC3.pSP64T-DNA zur Verfügung.

III.2.2.4 Injektion von cRNA in die Oozyten

Die zuvor vereinzelt Oozyten (III.2.2.1) wurden mit Hilfe eines Nanoliter-Injektors oder eines pneumatischen Injektors mit der gewünschten cRNA-Menge injiziert. Die zur Injektion verwendeten Glaskapillaren wurden durch eine spezielle Kapillarziehmaschine hergestellt. Die Spitze der Kapillare wurde mit einer Pinzette abgebrochen, bis die Öffnung für die

Injektion groß genug war. Wurde der Nanoliter-Injektor verwendet, wurde die Injektionskapillare mit Hilfe einer Microfill-Spitze mit rotem Paraffinöl gefüllt, um die Höhe der wässrigen RNA-Lösung darin besser abschätzen zu können. Danach wurde die Kapillare bis zum Einrasten auf den Microdispenser gesetzt. 1µl cRNA wurde 1:3 mit DEPC-H₂O verdünnt, auf ein Stück Parafilm pipettiert und dann langsam luftblasenfrei unter Beobachtung im Mikroskop mit der Kapillare aufgezogen. Die gewünschte Injektionsmenge wurde mit Hilfe des Nanoliter-Injektors eingestellt.

Wurde der pneumatische Injektor verwendet, wurde die Injektionsnadel mit Hilfe eines Kapillarenauffüllers mit 1µl RNA (verdünnt 1:3 mit DEPC-H₂O) luftblasenfrei gefüllt und am Kapillarenhalter des Injektors befestigt. Die gewünschte Injektionsmenge wurde durch die bei der Injektion entstandene Tropfengröße unter dem Binokular überprüft.

Bei beiden Injektoren wurden die Oozyten zur Injektion in eine Petrischale mit Ca⁺⁺-haltigem Puffer auf ein Netz (Maschenweite 1mm) gelegt. Um den Zellkern nicht zu verletzen, wurde die cRNA in den vegetativen Pol injiziert. Meist konnte bei der Injektion ein Aufblähen der Oozyten beobachtet werden. Die Inkubation der Oozyten für die Proteinsynthese erfolgte in einer Petrischale mit Kulturmedium (III.2.2.1) bei 18°C für 2-3 Tage. Dabei wurde das Kulturmedium einmal täglich erneuert und beschädigte Oozyten aussortiert. Nach der Expressionszeit von 2-3 Tagen wurden die Oozyten entweder für Transportstudien (III.2.2.5) oder zur Herstellung von Lysaten (III.2.2.7) verwendet. Als Kontrolle wurden Oozyten mit DEPC-H₂O injiziert.

III.2.2.5 Influxstudien mit Tritium-markierten Aminosäuren

Verwendeter Puffer

Na⁺-Aufnahmepuffer (10x)

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

Verwendete Radiobiochemika	Spezifische Aktivität (wenn nicht gesondert aufgeführt, wurde die Aktivität von ICN Biomedicals, Eschwege bezogen)
Arginin, L-[4,5- ³ H]	39Ci/mmol
Glutamin, L-[3,4- ³ H(N)]	30-60Ci/mmol (Perkin Elmer, NEN™ Life Science Products, Köln)
Glutaminsäure, L-[3,4- ³ H]	46Ci/mmol
Histidin, L-[Ring 2,5- ³ H]	44Ci/mmol (Biotrend, Schwabach)
Leucin, L-[4,5- ³ H]	63Ci/mmol
Lysin, L-[4,5- ³ H]	54Ci/mmol
Methionin, L-[methyl- ³ H] methylester Hydrochlorid	80Ci/mmol (Biotrend, Schwabach)
Ornithin, L-[1- ¹⁴ C]	55mCi/mmol
Prolin, L-[3,4- ³ H]	60Ci/mmol
Phenylalanin, L-[Seitenkette- ³ H]	15Ci/mmol
Serin, L-[G- ³ H]	63Ci/mmol

Tabelle 4 **Verwendete Radiobiochemika**

In der Tabelle sind alle Radiobiochemika aufgeführt, die bei Transportstudien in Xenopus laevis Oozyten verwendet wurden.

Zwei bis drei Tage nach der Injektion wurden die Oozyten dreimal mit je 2ml 1x Na⁺-Aufnahmepuffer gewaschen. Sollten aber Transportstudien zur Na⁺-Abhängigkeit durchgeführt werden, wurde das im Aufnahmepuffer enthaltene NaCl durch Cholinchlorid in gleicher Konzentration ersetzt. Darauf folgte die Vorinkubation von je fünf Oozyten in einem 2ml Reaktionsgefäß, welches 200µl Na⁺-Aufnahmepuffer mit einer definierten Konzentration der zu untersuchenden Aminosäure enthielt (Tabelle 4). Nach der zweistündigen Vorinkubation wurden die Oozyten mit Hilfe einer Pasteurpipette in eine Inkubationslösung überführt, die zusätzlich 5µCi/ml der zu untersuchenden radioaktiv markierten Aminosäure enthielt. Die Reaktionsgefäße wurden für 15-20Min. in einem 20°C Wasserbad inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen wurde das Reaktionsgefäß auf Eis gestellt und pro Reaktionsgefäß 1ml eiskalter Na⁺-Aufnahmepuffer zugefügt. Die Oozyten wurden in eiskaltem Na⁺-Aufnahmepuffer 5x gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Oozyten mit Hilfe einer Pasteurpipette einzeln in ein Szintillationsröhrchen überführt und mit 200µl 2%igem SDS lysiert. Zur Quantifizierung der in der Oozyte aufgenommenen radioaktiven Aminosäure wurden je 2ml

Szintillationsflüssigkeit mit den lysierten Oozyten vermischt und die Proben in den Szintillationszähler gestellt. Die Radioaktivität wurde in Zerfälle pro Minute (cpm) gemessen.

III.2.2.6 Trans-Stimulations-Experimente (Efflux-Studien)

Drei Tage nach der Injektion der cRNA wurden 3,6nmol radioaktiv markiertes L-[³H] Arginin (3,6nCi) in einem Volumen von 36nl in jeweils 3 Oozyten injiziert. Unmittelbar nach der Injektion wurden die Oozyten in ein 2ml Reaktionsgefäß mit 200µl Na⁺-Aufnahmepuffer überführt, der 1mM unmarkiertes L-Arginin oder gar kein L-Arginin enthielt. Nach der 30minütigen Inkubation bei 20°C im Wasserbad wurden 150µl entnommen und zur Messung mit 2ml Szintillator versetzt und das Röhrchen in den Szintillationszähler gestellt.

III.2.2.7 Lysate aus *Xenopus laevis* Oozyten

Verwendete Puffer:

RIPA-Puffer

Deoxycholat	1% (m/V)
Triton –X-100	1% (m/V)
SDS	0,1 % (m/V)
NaCl	150mM
MgCl ₂	2mM
Tris-HCl	10mM

RIPA-Puffer mit Harnstoff

Der RIPA-Puffer wurde wie oben angesetzt und 8M Harnstoff zugesetzt.

Direkt vor dem Gebrauch wurde der Proteaseinhibitor Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) in einer Endkonzentration von 1mM zugesetzt.

Drei Tage nach der Injektion mit cRNA wurden die Oozyten mit 1xPBS gewaschen. Fünf Oozyten, injiziert mit identischer cRNA, wurden in 25µl RIPA-Puffer ohne Harnstoff lysiert. Sollten Lysate mit N-Glykosidase F behandelt werden, um in einem SDS-PAGE sauber umrissene Banden zu erhalten, wurden zu dem 25µl Ansatz 4µl N-Glykosidase F gegeben und bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Im Anschluss wurden 75µl RIPA-Puffer mit 8M Harnstoff zu dem Ansatz pipettiert. Die Lysate wurden zentrifugiert (20 Min., 4°C,

14.000rpm, Tischzentrifuge) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Um die im Lysat enthaltene Proteinkonzentration bestimmen zu können, wurde 1µl des Lysats in einen Bradford-Ansatz eingesetzt (III.2.4.2) Die Lysate wurden entweder direkt in einem SDS-PAGE (III.2.4.3) aufgetrennt oder bei -70°C gelagert.

III.2.3 Zellkultur-Methoden

III.2.3.1 Allgemeine Bedingungen, Kulturmedien und Lösungen

Allgemeine Bedingungen

Die Arbeiten an den Zellen wurden unter einer sterilen Werkbank mit sterilen Plastikwaren, Glasgegenständen und Lösungen durchgeführt. Alle verwendeten Zelllinien wurden im Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die CO₂-Konzentration betrug 5%.

Folgende Materialien wurden steril bezogen:

Einfrierröhrchen	Cryogenic vials (Nalgene über Nalge Europe Ltd, Neerijse, Belgien)
Einweg-Auslaufpipetten	1ml, 5ml, 10ml, 25ml (Falcon BD Biosciences, Heidelberg)
Gewebekulturschalen	14,5cm Durchmesser (Greiner, Frickenhausen)
Kulturflaschen	25cm ² und 75cm ² Fläche (Falcon BD Biosciences, Heidelberg)
Pipettenspitzen	0,5-10µl, 10-100µl, 100-1000µl (Sarstedt, Nürnberg)
Reaktionsgefäße	0,5ml, 1,5ml und 2,0ml Safe-Lock (Sarstedt, Nürnberg)
Zentrifugenröhrchen	14ml Rundboden, 15ml und 50ml Spitzboden (Sarstedt, Nürnberg)

Die nicht steril bezogenen Materialien und Lösungen für die Zellkultur wurden wie folgt sterilisiert:

Glas- und Metallgegenstände:	Heißluftsterilisation bei 180°C für 3h
Plastikgegenstände, Lösungen hitzestabiler Substanzen:	Autoklavieren bei 121°C und 1-2 bar für 20Min.
Lösungen nicht autoklavierbarer Substanzen:	Sterilfiltration (Porengröße 0,2µm)

Kulturmedien

Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM)/ Nut Mix F12	Invitrogen Life Technologies, Gibco BRL, Karlsruhe)
Iscove's modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Invitrogen Life Technologies, Gibco BRL, Karlsruhe)

Medien-Zusätze

FBS (fötales Rinderserum)	Biochrom AG, Komplementinaktivierung durch 30minütige Inkubation bei 56°C
L-Glutamin	Invitrogen Life Technologies, Gibco BRL, Karlsruhe)
Penicillin 10.000U/ml/Streptomycin 10.000µg/ml (100xLsg.)	Invitrogen Life Technologies, Gibco BRL, Karlsruhe)

Lösungen und Puffer

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Trypsin-EDTA-Lösung (10x)	Sigma, Deisenhofen)
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Apotheke des Klinikums der Universität Mainz

III.2.3.2 Kultivieren von Zellen

Passagieren von Zellen

Damit Zellen optimal wachsen und über einen längeren Zeitraum in Kultur gehalten werden können, müssen sie in für das Wachstum abgestimmten Zeiträumen passagiert werden. Hierzu wurde die konfluente Zellkulturflasche oder Zellkulturplatte 1-2mal mit 1xPBS gespült und danach zum Ablösen der Zellen mit 1ml Trypsin überschichtet. Das Trypsin wurde sofort abgesaugt und die Zellen für ca. 1 Minute im Brutschrank inkubiert. Zum besseren Ablösen der Zellen wurde die Kulturflasche auf einen festen Untergrund geklopft. Nach Zugabe von vorgewärmtem Medium wurden die Zellen vereinzelt, indem sie mehrmals mit der Pipette aufgezogen und kräftig auf den Kulturflaschen-Boden pipettiert wurden. Ein Teil der Zellsuspension wurde verworfen und das Volumen mit frischem Medium aufgefüllt. Für ein optimales Wachstum wurden die Zellen 1-2mal pro Woche mit auf die Zelllinie abgestimmten Verdünnungen der Zellsuspension von 1:4 bis 1:20 umgesetzt.

Einfrieren von Zellen

Um auf Zelllinien langfristig zurückgreifen zu können ist es zweckmäßig sie einzufrieren. Außerdem besteht bei längerem Wachstum der Zellen die Möglichkeit, dass Mutationen entstehen.

Zum Einfrieren wurden die Zellen nach dem Ablösen mit Trypsin in ein 15ml Spitzbodenröhrchen überführt und dann abzentrifugiert (5min, 4°C, 900rpm, Megafuge). Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in einem Medium, das 10% FBS und 10% DMSO enthielt, aufgenommen und so in Einfrierröhrchen überführt. In 1ml Aliquots wurden

die Zellen über Nacht in einer Styroporbox langsam auf -70°C abgekühlt. Am nächsten Tag wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

Auftauen von Zellen

Im Gegensatz zum Einfrieren erfolgte das Auftauen der Zellen möglichst rasch. Das Einfrierrohrchen wurde aus dem flüssigen Stickstoff genommen und in der Hand aufgewärmt. Danach wurden die Zellen in ein mit vorgewärmtem Medium gefülltes 15ml Zentrifugenröhrchen überführt, gemischt und abzentrifugiert (5min, RT, 900rpm, Megafuge), um das DMSO aus dem Einfriermedium zu entfernen. Das Zellpellet wurde dann in frischem Medium resuspendiert und in eine Kulturflasche überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt.

Mycoplasmen-Nachweis

Ein Mycoplasmen-Nachweis wurde durchgeführt, um zu kontrollieren, ob die Zellen frei von Mycoplasmen waren. Dabei wurde die DNA durch einen Farbstoff sichtbar gemacht, wonach man die Zellkerne klar abgegrenzt erkennen kann. Wären die Zellen kontaminiert, würde man die Mycoplasmen-DNA sowohl auf als auch zwischen den Zellen sehen.

Die zu untersuchenden Zellen wurden mit geringer Dichte in eine Gewebekulturschale umgesetzt. Nach drei Tagen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit eiskaltem Methanol/Eisessig (2:1) für 3Min. fixiert. Danach wurde die Fixierlösung entfernt und die Zellen bei RT getrocknet. Es folgte eine 5minütige Färbung der Zellen mit 4,6 Diamidino-2-phenylindol (DAPI) ($2\mu\text{l}$ der DAPI-Lösung (0,1% DAPI in Methanol) in 1ml 1xPBS) im Dunkeln. Durch mehrmaliges Spülen mit H_2O wurde die DAPI-Lösung entfernt. Unter einem Fluoreszenz-Mikroskop mit einem Filter zur UV-Anregung (Absorbtionsspektrum 340-380nm) wurde der Zustand der Zellen überprüft.

III.2.3.3 Verwendete Zelllinien und transfizierte Zellen

NT2-Zellen

Die NT2 (Ntera 2/D1) Zelllinie wurde aus einem humanen Teratokarzinom-Gewebe gewonnen. Die Zelllinie wurde von Stratagene, Heidelberg bezogen und in 75cm^2 Flaschen mit 12ml DMEM/F12, das 10% FBS, 2mM L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin enthielt, kultiviert. Alle 7 Tage wurden die Zellen in einem Verhältnis 1:20 passagiert.

U373MG Glioblastom-Zellen

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um humane Astrozyten aus einem Glioblastom (ATCC, American Type Culture Collection). In 75cm²-Flaschen wurden die Zellen mit 12ml IMDM-Medium, das 10% FBS enthielt, kultiviert. In diese Zelllinie wurden die Fusionsproteine hCAT-1pEGFP-N1, hCAT-3pEGFP, hCAT-4pEGFP und die EGFP-Kontrolle stabil transfiziert (Wolf, Dissertation, 2001).

III.2.3.4 Behandlung von Zellen mit PMA

Bevor Zelloberflächenproteine biotinyliert wurden (III.2.4.1), wurden die Zellen mit PMA und dem PKC-Inhibitor BIM I vorinkubiert. Die Zellen wurden in 10cm-Zellkulturschalen bis zur Konfluenz kultiviert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen einmal mit 1xPBS gespült. Anschließend wurden die Zellen im für sie üblichen Medium mit 100nM PMA für 30Min. im Brutschrank inkubiert. Wurde auch der PKC-Inhibitor BIM I verwendet, wurden die Zellen für 30Min. mit 1µl (pro ml Medium) BIM I im Brutschrank inkubiert und es folgte darauf die Inkubation mit 100nM PMA für 30Min. im Brutschrank. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit 0,2% DMSO behandelt wurden. Die Zellen wurden dann mit 1xPBS gespült und laut dem Biotinylierungsprotokoll (III.2.4.1) behandelt.

III.2.3.5 Lysate aus humanen Zellen

Verwendete Puffer:

RIPA-Puffer

NaCl	150mM
EDTA	1mM
Tris-HCl pH7,2	100mM

Mit NaOH wurde ein pH-Wert von 7,4 eingestellt und dann die folgenden Substanzen hinzugefügt:

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

Am Gebrauchstag wurde ein Protease-Inhibitor-Cocktail (complete mini, Roche Diagnostik, Mannheim, 1 Tablette in 10ml RIPA-Puffer) hinzugegeben.

Die Zellen wurden in Zellkulturschalen (Ø 9,4cm) bis zur Konfluenz kultiviert und dreimal mit 1x PBS gewaschen. Es folgte die Lyse der Zellen durch Zugabe von 1ml RIPA-Puffer für

60Min. bei 4°C auf dem Kreisschüttler. Dann wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Kulturschale abgekratzt, in ein 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (20min, 4°C, 13.000rpm, Tischzentrifuge). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Zelllysate konnte auch mit N-Glykosidase F behandelt werden. Dazu wurde zu einem 10µl Ansatz 1µl N-Glykosidase F gegeben und für 1h bei 37°C inkubiert. Je 1µl wurde für eine Proteinbestimmung nach Bradford (III.2.4.2) eingesetzt. Die Lysate wurden entweder bei -70°C gelagert oder in eine SDS-PAGE eingesetzt (III.2.4.3.).

III.2.4 Biochemische Methoden

III.2.4.1 Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen

Durch die Biotinylierung mit dem membranundurchlässigen N-Hydroxysulfosuccinimid (NHS)-Biotin ist es möglich, Zelloberflächenproteine von intrazellulären Proteinen zu trennen. Dabei lässt man bei neutralem pH-Wert freie Aminogruppen an der Zelloberfläche intakter Zellen mit dem NHS-Ester des Biotins eine kovalente Amidbindung eingehen. Die so biotinylierten Membranproteine können nach Zelllyse und anschließende Kopplung an immobilisiertes Avidin von intrazellulären Proteinen getrennt werden. Dadurch ist es möglich, Veränderungen in der Zelloberflächenexpression zu quantifizieren.

Verwendete Puffer und Lösungen

PBS-CM-Puffer (PBS mit Ca⁺⁺ und Mg⁺⁺)

MgCl ₂	1mM
CaCl ₂	0,1mM

Gelöst wurde in 1xPBS

Quenching-Puffer

PBS-CM-Puffer	400ml
Glycin	3g

RIPA-Puffer

NaCl	150mM
EDTA	1mM
Tris-HCl pH7,2	100mM

Mit NaOH wurde ein pH-Wert von 7,4 eingestellt und dann die folgenden Substanzen hinzugefügt:

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

Am Gebrauchstag wurde ein Protease-Inhibitor-Cocktail (complete mini, Roche Diagnostik, Mannheim, 1 Tablette in 10ml RIPA-Puffer) hinzugegeben.

Biotinylierungsreagenz

EZ-Link™ Sulfo-NHS-SS-Biotin 1mg/ml

Gelöst wurde in PBS-CM-Puffer

Die zu untersuchenden Zellen wurden in 10cm Zellkulturplatten bis zur Konfluenz kultiviert. Je nach Versuchsanordnung wurden die Zellen vor der Biotinylierung vorbehandelt (III.2.3.4). Nach dem letzten Vorbehandlungsschritt wurden die Zellen mit eiskaltem PBS-CM-Puffer dreimal gewaschen und mit 2ml Biotinylierungsreagenz für 20Min. bei 4°C auf dem Kreisschüttler inkubiert. Danach wurde das Biotinylierungsreagenz abgesaugt und dreimal mit je 5ml eiskaltem Quenching-Puffer gewaschen. Darauf folgte die Inkubation der Zellen mit 5ml Quenching-Puffer für 30Min. bei 4°C. So wurde überschüssiges Biotin gebunden. Nach dreimaligem Spülen wurden die Zellen lysiert. Dafür wurde jede Platte mit 1ml RIPA-Puffer mit Protease-Inhibitoren für 60Min. bei 4°C auf dem Kreisschüttler inkubiert. Mit einem Zellschaber wurden die lysierten Zellen von den Zellkulturschalen gelöst und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Es folgte die Zentrifugation für 20Min. bei 12.400rpm und 4°C (Tischzentrifuge). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 1µl zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (III.2.4.2) verwendet.

Avidin-Kopplung

Zur Avidin-Kopplung wurden von stabil transfizierten Zellen 100µl der biotinylierten Lysate (entsprach ca. 200µg) und von Zellen, die den Transporter endogen exprimieren 150-200µl eingesetzt. Diese Lysate wurden mit der gleichen Menge UltraLink® Immobilized NeutrAvidin bei 4°C ü.N. auf dem Schüttler inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Proben zentrifugiert (15Min., 12.400rpm, 4°C, Tischzentrifuge). Die Überstände, die die intrazelluläre Fraktion beinhalteten, wurden bei -70°C gelagert. Die Avidin-Sedimente wurden viermal mit je 400µl RIPA-Puffer gewaschen und dann mit 30µl SDS-Probenpuffer (III.2.4.3) für Zelllysate versetzt und 30Min. bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (5Min., 12.400rpm, RT, Tischzentrifuge) wurde der Überstand, der die Membranproteine enthielt, entweder gleich in einer SDS-PAGE eingesetzt oder bei -70°C gelagert.

III.2.4.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford

Verwendete Lösung

Bradford-Reagenz

BioRad Protein Assay Farbstoff-Konzentrat (Bio Rad, München)

Es wurde 40%ig in Aqua bidest. angesetzt und filtriert.

Das Prinzip der Bradford-Methode beruht auf der Bindung des Farbstoffes Commassie Brilliant Blue an Proteine, wodurch sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465nm nach 595nm verschiebt (Sedmak und Grossberg, 1977).

In eine 96-Loch-Mikrotiterplatte wurden unterschiedliche BSA-Konzentrationen (0-7µg), die im Bereich der zu erwartenden Proteinkonzentration der Proben lag, als Standard (Doppelbestimmung) pipettiert. Das Endvolumen wurde mit Aqua bidest. auf 100µl aufgefüllt. Von der zu messenden Probe wurde ein definiertes Volumen (1-5µl) für eine Doppelbestimmung pipettiert und ebenfalls mit Aqua bidest. auf ein Endvolumen von jeweils 100µl aufgefüllt. Nach der Zugabe von 40%igem Bradford-Reagenz (100µl/Loch) zu Standard und Proben wurde die Extinktion innerhalb von 30Min. mit einem ELISA-Reader bestimmt. Die Proteinkonzentration der Proben wurde anhand der mit dem BSA-Standard erstellten Eichkurve bestimmt.

III.2.4.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Trenngele

	Stocklösung	12,5% Gel	10% Gel	8% Gel
		(Menge in ml angegeben)		
Aqua bidest.		4,8	6,0	7,1
Tris-HCl pH 8,8	1,5M	3,75	3,75	3,75
SDS	10% (m/V)	0,150	0,150	0,150
Acrylamid (37,5:1 Bisacrylamid)	30%	6,24	5,0	4,0
APS	10% (m/V)	0,100	0,100	0,100
Temed		0,010	0,010	0,010
Auftrennung im Bereich:		20-60kDa	40-100kDa	50-200kDa

Sammelgel

	Stocklösung	3,88%
(in ml angegeben)		
Aqua bidest.		3,05
Tris-HCl pH 8,8	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

SDS-Elektrophorese-Puffer (10x)

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

SDS-Probenpuffer für Zelllysate (2x)

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

SDS-Probenpuffer für Oocytenlysate (2x)

Tris Base	125mM
Glycerol	20 vol%
SDS	5%(m/V)
Bromphenolblau	0,001% (m/V)
2-Mercaptoethanol	2,0 vol% frisch zugeben

Der pH-Wert wurde mit 1N HCl auf 6,8 eingestellt.

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteingemischen nach ihrem Molekulargewicht. Das anionische Detergenz SDS bindet an hydrophobe Regionen von

Proteinen, welche dadurch 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 ging eine Konzentrierung der Proteine in einem Sammelgel voraus. Dadurch wurde ein besseres Trennergebnis während der Elektrophorese erreicht. Zum Gießen des Trenngels wurde die Lösung zwischen zwei, zuvor mit Ethanol gereinigten, Glasplatten mit einer Pasteurpipette eingefüllt. Um eine glatte Trenngeloberfläche zu erreichen, wurde sie mit einem Tropfen n-Butanol überschichtet. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert war, wurde das n-Butanol entfernt und das Gel mit in einer Spritzflasche befindlichem Aqua bidest gespült. Auf das Trenngel wurde das Sammelgel gegossen und der Kunststoffkamm zum Aussparen der Taschen zwischen die Glasplatten geschoben. Nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels wurde das Gel in eine dazugehörige Elektrophorese-Kammer (Mini-Protean[®] Kammer, Bio-Rad, München) überführt und diese mit SDS-Elektrophorese-Puffer gefüllt. Der Kunststoffkamm wurde entfernt, die Probestaschen mit Puffer gespült und die je nach Versuch mit 2x SDS-Probenpuffer für Zellysate oder 2x SDS-Probenpuffer für Oozytenlysate vorbereiteten Proben (Verhältnis 1:1 von Probe und Puffer) aufgetragen. Zum Einlaufen der Proben wurde eine Spannung von 200V angelegt, danach wurde die Spannung auf 100V reduziert.

Präparative SDS-PAGE

Verwendete Lösung

Commassie Blue Farblösung

Commassie Brilliant Blue [®] -250	0,25% (m/V)
Methanol	50%(V/V)
Essigsäure	10% (V/V)

Um Proteine präparativ aus einem Gel zu trennen, ist es nötig, sie im Gel sichtbar zu machen. Dazu wurden die Trenngele in die Commassie Blue Farblösung eingetaucht. Nach einer 30minütigen Inkubation entstand eine intensive Blaufärbung der Proteinbanden. Durch einen

Vergleich mit einem Molekulargewichtsmarker konnten nun die Proteine analysiert werden und die richtigen Banden mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten werden.

III.2.4.4 Western-Blot-Analyse

Verwendete Puffer und Lösungen

Ponceau S-Farblösung

Ponceau S (Sigma, Deisenhofen) 0,5% (m/V)

Essigsäure konz. 1% (V/V)

Angesetzt wurde in Aqua bidest.

Elektroblotting Transferpuffer

Tris Base 20mM

Glycin 150mM

Methanol 20% (V/V)

Gelöst wurde in Aqua bidest.

Blotto-Lösung

Tris-HCL pH 8,0 50mM

CaCl₂ 2mM

Antifoam A 0,01 vol%

Tween 20 0,05 vol%

Magermilchpulver (Frema, Reformhaus) 5% (m/V)

Zum Blocken unspezifischer Proteinbindungen wurde 10 vol% Ziegen Serum (Cedarlane) hinzugefügt.

Antikörperverdünnungspuffer

BSA (ICN, Biomedicals Eschwege) 1% (m/V)

Tween 20 0,1 vol%

Gelöst wurde in 1x PBS pH 7,4

TBS

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

Angesetzt wurde in Aqua bidest.

TBST

Tris-HCl pH 8,0	10mM
NaCl	150mM
Tween 20	0,05 vol%

Angesetzt wurde in Aqua bidest.

"Stripp-Lösung"

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

Verwendete Antikörper

In Western-Blot Analysen wurden die affinitätsaufgereinigten Fusionsantikörper, wenn nicht gesondert vermerkt, in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Für die Untersuchungen mit GFP-Fusionsproteinen wurde der Living Colors™ Peptid Antikörper (polyklonal) in einer Verdünnung von 1:300 (Clontech, Heidelberg) eingesetzt. Als sekundärer Antikörper diente in beiden Fällen der anti-Kaninchen-IgG Peroxidase-gekoppelte Antikörper (Calbiochem, Bad Soden) in einer Verdünnung von 1:10.000. Für den Tubulin-Nachweis wurde der anti-h- β -Tubulin monoklonale Primärantikörper verwendet. Hier wurde als sekundärer Antikörper anti-Maus-IgG Peroxidase gekoppelt (Sigma, Deisenhofen) in einer Verdünnung von 1:3000 eingesetzt.

Die Western-Blot Analyse stellt eine sensitive Nachweismethode zur Identifikation von Proteinen dar, wenn man spezifische Antikörper gegen ein zu untersuchendes Protein besitzt. Das Trenngel einer SDS-PAGE wurde für einige Minuten im Elektrobloiting-Puffer äquilibriert. Eine Nitrocellulose-Membran (Protran® 83, Schleicher und Schüll, Dassel) und 6 Whatman 3MM Papiere wurden auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten und ebenfalls äquilibriert. Der Transfer erfolgte in einer Elektrophorese-Kammer in der das Gel luftblasenfrei auf eine Nitrocellulose-Membran gelegt wurde. Beides wurde zwischen je drei Lagen Whatmann 3MM Papier, zwei grobmaschigen Schwämmen und einem Plastikträger

auf jeder Seite eingeklemmt. Dieser "Blot-Sandwich" wurde so eingespannt, dass die Nitrocellulose-Membran zur Anode zeigte und danach wurde die Kammer mit ElektrobloTTing-Puffer gefüllt. Der Transfer wurde ü.N. bei 4°C und einer Stromstärke von 100mA durchgeführt. Überprüft wurde der Erfolg des Transfers mittels Färbung der Membran mit dem Farbstoff Ponceau S, womit gleichzeitig das Vorhandensein des Proteins kontrolliert werden konnte. Nachdem das Ponceau S durch mehrmaliges Waschen mit Aqua bidest. wieder vollständig entfernt worden war, wurden unspezifische Proteinbindungen durch zweistündige Inkubation der Membran unter leichtem Schütteln bei RT in Blotto mit Ziegenserum abgesättigt. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10Min. mit Antikörperverdünnungspuffer gewaschen. Die Inkubation erfolgte in 3ml Antikörperverdünnungspuffer, in dem der spezifische Primärantikörper verdünnt wurde (meist 1:100). Die Membran und die Inkubationslösung wurden in eine Plastikfolie eingeschweißt und auf dem "end over end" Schüttler ü.N. bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran aus der Plastikfolie entnommen und dreimal für 10Min. mit Blotto gewaschen. Es folgte die Inkubation für 1h bei RT auf dem Kreisschüttler mit einem Sekundärantikörper, der in Blotto verdünnt war. Danach wurde die Membran dreimal mit 1xTBST und zweimal mit 1xTBS gewaschen und mit einer 1:1 Mischung des Chemilumineszenz Reagens Plus (Perkin Elmar, Köln) gleichmäßig überschichtet. Nach einer Minute wurde die Lösung entfernt und die in Frischhaltefolie eingepackte Membran einem Röntgenfilm in verschiedenen Zeiten (10sec.-5Min.) exponiert. Nach dem Trocknen des Röntgenfilms wurden die auf der Nitrocellulosemembran sichtbaren Banden des Molekulargewichtsmarkers mit einem Filzstift übertragen. Sollte die gleiche Membran mit einem zweiten Primärantikörper inkubiert werden, wurden die gebundenen Antikörper entfernt. Nach zweimaligem waschen mit 1xPBS wurde die Membran für 30Min. bei 50°C mit der "Stripp"-Lösung inkubiert. Danach wurde die Membran mindestens 5mal mit 1x PBS gewaschen und konnte dann in Blotto mit Ziegenserum erneut geblockt werden.

III.2.4.5 RNase-Verdauungsschutzanalyse

Die RNase-Verdauungsschutzanalyse wurde verwendet, um bestimmte RNAs in einem Gemisch von RNA aus Zellen oder Geweben nachzuweisen. Dazu wurden spezifische radioaktiv markierte RNA-Sonden verwendet. Zur Herstellung der Sonden wurde ein 100-300bp großes cDNA-Fragment der nachzuweisenden RNA in einen Vektor kloniert, der einen Promotor für eine DNA-abhängige RNA-Polymerase aus Phagen besitzt. Die cDNA konnte dann in eine radioaktiv-markierte Sonde umgeschrieben werden und diese mit dem RNA-

Gemisch hybridisiert werden, so dass sich RNA-DNA Hybride bilden. Ein anschließender RNase-Verdau gewährleistet, dass nicht hybridisierte, also einzelsträngige RNA abgebaut wird. Außer der Sonde für die nachzuweisende RNA wurde noch eine zweite spezifische RNA-Sonde gegen h- β -Aktin eingesetzt, die zur Quantifizierung der eingesetzten RNA-Menge diente. Anhand eines mitaufgetragenen DNA-Größenmarkers konnten die Größen der geschützten Fragmente bestimmt werden.

Verwendete Lösungen und Puffer

10x TP-Puffer (Roche Diagnostik, Mannheim)

Tris-HCl	400mM
NaCl	100mM
MgCl ₂	60mM
Spermidin	20mM

3,3 mM C,A, G

je 10 mM CTP, ATP, GTP (Roth, Karlsruhe) im Verhältnis 1:1:1 mischen

7,5 M Ammoniumacetat

2x AL-Puffer

2 M Ammoniumacetat pH 5,0

0,2% Laurylsarcosin

STE-Puffer

NaCl	100mM
Tris-HCl	20mM
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	10mM

Formamid-Probenpuffer

Formamid, entionisiert	80%
Natriumdodecylsulfat (SDS)	0,1%
EDTA	10mM
Xylencyanol	1mg/ml
Bromphenolblau	1mg/ml

10x Pipes (Piperazin-N,N'-bis[-2-ethansulfonsäure])

Pipes pH 6,7	400mM
EDTA	10mM
NaCl	4M

Hybridisierungspuffer

Pipes	1x
Formamid	80%

RNase A/T1-Puffer

NaCl	0,3M
Tris/HCl pH 7,4	10mM
EDTA	5mM

Proteinase K-Puffer

Tris-HCl pH 7,4	10mM
EDTA	10mM

Stoppuffer Volumen in Reaktion

10% SDS	20µl
Proteinase K-Puffer (s.o.)	47,4µl
20µg/µl Proteinase K (Roche Diagnostik, Mannheim)	2,5µl
10µg/µl tRNA	2µl

N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)

10% Ammonium Persulfate (APS)

Gellösung (50 ml für 2 Gele)

Harnstoff	8M
TBE	1x
Acrylamidlösung (AppliChem, Darmstadt)	6,25%
(38% Acrylamid, 2% Bisacrylamid in Aqua bidest.)	

Repell-Silan

Dimethyldichlorsilan in Chloroform 4% (V/V) in Chloroform,

Für die Markierung der Sonden:

[α -³²P] UTP (ICN Biomedicals, Eschwege)

Spezifische Aktivität: 111 TBq/mmol (3.0000 Ci/mmol)

Für die Markierung des DNA-Größenmarkers:

[γ -³²P] ATP (ICN Biomedicals, Eschwege)

Spezifische Aktivität: 185 TBq/mmol (5.000 Ci/mmol)

Anfertigung des radioaktiv markierten DNA-Größenstandards

Hierzu wurde der Vektor pGL2-basic (Promega) mit Hinf I linearisiert. Die Linearisierung wurde anhand eines Aliquots im Agarosegel überprüft. Danach wurde der linearisierte Vektor mittels Alkalischer Phosphatase dephosphoryliert, mit Phenol/Chloroform extrahiert (III.2.1.4) und gefällt.

Markiert wurden 3 μ g linearisierte Plasmid-DNA mit 2 μ l [γ -³²P]-ATP und 25 Einheiten der Polynukleotidkinase in 200 μ l Polynukleotidkinase-Puffer (Promega, Mannheim) bei 37°C für mindestens 1h.

Anschließend wurde der DNA-Größenstandard mit FAPP-Puffer verdünnt, so dass 7 μ l ca. 6.000cpm entsprachen.

Herstellung der Sonden durch *in vitro*-Transkription

	"CAT - Sonde"	h- β -Aktin-Sonde
linearisiertes Plasmid (0,5 μ g/ μ l)	1 μ l	1 μ l
Transkriptionspuffer 10x	2 μ l	1 μ l
3,3 mM C,A,G	3 μ l	3 μ l
RNasin	1 μ l	1 μ l
100 μ M UTP	1 μ l	3 μ l
[α - ³² P] UTP (ICN Biomedicals, Eschwege)	4 μ l	2 μ l
T3 Polymerase 10 E/ μ l (Roche Diagnostik, Mannheim)	1 μ l	1 μ l
DEPC-H ₂ O	ad 20 μ l	

Die Ansätze wurden gemischt und 1h bei 37°C inkubiert. Zur Fällung der RNA wurden 50 μ l DEPC-H₂O, 50 μ l 7,5M NH₄ Acetat, 2 μ l tRNA (10 μ g/ μ l) und 600 μ l Ethanol zugegeben und bei -70°C für 1h inkubiert. Nach der Zentrifugation (30Min., 4°C, 14.000rpm, Tischzentrifuge) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet mit 500 μ l 80%igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde in 100 μ l DEPC-H₂O resuspendiert. 1 μ l wurde mit 4ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und im β -Szintillationszähler gezählt.

Hybridisierung

Für die Hybridisierung wurden je 20 μ g der aus Zelllinien präparierten RNA mit 1 Volumen 2x AL-Puffer versetzt. Als Negativkontrolle wurden 20 μ g t-RNA verwendet. Mit 1ml eiskaltem Ethanol wurden die Ansätze bei -70°C in die Fällung gebracht. 200.000cpm der CAT-Sonde und 30.000cpm der h- β -Aktin wurden zu den vorgefällten RNAs gegeben und die Ansätze bei -70°C für eine weitere Stunde gefällt. Danach wurden die Proben für 30Min. bei 14.000 rpm zentrifugiert (Tischzentrifuge), der Überstand verworfen und das Pellet mit 1ml 80% Ethanol gewaschen. Auch dieser Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 μ l DEPC-H₂O aufgenommen. In einer Vakuumzentrifuge wurde das Pellet für ca. 30Min. getrocknet und das trockene Pellet dann in 40 μ l Hybridisierungspuffer aufgenommen. Der gut gemischte Ansatz wurde für ca. 15Min. bei RT inkubiert, damit sich das Pellet vollständig löste. Die Proben wurden dann in 1,5ml Schraubdeckel-Reaktionsgefäße überführt und in einem 85°C heißen Wasserbad für ca. 10Min. denaturiert. Für die optimale Hybridisierung wurde das Wasserbad langsam auf 51°C abgekühlt.

RNase-Verdau

Nicht hybridisierte einzelsträngige RNA-Fragmente wurden entfernt, indem zu jedem Ansatz 3,5µg RNase A (Sigma, Deisenhofen) und 25E RNase T1 (Roche Diagnostik, Mannheim) in 300µl RNase A/T1-Verdauungspuffer gegeben wurden. Für 30Min. wurden die Ansätze bei 30°C inkubiert. Um den RNA-Abbau zu beenden, wurden zu jedem Ansatz 70µl Stopppuffer pipettiert und dieser Ansatz für 15Min. bei 37°C inkubiert. Die Proteinase K wurde durch Extraktion mit 500µl Phenol/Chloroform (III.2.1.4) entfernt. Die anschließende Zentrifugation bei 2.000rpm (Tischzentrifuge) für 10Min. führte zur Phasentrennung. Die obere, wässrige Phase von ca. 380µl wurde in ein Eppendorfgesäß überführt und mit 1ml eiskaltem 100%igem Ethanol für eine Stunde bei -70°C gefällt. Die anschließende Zentrifugation führte zu einem Pellet, welches mit 1ml 80% Ethanol gewaschen und dann erneut bei 14.000rpm (Tischzentrifuge) für 15Min. zentrifugiert wurde. Das Pellet wurde für ca. 5Min. unter Vakuum getrocknet und anschließend in 7µl FAPP gelöst.

Gelelektrophorese

Die Produkte der RNA-Verdauungsschutzanalyse wurden mit Hilfe der Gelelektrophorese analysiert.

Für ein Gel wurden zwei Glasplatten von 0,4cm Dicke, wovon eine am oberen Rand ausgeschnitten war, mit Spülmittel und Ethanol gesäubert und mit Repell Silan silanisiert. Getrennt wurden die Platten durch 0,5mm dicke Abstandshalter an den Seiten und am unteren Ende. Zusammengehalten wurden sie durch Klammern, die nur den oberen Schmalseitenbereich ausschlossen. Die Komponenten der Gel-Lösung wurden bei 37°C gelöst, gefiltert und anschließend entgast. Zur Polymerisation wurden vor dem Gießen des Gels 45µl TEMED und 450µl APS beigemischt. Das Gel wurde dann sofort gegossen. Danach konnte der Kamm für die Probenaschen an der Oberseite eingeführt werden. Nach mehreren Stunden, als das Gel vollständig auspolymerisiert war, konnten der untere Abstandshalter und der Kamm entfernt und das Gel luftblasenfrei in eine Elektrophorese-Kammer mit 1x TBE eingespannt werden. Um einen gleichmäßigen Ionengradienten zu erreichen, wurde ein 30minütiger Vorlauf bei 25mA durchgeführt. Die Probenaschen wurden mit 1x TBE ausgespült. Während des Vorlaufs konnten die Proben für die Auftragung vorbereitet werden. Außer den Proben wurden 6.000cpm des DNA-Größenstandards und jeweils 2.000cpm der unverdauten Sonden für 5Min. bei 95°C denaturiert. Bevor die denaturierten Proben aufgetragen wurden, wurden die Probenaschen nochmals mit 1x TBE ausgespült. Die Elektrophorese wurde bei 25mA durchgeführt, bis die hellblaue Xylenblau-

Front (entspricht einer Höhe von ca. 110 Nukleotiden) ca. 1cm vor dem Herauslaufen aus dem Gel stand. In 10% Essigsäure und 10% Methanol wurde das Gel für 15Min. fixiert und dann auf Whatmann 3MM Papier gezogen. Nach der Abdeckung mit Frischhaltefolie wurde das Gel für 1h auf dem Geltrockner getrocknet. Danach wurde dem Gel ein Röntgenfilm aufgelegt und der Film nach einer eintägigen Exposition entwickelt. Bei zu geringer Schwärzung wurde ein neuer Röntgenfilm aufgelegt und die Expositionszeit verlängert.

III.2.4.6 Dot-blot Analyse

Verwendeter Puffer

STE-Puffer

NaCl	100mM
Tris-HCl	20mM
EDTA	10mM

Durch den RNA Master BlotTM (Clontech, Heidelberg), der eine positiv geladene Nylonmembran mit aufgedotterter PolyA⁺ RNAs darstellt, ist es möglich, Informationen über die Expression von zu untersuchender DNA in einem breiten Spektrum an Geweben und verschiedenen Zelllinien zu erhalten. Auch die Unterscheidung von fötalem und adultem Entwicklungszustand ist bei einigen Gewebetypen möglich.

Herstellung der Sonden

Für die Hybridisierung des Master-Blots wurden die verwendeten Plasmide so restringiert, dass jeweils die für CAT kodierende Region (entspricht "Insert") vom Vektor getrennt wurde (siehe Tabelle 5).

Plasmid	Enzyme zur Restriktion
pSPhCAT-1AB1	Bgl II, Sac I
phCAT-2A 104	Bgl II,
HC3-pSP64T	Bgl II,
hCAT-4pSP64T	EcoR I, Xho I

Tabelle 5 Plasmide für Master-Blot-Hybridisierung

In der Tabelle sind die Plasmide der verwendeten hCATs und die Restriktionsenzyme aufgeführt, mit denen die Sonden zur Hybridisierung des Master-Blot hergestellt wurden.

Danach folgte die Auftrennung und Aufreinigung in einer präparativen Gelelektrophorese (III.2.1.3).

Nachdem die Konzentration der enthaltenen DNA in einem Agarosegel abgeschätzt worden war, wurden je 25ng der "Inserts" für 2Min. bei 95°C denaturiert. Die denaturierte DNA wurde nach folgendem Protokoll in den "Oligolabelling Kit" (Pharmacia Biotech, Freiburg) eingesetzt:

Denaturierte DNA (25ng)	≤ 34μl
Reagier-Mix (cATP, cGTP, dTTP und Hexadeoxyribonukleotide)	10μl
Alpha ⁻³² P dCTP (50μCi)	5μl

Mit Aqua bidest. wurde auf 49μl aufgefüllt.

Nach dem Mischen wurde noch 1μl Klenow-Fragment zum Starten der Reaktion hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte für 45Min. bei 37°C. Nicht eingebaute Nukleotide wurden über eine G50 Sephadex Säule (Stratagene, Heidelberg) abgetrennt. Es wurden dabei 70-80μl STE-Puffer zum Äquilibrieren mit einer 10ml Spritze durch die Säule gedrückt. Die Ansätze wurden auf die Säule pipettiert und mit einer aufgesetzten Spritze langsam durch die Säule gedrückt, wobei nicht eingebaute Nukleotide durch das Prinzip des Molekularsiebes zurückgehalten wurden. Mit 80μl STE-Puffer, die erneut auf die Säule pipettiert und mit der Spritze durchgedrückt wurden, wurden die markierten Sonden als Eluat gewonnen. 1μl der eluierten Proben wurde in 2ml Szintillationsflüssigkeit gegeben und im β-Szintillationszähler gezählt.

Kreuzhybridisierung als Vorversuch

Um sicherzustellen, dass die hergestellten markierten Sonden für die CAT-Konstrukte nicht miteinander kreuzhybridisieren, wurde dazu ein Vorversuch durchgeführt. Es wurde ein Nitrocellulose-Filter (Schleicher & Schüll, Dassel) verwendet, auf den je 1μl der denaturierten RNA von allen in Tabelle 5 hergestellten Sonden für die CAT-Konstrukte in verschiedenen Konzentrationen (0,1ng, 1ng, 10ng, 100ng) und als Negativ-Kontrolle der pSP64T-Vektor aufgedotet wurde. Der so bestückte Filter wurde für 1h bei 80°C im Hybridisierungssofen gebacken und konnte nun zur Prähybridisierung und Hybridisierung eingesetzt werden.

Prähybridisierung und Hybridisierung

Verwendete Puffer und Lösungen

20xSSC

NaCl	3M
Na ₃ Citratdihydrat	0,3M

Der pH-Wert wurde auf 7,0 mit 1M HCl eingestellt. Dann wurde mit Aqua bidest auf 1l aufgefüllt.

20% SDS

SDS	200g
-----	------

Mit Aqua bidest. wurde auf 1l aufgefüllt

Waschlösung 1

SSC	2x
SDS	1%

Waschlösung 2

SSC	0,1x
SDS	0,5%

Prähybridisierungs-Lösung

Express Hyb-Lösung	7,5ml
DNA aus Lachsspermien (denaturiert)	0,75mg

Hybridisierungs-Lösung

Gelabelte DNA	15 ⁶ cpm/Probe
DNA aus Lachsspermien	150µg
C ₀ t-1 DNA	30µg
SSC (20x)	50µl

Mit DEPC-H₂O wurde auf 200µl aufgefüllt.

Der Ansatz wurde für 5Min. denaturiert und dann zu 7,5ml der Prähybridisierungs-Lösung pipettiert.

Die Filter zum Testen der Kreuzhybridisierung bzw. der Master-Blot-Filter wurden zusammengerollt und einzeln in eine Hybridisierungsröhre (Biometra, Göttingen) überführt.

In die Hybridisierungsröhre wurden 7,5ml der Prähybridisierungs-Lösung gegeben und so der Filter für 30Min. bei 65°C prähybridisiert. Danach wurde die Prähybridisierungs-Lösung verworfen und die Hybridisierungs-Lösung zugegeben. Die Hybridisierung wurde bei 65°C ü.N. durchgeführt.

Waschen der Filter

Um unspezifische Bindungen zu entfernen, wurden die Filter viermal mit 200ml der Wasch-Lösung 1 bei 65°C für 20Min. gewaschen. Darauf folgte ein Waschschrift mit erniedrigtem Salzgehalt (Wasch-Lösung 2) mit 200ml bei 55°C. Mit den Filtern wurde nach diesen Waschschriften eine Autoradiographie ü.N. durchgeführt. War das Signal zu schwach, wurde der Röntgenfilm länger exponiert.

Strippen des Filters

Um den Master-Blot nach der Hybridisierung erneut zu verwenden, war es nötig, die DNA-Proben zu entfernen. 200ml der Wasch-Lösung 2 wurden auf 100°C erhitzt und in die Hybridisierungsröhre geschüttet, in der der Filter bereits platziert wurde. Die Hybridisierungsröhre wurde bei 80°C für 10Min. im Hybridisierungsofen inkubiert und dann, zum Abkühlen der Lösung, die Temperatur auf RT reduziert. In mehrere Schichten Frischhaltefolie verpackt konnte der Master-Blot-Filter bei -20°C aufbewahrt werden.

III.2.5 Herstellung und Aufreinigung polyklonaler Antikörper

Für Untersuchungen der Expression von Proteinen sowie möglicher posttranskriptioneller und posttranslationeller Regulationsprozesse benötigt man spezifische Antikörper. Die Herstellung und Aufreinigung der Antikörper gegen den C-Terminus des humanen CAT-3, SLC7A4 und des murinen CAT-3 wird im Folgenden beschrieben.

III.2.5.1 Klonierung von Konstrukten für die Expression von CAT/Tryptophan E (TrpE)-Fusionsproteinen

Zur Herstellung von CAT/TrpE-Fusionsproteinen des hCAT-3-, SLC7A4-(auch hCAT-4 genannt) und des mCAT-3-Konstruktes wurden zunächst durch Restriktion der entsprechenden Plasmide (III.2.1.5) oder durch PCR-Reaktion (III.2.1.11) Fragmente hergestellt, die in den pATH-1-Vektor (Koerner *et al.*, 1991) kloniert wurden.

Name	Sequenz
HC4.BamHI757	5'-GGATCCGATCCGGCATAGCAAGGAGA-3'
hCAT-4.stop (HC4as 1908)	5'-GGAAGATCTAGCTACTCCATATGGCCAGG-3'
MC3.1745	5'-GCTATGGGATCCAACACAGTATG-3'
MC3.stop	5'-CTTCCTGTGTTACAGCATTGGA-3'
pATH-1/5"	5'-ACCAGCCGCCAGATTGAGATCC-3'
pATH-1/3"	5'-CGAGGCCCTTTCGTCTTG-3'

Tabelle 6 *Verwendete Oligonukleotide zur Herstellung und Sequenzierung der Fusionsproteine*

Die Tabelle enthält die bei der Herstellung und Sequenzierung der Fusionsproteine für hCAT-3, SLC7A4 (auch hCAT-4 genannt) und mCAT-3 verwendeten Oligonukleotide.

Der pATH-1-Vektor enthält neben einem Ampicillinresistenzgen ein Teil des Tryptophan-Operons, das für Tryptophan E (TrypE, ca. 37kDa) kodiert, daran schließt sich die multiple cloning site (MCS) an, die sich in der kodierenden Region befindet.

Zur Herstellung des hCAT-3-Fusionsproteins wurde das Plasmid HC3.pSP64T mit dem Restriktionsenzym BamH I restringiert. Die so entstandenen Fragmente wurden in einer präparativen Gelelektrophorese (III.2.1.3) aufgetrennt und das 327bp große Fragment aufgereinigt. In den offenen Leserahmen des mit BamH I restringierten und danach mit Phosphatase A behandelten pATH-1-Vektors wurde das 327bp große Fragment anschließend ligiert (III.2.1.6) (entstandenes Plasmid: HC3.pATH). Da vom pSP64T-Vektor noch ein Teil im Plasmid HC3.pATH vorhanden war, wurde es mit den Enzymen Sal I und Bgl II restringiert, wodurch 200bp herausfielen. Nach einer Aufreinigung über ein präparatives Gel (s.o.) wurde der Ansatz mit der DNA Large Polymerase I-Klenow (Promega, Mannheim) behandelt und mit einer Phenol/Chloroform Extraktion (III.2.1.4) aufgereinigt und anschließend religiert. Als Kontrollschnitt wurde das erhaltene Plasmid HC3.pATH-200 mit dem Enzym Sal I (Soll: ungeschnitten) bzw. mit BamH I (Soll 127bp) inkubiert.

Für das Konstrukt des SLC7A4-Fusionsproteins wurde eine PCR-Reaktion durchgeführt. Dabei diente das Plasmid HC4.pSP64T als Matrize. Verwendet wurden die Oligonukleotide HC4.BamH1757 in sense-Richtung und hCAT-4.stop (HC4as 1908) in antisense-Richtung. Die Bedingungen der PCR-Reaktion waren wie folgt:

1 Zyklus	95°C	5Min. (Denaturierung)
35 Zyklen	95°C	1Min. (Denaturierung)
	62°C	2Min. (Hybridisierung)
	72°C	3Min. (Polymerasereaktion)
1 Zyklus	72°C	10Min. (verlängerte Polymerasereaktion)

Das 120bp große Fragment wurde mit BamH I und Bgl II restringiert und anschließend über eine präparative Gelelektrophorese (s.o.) aufgereinigt. Das so behandelte Fragment wurde in den offenen Leserahmen des mit BamH I linearisierten und mit Phosphatase A behandelten pATH-1-Vektor ligiert. Das entstandene Konstrukt HC4.pATH wurde einem Kontrollschnitt mit den Enzymen EcoR V und BamH I unterzogen (Soll: 900bp und 2999bp).

Um ein Konstrukt für die Herstellung des mCAT-3/TrpE-Fusionsproteins zu erhalten, musste ebenfalls eine PCR-Reaktion durchgeführt werden. Als Matrize diente hier Kleinhirn-RNA der Ratte, die in einer Reversen Transkription (III.2.1.10) in cDNA umgeschrieben wurde. Mit den Oligonukleotiden MC3.1745 und MC3.stop wurde unter folgenden PCR-Bedingungen ein 112bp großes Fragment amplifiziert:

1 Zyklus	95°C	5Min. (Denaturierung)
35 Zyklen	95°C	1Min. (Denaturierung)
	55°C	2Min. (Hybridisierung)
	72°C	3Min. (Polymerasereaktion)
1 Zyklus	72°C	10Min. (verlängerte Polymerasereaktion)

Dieses Fragment wurde mit den Oligonukleotiden BamH I und Bgl II restringiert, in einer präparativen Gelelektrophorese (s.o.) aufgereinigt und in den offenen Leserahmen des mit BamH I restringierten und mit Phosphatase A behandelten pATH-1 Vektor ligiert. Das so entstandene Plasmid mc3.pATH wurde als Kontrolle mit den Enzymen Hind III und EcoR V restringiert (Soll: 1050 und 2839bp).

Bevor die jeweiligen Fusionsproteine exprimiert und Kaninchen damit immunisiert wurden, wurde jeder als richtig identifizierte Klon mit den Oligonukleotiden pATH-1/3" und pATH-1/5" sequenziert.

III.2.5.2 Expression von TrpE-Fusionsproteinen

Verwendete Lösungen und Medien

5xM9-Salz

NaHPO ₄ x4H ₂ O	0,24M
KH ₂ PO ₄	0,086M
NaCl	0,04M
NH ₄ Cl ₂	0,94M

M9-Medium mit Ergänzung (Supplement M9)

5x M9 Salz	1x
Pepton No.5 (Casamino acids, Gibco)	0,5% (m/V)

Das Medium wurde in Aqua bidest. angesetzt und danach 20Min. autoklaviert. Dem Medium wurde nach dem Autoklavieren MgSO₄ und CaCl₂ zugesetzt, die vorher ebenfalls autoklaviert wurden. Glucose, Thiamin und Ampicillin wurden in den unten angegebenen Konzentrationen in Aqua bidest. angesetzt, steril filtriert und dem Medium zugesetzt. Bei Bedarf wurde das Medium mit 20µg/ml Tryptophan (steril filtriert) ergänzt. Zur Herstellung von M9-Agar-Platten wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 15g/L select Agar hinzugefügt.

MgSO ₄	1mM
CaCl ₂	0,5mM
Glucose	5%
Thiamin	10µg/ml
Tryptophan	20µg/ml
Ampicillin	50µg/ml

Angesetzt wurde in Aqua bidest.

HEMGN-Puffer

KCl	100mM
Hepes pH 7,6	25mM
EDTA pH 8,0	0,1mM
MgCl ₂	12mM
Glycerol	10%
Nonidet P-40 (NP-40)	0,1%

Angesetzt wurde in Aqua bidest. Kurz vor dem Gebrauch wurden dem HEMGN-Puffer unter anderem Proteaseinhibitoren hinzugefügt:

DTT	1mM
Aprotinin	2µg/ml
Leupeptin	1µg/ml
Pepstatin	1µg/ml
PMSF	0,1mM
Natrium meta-bisulfit	0,1mM

Die unter Kapitel III.2.5.1 beschriebenen Plasmide wurden in Bakterien exprimiert. Ebenso wurde mit dem pATH-1 Vektor als Kontrolle verfahren. Verwendet wurde der *E.coli* Stamm XL-1 blue[®] (Stratagene, Heidelberg), in den die Plasmide transformiert und anschließend auf M9/Tryptophan/Ampicillin-Platten selektiert wurden. Je eine Kolonie wurde in einen Ansatz von 5ml M9/Tryptophan/Ampicillin-Medium gegeben und ü.N. bei 37°C inkubiert. Durch die Anwesenheit von Tryptophan wird die Expression des trpE-Operons unterdrückt. Deshalb wurde anschließend 1ml der ü.N.-Kultur in 100ml M9/Ampicillin-Medium ohne Tryptophan pipettiert (wodurch eine Induktion des Operons ausgelöst wurde) und bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 vermehrt. Anschließend wurde durch das Tryptophan-Analogon 3,3-Indolacrylsäure (10µg/ml, Sigma, Deisenhofen), mit dem die Bakterien für 4h bei 37°C kultiviert wurden, die Expression der Fusionsproteine zusätzlich induziert. Daran schloss sich eine Proteinextraktion an, deren Schritte alle bei 4°C oder auf Eis durchgeführt wurden. Die Bakterien wurden zentrifugiert (5.100rpm, 10Min., Avanti JA-25.50 Rotor J-30I) und anschließend in 2,5ml 1xPBS resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (4.400rpm, 10Min., Avanti JA-25.50 Rotor J-30I) wurde das Pellet in 1ml HEMGN-Puffer, dem Proteaseinhibitoren und Lysozym (0,5mg/ml) enthielt, resuspendiert und für 30Min. auf dem Schüttler inkubiert. Der Ansatz wurde dreimal für 45sec. mit Ultraschall behandelt und im Anschluss zentrifugiert (13.000rpm, 15Min., Tischzentrifuge). Dem Überstand wurde 1µl zur

Proteinkonzentrations-Bestimmung nach Bradford (III.2.4.2) entnommen und die Effizienz der Induktion durch Analyse von 10µl Lysat in einer SDS-PAGE (III.2.4.3) überprüft.

III.2.5.3 Aufarbeitung der Fusionsproteine zur Immunisierung durch präparative SDS-PAGE

In einer präparativen SDS-PAGE wurden die in Kapitel (III.2.5.2) hergestellten Protein-Lysate analysiert. In jede der neun Probenaschen wurde Gesamtprotein aufgetragen, das 1:1 mit Probenpuffer für Zelllysate versetzt wurde. Nachdem die Proteine im Gel ca. 1h aufgetrennt worden waren, wurde das Gel aus der Gel-Kammer entnommen und mit der Commassie-blue Färbelösung (III.2.4.3) in einer Petrischale überschichtet und für 10Min. auf dem Taumler gefärbt. Nach Anfärben des Gels wurde der Teil, der das überexprimierte Protein enthielt mit einem Skalpell herausgeschnitten. Die Menge des Fusionsproteins wurde abgeschätzt: der Anteil des überexprimierten Fusionsproteins betrug in der Regel etwa 1/10 der Gesamtproteinmenge. In ein Reaktionsgefäß wurde pro 1g erhaltenem Gel 1ml Aqua bidest pipettiert und mit dem Ultra-Turrax wenige Sekunden homogenisiert. Das Homogenat wurde bei -70°C gelagert.

III.2.5.4 Immunisierung von Kaninchen

Für die Herstellung der Antikörper gegen den C-Terminus von hCAT-3, SLC7A4 und mCAT-3 wurden jeweils drei zwölf Wochen alte Kaninchen bestellt (Charles River, Kißlegg). Die Tiere wurden für 7 Tage ohne Behandlung in ihren Käfigen eingewöhnt. Grundimmunisiert wurde mit je etwa 250µg des homogenisierten Proteins unter Zusatz von 1 Volumen vollständigem Freundschens Adjuvans (Complete Freund's Adjuvans, Lot 13N3750, Gibco BRL, Eggenstein). Dieses Adjuvans besteht aus einer Mineralölsuspension, die abgetötete Mycobakterien enthält. Dadurch wird das Immunsystem zusätzlich stimuliert. Die weitere Immunisierung wurde im Abstand von drei Wochen 2-4mal mit je etwa 250µg Protein, das mit 1 Volumen unvollständigem Freundschens Adjuvans (incomplete Freund's Adjuvans, Lot 28P9051, Gibco BRL, Eggenstein) vermischt wurde, durchgeführt. Das unvollständige Adjuvans besteht nur aus der Mineralölsuspension ohne die Mycobakterien. Nach 2-4maligem immunisieren wurden die Kaninchen heparinisiert (1000I.E./kg Heparin, Lequemin R N 25000, Hoffman Roche AG, Klinikapotheke). Danach wurden die Kaninchen durch einen Genickschlag getötet und die Carotis mit einem Schnitt eröffnet. Das Blut wurde in einem Becherglas aufgefangen, in dem 0,1M EDTA pH 7,4 in 0,9% NaCl vorgelegt war (Verhältnis Blut zu EDTA-Lösung 9+1). Die Menge des gewonnenen Blutes variierte zwischen 80-

120ml. Das Blut wurde zentrifugiert (30Min., 2.100rpm, Megafuge) und der Überstand in ein neues Schraubdeckel-Röhrchen überführt und nochmals zentrifugiert (30Min., 2.100rpm, Megafuge). Sollte das so gewonnene Plasma nicht sofort durch eine Affinitätschromatographie aufgereinigt werden (III.2.5.10), wurde es bei -20°C gelagert.

Gewinnung des Präimmun- und Immunplasmas

In den 7 Tagen Eingewöhnungszeit wurde den Kaninchen mit einer (2GGx1, 45x25mm) Injektions-Kanüle 9ml Präimmunplasma abgenommen. Außerdem wurde jedem Tier jeweils 10 Tage nach der Injektion mit dem Antigen ebenfalls 9ml Blut aus der Ohrvene entnommen. Das Blut wurde direkt in ein mit 1ml 0,1M EDTA pH 7,4 in 0,9% NaCl gefülltes Schraubdeckel-Röhrchen getropft. Das Blut wurde zentrifugiert (30Min., 2100rpm, Megafuge) und der Überstand in ein neues Schraubdeckel-Röhrchen überführt und nochmals zentrifugiert (30Min., 2.100rpm, Megafuge). Dieser Überstand wurde bei -70°C aufbewahrt und ein Aliquot, unter Verwendung von Lysaten aus Oozyten oder Zellen, die die jeweilige CAT-Isoform exprimierten, in einem Western-Blot (III.2.4.4) analysiert.

III.2.5.5 Klonierung von Konstrukten für die Expression von Glutathion-S-Transferase (GST) Fusionsproteinen zur Aufreinigung der Antikörper

Die Immunplasmen wurden mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Dazu wurden pGEX-Plasmide (Smith, 1993; Smith & Johnson, 1988) konstruiert, die für Fusionsproteine zwischen Glutathion-S-Transferase (GST) und denselben carboxyterminalen Fragmenten von hCAT-3, SLC7A4 und mCAT-3 kodieren, die auch zur Herstellung der TrpE Fusionsproteine benutzt worden waren (siehe III.2.5.1). Statt des pATH-1-Vektors wurde der pGEX-3X-Vektor verwendet. Als Kontrollschnitt für das Fusionsprotein des hCAT-3 wurde das erhaltene Plasmid HC3.pGEX-200 mit den Enzymen Sal I und Pst I inkubiert (entstandene Fragment-Größen: 900bp und 4150bp). Für das Fusionsprotein des SLC7A4 und des mCAT-3 wurde eine PCR-Reaktion durchgeführt wie in III.2.5.1 beschrieben. Das dabei entstandene 120bp (für SLC7A4) bzw. 112bp (für mCAT-3) große Fragment wurde mit dem Enzym Sma I blunt restringiert. Danach wurde die DNA in einem präparativen Gel (III.2.1.3) aufgetrennt, aufgereinigt und in den ebenfalls mit Sma I blunt restringierten pGEX-3x-Vektor ligiert. Dabei entstanden die Fusionsproteine HC4.pGEX-3x und mc3.pGEX-3x. Diese Konstrukte wurden als Kontrolle mit Bgl II und Pst I restringiert (entstandene Fragment-Größen: 900bp+4170bp für HC4.gGEX-3x und 1020bp+4040bp für mc3.gGEX-3x). Ein durch

Sequenzierung als richtig ausgewiesener Klon von HC3.pGEX-200, HC4.pGEX-3x und mc3.pGEX-3x wurde in eine Minipräparation (III.2.1.9) eingesetzt.

III.2.5.6 Expression von CAT/GST-Fusionsproteinen

Die erhaltenen Plasmide HC3.pGEX-200, HC4.pGEX-3x, mc3.pGEX-3x und der leere Vektor pGEX-3x wurden in den Bakterienstamm *E.coli* XL 1-blue[®] transformiert und auf LB/Ampicillin-Platten selektiert. In 62,5ml LB/Ampicillin-Medium wurde jeweils ein Klon der GST-Fusionsproteine überführt und ü.N. bei 37°C inkubiert. Davon wurden dann je 12,5ml in 125ml LB/Ampicillin-Medium gegeben und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 vermehrt. Die Expression der Fusionsproteine wurde durch Zugabe von 0,1mM Isoprpyl-1-thio-β-D-galactosid (IPTG, Boehringer Mannheim) für 5h induziert. Aufgrund der sterischen Ähnlichkeit mit Lactose ist IPTG in der Lage an den Lactose-Repressor zu binden und eine Derepression des Lactose-Operons zu bewirken. Zur Proteinisolierung wurden die Bakterien zentrifugiert (5.500rpm, 10Min., 4°C, JLA 16.250 Rotor, Avanti J-30I) und das entstandene Pellet in 3ml eiskaltem 1xPBS resuspendiert. Die Zellen wurden dann durch Ultraschallbehandlung (zweimal für 45sec.) lysiert. Danach wurde 1% Triton-X-100 zugegeben und zentrifugiert (8.000rpm, 5Min., 4°C, JLA 16.250 Rotor, Avanti J-30I). Der Überstand wurde abgenommen und die Proteinkonzentration (III.2.4.2) bestimmt. Um den Erfolg der Induktion zu überprüfen, wurden 10µl des Bakterien-Lysates in eine SDS-PAGE (III.2.4.3) eingesetzt. Die Lysate wurden bei -70°C gelagert oder sofort über HiTrap[™] Affinitätssäulen aufgereinigt (III.2.5.7).

III.2.5.7 Aufreinigung der GST-Fusionsproteine über HiTrap[™] Affinitätssäulen

Mit den HiTrap[™] Affinitätssäulen (Amersham pharmacia, Biotech) ist es möglich, GST-Fusionsproteine direkt aus Bakterienlysaten in einem Schritt aufzureinigen.

Verwendete Puffer

Bindepuffer

PBS pH 7,3	1x
Na ₂ HPO ₄	10mM
KH ₂ PO ₄ pH 7,3	1,8mM

Elutionspuffer

Tris-HCl 50mM

Glutathion reduziert pH 8,0 10mM

Das reduzierte Glutathion (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) wurde direkt eingewogen.

Die Säulen wurden nach Anweisung des Herstellers äquilibriert und dann mit maximal 8mg des unter III.2.5.6 gewonnenen Lysates beladen. Mit einer Luer-Spritze wurde es langsam (Flussrate 1-2ml pro Min.) durch die Säule gedrückt. Anschließend wurde die Säule mit 4ml Bindepuffer gewaschen und danach mit Elutionspuffer in 4 Fraktionen à 2ml eluiert. Durch eine SDS-PAGE und anschließende Commasie blue brilliant®-Färbung wurden die Fraktionen mit dem größten Anteil an Fusions-Protein ermittelt. Diese wurden zusammengefasst und dialysiert (III.2.5.8).

Um die Säule für eine erneute Präparation zu reinigen, wurden 2ml 6M Guanidinhydrochloride über die Säule gegeben. Um das aktive Guanidinhydrochloride abzutrennen, wurde die Säule erst mit 5ml 1xPBS, dann mit 4ml 70%igem Ethanol und wieder mit 5ml 1xPBS gewaschen. Zur Lagerung wurde die Säule mit 20%igem Ethanol überschichtet und bei 4°C aufbewahrt.

III.2.5.8 Konzentrierung von Proteinlösungen durch Dialyse gegen Polyethylenglykol 20.000

Verwendeter Puffer

Dialysepuffer

Polyethylenglykol (PEG) 20.000 (Serva, Boehringer Ingelheim) 20% (m/V)

PMSF 1mM

MOPS (3-(Morpholino)-propansulfonysäure) pH 7,5 (Roth, Karlsruhe) 0,1M

Angesetzt wurde in Aqua bidest.

10-20cm große Dialyse-Schlauchstücke wurden 10Min. in einer 2% Natriumhydrogencarbonat-Lösung, die 1mM EDTA pH 8,0 enthielt, gekocht. Die Schlauchstücke wurden danach in Aqua bidest. gewaschen und anschließend nochmals für 10Min. in einer 1mM EDTA-Lösung pH 8,0 gekocht. Nach dem Abkühlen wurden die Schlauchstücke in 20%igem Ethanol bei 4°C aufbewahrt. Vor dem Gebrauch wurden die Dialyseschläuche mit Aqua bidest. gespült und ein Ende mit einer Plastikklemme

verschlossen. Dann wurde die Proteinlösung eingefüllt und der Schlauch am oberen Ende ebenfalls mit einer Plastikklemme verschlossen. Die Konzentrierung wurde bei 4°C für mehrere Stunden oder ü.N. in 1-2l Dialysepuffer durchgeführt. Die dialysierten Lysate wurden nach einer Bestimmung der Proteinmenge nach Bradford, entweder bei -70°C gelagert oder direkt zur Herstellung der Affinitätsmatrix verwendet.

III.2.5.9 Herstellung der Affinitätsmatrix zur Aufreinigung der Immunplasmen

Die nach Kapitel III.2.5.6-8 hergestellten GST-Fusionsproteine wurden an das Gelmaterial Affi-Gel® 10 (Bio Rad, München) gebunden. Dazu wurden 4ml Affi-Gel® 10 gewaschen, indem sie in einem Becherglas 1:1 mit Aqua bidest. versetzt und mittels eines Glasstabes vermischt wurden. Dann wurde gewartet, bis sich das Affi-Gel® am Becherboden abgesetzt hatte und danach wurde der Überstand abgesaugt. Nach viermaliger Wiederholung wurde das Affi-Gel® in ein Schraubdeckel-Röhrchen überführt und zentrifugiert (300rpm, 2Min., 4°C, Megafuge). Der wässrige Überstand wurde abgenommen und zum Affi-Gel® 8mg (3ml) der kalten, konzentrierten Proteinlösung gegeben. Dies wurde für 4h auf dem Schüttler im Kühlraum bei 4°C inkubiert. Das Schraubdeckel-Röhrchen wurde für wenige Minuten stehen gelassen. Nachdem der Überstand abgenommen worden war, wurden für 1h durch Zugabe von 0,4ml 1M Ethanolamin pH 8,0 verbleibende Bindungen blockiert. Danach wurde das sedimentierte Material dreimal mit 0,1M MOPS pH 7,5 gewaschen und in eine Chromatographie-Säule (Poly-Prep Chromatographie columns, Bio Rad, München) überführt. Damit sich das Material setzen konnte, wurde die Säule für etwa 24h im Kühlraum in die Säulenvorrichtung gestellt. Erst dann wurde mit der Affinitätsaufreinigung der Plasmen begonnen (III.2.5.10).

III.2.5.10 Aufreinigung der Immunplasmen

Die wie im Kapitel III.2.5.9 beschrieben hergestellten Chromatographie-Säulen enthielten das Säulenmaterial zur Aufreinigung der Immunplasmen. Vor dem Versuch wurde das Säulenmaterial mit 16ml 1xPBS äquilibriert. Danach wurden unspezifische Bindungsstellen mit 4ml 0,1% BSA in PBS blockiert und die Säulen mit 12ml 1xPBS gespült. In der Zwischenzeit wurden 4ml des jeweiligen CAT-Antiserums aufgetaut und zur Inaktivierung des Komplements 30Min. bei 56°C inkubiert. Danach wurde zentrifugiert (2.000rpm, 10Min., Megafuge), der Überstand 1:1 mit 1xPBS versetzt und ü.N. im Kühlraum bei 4°C rezirkulierend über die Säule gegeben (Geschwindigkeit ca. 0,1ml/ Minute). Am nächsten Tag wurde das ü.N. rezirkulierte Plasma (als Durchlauf bezeichnet) in einem Becherglas

aufgefangen und das Säulenmaterial mit 12ml 1xPBS gewaschen. Zur Elution der Antikörper wurden 16ml 0,1M Glycin/HCl pH 2,5 1M NaCl langsam über die Säule getropft. In vier Schraubdeckel-Röhrchen wurden 400µl 1M Tris-HCl pH 8,0 vorgelegt. In diese wurden jeweils 4ml langsam von der Säule eingetropft. Der pH-Wert, der neutral sein sollte, wurde sofort kontrolliert und bei Bedarf mit 100mM Tris-HCl pH 8,0 auf einen neutralen pH-Wert eingestellt. Die vier Fraktionen wurden in den vier Schraubdeckel-Röhrchen aufgefangen und der Durchlauf wurde in einem Western-blot (III.2.4.4) analysiert. Die Fraktionen, die einen gut aufgereinigten Antikörper zeigten, wurden vereint und dann gegen 1xPBS dialysiert und mit 0,1% BSA versetzt. Danach wurden die affinitätsaufgereinigten Antikörper in 200µl Aliquots bei -70°C aufbewahrt.

III.2.6 Auswertung und Berechnung

Regression

Lineare und nicht-lineare Regression wurde mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) berechnet.

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

Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurden für die hCAT-3 exprimierenden Oozyten durch Messung der Transportaktivität bei verschiedenen Konzentrationen von basischen AS erstellt. Für die Eadie-Hofstee-Auftragung der Daten wurde, nach Abzug der Kontrollwerte; der Quotient aus Transportgeschwindigkeit (V/S) und Substratkonzentration gegen die Transportgeschwindigkeit (V) aufgetragen. Die lineare Regression der einzelnen Werte ergab eine Gerade. Der Kehrwert der Steigung der Geraden entsprach der Substratkonzentration bei halbmaximaler Transportaktivität (Michaelis-Menten-Konstante, K_M) und der Durchgangspunkt auf der x-Achse entsprach dem Wert der maximalen Transportgeschwindigkeit (V_{max}).

Statistik

Standardabweichungen, Standardfehler und alle Signifikanztests wurden am Computer mit Hilfe der Programme GraphPad Prism 3.0 und Microsoft[®] Excel (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. P-Werte von $>0,05$ wurden als nicht signifikant gewertet und mit „ns“ markiert.

IV Ergebnisse

IV.1 Charakterisierung der Transporteigenschaft des humanen kationischen Aminosäuretransporters CAT-3

Von den Arbeitsgruppen Ito und Hosokawa wurden jeweils die Transporteigenschaften des CAT-3 aus Maus und Ratte bestimmt und beschrieben (Ito *et al.*, 1997; Hosokawa *et al.*, 1999). Um festzustellen, ob das humane Orthologe hCAT-3 vergleichende Transporteigenschaften besitzt, wurden das Substratspektrum, die Transport-Kinetik (K_M und V_{max}), die Na^+ und pH-Abhängigkeit sowie die Trans-Stimulierbarkeit untersucht. Zu diesem Zweck wurde hCAT-3 cDNA (Vekony, Diplomarbeit 1999) für die *in vitro*-Transkription in den pSP64T-Vektor kloniert (siehe Kapitel III.2.2.3) und die cRNA in *X. laevis* Oozyten injiziert. Nach 2 Tagen Expression wurden Aufnahmestudien mit radioaktiv markiertem L-Arginin und weiteren Aminosäuren durchgeführt.

IV.1.1 Substratspektrum von hCAT-3

Zur Überprüfung des Substratspektrums von hCAT-3 wurde die Aufnahme von 10 verschiedenen Aminosäuren, davon 3 kationische, 6 neutrale und 1 saure getestet. Da bekannt ist, dass L-Histidin bei niedrigen pH-Werten vorwiegend in der protonierten Form vorliegt und dadurch von CAT-1 besser transportiert wird, wurde die Aufnahme von L-Histidin bei pH 5,5 und 7,5 gemessen.

Aus Abbildung 4 geht hervor, dass in Versuchen mit Oozyten für sämtliche kationischen Aminosäuren ein hCAT-3-vermittelter Transport zu erkennen war (signifikant ($p > 0,001$)). Der Transport lag 10fach höher als in Wasser-injizierten Kontroll-Oozyten. Im Gegensatz dazu konnte weder für die anionische (Abbildung 5) noch für die neutralen Aminosäuren (Abbildung 6) ein hCAT-3 vermittelter Transport in Oozyten gezeigt werden. Im Gegensatz zu hCAT-1, bei dem im saurem pH-Wert Histidin besser transportiert wurde als bei neutralem pH-Wert, konnte für hCAT-3 bei keinem der beiden pH-Werte ein Transport beobachtet werden (Abbildung 7).

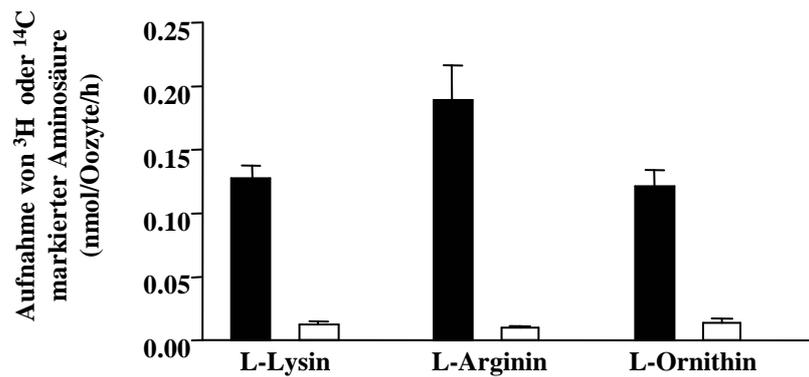


Abbildung 4 **Transportaktivität von hCAT-3 für basische Aminosäuren**

X. laevis Oozyten wurden mit 36ng hCAT-3 cRNA (in 36nl Wasser, schwarze Balken), oder mit 36nl Wasser (weiße Balken) injiziert. Nach 2 Tagen wurde die Aufnahme von L-[³H] Arginin, L-[³H] Lysin und L-[¹⁴C] Ornithin (je 100μM) für 15Min. bei 20°C gemessen. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen. n=15-30 bei 3 unterschiedlichen Präparationen.

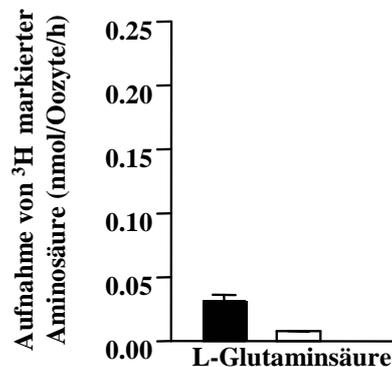


Abbildung 5 **Transportaktivität von hCAT-3 für L-Glutaminsäure**

X. laevis Oozyten wurden mit 36ng hCAT-3 cRNA (in 36nl Wasser, schwarze Balken), oder mit 36nl Wasser (weiße Balken) injiziert. Nach 2 Tagen wurde die Aufnahme von L-[³H] Glutaminsäure (100μM) für 15Min. bei 20°C gemessen. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen. n=15-30 bei 3 unterschiedlichen Präparationen.

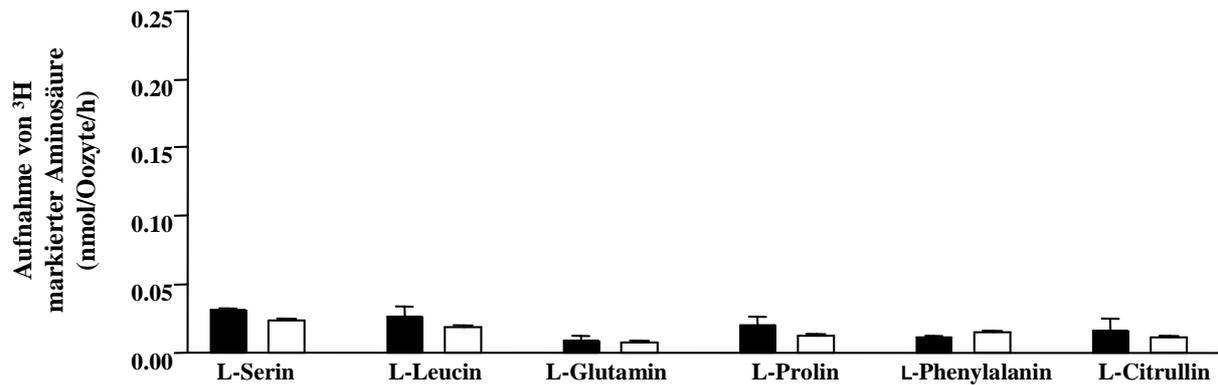


Abbildung 6 **Transportaktivität von hCAT-3 für neutrale Aminosäuren**

X. laevis Oozyten wurden mit 36ng hCAT-3 cRNA (in 36nl Wasser, schwarze Balken), oder mit 36nl Wasser (weiße Balken) injiziert. Nach 2 Tagen wurde die Aufnahme von L-[³H] Serin, L-[³H] Leucin, L-[³H] Glutamin, L-[³H] Prolin, L-[³H] Phenylalanin, L-[³H] Citrullin (je 100μM) für 15Min. bei 20°C gemessen. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen. n=15-30 bei 3 unterschiedlichen Präparationen.

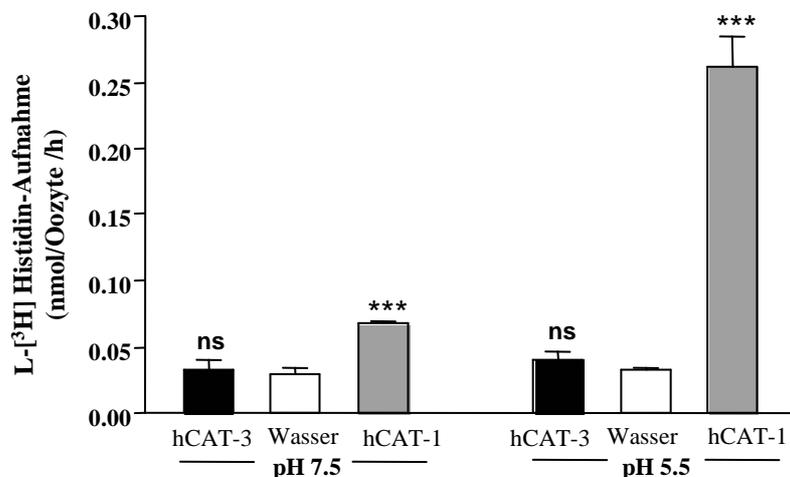


Abbildung 7 **Transportaktivität von hCAT-3 und hCAT-1 für L-Histidin bei verschiedenen pH-Werten**

X. laevis Oozyten wurden mit 36ng hCAT-3 (in 36nl Wasser, schwarze Balken) oder hCAT-1 cRNA (in 36nl Wasser, graue Balken) oder mit 36nl Wasser (weiße Balken) injiziert. Nach 2 Tagen wurde für beide CAT-Isoformen die Aufnahme von L-[³H] Histidin (100μM) bei pH 7,5 und 5,5 für 15Min. bei 20°C gemessen. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen. n=15-30 aus 3 unterschiedlichen Präparationen. *** p<0,001 bezogen auf die Wasser-Kontrolle.

IV.1.2 Hemmung des hCAT-3-vermittelten L-Arginin-Transports

Für rCAT-3 wurde laut Hosokawa *et al.* die Hemmung des L-Arginin-Transports durch D-Arginin gezeigt (Hosokawa *et al.*, 1999). Um dieses Ergebnis für den hCAT-3 zu überprüfen, wurde die L-Lysin und D-Arginin-vermittelte Hemmung der Transportaktivität gemessen.

Der durch hCAT-3 vermittelte L-Arginintransport (50 μ M) konnte durch ansteigende Konzentrationen von L-Lysin signifikant ($p < 0.01$) reduziert werden (ab 100 μ M L-Lysin) (Abbildung 8). Im Gegensatz dazu konnte erst bei einer Konzentration von 10mM D-Arginin eine signifikante Hemmung ($p < 0.01$) des L-Arginintransports gezeigt werden. D-Arginin stellt also für hCAT-3 wahrscheinlich kein Substrat dar.

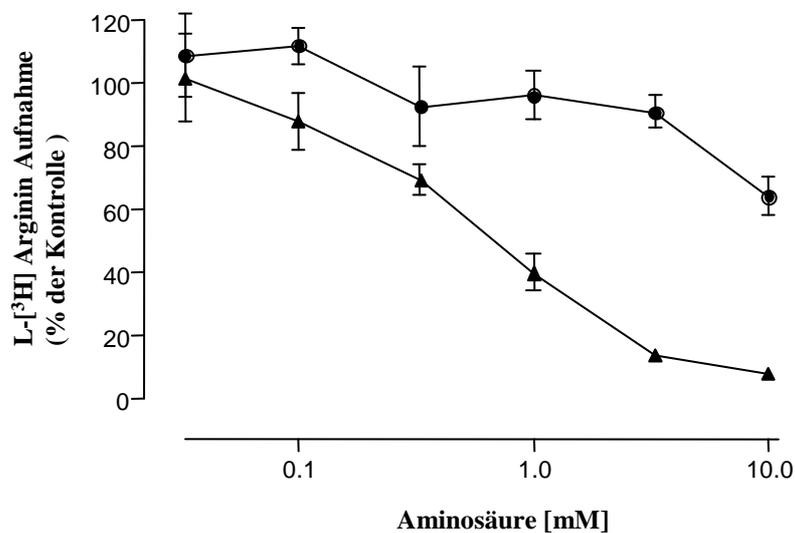


Abbildung 8 **Hemmung des hCAT-3 vermittelten L-Arginin-Transports**

X. laevis Oozyten wurden mit 36ng hCAT-3 cRNA (in 36nl Wasser) oder mit 36nl Wasser injiziert. Nach 2 Tagen wurde die Aufnahme von 50 μ M L-Arginin entweder in der Gegenwart von L-Lysin (Dreiecke) oder D-Arginin (Kreise) in steigenden Konzentrationen (0.03-10mM) für 15Min. bei 20°C gemessen. Die Werte der Wasser-injizierten Kontroll-Oozyten wurden abgezogen. Die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte mit Standardabweichungen. $n=15-30$ Werten pro Versuch aus 3 unterschiedlichen Präparationen.

IV.1.3 Kinetik des hCAT-3 vermittelten Transports für kationische Aminosäuren

Um die Affinität von hCAT-3 zu den kationischen Aminosäuren L-Arginin, L-Lysin und L-Ornithin zu bestimmen, wurde die Aufnahme jeder dieser radioaktiv markierten Aminosäure in hCAT-3-injizierten Oozyten nach 2 Tagen Expression in Abhängigkeit von der extrazellulären Aminosäure-Konzentration (0.03-10mM) gemessen (Abbildung 9).

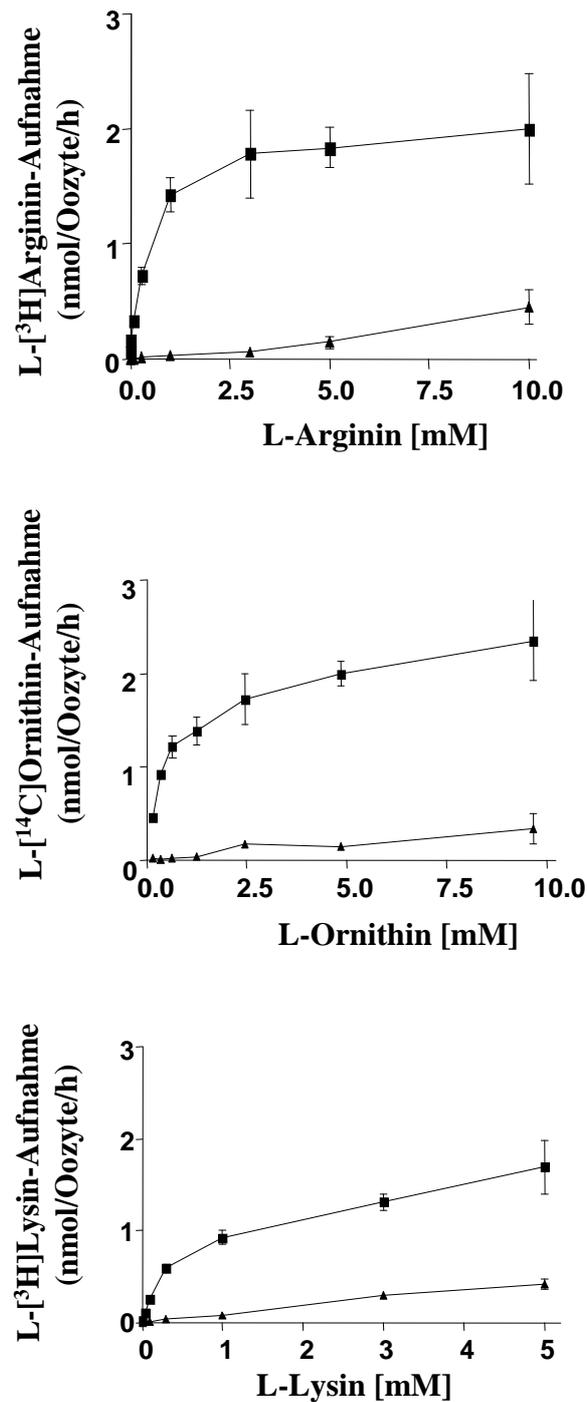


Abbildung 9 **Konzentrations-abhängige Aufnahme von kationischen Aminosäuren in hCAT-3 exprimierenden Oozyten**

X. laevis Oozyten wurden mit 36ng hCAT-3 cRNA (in 36nl Wasser, Quadrate) oder mit 36nl Wasser (Dreiecke), injiziert. Nach 2 Tagen wurde die Aufnahme von L-[³H] Arginin, L-[³H] Lysin und L-[¹⁴C] Ornithin in den angegebenen Konzentrationen (0.03-10mM) für 15Min. bei 20°C gemessen. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen von einem repräsentativen Experiment mit 5-10 Wiederholungen pro Datenpunkt.

Aus Abbildung 9 geht hervor, dass die Transportaktivität für L-Arginin, L-Lysin und L-Ornithin in hCAT-3-injizierten Oozyten Konzentrations-abhängig anstieg. Die Substratkonzentrationen bei halbmaximaler Transportaktivität (Michaelis-Menten-Konstante K_M) und die maximale Transportgeschwindigkeit (V_{max}) wurden durch eine Eadie-Hofstee-Auswertung bestimmt (nicht gezeigt). Dafür wurden die Werte der wasserinjizierten Kontroll-Oozyten von den Messwerten hCAT-3-exprimierender Oozyten abgezogen und der Quotient aus Transportgeschwindigkeit und Substratkonzentration (V/S) gegen die Transportgeschwindigkeit (V) aufgetragen. Die lineare Regression der einzelnen Werte ergab eine Gerade. Der Kehrwert der Steigung der Geraden entspricht der Substratkonzentration bei halbmaximaler Transportaktivität (K_M). Die berechneten Werte für V_{max} und K_M sind in der folgenden Tabelle (Tabelle 7) dargestellt.

Substrat	K_M (mM)	V_{max} (nmol/Oozyte/h)
L-Arginin	0.45±0.13	1.4±0.3
L-Lysin	0.65±0.23	1.4±0.7
L-Ornithin	0.91±0.26	2.5±0.8

Tabelle 7 Halbmaximale Transportaktivität (K_M) und maximale Transportgeschwindigkeit (V_{max}) von hCAT-3

Die Tabelle enthält die in einer Eadie-Hofstee-Auswertung ermittelten Werte für die halbmaximale Transportaktivität (K_M) und die maximale Transportgeschwindigkeit (V_{max}).

IV.1.4 Transportaktivität von hCAT-3 für L-Arginin bei unterschiedlichen pH-Werten

Die y^+ -Transportaktivität ist unabhängig vom extrazellulären pH-Wert. Um zu überprüfen, ob hCAT-3 auch bei anderen pH-Werten (als pH-Wert 7,4) aktiv ist, wurde die Aufnahme von L-Arginin bei unterschiedlichen pH-Werten untersucht. Der pH-Wert des Aufnahmebuffers wurde von 5,0 bis 8,5 in 0,5er Schritten gesteigert.

Der hCAT-3 vermittelte Transport zeigte keine signifikante Änderung bei den verschiedenen pH-Werten (Abbildung 10).

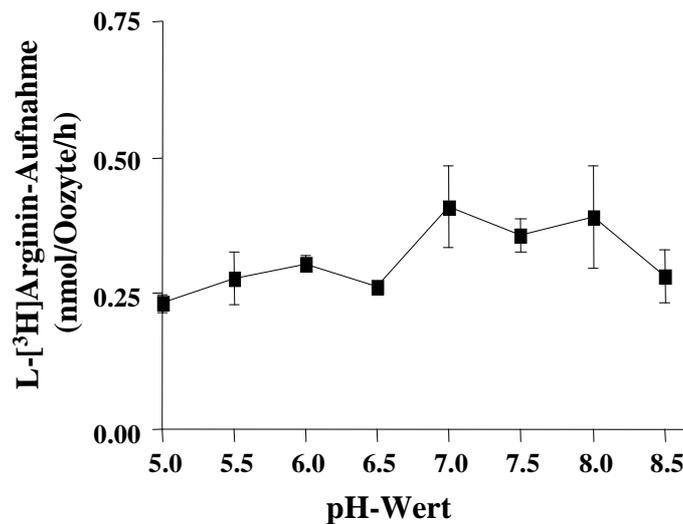


Abbildung 10 Transportaktivität von hCAT-3 für L-Arginin bei unterschiedlichen pH-Werten

X. laevis Oozyten wurden mit 36ng hCAT-3 cRNA (in 36nl Wasser, Quadrate), oder mit 36nl Wasser injiziert. Nach 2 Tagen wurde die Aufnahme von L-[³H] Arginin (100μM) bei den pH-Werten von 5,5 bis 8,5 in Schritten von 0,5 für 15Min. bei 20°C gemessen. Die Datenpunkte, von denen die Werte der mit Wasser-injizierten Oozyten abgezogen wurden, repräsentieren die Mittelwerte mit Standardabweichungen. n=15-30 Werten pro Versuch aus 3 unterschiedlichen Präparationen.

IV.1.5 Na⁺-Abhängigkeit des hCAT-3 vermittelten L-Arginin-Transports

Die Transportaktivität von System y⁺ ist unabhängig von Natrium-Ionen. Zur Untersuchung der Na⁺-Abhängigkeit von hCAT-3 wurde die Aufnahme von L-[³H] Arginin (100μM) über 15Min. zum einen in Na⁺-haltigem Aufnahmebuffer gemessen und zum anderen in Aufnahmebuffer, in dem NaCl durch die gleiche Konzentration an Cholinchlorid ersetzt worden war.

Der hCAT-3 vermittelte L-Arginin-Transport zeigte keinen signifikanten Unterschied, wenn Na⁺ durch Cholinchlorid ersetzt wurde (Abbildung 11).

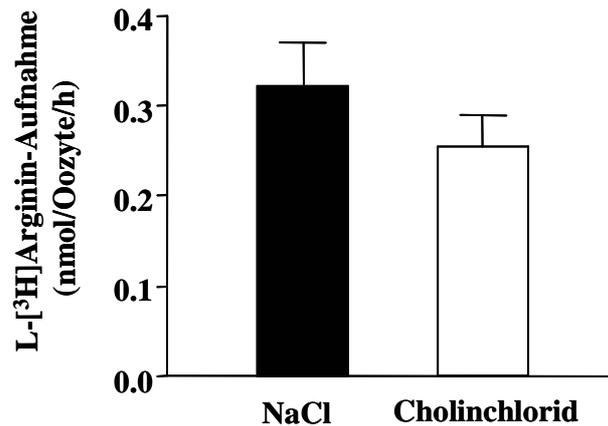


Abbildung 11 Na^+ -Abhängigkeit des hCAT-3 vermittelten L-Arginin-Transports

X. laevis Oozyten wurden mit 36ng hCAT-3 cRNA (in 36nl Wasser) injiziert. Nach 2 Tagen wurde die Aufnahme von L-[³H] Arginin (100 μM) für 15Min. bei 20°C in Aufnahmebuffer gemessen, der 100mM NaCl (schwarze Säule) oder 100mM Cholinchlorid (weiße Säule) enthielt. Die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte mit Standardabweichungen. $n=15-30$ Werten pro Versuch aus 3 unterschiedlichen Präparationen.

IV.1.6 Abhängigkeit des hCAT-3 vermittelten Transports von Substrat auf der Trans-Seite

White und Christensen (1982) hatten gezeigt, dass die Geschwindigkeit der L-Arginin-Aufnahme in Zellen, die System y^+ exprimieren durch die Anwesenheit von intrazellulären basischen Aminosäuren stimuliert wird (White und Christensen, 1982). Dieser durch Abhängigkeit von Substrat auf der Trans-Seite gekennzeichnete Transport wird als Trans-Stimulation bezeichnet und wurde für die Isoformen CAT-1 und 2B beschrieben (Closs *et al.*, 1993a; Kakuda *et al.* 1993; Closs *et al.*, 1997). Die Trans-Stimulation von hCAT-3 wurde mit Hilfe von Efflux-Studien untersucht. Hierbei wurden die Oozyten mit radioaktiv markiertem L-Arginin injiziert und der Efflux mit L-Arginin als Trans-Substrat gemessen. Der hCAT-3-vermittelte Efflux war in Anwesenheit von 1mM L-Arginin (Trans-Substrat) 2fach gesteigert im Vergleich zum L-Arginin freien Puffer (Abbildung 12).

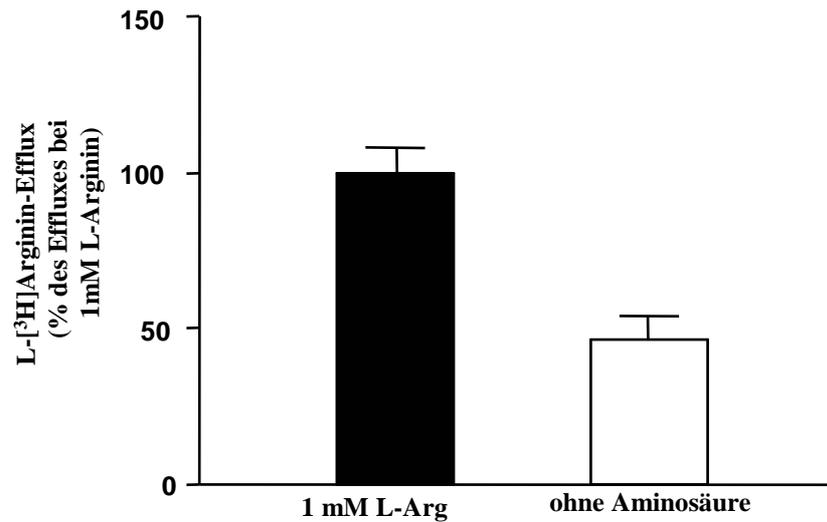


Abbildung 12 *Abhängigkeit des hCAT-3 vermittelten Transports von Substrat auf der Trans-Seite*

X. laevis Oozyten wurden mit 36ng hCAT-3 cRNA (in 36nl Wasser) injiziert. Zwei Tage später wurden jeweils 3 Oozyten ein zweites Mal mit 3,6nmol L-[³H] Arginin (in 36nl Wasser) injiziert. Danach wurden die Oozyten entweder in 200µl Puffer mit 1mM L-Arginin oder ohne Aminosäure bei 20°C für 30Min. inkubiert. Gemessen wurde die im Inkubationspuffer enthaltene Radioaktivität. Die Werte der Wasser-injizierten Kontroll-Oozyten wurden abgezogen. Die Ergebnisse wurden in Prozent des Efflux bei 1mM extrazellulärem L-Arginin aufgetragen. Die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte mit Standardabweichungen mit n=30-60 Werten pro Versuch aus 3 unterschiedlichen Präparationen.

IV.2 Expression von hCAT-3 in verschiedenen humanen Geweben und Zelllinien

Im Gegensatz zu hCAT-1, von dem bekannt ist, dass er ubiquitär exprimiert wird, wurde die CAT-3-Expression in Maus und Ratte als auf das Gehirn beschränkt beschrieben. Für unsere Arbeitsgruppe war es aufgrund dieser Ergebnisse interessant, mögliche Unterschiede in der Expression des humanen CAT-3 im Vergleich zu Maus und Ratte herauszufinden. Auch die übrigen CAT-Isoformen sollten auf Gemeinsamkeiten und Unterschiede in ihrer Expression mit der des hCAT-3 verglichen werden. Die von Hosokawa *et al.* beschriebene Neuronenspezifische Expression des rCAT-3 wirft die Frage auf, ob CAT-3 eine spezifische Rolle bei der Substratversorgung der neuronalen NO-Synthase (nNOS) spielen könnte (Hosokawa *et al.*, 1997). Um diese Fragestellung zu beantworten wurde die Expression des hCAT-3 mittels eines kommerziellen Dot-Blot-Filters, auf dem sich Poly (A)⁺-RNA von 76 verschiedenen humanen Geweben und Zelllinien befand, untersucht. Mit Hilfe der Plasmide pSP_hCAT-1AB1, p_hCAT-2A 104, HC3.pSP64T, hCAT-4.pSP64T und pNO1wt wurden $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP markierte Sonden für die Isoformen hCAT-1, -2, -3, dem SLC7A4 und der humanen nNOS hergestellt, mit denen nacheinander hybridisiert wurde. Das erhaltene Expressionsmuster der CAT-Isoformen und der nNOS wurden darauf miteinander verglichen.

Die Hybridisierung der Membran mit der hCAT-3-Sonde zeigte, dass hCAT-3 nicht ausschließlich in verschiedenen Bereichen des Gehirns exprimiert wird, sondern auch in einer Anzahl verschiedener anderer Gewebe und Zelllinien (Abbildung 13). Am stärksten exprimiert war hCAT-3 im Thymus und in Burkitt's Lymphomzellen. Auch in Uterus, Testis, Brustdrüse und MOLT-4 Leukämiezellen war das Signal der hCAT-3-Expression höher als in Gehirn-Bereichen mit der stärksten hCAT-3-Expression (Thalamus > Amygdala > Hippocampus). Im Ovar und Magen war eine geringe hCAT-3-Expression detektierbar, die etwa vergleichbar war mit der Signalstärke der Medulla oblongata oder des Nucleus caudatus.

Beim Vergleich des Expressionsmusters von hCAT-3 mit den anderen CAT-Isoformen zeigte sich, dass hCAT-1 und -2 in den meisten Geweben, auch im zentralen Nervensystem (ZNS), detektierbar waren. Deutlich schwächer war SLC7A4 exprimiert. Dieser zeigte seine höchste Expression in Plazenta und Testis. Allerdings konnten in Testis alle CAT-Isoformen detektiert werden.

In der Plazenta war hCAT-3 als einzige Isoform nicht detektierbar. Zwar wurde hCAT-3 in Thymus, Uterus und Brustdrüse mit den anderen Isoformen (außer SLC7A4) coexprimiert aber er schien im Thymus die dominante Isoform zu sein. Einerseits zeigten Gewebe mit der höchsten CAT-3-Expression im ZNS (Thalamus und Amygdala) nur eine moderate nNOS-

Expression, andererseits zeigten die Gewebe, in denen die nNOS stark exprimiert wird, für hCAT-3 kaum (Nucleus caudatus) oder gar kein Signal (Cerebellum, Pons, Putamen). Es gibt also kein überlappendes Expressionsmuster von hCAT-3 und der nNOS. Die stärkste Expression für die nNOS wurde im Skelettmuskel und geringere Signale in Niere, verschiedenen Gehirnbereichen, Pankreas, Prostata, Speicheldrüse und Darm detektiert.

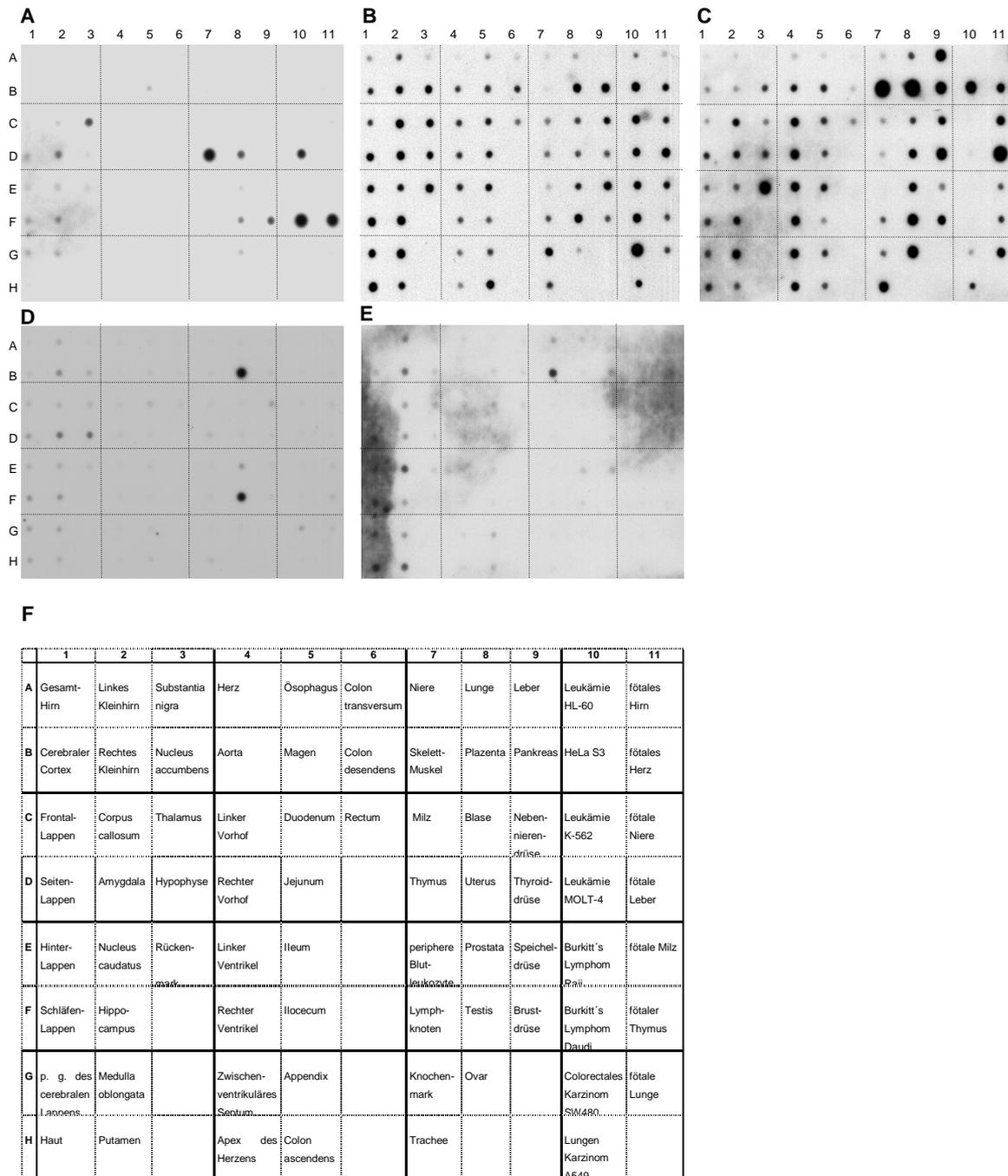


Abbildung 13 Expression von CAT-Isoformen und nNOS in verschiedenen humanen Geweben und Zelllinien (Dot-Blot-Analyse)

Eine kommerzielle Membran, die poly(A)⁺-RNA von 68 humanen Geweben und 8 Zelllinien enthielt, wurde nacheinander mit einer ³²P dCTP markierten cDNA-Sonde für hCAT-3 (A), hCAT-1 (B), hCAT-2 (C), SLC7A4 (D) und der humanen nNOS (E), hybridisiert. Nach jeder Hybridisierung wurde die jeweilige Sonde von der Membran entfernt. Ein Röntgenfilm wurde der Membran für 1-2 Tage exponiert. Die Membran war in ein Koordinatensystem eingeteilt und jedes Gewebe oder jede Zelllinie wurde durch einen Buchstaben (Senkrechte) und eine Zahl (Waagerechte) angegeben. Die Auswertung des Röntgenfilms erfolgte durch das Übereinanderlegen von Film und dem mitgelieferten Raster (F).

Die durch die Filterhybridisierung dargestellte hCAT-3-Expression in verschiedenen peripheren Geweben sollte durch eine unabhängige Methode verifiziert werden. Aus diesem Grund wurde mit Hilfe der RNase-Verdauungsschutzanalyse die hCAT-3-Expression mit RNA aus Brustgewebe, Uterus, Ovar und Testis untersucht. Plazenta diente als Negativkontrolle.

Sowohl in Uterus als auch in Testis war nach einem Tag Expositionszeit des Röntgenfilms ein Signal detektierbar (Abbildung 14). Nach 7 tägiger Expositionszeit (Abbildung 14, kleiner Geleinschub oben) konnte auch ein Signal in Brustgewebe und Ovar detektiert werden. Wie zu erwarten war, zeigte sich in der Negativkontrolle (Plazenta) auch nach längerer Exposition kein Signal.

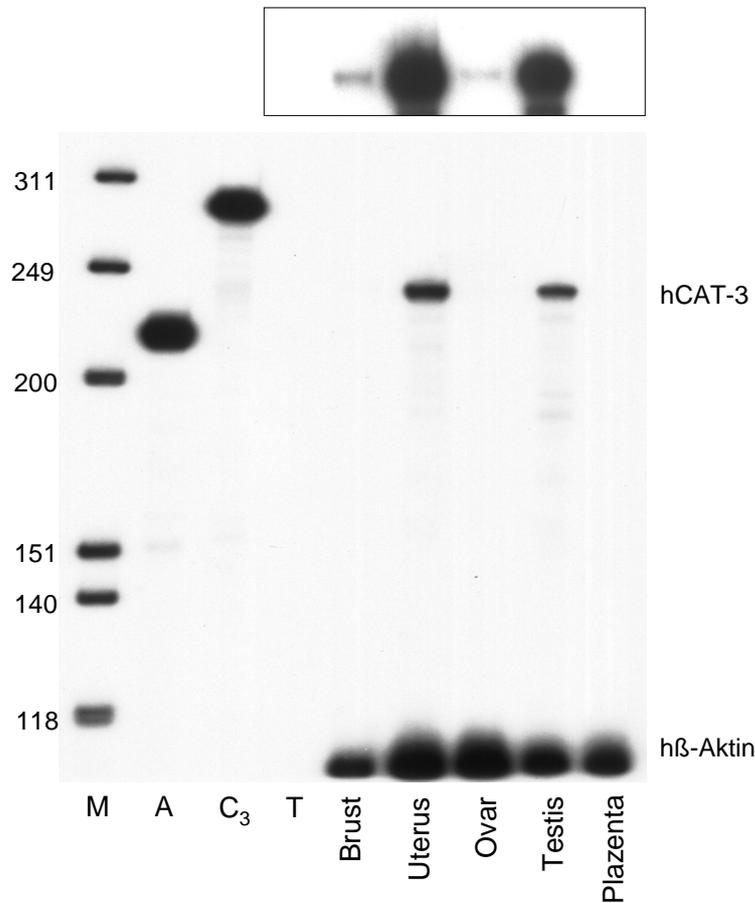


Abbildung 14 Nachweis von hCAT-3-mRNA in Brustgewebe, Uterus, Ovar, Testis und Plazenta (RNase-Verdauungsschutzanalyse)

Die Gesamt-RNA aus Brustgewebe, Testis und Plazenta wurde nach Chromczynski und Sacchi isoliert. Die RNA von Ovar und Uterus wurden von der Firma Stratagene gekauft. Jeweils 20µg mRNA wurden mittels RNase-Verdauungsschutzanalyse untersucht. Zur Standardisierung wurde eine Sonde für hβ-Aktin eingesetzt. Ein Ansatz mit tRNA diente zur Kontrolle. Nach der RNase-Behandlung wurden die geschützten Fragmente (hCAT-3: 243nt; hβ-Aktin: 108nt) über ein 6%iges, denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetrennt. Ein Röntgenfilm wurde dem Gel für einen Tag exponiert. (Der obere Geleinschub zeigt eine 7 tägige Expositionszeit des Röntgenfilms). M: DNA-Größenmarker pG12-Basic (Promega) verdaut mit Hinf I. A: hβ-Aktin-Sonde (unverdautes ³²P-markiertes Fragment 228nt). C₃: hCAT-3-Sonde (unverdautes ³²P-markiertes Fragment 292nt). T: tRNA. Plazenta diente als Negativkontrolle. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Autoradiogramm.

IV.3 Gewinnung polyklonaler Antikörper gegen den kationischen Aminosäure-Transporter CAT-3 und das verwandte Protein SLC7A4.

Daten zur Expression von CAT-3 und SLC7A4 konnten ohne spezifische Antikörper nur in RNA-Analysen erhoben werden. Mit spezifischen Antikörpern kann zum einen das Expressionsmuster und die subzelluläre Verteilung der erwähnten Isoformen genau untersucht werden. Zum anderen kann ein mögliches SLC7A4-assoziiertes Protein identifiziert werden, dessen Präsenz für die Funktionsfähigkeit von SLC7A4 notwendig sein könnte. Deshalb wurden Isoform-spezifische Antikörper gegen die C-Termini der humanen CAT-3 und SLC7A4-Proteine und des murinen CAT-3 –Proteins generiert .

IV.3.1 Generierung und Induktion von CAT/Tryptophan E (TrpE)-Fusionsproteinen

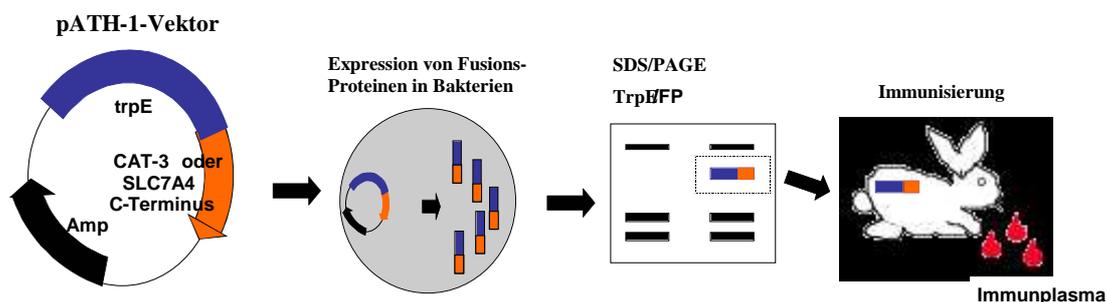


Abbildung 15 Schematische Darstellung der Generierung der trpE-FP mit den C-Termini der CAT-Proteine

Nach Klonierung der entsprechenden cDNA-Fragmente in den Expressionsvektor pATH-1 wurden die Fusionsproteine in XL-1 Blue-Bakterien zur Expression gebracht. Nach Lyse der Zellen wurden die trpE-Fusionsproteine in einer präparativen SDS-PAGE aufgetrennt und zur Immunisierung von Kaninchen verwendet.

Zur Herstellung von CAT/TrpE-Fusionsproteinen wurden die jeweiligen cDNA-Fragmente, die für die C-Termini von hCAT-3, SLC7A4 bzw. mCAT-3 kodieren in den bakteriellen Expressionsvektor (pATH-1) gesetzt, der ein Gen aus dem Tryptophan-Operon (TrpE) enthält (Abbildung 15), das für 323 aminoterminalen Reste der Anthranilatsynthetase kodiert

(Massengewicht ca. 37kDa). Die Anzahl der AS für die die verwendeten cDNA-Fragmente kodieren sowie die errechneten Massengewichte (MG) der TrpE-Fusionsproteine sind in Tabelle 8 aufgeführt.

	C-Terminales Fragment	TrpE/CAT-FP-Konstrukt	Molekularmasse des TrpE/CAT-FP (kDa)
hCAT-3	35 AS	HC3.pATH-1	40.7
SLC7A4	49 AS	HC4.pATH-1	42.3
mCAT-3	35 AS	mCAT-3.pATH-1	40.7

Tabelle 8 Fusionsproteine (FP) zwischen TrpE und den C-Termini von hCAT-3, SLC7A4 und mCAT-3 zur Immunisierung von Kaninchen

In der Tabelle sind die Anzahl der C-terminalen Aminosäuren aufgeführt, für die die zur Klonierung der Fusionsprotein-Konstrukte verwendeten cDNA-Fragmente kodieren. Außerdem der Expressionsvektor (pATH-1, 37kDa) und das resultierende CAT/pATH-Konstrukt mit entsprechendem Massengewicht (m) der resultierenden FP.

Die Plasmide wurden in *XL-1-Blue*-Bakterien transformiert und die Expression der Fusionsproteine induziert. Nach Lyse der Zellen wurde das Ergebnis der Induktion im SDS-PAGE überprüft (Abbildung 16).

Die trpE-Fusionsproteine HC3-pATH-1, HC4.pATH-1 und mC3-pATH-1 waren nach der Induktion mit 3,3-Indolacrylsäure stark überexprimiert, wobei HC3-pATH-1 immer am stärksten induziert war. Die Fusionsproteine wanderten in der SDS-PAGE bei den in Tabelle 8 errechneten Massengewichten (m). Die CAT-Proteine zeigten in früheren Versuchen im SDS-Gel nicht immer das errechnete Massengewicht, weswegen in den SDS-Gelen als Größenvergleich meist eine Probe des induzierten pATH-1-Expressionsvektors und eines weiteren induzierten trpE-Fusionsproteins aufgetragen wurde. Die jeweiligen Banden (Abbildung 16) wurden homogenisiert und das Homogenat zur Immunisierung für je 3 Kaninchen verwendet (Schema: Abbildung 15, III.2.5.4).

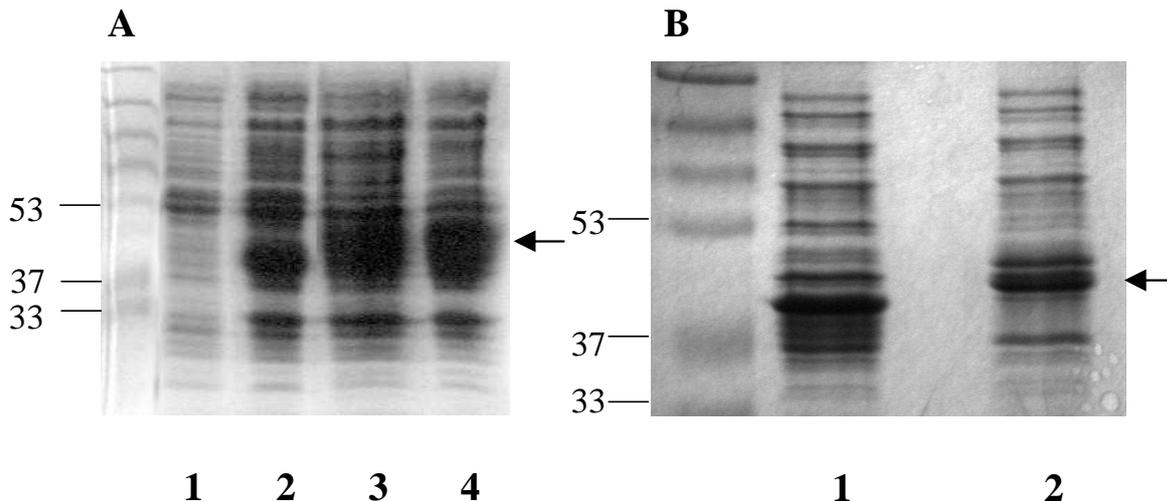


Abbildung 16 **Induktion der Expression der *trpE*-Fusionsproteine (SDS-PAGE)**

Die Expression der *TrpE*-Fusionsproteine wurde durch Zugabe von 10 µg/ml 3,3-Indolacrylsäure für 4h bei 37°C induziert. Nach Lyse der Zellen wurden je 20 µg Gesamtprotein aus Bakterienlysat über SDS-PAGE (12,5% ige Gele) aufgetrennt und mittels Commassie-blue Färbung sichtbar gemacht. Die Abbildung A zeigt XLI-Blue-Bakterienlysat als negativ-Kontrolle (Spur 1), und den *pATH-1*-Expressionsvektor (Spur 2, 37kDa). Spur 3 und 4 zeigen die Induktion des HC3.*pATH-1*-(Spur 3, 40.7kDa) bzw. des mC3.*pATH-1*-Konstruktes (Spur 4, 40.7kDa). Abbildung B zeigt die Induktion des *pATH-1*- Expressionsvektors als Kontrolle (Spur 1, 37kDa) und des HC4.*pATH-1* Konstruktes (Spur 2, 42.3kDa). Links neben den Abbildungen sind die Molekulargewichte der vorgefärbten Markerproteine in kDa angegeben. Die Abbildungen zeigen repräsentative Gele.

IV.3.2 Überprüfung des gewonnenen Präimmunplasmas

Um sicherzustellen, dass die zur Immunisierung verwendeten Kaninchen noch keine unspezifische Immunantwort bzw. unspezifische Signale zeigten, wurde den Kaninchen vor der Immunisierung Blut entnommen und in einer Western-Blot Analyse untersucht.

Das vor der Immunisierung aus der Ohrvene der Kaninchen entnommene Präimmunplasma zeigte wie erwartet keine Banden oder nur unspezifische, was daran zu erkennen war, dass sie auch in den Lysaten der mit Wasser-injizierten Kontroll-Oozyten sichtbar waren (Abbildung 17). Es ist möglich, dass im Präimmunplasma unspezifische Banden detektierbar sind, da die Tiere trotz unterschiedlicher Vorsichtsmaßnahmen verschiedenen Antigenen ausgesetzt waren.

Für die Präimmunplasmen der Kaninchen die mit den Konstrukten HC3.*pATH-1* bzw. HC4.*pATH-1* immunisiert werden sollten, wurden Lysate von hCAT-3- bzw. SLC7A4-exprimierenden Oozyten verwendet. Um das Rohplasma des Kaninchens zu testen, was später

mit dem mCAT-3.pATH-1-Konstrukt immunisiert werden sollte, wurden Lysate von hCAT-3-exprimierenden Oozyten verwendet.

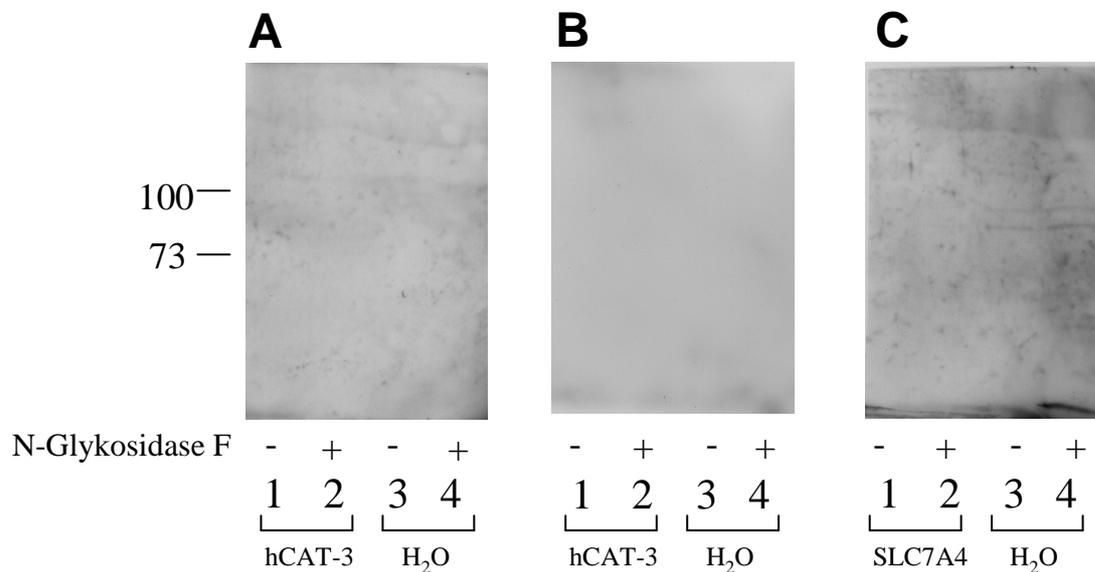


Abbildung 17 Überprüfung des gewonnenen Präimmunplasmas (Western-Blot)

Die Abbildung zeigt in Spur 1 und 2 Lysate von hCAT-3-exprimierenden Oozyten (Abbildung A+B) und Lysate von SLC7A4-exprimierenden Oozyten (Abbildung C). In den Spuren 3 und 4 wurden jeweils Lysate von Wasser-injizierten Kontroll-Oozyten aufgetragen. Die Spuren 2 und 4 zeigen mit N-Glykosidase F behandelte Lysate. Je 20µg Gesamtprotein wurden über SDS-PAGE aufgetrennt (12,5% ige Gele) und auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet. Die Proteine wurden mit dem Präimmunplasma von Kaninchen, die später entweder mit dem Fusionsprotein-Konstrukt HC3.pATH-1, HC4.pATH-1 oder mCAT-3.pATH-1 immunisiert worden waren, inkubiert (1:100) (Um das Präimmunplasma des Kaninchens zu testen, was später mit dem mCAT-3.pATH-1-Konstrukt immunisiert werden sollte, wurde Lysat von hCAT-3-exprimierenden Oozyten verwendet). Anschließend wurden die Membranen mit einem sekundären Antikörper (anti-Kaninchen-IgG Peroxidase gekoppelt 1:10.000) inkubiert. Durch Chemilumineszenzreagenz wurden die Signale sichtbar gemacht und ein Röntgenfilm exponiert. Links neben den Abbildungen sind die Molekulargewichte der vorgefärbten Markerproteine in kDa angegeben. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Gel für das jeweilige CAT-Präimmunplasma.

IV.3.3 Überprüfung der gewonnenen, noch nicht affinitäts-aufgereinigten Immunplasmen

Um zu überprüfen, ob in den gewonnenen, noch nicht affinitäts-aufgereinigten Immunplasmen gegen das CAT-3- bzw. SLC7A4-Protein spezifische Signale detektierbar waren, wurden diese in Western-Blot Analysen eingesetzt. In diesen Analysen wurden Lysate von U373MG Glioblastom-Zellen verwendet, die hCAT-3.EGFP und SLC7A4.EGFP überexprimierten. Als Kontrolle wurden Lysate von nicht transfizierten U373MG-Zellen eingesetzt.

Wie in Abbildung 18 für das anti-hCAT-3-Immunplasma gezeigt, wurde in den noch nicht aufgereinigten Immunplasmen kein spezifisches Signal gefunden. Ähnliche Ergebnisse ergaben sich für alle Immunplasmen.

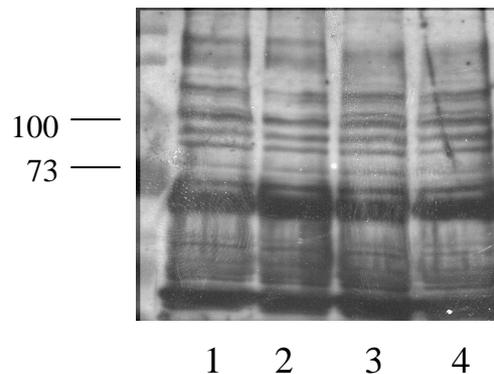


Abbildung 18 Überprüfung des gewonnenen anti-hCAT-3-Immunplasmas (Western-Blot)

Das nach der Immunisierung gewonnene Immunplasma, wurde zuerst ohne Affinitätsaufreinigung in einer SDS-PAGE (12,5% iges Gel) untersucht. Die Abbildung zeigt in Spur 1 und 2 Lysat von U373MG Glioblastom-Zellen, in denen hCAT-3 überexprimiert wurde. In den Spuren 3 und 4 wurde das Lysat von U373-Kontroll-Zellen aufgetragen. In den Spuren 2 und 4 wurde das Lysat mit Glykosidase F behandelt. Die Blots wurden mit dem Immunplasma anti-hCAT-3 (primärer Antikörper 1:100) und anschließend mit einem sekundären Antikörper (anti-Kaninchen-IgG Peroxidase gekoppelt 1:10.000) inkubiert. Durch Chemilumineszenzreagenz wurden die Signale sichtbar gemacht und ein Röntgenfilm exponiert. Links neben der Abbildung sind die Molekulargewichte der vorgefärbten Markerproteine in kDa angegeben. Gezeigt ist ein repräsentatives Gel.

IV.3.4 Generierung und Induktion von GST-FP und Affinitätsaufreinigung der Antikörper

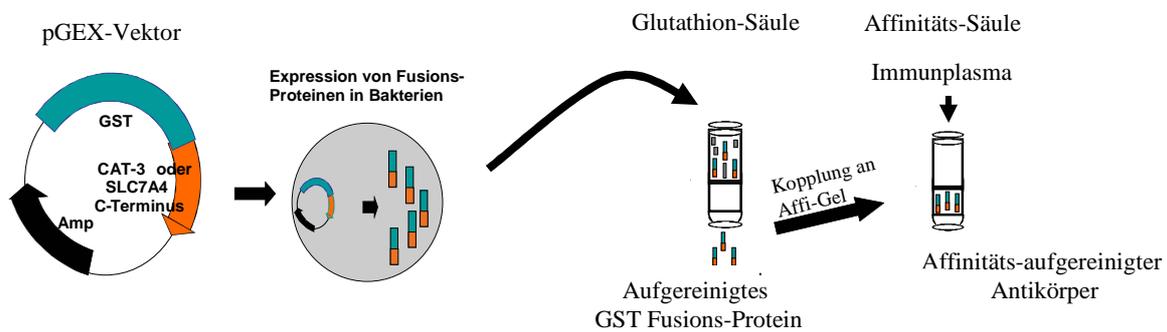


Abbildung 19 Schematische Darstellung der Generierung von Fusionsproteinen zwischen GST und C-Termini der CAT-Proteine zur Aufreinigung der Immunplasmen

Der gewünschte C-terminale Bereich wurde in den pGEX-2T Expressionsvektor kloniert und die Fusionsproteine in XLI-Blue-Bakterien exprimiert. Die GST-Fusionsproteine wurden nach der Affinitätsaufreinigung über Glutathion-Säulen an eine Affinitätsmatrix gekoppelt mittels derer die gewonnenen Immunplasmen aufgereinigt wurden.

Es wurden Fusionsproteine zwischen der Glutathion-S-Transferase (GST, Massengewicht ca. 26 kDa) und den C-terminalen 35 bzw. 49 Aminosäuren von CAT-3 bzw. SLC7A4 generiert (Abbildung 19). Die Anzahl der Aminosäuren für die verwendeten cDNA-Fragmente kodieren, sowie die errechneten Massengewichte (m) der GST-Fusionsproteine sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

	C-terminales Fragment	GST/CAT-FP- Konstrukt	Massengewichte der GST-CAT- Fusionsproteine (kDa)
hCAT-3	35 AS	HC3.pGEX-2T	30.1
SLC7A4	49 AS	HC4.pGEX-2T	31.7
mCAT-3	35 AS	mC3.pGEX-2T	30.1

Tabelle 9 Fusionsproteine zur Generierung und Aufreinigung von Antikörpern gegen die C-Termini von hCAT-3, SLC7A4 und mCAT-3

In der Tabelle ist die Anzahl der C-terminalen Aminosäuren aufgeführt, die von den zur Klonierung der Fusionsprotein-Konstrukte verwendeten cDNA-Fragmente kodiert werden. Außerdem sind der verwendete Expressionsvektor (pGEX-2T, 26kDa) und das resultierende CAT-pGEX-Konstrukt mit entsprechendem Massengewicht der Fusionsproteine angegeben.

Die Plasmide wurden in *XLI-Blue*-Bakterien transformiert und die Expression der Fusionsproteine induziert. Nach Lyse der Zellen wurde das Ergebnis der Induktion im SDS-PAGE überprüft (Abbildung 20). Die Fusionsproteine HC3.pGEX-2T, mC3.pGEX-2T und HC4.pGEX-2T ließen sich stark in Bakterien überexprimieren und zeigten im SDS-PAGE die erwarteten Molekularmassen von 30.1 bzw. 31.7kDa (Molekularmassen siehe Tabelle 9). Die GST-Fusionsproteine wurden dann über Glutathion-gekoppelte, epoxy-aktivierte Sepharose B6-Säulen affinitätsaufgereinigt (Abbildung 21). Dabei wurden die Fusions-Proteine im letzten Schritt in 4 Fraktionen eluiert. Der Hauptteil des eluierten Proteins befand sich meist in den Fraktionen 1 und 2. Diese Fraktionen wurden zusammengefasst und dialysiert. Die Affinitätsaufreinigung war bei allen GST-Fusionsproteinen erfolgreich. Die aufgereinigten GST-Fusionsproteine wurden an Affi-Gel® 10 gekoppelt. Mit Hilfe dieser Affinitätsmatrix wurden schließlich die Immunplasmen aufgereinigt, die nach dem Ausbluten der Kaninchen gewonnenen worden waren (Schema: Abbildung 19).

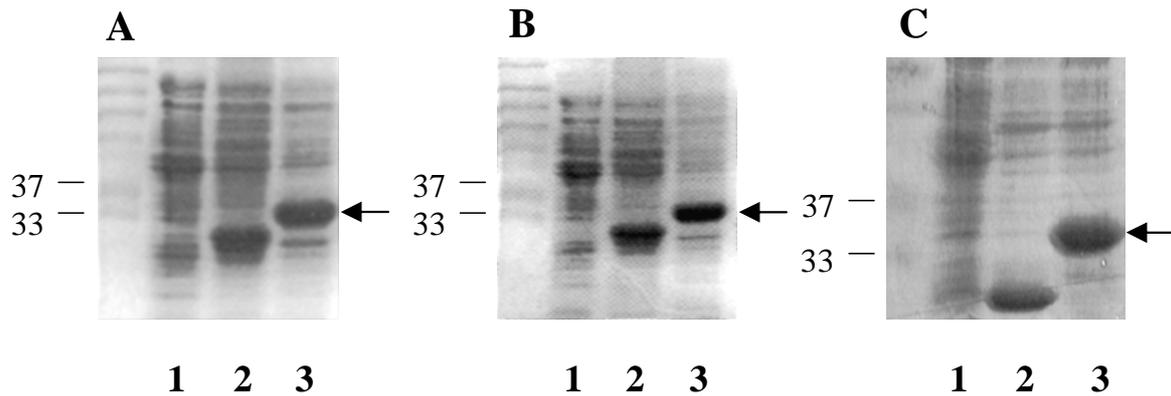


Abbildung 20 Überprüfung der Induktion der Expression der GST-Fusionsproteine (SDS-PAGE)

Die Expression der GST-Fusionsproteine HC3.pGEX-2T (Abb.A), HC4.pGEX-2T (Abb. C), mC3.pGEX-2T (Abb. B) wurde durch Zugabe von 10 μ g/ml 3,3-Indolacrylsäure für 4h bei 37°C induziert. Nach Lyse der Zellen wurden je 20 μ g Gesamtprotein aus Bakterienlysat über SDS-PAGE (12,5% ige Gele) aufgetrennt und mittels Commassie-blue Färbelösung sichtbar gemacht. Die Abbildungen zeigen das XLI-Blue-Bakterienlysat (Spur 1 in A-C), das Lysat des pGEX-2T-Expressionsvektors (Spur 2 in A-C, 26kDa) und das von HC3.pGEX-2T (Spur 3 in A, 30.1kDa), mC3.pGEX-2T (Spur 3 in B, 30.1kDa) und HC4.pGEX-2T (Spur 3 in C, 31.7kDa). Links neben den Abbildungen sind die Molekularmassen der vorgefärbten Markerproteine in kDa angegeben. Die Abbildungen zeigen repräsentative Gele.

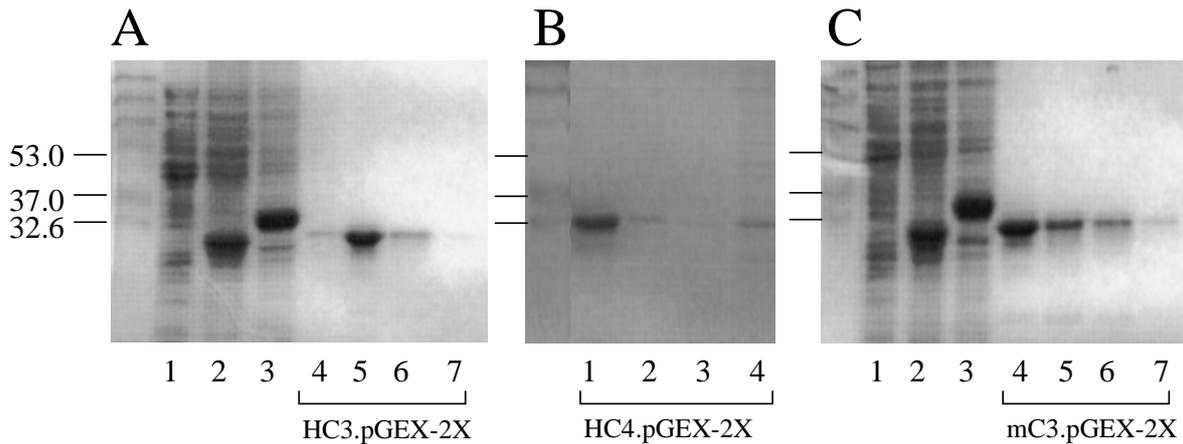


Abbildung 21 Überprüfung der Affinitätsaufreinigung der überexprimierten GST-Fusionsproteine (SDS-PAGE)

Die GST-Fusionsproteine wurden über Glutathion-Säulen aufgereinigt. Die Abbildungen zeigen die 4 verschiedenen Fraktionen, in denen sich das eluierte Protein befand. Die Abbildungen A und C zeigen als Kontrolle und zum Größenvergleich induzierte Lysate von XL1-Blue-Bakterien ohne Vektor (Spur 1) oder mit HC3.pGEX-2X (Spur 2, 30.1kDa) oder HC4.pGEX-2X (Spur 3, 31.7kDa) transformiert. Es folgen in den beiden Abbildungen A und C die Fraktionen 1-4 des HC3.pGEX-2X-Eluates (Spuren 4-7 Abbildung A, 30.1kDa) und mC3.pGEX-2X-Eluates (Spuren 4-7 in Abbildung C, 30.1kDa). Abbildung B zeigt die Fraktionen 1-4 des HC4.pGEX-2X-Eluates (Spuren 1-4, 31.7kDa). Links neben den Abbildungen sind die Molekulargewichte der vorgefärbten Markerproteine in kDa angegeben. Die Abbildungen zeigen repräsentative Gele.

IV.3.5 Nachweis der Spezifität des murinen CAT-3-Antikörpers

Für das aufgereinigte Immunplasma, das nach Immunisierung mit dem mCAT-3 TrpE-FP gewonnen wurde, wurde zur Überprüfung das Lysat von hCAT-3-injizierten Oozyten verwendet, da mCAT-3 in dem zur Injektion in Oozyten geeigneten pSP64T-Vektor nicht zur Verfügung stand. Es existierten auch keine Zellen, in denen mCAT-3 stabil oder transient transfiziert worden war. In diesen wie auch in den folgenden Versuchen, in denen das Lysat von hCAT-3-überexprimierenden U373MG Glioblastom-Zellen verwendet wurde, um das mCAT-3-Immunplasma zu testen, konnte kein Signal detektiert werden (Abbildungen nicht gezeigt). Wahrscheinlich ist die Spezifität der Antikörper, die wahrscheinlich zwischen Mensch und Maus unterscheiden, dafür verantwortlich. Der C-Terminale Bereich, aus dem die Sequenz für die Herstellung der Antikörper ausgewählt wurde, unterscheidet sich zwischen Mensch und Maus in 15 von 35 Aminosäuren.

IV.3.6 Aufreinigung der gewonnenen Antikörper

Die gewonnenen Immunplasmen wurden über Affi Gel® 10-gekoppelte GST-Fusionsproteine affinitäts-aufgereinigt. Das über Nacht rezirkulierte Plasma (als Durchlauf bezeichnet) wurde aufgefangen, das Säulenmaterial gewaschen und danach wurden die an die Affi-Säule gebundenen Antikörper in 4 Fraktionen eluiert. Um die über Affinitätssäulen aufgereinigten Antikörper auf ihre Spezifität hin überprüfen zu können, wurden sie mit Hilfe von Western-Blot Analysen untersucht. Dazu wurden zum einen Lysate aus Oozyten verwendet, die mit der jeweiligen CAT-cRNA oder als Kontrolle mit Wasser injiziert worden waren. Zum anderen wurden Lysate von U373MG Glioblastom-Zellen verwendet, die ein Fusionsprotein aus dem jeweiligen CAT mit dem verstärkt grün fluoreszierenden Protein EGFP (enhanced green fluorescent protein) oder nur EGFP alleine überexprimierten. Einige Lysate wurden mit N-Glykosidase F behandelt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran wurde diese mit den gewonnenen Immunplasmen von hCAT-3 und SLC7A4 inkubiert.

Abbildung 22 bis Abbildung 25 zeigen die Ergebnisse der affinitäts-Aufreinigung der Antikörper gegen hCAT-3 und SLC7A4. Durch die Aufreinigung des Immunplasmas wurde eine deutliche Verbesserung des Analyseergebnisses erreicht. Anti-hCAT-3 erkannte in Lysaten von U373MG Glioblastom-Zellen für die glykosylierte und deglykosylierte Form des hCAT-3-EGFP-Fusionsproteins spezifische Banden in einer Höhe von jeweils ca. 86 und 67 kDa (Abbildung 22). Das errechnete Molekulargewicht (ca. 95 kDa) liegt für die deglykosylierte Form des hCAT-3-EGFP-Fusionsproteins höher als es in den SDS-PAGE erscheint. Dies scheint eine Besonderheit hydrophober Proteine zu sein, die auch bei anderen CAT-Isoformen beobachtet wurde. Die detektierten Proteinenbanden in mit N-Glykosidase F behandelten Lysaten zeigten alle eine Verringerung der Molekulargewichte gegenüber den Banden in nicht behandelten Lysaten, d.h. die Proteine lagen in der Zelle in N-glykosylierter Form vor. Obwohl das Signal in allen Fraktionen sichtbar war, war die Hintergrundfärbung und das Vorhandensein von unspezifischen Signalen in den Fraktionen 1 und 2 bei den Kaninchen am stärksten, die nach der Grundimmunisierung noch 3 oder 4mal immunisiert worden waren. Im 2mal immunisierten Kaninchen ist schon in der 2ten Fraktion ein deutliches Signal ohne starke Hintergrundfärbung zu erkennen.

Anti-SLC7A4 erkannte in Lysaten von U373MG Glioblastom-Zellen, die SLC7A4-EGFP-Fusionsproteine überexprimierten, spezifische Banden in einer Höhe von ca. 86 bzw. 67 kDa für die glykosylierte bzw. deglykosylierte Form (Abbildung 24). Die errechnete

Molekularmasse (ca. 95kDa) liegt, wie beim hCAT-3-EGFP-Fusionsprotein, für die deglykosylierte Form des SLC7A4-EGFP-Fusionsproteins höher als es in den SDS-PAGE erscheint. Die detektierten Proteinbanden in mit N-Glykosidase F behandelten Lysaten zeigten wie bei den hCAT-3 Lysaten alle eine Verringerung der Molekularmasse gegenüber den Banden in nicht behandelten Lysaten, d.h. auch die SLC7A4-Proteine lagen in der Zelle in N-glykosylierter Form vor. In fast allen Fraktionen konnten nach der affinitäts-Aufreinigung spezifische Signale detektiert werden. Die Hintergrundfärbung in den Kaninchen, die nach der Grundimmunisierung 2mal bzw. 4mal immunisiert worden waren war bis zur zweiten Fraktion sichtbar. Spätestens die dritte Fraktion zeigte spezifische Signale ohne Hintergrundfärbung.

Der SLC7A4-Antikörper des 3mal immunisierten Kaninchen erbrachte bereits ab der ersten Fraktion klare Signale (Abbildung 24 B). Nach mehrmaligem Aufreinigen von Serum aus dem gleichen Kaninchen zeigten sich sowohl für den hCAT-3- als auch für den SLC7A4-Antikörper aus dem 2-3mal immunisierten Kaninchen die klarsten Signale.

Mittels Western-Blot Analysen konnten auch in Oozyten-Lysaten hCAT-3- und SLC7A4-Proteine vom affinitäts-aufgearbeiteten anti-hCAT-3 und anti-SLC7A4-Antikörper detektiert werden. Der hCAT-3 Antikörper erkannte in den Oozyten-Lysaten ein glykosyliertes Protein von etwa 56 kDa (Abbildung 23). Das deglykosylierte Lysat zeigte ein Signal, das nur wenig verlagert war. Es ergab sich also ein anderes Bild als in Zelllysaten, in denen das deglykosylierte Lysat ein Signal mit deutlich verlagerter Molekularmasse zeigte. Wie für die Isoform hCAT-3 zeigten auch die mit N-Glykosidase F behandelten Lysate SLC7A4-exprimierender Oozyten eine Verlagerung der Molekularmasse gegenüber den nicht behandelten Lysaten, die geringer war als in Zelllysaten (Abbildung 25).

Allgemein lässt sich über die Aufreinigung sagen, dass nur selten alle 4 Fraktionen der Affinitätsaufreinigung für spätere Analysen eingesetzt werden konnten. Nur die Fraktionen, die in Western-Blot-Analysen die besten Signale erbrachten, wurden vereint und dialysiert. Die Fraktionen, die starke Hintergrundfärbung zeigten, wurden verworfen. Die Aufreinigung und das Eluieren in verschiedenen Fraktionen ist also unbedingt empfehlenswert.

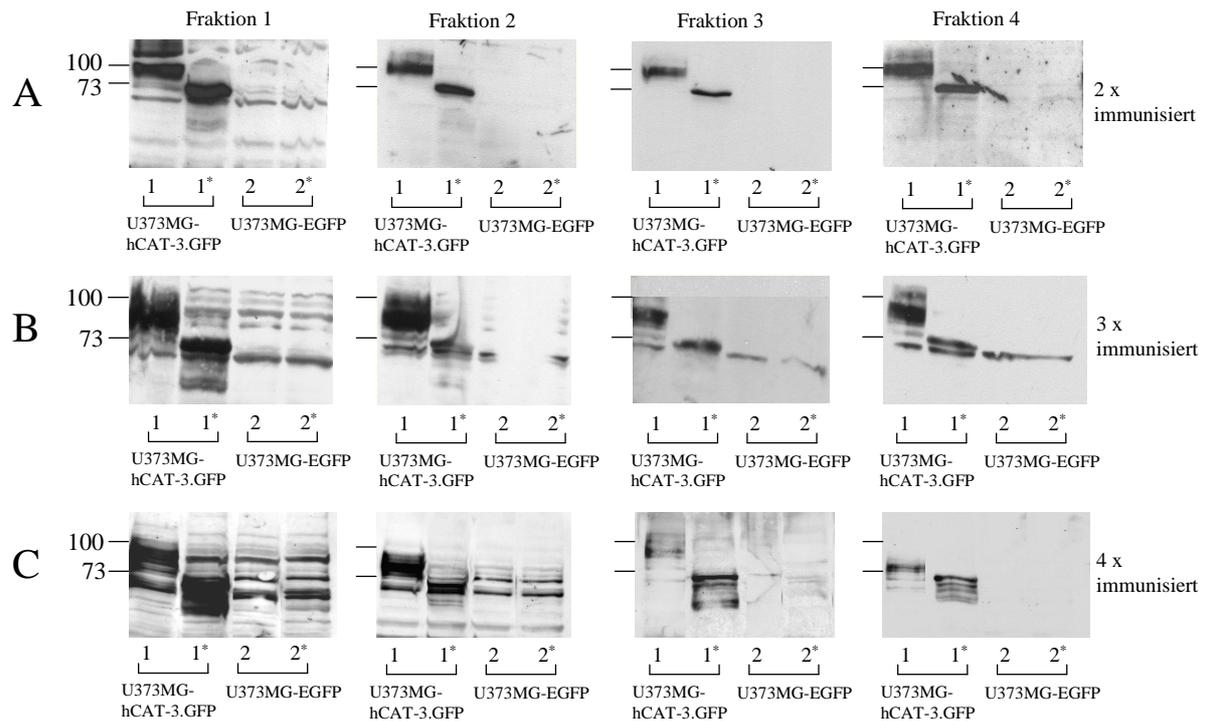


Abbildung 22 Nachweis der Spezifität der Antikörper gegen den C-Terminus von hCAT-3 unter Verwendung hCAT-3-überexprimierender U373MG Glioblastom-Zellen (Western-Blot)

Von konfluenten U373MG Glioblastom-Zellen, die das Fusionsprotein hCAT-3.GFP exprimierten, wurden Lysate hergestellt. Mit N-Glycosidase F behandelte Lysate sind mit * gekennzeichnet. Je 20 μ g der Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt (12,5% ige Gele) und auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet. Die Gele wurden identisch beladen. Spuren 1 und 1* zeigen das hCAT-3.GFP-exprimierende U373MG Glioblastom-Zelllysat. Die Spuren 2 und 2* zeigen Lysate U373MG Glioblastom-Zellen, die EGFP exprimierten. Die Abbildungen A, B, und C zeigen die Ergebnisse bei drei verschiedenen Kaninchen, die alle die gleiche Grundimmunisierung erhielten und danach zusätzlich noch entweder 2mal (A), 3mal (B) oder 4mal (C) immunisiert wurden. In den Abbildungen A-C wurden die Membranen mit den Fraktionen 1-4 der affinitätsgereinigten hCAT-3 Immunplasmen (1:100) inkubiert und anschließend mit einem Peroxidase gekoppelten anti-Kaninchen-IgG (1:10.000). Durch Chemilumineszenzreagenz wurden die gebundenen Proteine sichtbar gemacht und ein Röntgenfilm exponiert. Links neben den Abbildungen sind die Molekularmassen der vorgefärbten Markerproteine in kDa angegeben. Die Abbildungen zeigen repräsentative Gele.

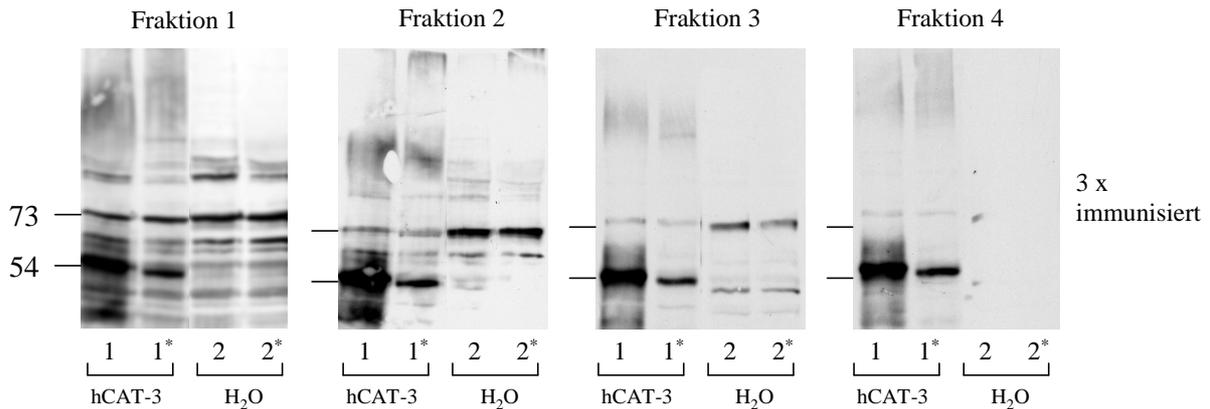


Abbildung 23 Nachweis der Spezifität der Antikörper gegen den C-Terminus von hCAT-3 unter Verwendung hCAT-3 exprimierender Oozyten (Western-Blot)

Die Abbildung zeigt das Ergebnis in *X. laevis* Oozyten, die entweder mit 36ng hCAT-3 cRNA (in 36nl Wasser, Spuren 1 und 1*) oder als Kontrolle mit 36nl H₂O injiziert worden waren (Spuren 2 und 2*). Nach drei Tagen wurden Lysate hergestellt, von denen die Hälfte mit N-Glykosidase F behandelt wurden (mit * markiert). Je 20µg der Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet. Die Gele wurden identisch beladen. In der Abbildung wurden die Membranen mit den Fraktionen 1-4 der affinitätsgereinigten hCAT-3 Immunplasmen (1:100) inkubiert und danach mit einem Peroxidase gekoppelten anti-Kaninchen-IgG (1:10.000). Durch Chemilumineszenzreagenz wurden die gebundenen Proteine sichtbar gemacht und ein Röntgenfilm exponiert. Links neben den Abbildungen sind die Molekularmassen der vorgefärbten Markerproteine in kDa angegeben. Die Abbildung zeigt repräsentative Gele mit dem Immunplasma eines Kaninchens, welches nach der Grundimmunisierung noch zusätzlich 3mal immunisiert wurde.

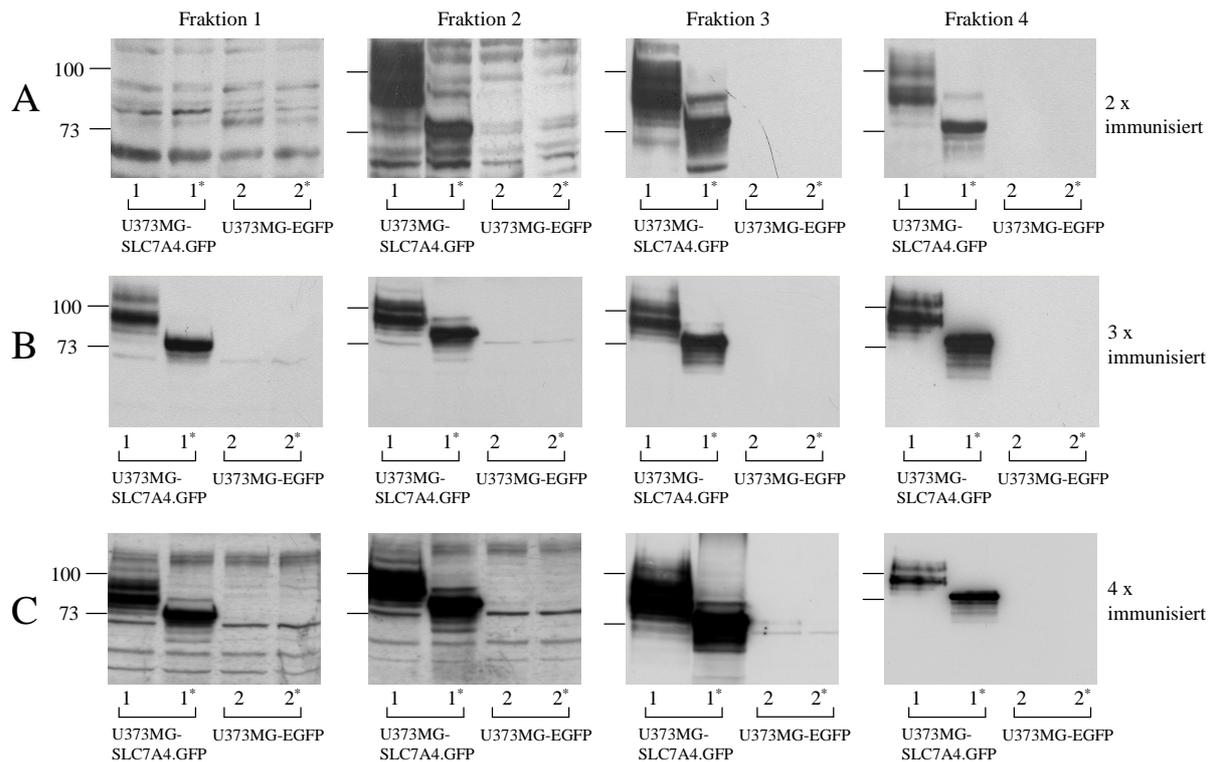


Abbildung 24 Nachweis der Spezifität der Antikörper gegen den C-Terminus von SLC7A4 unter Verwendung SLC7A4.GFP überexprimierender U373MG-Glioblastom-Zellen (Western-Blot)

Von konfluenten U373MG Glioblastom-Zellen, die das Fusionsprotein SLC7A4.GFP exprimierten, wurden Lysate hergestellt, die teilweise mit N-Glykosidase F behandelt wurden (markiert mit *). Je 20µg der Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt (12,5% ige Gele) und auf eine Nitrozellulose-Membran geblotet. Die Gele wurden identisch beladen. Spuren 1 und 1* zeigen das SLC7A4.GFP exprimierende U373MG Glioblastom-Zelllysate. Die Spuren 2 und 2* zeigen Lysate von U373MG Glioblastom-Zelle, die EGFP exprimieren.. Die Abbildungen A, B, und C zeigen die Ergebnisse bei drei verschiedenen Kaninchen, die alle die gleiche Grundimmunisierung erhielten und danach zusätzlich noch entweder die entweder 2mal (A), 3mal (B) oder 4mal (C) immunisiert wurden. In den Abbildungen A-C wurden die Membranen mit den Fraktionen 1-4 der affinitätsgereinigten SLC7A4-Immunchromatogrammen (1:100) inkubiert und danach mit einem Peroxidase gekoppelten anti-Kaninchen-IgG (1:10.000). Durch Chemilumineszenzreagenz wurden die gebundenen Proteine sichtbar gemacht und ein Röntgenfilm exponiert. Links neben den Abbildungen sind die Molekularmassen der vorgefärbten Markerproteine in kDa angegeben. Die Abbildung zeigt repräsentative Gele.

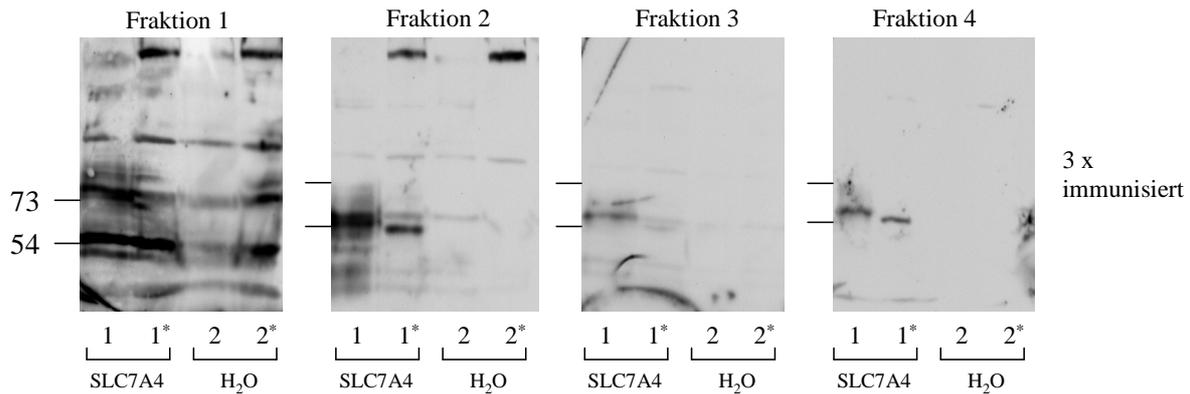


Abbildung 25 Nachweis der Spezifität der Antikörper gegen den C-Terminus von SLC7A4 unter Verwendung SLC7A4.GFP-exprimierender Oozyten (Western-Blot)

Die Abbildung zeigt das Ergebnis in *X. laevis* Oozyten, die entweder mit 36ng SLC7A4-cRNA (in 36nl Wasser, Spuren 1 und 1*) oder als Kontrolle mit 36nl H₂O (Spuren 2 und 2*) injiziert worden waren. Drei Tage danach wurden Lysate hergestellt, von denen die Hälfte mit N-Glykosidase F behandelt wurde (mit * gekennzeichnet). Je 20µg der Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Die Gele wurden identisch beladen. Die Membranen wurden mit den Fraktionen 1-4 der affinitätsgereinigten SLC7A4-Immunplasmen (1:100) inkubiert und danach mit einem Peroxidase gekoppelten anti-Kaninchen-IgG (1:10.000). Durch Chemilumineszenzreagenz wurden die gebundenen Proteine sichtbar gemacht und ein Röntgenfilm exponiert. Links neben den Abbildungen sind die Molekularmassen der vorgefärbten Markerproteine in kDa angegeben. Die Abbildung zeigt repräsentative Gele mit dem Immunplasma eines Kaninchens, welches nach der Grundimmunisierung noch zusätzlich 3mal immunisierten wurde

Für das aufgereinigte Immunplasma, das nach Immunisierung mit dem mCAT-3 TrpE-FP gewonnen wurde, wurde zur Überprüfung das Lysat von hCAT-3-injizierten Oozyten verwendet, da mCAT-3 in dem zur Injektion in Oozyten geeigneten pSP64T-Vektor nicht zur Verfügung stand. Es existierten auch keine Zellen, in denen mCAT-3 stabil oder transient transfiziert worden war. In diesen wie auch in den folgenden Versuchen, in denen das Lysat von hCAT-3-überexprimierenden U373MG Glioblastom-Zellen verwendet wurde, um das mCAT-3-Immunplasma zu testen, konnte kein Signal detektiert werden (Abbildungen nicht gezeigt). Wahrscheinlich ist die Spezifität der Antikörper, die wahrscheinlich zwischen Mensch und Maus unterscheiden, dafür verantwortlich. Der C-Terminale Bereich, aus dem die Sequenz für die Herstellung der Antikörper ausgewählt wurde, unterscheidet sich zwischen Mensch und Maus in 15 von 35 Aminosäuren

IV.3.7 Spezifität der affinitäts-aufgereinigten Antikörper

Um zu testen, ob die neu gewonnenen Antikörper Isoform-spezifisch sind, wurde eine Western-Blot Analyse durchgeführt mit Lysaten von U373MG Glioblastom-Zellen, die jeweils ein Fusionsprotein zwischen hCAT-1, -2, -3, SLC7A4 und EGFP oder EGFP alleine überexprimierten. Die Nitrozellulose-Membran wurde nacheinander mit den Antikörpern gegen hCAT-1, hCAT-2 (Gräf, Dissertation 1998), hCAT-3, SLC7A4 oder einem EGFP-Antikörper inkubiert

Aus der Abbildung 26 geht hervor, dass die aufgereinigten Antikörper gegen hCAT-1, -2, -3 und SLC7A4 in den Lysaten jeweils nur die spezifischen Isoformen erkannten gegen die sie gerichtet waren. Es kam also zu keiner Kreuz-Reaktion mit anderen CAT-Isoformen. Das jeweilige Molekulargewicht für die deglykosylierten Formen lag zwischen 85-67kDa.. Der Antikörper gegen EGFP erkannte ebenfalls spezifisch EGFP in Höhe von 29 kDa. Die detektierten Proteinbanden in mit N-Glykosidase F behandelten Lysaten zeigten alle eine Verlagerung der Molekularmasse gegenüber den nicht behandelten Lysaten. Da es sich beim EGFP-Protein bekanntlich um ein nicht glykosyliertes Protein handelt, zeigt sich bei ihm keine derartige Verlagerung. Das hCAT-2-Protein ist in U373MG Glioblastom-Zellen nur schwach exprimiert, was eine längere Expositionszeit des Röntgenfilms erforderte und so zu einem verstärkten Hintergrund führte.

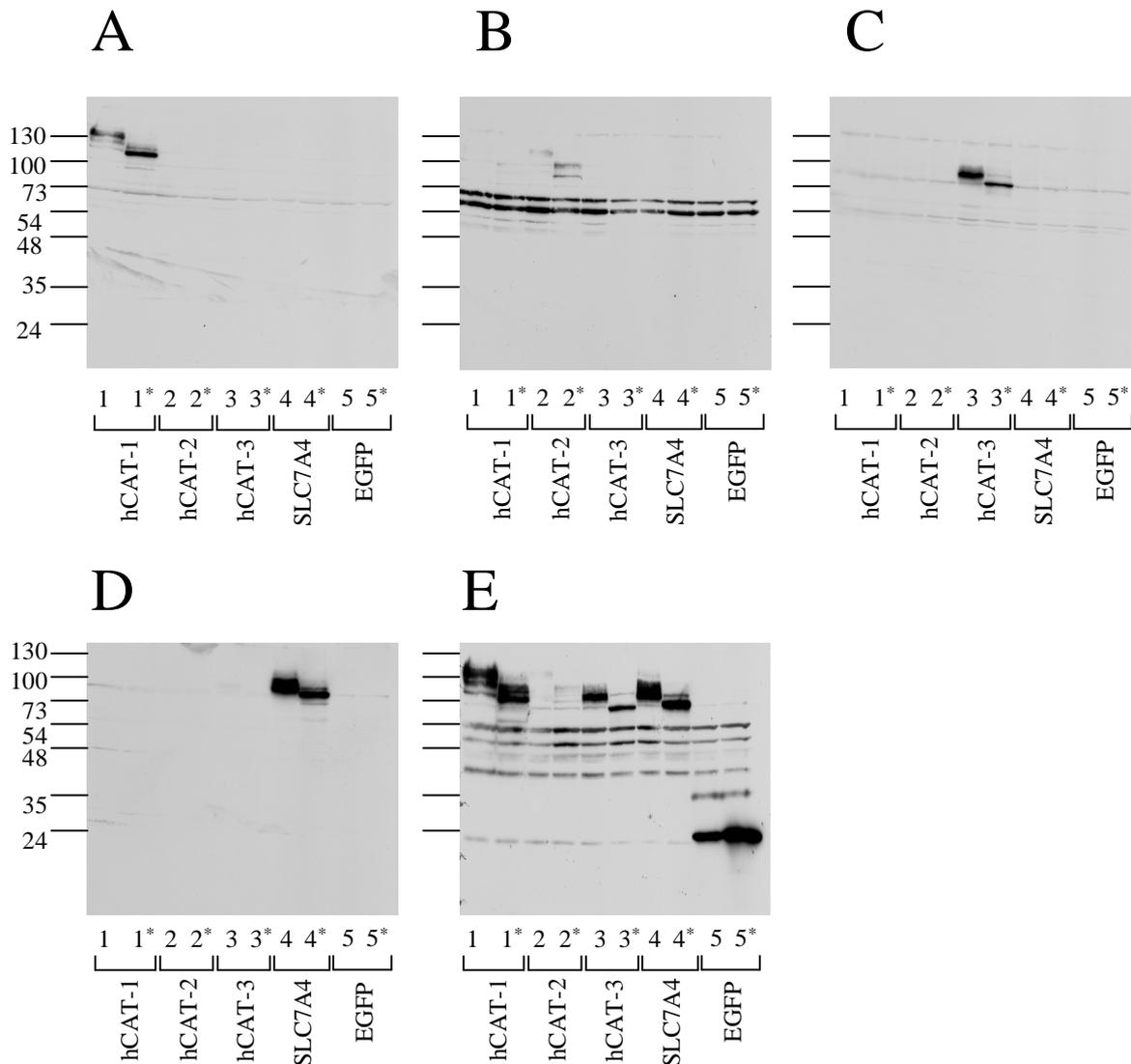


Abbildung 26 Isoform-Spezifität der aufgereinigten Antikörper

Von konfluenten U373MG Glioblastom-Zellen, die jeweils ein Fusionsprotein zwischen hCAT-1, -2, -3, oder SLC7A4 und EGFP überexprimierten, wurden Lysate hergestellt. Eine Hälfte der Lysate wurde mit N-Glykosidase F behandelt (mit * gekennzeichnet). Die Lysate (je 20µg) wurden in der Reihenfolge hCAT-1, -2, -3, SLC7A4 und EGFP aufgetragen, über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet. Die Detektion der CAT-Proteine erfolgte nacheinander mit den affinitäts-aufgereinigten Antikörpern gegen hCAT-1 (A), hCAT-2 (B), hCAT-3 (C), SLC7A4 (D) und EGFP (E). Als sekundärer Antikörper wurde Peroxidase gekoppelter anti-Kaninchen-IgG (1:10.000) verwendet. Zwischen den Inkubationen mit den verschiedenen primären Antikörpern wurden die bereits gebundenen Antikörper durch Behandlung mit einer 1%igen SDS/SSC-Spüllösung von der Membran entfernt. Mittels Chemilumineszenzreagenz wurden die gebundenen Antikörper sichtbar gemacht und ein Röntgenfilm der Membran exponiert. Links neben den Abbildungen sind die Molekularmasse der vorgefärbten Markerproteine in kDa angegeben.

IV.3.8 Nachweis des endogenen hCAT-3 in NT2-Teratokarzinom-Zellen

Der aufgereinigte hCAT-3 Antikörper detektierte in Lysaten von U373MG Glioblastom-Zellen, die ein Fusionsprotein zwischen hCAT-3 und EGFP überexprimierten, deutlich das hCAT-3-Protein. Als nächstes ergab sich nun die Frage, ob der aufgereinigte hCAT-3-Antikörper auch das endogene hCAT-3 Protein detektieren kann. Auf mRNA-Ebene konnten wir hCAT-3 bereits in humanen NT-2 Teratokarzinom-Zellen nachweisen und zeigen, dass er in dieser Zelllinie die prominente hCAT-Isoform darstellt. Diese Zelllinie wurde daher für weitere Analysen ausgewählt.

In unbehandelten und in mit N-Glykosidase F behandelten Lysaten von NT2-Teratokarzinom-Zellen erkannte der hCAT-3 Antikörper das endogene hCAT-3 Protein in einer Höhe von ca. 65 bzw. 55 kDa (Abbildung 27).

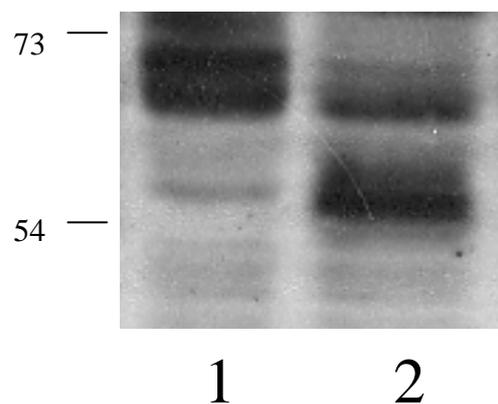


Abbildung 27 Detektion des endogenen hCAT-3 in NT2-Teratokarzinom-Zellen

Von konfluenten NT2-Teratokarzinom-Zellen wurden Lysate hergestellt, die entweder mit N-Glykosidase F behandelt wurden (Spur 2) oder unbehandelt blieben (Spur 1). Je 80µg der Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt (12,5% ige Gele) und auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet. Die Proteine wurden mit dem aufgereinigten hCAT-3 Immunplasma (1:100) und einem sekundären Antikörper (anti-Kaninchen-IgG Peroxidase gekoppelt, 1:10.000) inkubiert. Durch Chemilumineszenzreagenz wurden die Signale sichtbar gemacht und ein Röntgenfilm der Membran exponiert. Links neben den Abbildungen sind die Molekularmassen der vorgefärbten Markerproteine in kDa angegeben. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Gel.

IV.4 Subzelluläre Verteilung des hCAT-3-Proteins in humanen Zellen

Von Alexander Rotmann war durch Biotinylierung der Zelloberflächen-Proteine und anschließende Western-Blot Analysen gezeigt worden, dass die Expression von hCAT-1 intrazellulär höher ist als an der Zelloberfläche (Rotmann, Dissertation 2003). Diese Ergebnisse wurden sowohl in stabil transfizierten, hCAT-1-überexprimierenden U373MG Glioblastom-Zellen, als auch in DLD-1-Zellen, die hCAT-1 endogen exprimieren, erzielt. Es ergab sich für das Verhältnis von Gesamtlysate zu Zelloberflächen-Protein ein Faktor von 5-10, sowohl für den endogenen als auch für den überexprimierten hCAT-1. Das deutet darauf hin, dass vom hCAT-1-Gesamtprotein nur etwa 10-20% an der Zelloberfläche exprimiert wird. Es galt nun die Frage zu beantworten, ob sich die subzelluläre Lokalisation des hCAT-3-Proteins von der des hCAT-1-Proteins unterscheidet.

IV.4.1 Vergleich der subzellulären Verteilung von hCAT-3 und hCAT-1-EGFP-Fusionsproteinen in U373MG-Glioblastom-Zellen

Mit Hilfe von Biotinylierung der Zelloberflächenproteine und anschließenden Western-Blot Analysen wurde die membranäre und intrazelluläre Expression von hCAT-3 untersucht. Die Befunde von Rotmann konnten in Bezug auf die subzelluläre Verteilung von hCAT-1 bestätigt werden (Abbildung 28). Für das hCAT-3-Protein zeigte sich die gleiche subzelluläre Verteilung. Auch hier war die intrazelluläre Expression höher als an der Zelloberfläche. Beachtet man bei der Berechnung der Proteinausbeute dass unterschiedliche Mengen an Protein in Western-Blot-Analysen für Gesamtlysate und für das Zelloberflächen-Protein eingesetzt wurden, so lag das Verhältnis von Gesamtlysate zu Zelloberflächen-Protein ebenso wie bei hCAT-1 bei einem Faktor von 5-10. Daraus lässt sich schließen, dass vom hCAT-3-Gesamtprotein in der Zelle auch etwa nur 10-20% an der Zelloberfläche exprimiert werden. Man muss aber bedenken, dass bei der Biotinylierung die Ausbeute unter Umständen schwanken kann und Protein verloren geht. Von Rotmann mittels konfokaler Mikroskopie gezeigte Bilder bestätigen aber zusätzlich die Ergebnisse.

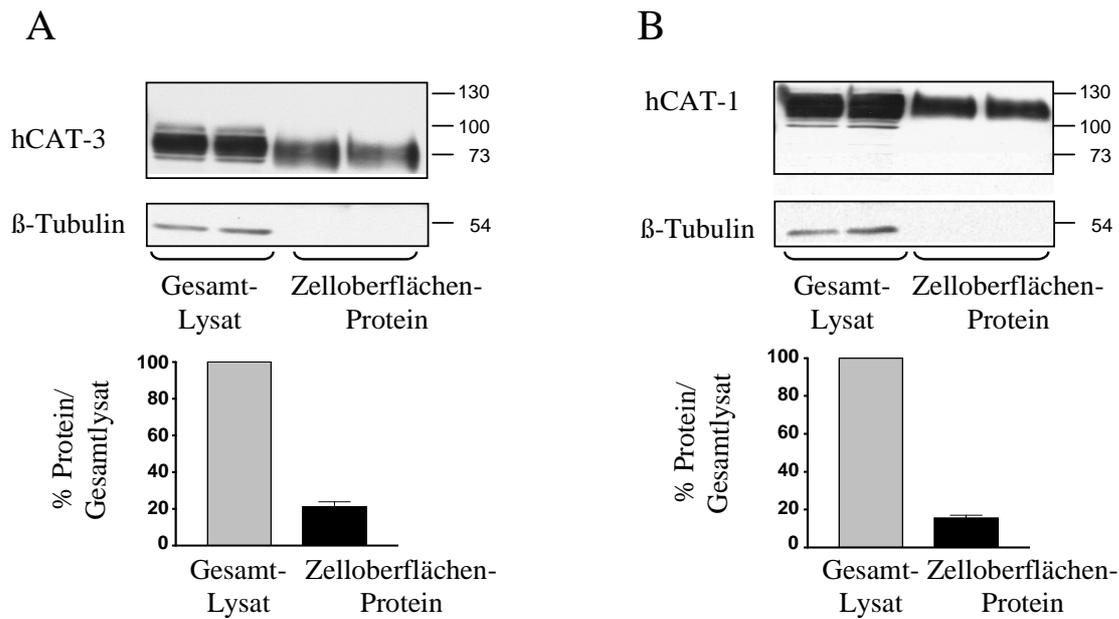


Abbildung 28 Subzelluläre Verteilung des hCAT-3 und hCAT-1-Proteins in stabil transfizierten U373MG Glioblastom-Zellen (Biotinylierung und Western-Blot)

Mit hCAT-3.EGFP (A) oder hCAT-1.EGFP (B) stabil transfizierte U373MG Glioblastom-Zellen wurden in 10cm-Zellkulturplatten bis zur Konfluenz kultiviert. Danach wurden die Zelloberflächen-Proteine mit dem membranundurchlässigen Sulfo-NHS-Biotin biotinyliert, die Zellen lysiert und durch Bindung an immobilisiertes Avidin extrahiert. Nach dem Ablösen der Zelloberflächen-Proteine vom Avidin wurden diese über SDS-PAGE aufgetrennt (10% ige Gele). Anschließend wurden die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet und diese mit einem primären Antikörper gegen EGFP (Living ColorsTM Peptid-Antikörper, 1:500) und einem sekundären Antikörper (anti-Kaninchen IgG Peroxidase gekoppelt 1:10.000) inkubiert. Nach Entfernung des hCAT-3- bzw hCAT-1-Antikörpers von der Membran wurde diese mit dem anti-β-Tubulin Antikörper inkubiert (jeweils unterer Teilabb.). Durch Chemilumineszenzreagenz wurden die Signale sichtbar gemacht und ein Röntgenfilm exponiert. Rechts neben den Abbildungen sind die Molekularmassen der vorgefärbten Markerproteine in kDa angegeben. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Gel.

IV.4.2 Endogene hCAT-3-Expression in NT2-Teratokarzinom-Zellen

Um die in den überexprimierten Zellen erhobenen Befunde für den endogen exprimierten hCAT-3 überprüfen zu können, wurden die bereits beschriebenen Antikörper gegen das hCAT-3-Protein in entsprechenden Biotinylierungs-Analysen in NT2-Teratokarzinom-Zellen eingesetzt. Aus der Abbildung 29 geht hervor, dass die in stabil transfizierten U373MG

Glioblastom-Zellen zeigte subzelluläre Verteilung von hCAT-3 im endogenen System bestätigt werden konnte. Auch für den in NT2-Teratokarzinom-Zellen endogen exprimierten hCAT-3 war die intrazelluläre Expression höher als an der Zelloberfläche. Es wurde ebenfalls vom hCAT-3 Gesamtprotein in der Zelle nur etwa 10-20% an der Zellmembran exprimiert.

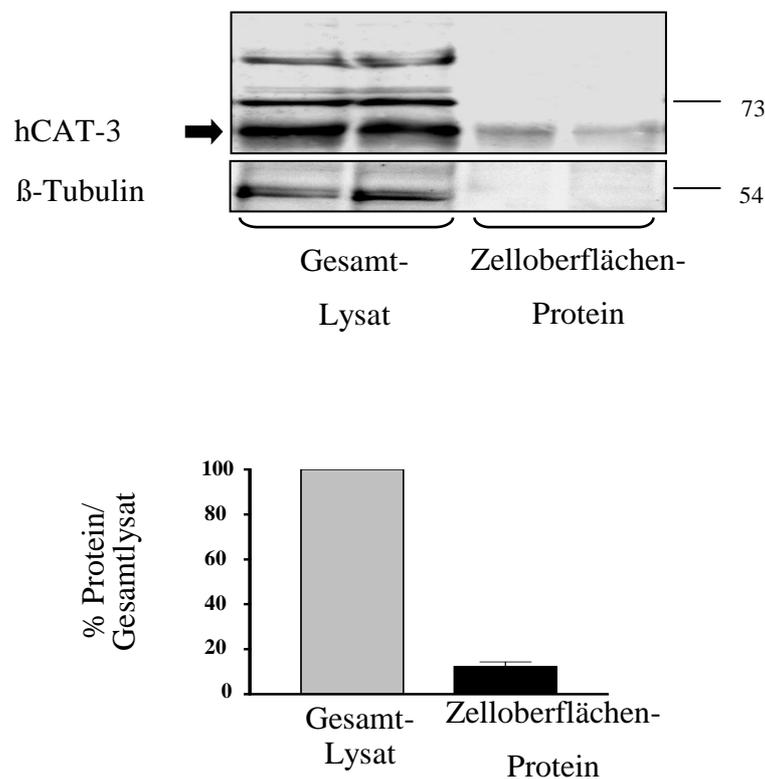


Abbildung 29 Nachweis der Expression von Zelloberflächen-Proteinen in NT2-Teratokarzinom-Zellen (Biotinylierung und Western-Blot).

NT2-Teratokarzinom-Zellen wurden in 10cm-Zellkultur-Platten bis zur Konfluenz kultiviert. Danach wurden die Zelloberflächen-Proteine wie in Abbildung 28 beschrieben biotinyliert und über SDS-PAGE (10% ige Gele) aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet und die Membran mit dem primären Antikörper gegen hCAT-3 (1:100) und einem sekundären Antikörper (anti-Kaninchen IgG Peroxidase gekoppelt 1:10.000) inkubiert. Zur Quantifizierung wurde die Membran gewaschen und mit einem primären Antikörper gegen β-Tubulin (anti-β-Tubulin monoklonal 1:1000) und einem sekundären Antikörper (anti-maus IgG Peroxidase gekoppelt 1:3000) inkubiert. Mit Hilfe von Chemilumineszenzreagenz wurden die Signale sichtbar gemacht und ein Röntgenfilm exponiert. Rechts neben der Abbildung sind die Molekularmassen der vorgefärbten Markerproteine in kDa angegeben. Gezeigt ist ein repräsentatives Gel.

IV.4.3 Einfluss der PKC-Aktivierung auf die subzelluläre Verteilung von hCAT-3

Von Gräf *et al.* (Gräf *et al.*, 2001) konnte gezeigt werden, dass durch Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) in *X. laevis*-Oozyten und in humanen endothelialen EA.hy 926-Zellen die hCAT-1-vermittelte L-Arginin-Aufnahme inhibiert wird. Bei Untersuchungen zum Mechanismus der PKC-vermittelten Inhibition der hCAT-1-Transportaktivität wurde von Rotmann gezeigt, dass die PKC-vermittelte Reduktion der hCAT-1-Transportaktivität auf einer Reduktion der hCAT-Expression an der Zelloberfläche beruht (Rotmann, Dissertation 2003). Auch nach der Entfernung der putativen PKC-Bindestellen am hCAT-1-Protein war der PKC-Effekt noch vorhanden.

In hCAT-3-exprimierenden *X. laevis* Oozyten wurde der hCAT-3 vermittelte L-Arginin-Transport nach Behandlung mit dem PKC-aktivierenden Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) um ca. 60% reduziert (Rotmann *et al.*, 2005). Wenn das hCAT-3-EGFP Fusionsprotein stabil in U373MG-Zellen transfiziert wurde, war die Transportaktivität unter PMA-Behandlung ebenfalls reduziert. Die Reduktion betrug hier ca. 50%. Vorbehandlung mit dem PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimid I (BIM I) verminderte in Oozyten und U373MG-Zellen die durch PMA bedingte Inhibition, was auf einen PKC-spezifischen Effekt schließen lässt. Um hCAT-3 auch in der subzellulären Verteilung nach PKC-Aktivierung mit hCAT-1 vergleichen zu können, sollte in diesem Teil der Arbeit der Einfluss der PKC-Aktivierung auf die Oberflächen-Expression von hCAT-3 untersucht werden. Die PKC wurde durch Inkubation mit PMA aktiviert. Mittels Biotinylierung der Zelloberflächen-Proteine und anschließenden Western-Blot Analysen wurden PKC-vermittelte Änderungen der Expression des hCAT-3 an der Plasmamembran quantifiziert.

Aus Abbildung 30 geht hervor, dass der Anteil an hCAT-3-EGFP in der Zelloberflächen-Proteinfraktion von U373MG Glioblastom-Zellen durch die Behandlung mit PMA deutlich abnahm. Durch eine Vorbehandlung der Zellen mit dem PKC-Inhibitor BIM I konnte der PMA-Effekt aufgehoben werden. Die Quantifizierung mehrerer unabhängiger Versuche zeigte, dass die Expression von hCAT-3 in den mit PMA behandelten Zellen nur an der Zelloberfläche signifikant abnahm. Es ergab sich hierfür eine Verringerung auf $70\% \pm 5\%$. Dieser Effekt wurde durch die Vorinkubation mit BIM I signifikant reduziert, aber nicht gänzlich aufgehoben ($90\% \pm 5\%$). Die Expression in den Gesamtlysaten blieb nahezu unverändert. In den Gesamtlysaten wies β -Tubulin keine Veränderung durch die PMA-Behandlung auf. In den Zelloberflächen-Proteinfraktionen konnte β -Tubulin nicht nachgewiesen werden, was für die Effizienz der Methode spricht.

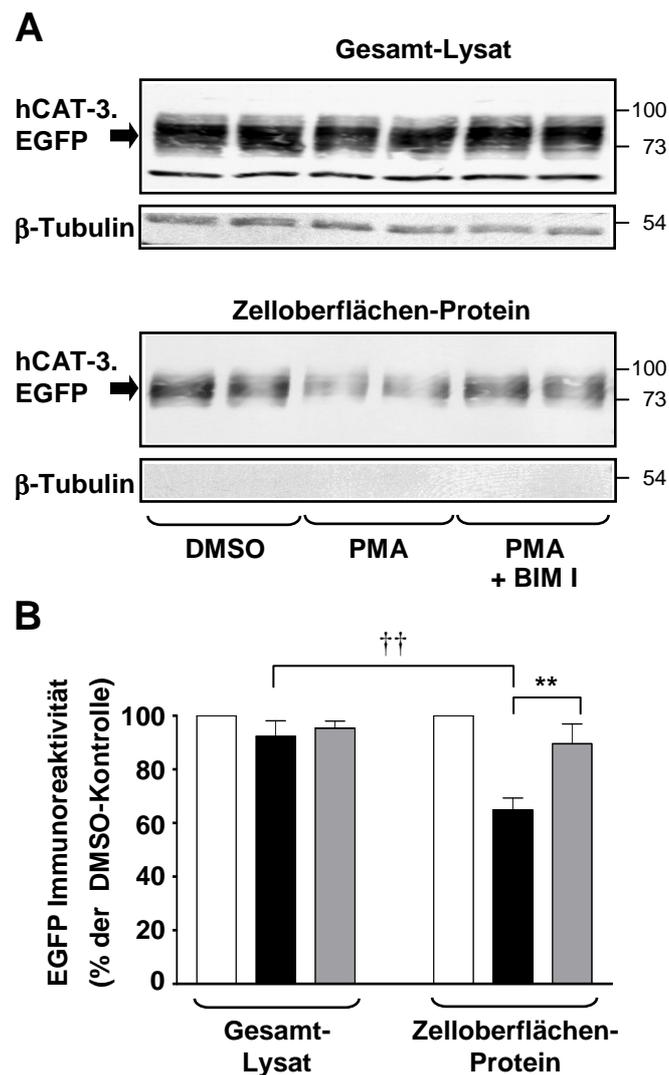


Abbildung 30 Nachweis der Expression von hCAT-3.EGFP in stabil transfizierten U373MG Glioblastom-Zellen (Biotinylierung und Western Blot)

U373MG Glioblastom-Zellen wurden stabil mit hCAT-3.EGFP transfiziert und bis zur Konfluenz in 10cm-Zellkulturplatten kultiviert. Zur Behandlung wurden die Zellen zuerst für 30Min. mit 1 μ M des PKC-Inhibitors BIM I oder alle übrigen Ansätze mit 0,1% DMSO vorinkubiert. Danach wurden die Versuchsansätze für 30Min. entweder mit 100nM PMA, 100nM PMA+1 μ M BIM I oder mit 0,1% DMSO inkubiert. Nach dieser Behandlung wurden die Zelloberflächen-Proteine mit dem membranundurchlässigen Sulfo-NHS-Biotin biotinyliert, die Zellen lysiert und durch Bindung an immobilisiertes Avidin extrahiert. Nach dem Ablösen der Zelloberflächen-Proteine vom Avidin wurden sie über SDS-PAGE aufgetrennt (10% ige Gele). Anschließend wurden die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet und diese mit einem primären Antikörper gegen EGFP (Living ColorsTM Peptid-Antikörper, 1:500 und einem sekundären Antikörper (anti-Kaninchen IgG Peroxidase gekoppelt 1:10.000) inkubiert. Zur Quantifizierung wurde die Membran gewaschen und mit einem

primären Antikörper gegen β -Tubulin (anti- β -Tubulin monoklonal 1:1000) und einem sekundären Antikörper (anti-maus IgG Peroxidase gekoppelt 1:3000) inkubiert. Durch Chemilumineszenzreagenz wurden die Signale sichtbar gemacht und ein Röntgenfilm exponiert. Rechts neben den Abbildungen sind die Molekularmassen der vorgefärbten Markerproteine in kDa angegeben. Die Abbildung A zeigt repräsentative Blots in denen im oberen Bild die Expression der Gesamtlysate und im unteren die Expression der Zelloberflächen-Proteine nach Behandlung jeweils doppelt aufgetragen wurden.

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

V Diskussion

Durch die Klonierung einer cDNA (Vekony, Diplomarbeit 1999), die die komplette Region des humanen CAT-3 enthielt, war es möglich geworden dessen Eigenschaften zu charakterisieren. Ein Vergleich der Aminosäure-Sequenzen zwischen hCAT-3, -1, -2A, -2B und SLC7A4 zeigt eine gute Konservierung der Gesamtsequenz. Sequenzvergleiche (siehe Tabelle 10) zwischen hCAT-3 und den anderen hCAT-Isoformen legten nahe, dass hCAT-3 ebenfalls einen Transporter für basische Aminosäuren darstellen könnte. Eine noch höhere Identität (in %) besitzen die Bereiche, die für die Transporteigenschaften des Proteins verantwortlich sind, also die funktionelle Domäne darstellen. So ist die funktionelle Domäne des hCAT-3 zu 71% gleichermaßen mit der des hCAT-1 und -2B identisch. Die Sequenzidentität von 42% für SLC7A4 zu den anderen hCAT-Isoformen führte bei Sperandeo *et al.* zu der Vermutung, dass SLC7A4 ebenfalls ein Transporter für basische Aminosäuren sein könnte (Sperandeo *et al.*, 1998). Dahingehende Versuche konnten aber keine Transport-Aktivität belegen. Die Isoformen hCAT-1 und -2B weisen System y^+ -ähnliche Transport-Eigenschaften auf und da die Homologie zu hCAT-3 hoch ist, konnte vermutet werden, dass auch er y^+ -ähnliche Transport-Eigenschaften besitzt. hCAT-2A, der sich in der funktionellen Domäne stark von hCAT-2B unterscheidet und keine y^+ -ähnlichen Transport-Eigenschaften aufweist, ist in dieser Domäne nur zu 52% mit hCAT-3 identisch.

Sequenzvergleiche (siehe Tabelle 10) zwischen hCAT-3 und den orthologen Proteinen mCAT-3 bzw. rCAT-3 belegen eine hohe Homologie (82% bzw 83%). Von den Arbeitsgruppen Ito und Hosokawa wurden Transporteigenschaften des CAT-3 aus Maus und Ratte beschrieben. Sowohl in *Xenopus laevis* Oozyten (mCAT) als auch in COS7-Zellen (rCAT) konnte der Na^+ -unabhängige Transport von basischen Aminosäuren gezeigt werden. Die ermittelten K_M -Werte für L-Arginin lagen in einem Bereich von 40-120 μM (Ito *et al.* 1997; Hosokawa *et al.*, 1999). Die maximale Transportaktivität (V_{max}) des murinen CAT-3 war in Untersuchungen an *Xenopus laevis* Oozyten deutlich niedriger als in den Isoformen CAT-1 und -2B (Ito *et al.* 1997). Zusätzlich unterschied sich das Substratspektrum des CAT-3 von dem der bereits erwähnten CAT-Isoformen. So hemmten z.B. Na^+ -unabhängig eine Anzahl neutraler und sogar anionischer Aminosäuren den Transport von basischen AS (Ito *et al.* 1997; Hosokawa *et al.*, 1999). Trotz der Homologie zwischen den Aminosäure-Sequenzen kann es zwischen den einzelnen Isoformen der CAT-Familie Unterschiede in der Transportaktivität, im Substratspektrum oder in anderen Charakteristika geben. Zusätzlich ist es möglich, dass eine Isoform nicht eindeutig einem Transport-System zugeordnet werden kann. So ist z.B. hCAT-2A ohne Zweifel zu der CAT-Familie, nicht aber dem y^+ -System

zuzuordnen (Closs *et al.*, 1993a). Die Überlegungen ob hCAT-3 ähnliche Eigenschaften wie mCAT-3 bzw. rCAT-3 aufweisen würde oder ob er denen von hCAT-1 und -2B gleicht, konnten durch die Experimente in dieser Arbeit beantwortet werden und sollen im folgenden diskutiert werden.

	hCAT-3	hCAT-3
	Gesamte Sequenz (%)	Funktionelle Domäne (%)
mCAT-3	82	73
rCAT-3	83	88
hCAT-1	61	71
hCAT-2A	58	52
hCAT-2B	59	71
SLC7A4	42	42

Tabelle 10 Sequenzvergleich von hCAT-3 zu der CAT-3-Isoform aus den Spezies Maus und Ratte und den anderen humanen CAT-Proteinen (Closs und Mann 1999)

Die Tabelle zeigt einen Vergleich der Identität der Aminosäure-Sequenzen von hCAT-3 zu mCAT-3 bzw. rCAT-3. Zusätzlich vergleicht sie hCAT-3 mit den anderen hCAT-Isoformen und dem verwandten Proteins SLC7A4. Die Zahlen geben die % Identität nach einer optimalen Ausrichtung der gesamten Sequenz oder nur der funktionellen Domäne an. Zur optimalen Ausrichtung wurde das NCBI Blast Programm verwendet.

V.1 Vergleich des Substratspektrums und der Transportkinetik

In der Literatur wird immer wieder gezeigt, dass Sequenzhomologien zwischen verschiedenen Isoformen eines Transportsystems nicht unbedingt zu denselben Transport-Eigenschaften führen oder die Isoformen ein anderes Substratspektrum zeigen (Closs *et al.*, 1993a). So werden beim Absuchen von Genbanken oft Transporter entdeckt, die zwar Sequenzhomologien zu bekannten Transportern aufweisen, bei denen sich aber ein anderes Substratspektrum herausstellt. So wurden z.B. mit Oligonukleotiden, die eine Sequenzhomologie zu einer Region des GABA-Transporters aufweisen, die Na⁺-abhängigen

Transporter für Dopamin (Giros *et al.*, 1991) und Serotonin kloniert (Hoffman *et al.*, 1991). Auch bei den kationischen Aminosäuretransportern treten trotz hoher Sequenzhomologien Unterschiede auf. Obwohl die Identität zwischen den Isoformen CAT-2A und CAT-2B bei 97% liegt, wird CAT-2A nicht zum System y^+ gerechnet. CAT-2A besitzt eine geringere Affinität zu basischen Aminosäuren und so gut wie keine Trans-Stimulierbarkeit. Vergleicht man die Sequenz des SLC7A4 mit den hCATs kann man vermuten, dass es sich dabei ebenfalls um einen Transporter für basische Aminosäuren handelt. Es konnte aber in unserer Arbeitsgruppe keine Transportaktivität für L-Arginin gezeigt werden (Wolf, Dissertation 2001; Wolf *et al.*, 2001). Aufgrund der Homologie von SLC7A4 zu einem Ornithin/Putrescin-Austauscher aus Hefen und Bakterien (Igarashi und Kashiwagi 1999) wären auch Polyamine als Substrat denkbar, aber auch dafür konnte in Aufnahmeversuchen keine Transportaktivität beobachtet werden. SLC7A4 konnte also bislang, trotz der Sequenzhomologie zu Transportern, weder dem System y^+ noch einem anderen Transportsystem zugeordnet werden. Die Studien über das Substratspektrum von hCAT-3 zeigten, dass es mit dem der übrigen CAT-Isoformen übereinstimmt, nämlich selektiv ist für die basischen Aminosäuren L-Arginin, L-Lysin und L-Ornithin. Von der Isoform hCAT-1 ist bekannt, dass sie bei saurem pH-Wert (5.5) im Gegensatz zu neutralem pH-Wert (7.5) Histidin als Substrat erkennt. Für hCAT-3 war, obwohl er sonst ähnliche Eigenschaften wie CAT-1 zeigte, Histidin bei keinem der beiden pH-Werte ein Substrat. In Maus und Ratte ist der CAT-3-vermittelte L-Arginin-Transport durch weitere Aminosäuren kompetitiv hemmbar. Von Hosokawa *et al.* wurde zwar eine kompetitive Hemmung des L-Arginin-Transports durch L-Citrullin und D-Arginin beobachtet (Hosokawa *et al.*, 1996), jedoch war für den hCAT-3 keine Transportaktivität für L-Citrullin nachweisbar. Darüber hinaus wurde erst bei einer Konzentration von 10mM D-Arginin eine signifikante Hemmung des L-Arginin-Transports (100 μ M) gezeigt. Weder L-Citrullin noch D-Arginin stellten also für hCAT-3 Substrate dar. Für den murinen CAT-3 konnte von Ito & Groudine eine kompetitive Hemmung des Transports außer für basische Aminosäuren auch durch die Aminosäuren L-Methionin, L-Cystein, L-Aspartat und L-Glutamat gezeigt werden. In den hier vorgestellten Untersuchungen für den humanen CAT-3 war jedoch keine Transportaktivität für diese Aminosäuren zu beobachten.

Zur Charakterisierung der Transporteigenschaften wurden Aufnahmestudien mit radioaktiv markierten basischen Aminosäuren im Oozyten-Expressionssystem durchgeführt. Diese Ergebnisse wiesen auf die Zugehörigkeit des hCAT-3 zum y^+ -Transportsystem hin. Die ermittelten Daten für die Substratkonzentration bei halbmaximaler Transportaktivität (K_M -Werte) lagen bei 0,45mM für L-Arginin. L-Lysin wies Werte von 0,65mM und L-Ornithin-

Werte von 0,91mM auf. Die Transportaffinität des hCAT-3 war somit für L-Arginin zweifach höher als die für L-Ornithin. Die Affinität für L-Lysin lag zwischen diesen beiden Werten. Somit ist die Affinität für L-Arginin vergleichbar mit der von hCAT-2B. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Daten für den murinen CAT in Oozyten von Ito (Ito und Groudine, 1997). Diese weisen bei Flux-Studien mit L-[³H] Arginin eine vier bis zehnfach geringere Transportaktivität von mCAT-3 auf, verglichen mit der Aktivität der anderen CAT-Familienmitglieder. Die K_M -Werte für L-Arginin liegen bei 40-60 μ M und für L-Lysin bei 115-165 μ M. Es zeigt sich also eine deutlichere Divergenz zwischen der Affinität zu L-Arginin und L-Lysin von mCAT-3 verglichen mit hCAT-3. Ito fand eine zwei bis dreifach höhere Affinität des mCAT-3 für L-Arginin als für L-Lysin. Für den rCAT-3 wurde die Transport-Kinetik mit L-[³H] Arginin in COS7-Zellen gemessen (Hosokawa *et al.*, 1996) und daraus ein K_M -Wert von 103 μ M bestimmt. Hosokawa folgerte daraus, dass der L-Arginin-Transport von rCAT-3 vergleichbar ist mit dem mCAT-1- und mCAT-2B-vermittelten Transport. Die Werte für mCAT-1 und -2B (ebenso wie die Werte für mCAT-3 und hCAT-3) wurden allerdings in *X. laevis*-Oozyten erhoben. Es ist fraglich, ob die Werte wirklich vergleichbar sind, denn von Hosokawa wurden sehr niedrige L-Arginin-Konzentrationen (bis 1mM) verwendet. Bei dieser von Hosokawa als höchste gewählte Arginin-Konzentration befand sich rCAT-3 bereits in der Sättigung. Die Sättigung des hCAT-3 war erst bei deutlich höheren Werten, nämlich bei ca. 4mM L-[³H] Arginin erreicht.

Die ermittelten Werte für die maximale Transportgeschwindigkeit (V_{max}) von hCAT-3 lagen im Bereich von 1,4nmol/Oozyte/h für die Aminosäuren L-Arginin und L-Lysin. Die V_{max} für L-Ornithin betrug bei 2,5nmol/Oozyte/h. hCAT-3 zeigte also im Vergleich mit CAT-1 und CAT-2B eine ähnliche maximale Transportgeschwindigkeit (1,1-1,8 bzw. 1,1-4,0 nmol L-Arg/Oozyte/h). Diese Ergebnisse weichen stark von den V_{max} -Werten, die Ito für den mCAT-3 in Oozyten beschreibt (0,02-0,06 nmol/Oozyte/h) ab. Letztere liegen also ca. um das 50-fache niedriger als die Werte, die für die anderen Isoformen und hCAT-3 beobachtet wurden. Auch bei Untersuchungen des rCAT-3, der transient in COS7-Zellen exprimiert wurde, konnte von der Arbeitsgruppe Hosokawa nur ein etwa zweifacher Anstieg der Transportrate für basische Aminosäuren gezeigt werden (Hosokawa *et al.*, 1996). Möglicherweise war aber eine geringe Transfektionsrate dafür verantwortlich.

Daraus wird deutlich, dass es Unterschiede im Substratspektrum und den Transport-Eigenschaften von CAT-3 gegenüber den CAT-Isoformen, -1, -2A, und -2B als auch zwischen den Spezies Mensch, Maus und Ratte gibt. Vergleicht man die K_M und V_{max} -Werte innerhalb einer Isoform zwischen den Spezies zeigen sich deutliche Unterschiede. Diese Varianz zeigt

sich in den Isoformen hCAT-1, -2A und -2B im Vergleich zwischen den Spezies nicht, die Ergebnisse sind einheitlicher. Möglicherweise sind die variierenden Werte in den Unterschieden auf Ebene der Aminosäuresequenz der funktionellen Domäne des CAT-3 aus der jeweiligen Spezies begründet. In diesem Bereich von 43 Aminosäuren unterscheiden sich der humane und murine CAT-3 in 11 Aminosäuren, CAT-3 von Mensch und Ratte in 5 Aminosäuren und CAT-3 von Maus und Ratte in 7 Aminosäuren. Zu hCAT-2A und dem verwandten Protein SLC7A4 ist die Differenz noch deutlich größer (Tabelle 10). Die Möglichkeit, dass in der Sequenz von mCAT-3, der die größten Unterschiede aufweist, eine Mutation oder ein Klonierungsfehler vorliegt ist nahezu ausgeschlossen, denn die Maus cDNA-Sequenz ist zu 100% mit der genomischen DNA identisch. Es scheint sich um einen wirklichen Spezies-Unterschied zwischen einerseits Mensch und Maus und andererseits auch zwischen Maus und Ratte zu handeln. Dabei ist erstaunlich, dass der Unterschied zwischen Mensch und Ratte geringer ist als der zwischen Maus und Ratte. Bei der Isoform CAT-1 ist die Differenz zwischen den Spezies geringer. So unterscheiden sich hCAT-1 und mCAT-1 in nur 7 Aminosäuren. Im Gegensatz zur CAT-3-Isoform unterscheiden sich ihre Transporteigenschaften kaum. Neben den bereits erwähnten Unterschieden in der Versuchsdurchführung bieten die Unterschiede der Aminosäuren in der funktionellen Domäne eine mögliche Erklärung für die differierenden Transporteigenschaften von CAT-3 zwischen den einzelnen Spezies.

	Expressionssystem	K_M [mM L-Arg]	V_{max} [nmol/Oozyte/h]
hCAT-3	<i>X. laevis</i> Oozyten	0,45	1,4
mCAT-3	<i>X. laevis</i> Oozyten	0,04	0,02-0,06
rCAT-3	COS7-Zellen	0,13	keine Daten
hCAT-1	<i>X. laevis</i> Oozyten	0,11-0,16	1,6-1,8
hCAT-2A	<i>X. laevis</i> Oozyten	3,36-3,90	2,2-8,4
hCAT-2B	<i>X. laevis</i> Oozyten	0,32-0,73	1,2-4,0
mCAT-1	<i>X. laevis</i> Oozyten	0,14-0,25	1,1-1,6
mCAT-2A	<i>X. laevis</i> Oozyten	2,10-5,20	3,9-7,1
mCAT2B	<i>X. laevis</i> Oozyten	0,25-0,38	1,1-3,4

Tabelle 11 Vergleich der Transporteigenschaften der CAT-Isoformen

Die Tabelle zeigt die K_M und V_{max} -Werte der verschiedenen CAT-Isoformen aus Mensch (h), Maus (m) und Ratte (r). Für den rCAT-3 wurden in COS7-Zellen keine V_{max} -Daten erhoben.

V.1.1 Vergleich der hCAT-3-Transportaktivität für L-Arginin bei unterschiedlichen pH-Werten

Aufgrund der deutlichen Homologie von CAT-3 zu den anderen CAT-Isoformen stellte sich die Frage, ob der pH-Wert Einfluss auf die hCAT-3-vermittelte Transport-Aktivität für L-Arginin hat. Die Bedeutung des pH-Wertes wurde bereits für einzelne Isoformen der CAT-Familie und bei den System L-Aminosäuretransportern (LAT) untersucht. So ist die Transportaktivität von LAT2 bei pH 6,5 höher als bei pH 8,5. Die Isoform LAT1 zeigt keine Veränderung der Aktivität (Rajan *et al.*, 2000). Aus diesem Grund wurde ein Spektrum von pH 5,5 bis pH 8,5 gewählt um die Abhängigkeit der hCAT-3-Transportaktivität vom pH-Wert zu testen. Es wurde deutlich, dass der hCAT-3-vermittelte L-Arginin-Transport keine signifikante Änderung der Aktivität bei den verschiedenen pH-Werten zeigte. hCAT-3 demonstriert damit das gleiche Verhalten wie CAT-1, unterscheidet sich aber von hCAT-2A und -2B, die bei pH 5,5 nur eine halbmaximale Transportaktivität aufweisen.

Auch die Expression kann einen Hinweis auf die Notwendigkeit von saurem pH-Wert geben. Handelt es sich um einen Transporter, der hauptsächlich in Verdauungsorganen exprimiert wird, könnte dies bedeuten, dass er einen niedrigen pH-Wert für die optimale Transportaktivität benötigt. Das Expressionsmuster von hCAT-3 in Geweben wie Thymus, Uterus, Testis, Ovar und Brustdrüse deutet unter diesem Aspekt auf Unabhängigkeit der Transportaktivität vom pH-Wert hin.

V.1.2 Vergleich der Na⁺-Abhängigkeit und der Trans-Stimulierbarkeit von hCAT-3

Für die Isoformen CAT-1, -2A und -2B wurde der Transport als Na⁺-unabhängig beschrieben. Auch für hCAT-3 wurde eine Na⁺-Unabhängigkeit bei Versuchen gezeigt, bei denen NaCl im Aufnahmepuffer durch Cholinchlorid ersetzt wurde.

Transporter, die energieunabhängig sind, vermitteln eine dem elektrochemischen Gleichgewicht folgende „erleichterte Diffusion“, d.h. der Transport erfolgt in beide Richtungen der Membran. Eine Besonderheit dieser Transporter ist, dass häufig die Geschwindigkeit der Konformationsänderung durch Substrat auf der Trans-Seite, d.h. der Seite der Membran zu der hintransportiert wird, stimuliert wird. Dieses als Trans-Stimulation bezeichnete Phänomen ist für das y⁺-System bekannt. Die Konzentration des Substrates auf der Trans-Seite spielt dabei eine wichtige Rolle. Die Transportaktivität von CAT-1 ist z.B.

stark reduziert, wenn die Konzentration an basischen Aminosäuren auf der Trans-Seite der Membran weniger als 200µM beträgt (Closs et al., 1993b). Zusätzlich haben heterodimere Aminosäuretransporter die Eigenschaft, eine basische Aminosäure nur im Austausch gegen eine andere Aminosäure zu transportieren (Bröer *et al.*, 2000). Man bezeichnet sie deshalb als strenge Austauscher.

Im Gegensatz zur hCAT-1-vermittelten Transport-Aktivität zeigte hCAT-3 kaum eine Veränderung durch Substrat auf der Trans-Seite der Membran. Die Rate der Trans-Stimulation lag nur bei 2, war also moderat, ähnlich wie die der Isoform hCAT-2B. Die Isoform hCAT-2A ist überhaupt nicht stimulierbar. Für hCAT-2A ist dies sinnvoll, um in Hepatozyten, dem Hauptexpressionsort von hCAT-2A effizient funktionieren zu können, da die Zellen eine geringe Konzentration an basischen Aminosäuren besitzen. Die moderate Trans-Stimulierbarkeit von hCAT-3 in den Efflux-Experimenten deutet aber darauf hin, dass er nicht nur als Austauscher fungiert, sondern auch als Transporter in nur eine Richtung funktioniert. Ein Vergleich zwischen den Spezies Mensch und Maus ergab, dass sie sich in dieser Eigenschaft gleich verhalten. Von Ito *et al.* wurde für mCAT-3 ebenfalls eine moderate Trans-Stimulation mit einer etwa zweifachen Erhöhung der Transportaktivität gezeigt.

V.2 Expression von hCAT-3 in Geweben und Zelllinien

Aus der Literatur sind Expressionsdaten des CAT-3 aus Maus und Ratte bekannt. So wurde mCAT-3 durch in-situ-Hybridisierung in frühen Embryonen im Maus-Mesoderm und in späteren Embryonen im Bereich der Mittelhirn-Thalamus-Hypothalamus-Achse detektiert (Ito und Groudine 1997). Hosokawa *et al.* zeigten Expressionsdaten für den rCAT-3 ebenfalls durch in-situ-Hybridisierung und immunohistochemische Untersuchungen. Sie detektierten das rCAT-3 Protein in Neuronen des ventromedialen Gehirn-Bereiches. Dieser beinhaltet z.B. Nucleus präopticus, Substantia nigra, Amygdala und den hypothalamischen Kern (Hosokawa *et al.*, 1999). In unseren Expressions-Studien konnten wir zeigen, dass sich die hCAT-3-Expression nicht nur auf das Gehirn beschränkt. Mittels Dot-Blot-Analysen detektierten wir bei 76 getesteten Geweben und Zelllinien in Thymus und in Burkitt's Lymphomzellen das stärkste hCAT-3-Signal. Außerdem wurden Signale in Uterus, Testis, Ovar, Brustdrüse und MOLT-4 Leukämiezellen visualisiert. Die hCAT-3 Expression war in diesen Geweben deutlich höher als in den verschiedenen Gehirnbereichen, die Hosokawa und Ito als Expressionsort gezeigt haben. Von den Gehirnbereichen zeigte Thalamus das stärkste Signal, gefolgt von Amygdala und Hippocampus. Zudem konnten wir eine geringe Expression in

Ovar und Magen detektieren. Sie war vergleichbar mit der Signalstärke in einigen Gehirnbereichen wie Medulla oblongata und Nucleus caudatus. Die von uns beobachtete Expression von hCAT-3 in Thalamus und Hippocampus stimmt mit früher veröffentlichten Daten in Maus und Ratte überein (Ito und Groudine 1997; Braissant O. *et al.*, 1999). Bei der Klonierung von hCAT-3 konnten wir damals durch das Absuchen humaner cerebraler cDNA-Banken nur eine sehr geringe Menge positiver Klone finden (Vékony, Diplomarbeit 1999). Rückblickend gab diese Gegebenheit schon einen Hinweis auf das geringe Vorkommen von hCAT-3 im Gehirn.

Von allen untersuchten fötalen Geweben konnte nur im Thymus eine hCAT-3-Expression gefunden werden, jedoch nicht in Hirn, Herz, Niere, Leber, Lunge oder Magen. Die Stärke des Signals war bei fötalem Thymus und Thymus gleich. Dies bedeutet wahrscheinlich, dass die hCAT-3-Expression in weiten Teilen auf das embryonale Stadium der untersuchten Gewebe beschränkt ist. Für eine genauere Analyse müssten z.B. RNase-Verdauungsschutz-Experimente mit bisher nicht untersuchten fötalen Geweben stattfinden. hCAT-3 ist im Thymus eindeutig die dominierende CAT-Isoform. In Uterus und Brustdrüse wird der Transporter mit hCAT-1 co-exprimiert.

SLC7A4 wurde auch im zentralen Nervensystem, aber deutlich schwächer exprimiert. Am höchsten zeigte sich seine Expression in Plazenta und Testis. In Testis waren alle CAT-Isoformen detektierbar, hingegen war hCAT-3 in der Plazenta als einzige Isoform nicht nachweisbar.

Weitere Vergleiche des Verteilungsmuster von hCAT-3 mit dem der anderen bekannten CAT-Isoformen und dem SLC7A4-Protein zeigten, dass die Isoformen hCAT-1 und -2 (A oder B) die dominierenden Isoformen im menschlichen Gehirn darstellten. Für den rCAT-1 wurde eine neuronale und gliale Expression beschrieben. In neuronalen Kulturen, die von Hypothalamus und Hirnstamm der Ratte angelegt wurden, wurden basale Transportraten mit CAT-1 Aktivität in Verbindung gesetzt (Braissant O. *et al.*, 1999). Die Expression von hCAT-2 (A oder B) im Gehirn wurde von unserer Arbeitsgruppe erstmals deutlich dokumentiert. Da die zur Hybridisierung verwendete Probe die spleiß-Varianten -2A und -2B nicht unterscheiden konnte, sind hier weitere Untersuchungen nötig, um die Expression der jeweiligen CAT-Isoform genauer bestimmen zu können.

In unserer Arbeitsgruppe wurde vermutet, dass hCAT-3 oder das SLC7A4-Protein eine Rolle bei der Versorgung der neuronalen NOS spielen könnten. Nachdem aber bei der Charakterisierung von SLC7A4 keine Transportaktivität detektiert werden konnte, musste davon ausgegangen werden, dass SLC7A4 keine Rolle bei der Bereitstellung von basischen

Aminosäuren spielt. Für hCAT-3 konnte bei den von uns durchgeführten dot-Blot-Analysen in den Geweben des ZNS mit dem stärksten hCAT-3-Signal (Thalamus und Amygdala) nur eine geringe nNOS-Expression gezeigt werden. In den ZNS-Geweben, in denen die nNOS stark exprimiert wurde, konnte entweder nur ein sehr schwaches (Nucleus caudatus) oder gar kein hCAT-3-Signal (Cerebellum, Putamen) detektiert werden. Auch in peripheren Geweben ergab sich keine Korrelation zwischen der Expression des hCAT-3 bzw. SLC7A4 und der nNOS. Diese Ergebnisse sprechen gegen eine Funktion von hCAT-3 bzw. SLC7A4 für die Substratversorgung der nNOS.

Es gibt Hinweise, dass L-Arginin-metabolisierende und -synthetisierende Enzyme im Hirn in verschiedenen Zelltypen lokalisiert sind. Diese sind auf den Austausch von L-Arginin oder dessen metabolische Zwischenprodukte von Zelle zu Zelle angewiesen (siehe Review Wiesinger H., 2001). hCAT-3 ist möglicherweise in solchen Zellen exprimiert, die L-Arginin oder andere basische Aminosäuren benachbarten Zellen zur Verfügung stellen. Die von uns gezeigte geringe Trans-Stimulierbarkeit von hCAT-3 macht ihn zu einem möglichen Kandidaten für den Efflux von basischen Aminosäuren, besonders wenn die extrazelluläre Konzentration an basischen Aminosäuren gering ist. Diese Fragestellung, sowie die spezifische Rolle des hCAT-3 im Thymus, aber auch in anderen Geweben muss noch genauer untersucht werden. Zu diesem Zweck sollten mit humaner Thymus-mRNA RNase Verdauungsschutzanalysen durchgeführt werden. Zusätzlich können mit den in unserer Arbeitsgruppe generierten Antikörpern gegen hCAT-3 Untersuchungen auf Proteinebene durchgeführt werden.

V.3 Generierung polyklonaler Antikörper gegen hCAT-3 und das verwandte Protein SLC7A4

Als die Arbeitsgruppe von Cunningham den ersten Versuch unternahm, mCAT-spezifische Antikörper zu gewinnen, ergaben sich massive Schwierigkeiten (Kim und Cunningham, 1993). Diese resultierten aus dem Umstand, dass es sich um hydrophobe Membranproteine handelt, von denen nur sehr kurze Sequenzbereiche aus der Membran herausragen. Darüber hinaus gelingt die Überexpression in Bakterien nur schlecht, da sich die CAT-Proteine als toxisch für die Bakterien erweisen. Aufgrund dessen ist es ratsam, nur einen geringen Sequenzbereich zur Generierung der CAT-Antikörper zu verwenden.

Da es zur Untersuchung der CAT-Protein-Expression sowie zur Klärung der posttranskriptionellen oder posttranslationellen Regulationsmechanismen notwendig ist, mit Antikörpern zu arbeiten, wurden auch in unserer Arbeitsgruppe Antikörper gegen CAT-3 und

SLC7A4 hergestellt. Closs und Gräf konnten Antikörper gegen den C-Terminus der humanen und murinen CAT-1 und CAT-2-Proteine generieren (Closs *et al.*, 1993a; Gräf 1998). Auch Woodard *et al.* versuchten mCAT-1 spezifische Antikörper zu gewinnen (Woodard *et al.*, 1994), allerdings verwendeten sie synthetisierte Peptide zur Immunisierung. Auch in unserer Arbeitsgruppe wurden anti-Peptidantikörper, gegen die funktionelle Domäne von hCAT-2A, generiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden Antikörper gegen den C-Terminus des humanen und murinen CAT-3 und des SLC7A4-Proteins hergestellt. Zu diesem Zweck wurden die jeweiligen cDNA-Fragmente, die für die C-Termini von hCAT-3, SLC7A4 und mCAT-3 kodieren (35 Aminosäuren für CAT-3, 49 Aminosäuren für SLC7A4) in den bakteriellen Expressionsvektor pATH-1 gesetzt. Daraus resultierten die trpE/CAT-Fusionsproteine HC3.pATH-1, mC3.pATH-1 und HC4.pATH-1 mit Massengewichten von 40.7 bzw. 42.3 kDa. Die trpE-Fusionsproteine waren nach der Induktion in Bakterien deutlich überexprimiert und wurden zur Immunisierung in jeweils 3 Kaninchen eingesetzt. Zur Klonierung der GST-Fusionsprotein-Konstrukte wurden die identischen C-terminalen Fragmente verwendet wie zuvor bei den trpE-Konstrukten. Auch diese ließen sich überexprimieren. Die Immunplasmen wurden an CAT-3- und SLC7A4-exprimierenden Oozyten und in hCAT-3 überexprimierenden U373MG Glioblastom-Zellen untersucht. Das vor der Immunisierung entnommene Präimmunplasma zeigte fast keine unspezifischen Banden. Die wenigen bestehenden Banden könnten daraus resultieren, dass die Tiere nicht völlig isoliert gehalten werden konnten und im Tierstall weiteren unspezifischen Antigenen ausgesetzt waren.

Die Immunplasmen wurden über GSH-Säulen affinitätsaufgereinigt. Erst diese Aufreinigung erbrachte eine mögliche Auswertung in Western-blot Analysen. Bei der Untersuchung der Rohplasmen konnte aufgrund der Überdeckung durch starke Hintergrundfärbung kein spezifisches Signal detektiert werden. Eine mögliche Erklärung hierfür sind im unaufgereinigten Plasma vorhandene Proteine, die sich durch unspezifische Reaktionen störend auswirken können. Die Notwendigkeit des Aufreinigungsschrittes unterscheidet sich von früheren Antikörper-Generierungen, die in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurden. Für anti-hCAT-2/Kh2 und anti-mCAT-2/Km4 konnten bereits vor der Aufreinigung eindeutige Signale im Western-Blot gezeigt werden (Gräf, Dissertation 1998). Aber auch hier erbrachte die Affinitäts-Aufreinigung eine Reduzierung der Hintergrundfärbung. Die Affinitäts-Aufreinigung der Plasmen ist also generell zu empfehlen. Nach der Aufreinigung wurden die Antikörper in 4 Fraktionen aufgefangen, um nach Western-Blot-Analysen diejenigen mit dem stärksten Signal auswählen zu können. Dabei zeigte sich, dass in allen

Fraktionen spezifische Signale detektiert werden konnten, aber gerade in der ersten Fraktion noch starke Hintergrundfärbung zu sehen war. So konnten selten alle 4 Fraktionen verwendet werden. Vergleichende Western-Blot-Analysen der Seren von Kaninchen, die nach der Grundimmunisierung weitere 2-4-mal immunisiert wurden zeigten für die 2- und 3-mal immunisierten Kaninchen die klarsten Signale. Die 4-mal gespritzten Kaninchen zeigten eine erhöhte Hintergrundfärbung. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die längere Exposition der Tiere mit Antigenen im Tierstall sein. Aber von allen drei Kaninchen, die pro Antigen zur Immunisierung eingesetzt wurden, konnte das Serum verwendet werden, so dass von einer sehr guten Ausbeute bei der Immunisierung gesprochen werden kann.

Der Spezifitäts-Nachweis der affinitäts-aufgereinigten Antikörper wurde in transfizierten U373MG Glioblastom-Zellen erbracht. Da die C-Termini der verschiedenen CAT-Isoformen nicht gut konserviert sind, war zu erwarten, dass es nicht zu einer Kreuzreaktion kommen würde. Tatsächlich konnte keine Kreuzreaktion für die Proteine der verschiedenen hCAT-Antikörper beobachtet werden. Die Spezifität der Antikörper ist von besonderer Bedeutung, wenn z.B. die Expression oder bestimmte Eigenschaften von Proteinen in Zelllinien oder Geweben untersucht werden soll, in denen mehr als eine CAT-Isoform exprimiert wird. Da CAT-1 ubiquitär exprimiert wird und mit CAT-3 kolokalisiert ist, würde ein nicht spezifischer Antikörper zu falschen oder nicht eindeutigen Ergebnissen führen.

Bei der Beantwortung der Frage, welche Rolle hCAT-3 im Thymus spielt, wo er seine stärkste Expression besitzt und gleichzeitig die dominante Isoform ist, ist ein spezifischer Antikörper gegen das hCAT-3-Protein notwendig. Durch den spezifischen Antikörper können gezielt Fragestellungen zur Regulation von hCAT-3 im Thymus und anderen Geweben untersucht werden. Weiterhin könnten Ergebnisse, die bisher nur auf RNA-Ebene gewonnen werden konnten, durch die Verwendung isoformspezifischer Antikörper auch auf Protein-Ebene überprüft werden. Durch die Verwendung der Antikörper in Western-Blot-Analysen ist es möglich ohne Radiobiochemika (wie z.B. in RNase-Verdauungsschutz-Analysen) Regulationsmechanismen zu untersuchen. Die Rolle der hCAT-3 und SLC7A4-Proteine kann während verschiedener Stimuli (z.B. LPS, Interferon oder Insulin) in verschiedenen Zelllinien und Geweben genauer überprüft und ihre Rolle in einer speziellen Situation aufgeklärt werden. Gerade beim SLC7A4-Protein, für das bisher keine Transport-Aktivität gezeigt werden konnte, wird ein spezifischer Antikörper zur Aufklärung seiner Rolle im Organismus beitragen können.

Nach dem Modell der 14 Transmembrandomänen des hCAT-3 befindet sich die einzige putative N-Glykosylierungsstelle in der dritten extrazellulären Schleife. Auch das SLC7A4-

Protein weist in der dritten extrazellulären Schleife eine N-Glykosylierungsstelle auf und darüber hinaus je eine weitere in der zweiten und sechsten extrazellulären Schleife. Durch die gewonnenen Antikörper konnten Untersuchungen der Glykosylierung des hCAT-3- und des SLC7A4-Proteins durchgeführt werden. Hierfür wurden die Lysate teilweise mit N-Glykosidase F behandelt. Die deglykosylierten Proteine sind im SDS-PAGE als schärfere Bande detektierbar. Der hCAT-3 Antikörper detektierte in Lysaten von U373MG Glioblastom-Zellen spezifische Banden in der Höhe von ca. 86 bzw. 67 kDa, jeweils für die glykosylierte bzw. deglykosylierte Form. Die Banden im SDS-PAGE wiesen scheinbar eine geringere Molekularmasse der Proteine auf als sie es nach Berechnung der Molekularmasse aufweisen müssten. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass Membranproteine sehr hydrophob sind und sich Abweichungen im Laufverhalten ergeben können. Zusätzlich verändert sich das Laufverhalten durch die Zusammensetzung der verwendeten SDS-PAGE. Werden für die Versuche 10- oder 12,5%ige SDS-PAGE verwendet, laufen die Banden der CAT-Proteine bei einer höheren Molekularmasse als in 8%igen Gelen. Dieses Phänomen wurde von Wolf auch für CAT-1 gezeigt (Wolf, Dissertation 2001). Die mit N-Glykosidase F behandelten Lysate zeigten eine Verlagerung der Molekularmasse gegenüber den unbehandelten Lysaten. Die hCAT-3 und SLC7A4-Proteine lagen demnach in U373MG-Zellen in glykosylierter Form vor. Von Gräf konnte gezeigt werden, dass die anderen hCAT-Isoformen (hCAT-1, -2A und B) ebenfalls in der dritten extrazellulären Schleife glykosyliert werden. In Oozyten zeigten Untersuchungen ein anderes Bild als in Zelllysaten. Die Antikörper gegen hCAT-3 und SLC7A4 erkannten ein glykosyliertes Protein von ca. 56kDa. Das deglykosylierte Lysat zeigte ein Signal, das nur wenig verlagert war. In den transfizierten Säuger-Zellen war der Abstand zwischen der Bande der glykosylierten zu den deglykosylierten Fusionsproteinen grösser als in den Oozyten. Wahrscheinlich wird sowohl hCAT-3 als auch SLC7A4 in den Zellen stärker glykosyliert als in Oozyten.

In Western-Blot-Analysen (10%ige SDS-PAGE) detektierte das rCAT-3-Antiserum in COS7-Zellen ein Protein in Höhe von ca. 70kDa (Hosokawa *et al.*, 1999). Die Glykosylierung des rCAT-3-Proteins kann nicht mit den hier gezeigten Daten verglichen werden, denn eine Behandlung mit N-Glykosidase F wurde von Hosokawa nicht durchgeführt.

V.3.1 Endogene Expression in NT2-Teratokarzinom-Zellen

Bei bisher durchgeführten Experimenten wurde hCAT-3 entweder als hCAT-3.EGFP-Konstrukt in Oozyten exprimiert oder in U373MG Glioblastom-Zellen stabil transfiziert und dort mit dem EGFP-Antikörper untersucht. Die endogene Expression konnte erst durch die

hCAT-3-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Zwar fällt der Nachweis des hCAT-3-Proteins in stabil transfizierten Zellen leichter, da das Protein überexprimiert wird, aber es ist notwendig, Ergebnisse die im überexprimierten Zellsystem erhoben wurden, auch für das endogen exprimierte hCAT-3-Protein nachzuweisen. Auf mRNA-Ebene konnten wir hCAT-3 als prominente CAT-Isoform bereits in NT2-Teratokarzinom-Zellen nachweisen (Vekony, Diplomarbeit 1999; Wolf *et al.*, 2001). In diesen Zellen erkannte der von uns hergestellte hCAT-3 Antikörper das endogene hCAT-3-Protein in einer Höhe von etwa ca. 65 (glykosyliert) bzw. 55kDa (deglykosyliert). Damit bietet sich nun die Möglichkeit, die hergestellten Antikörper für Immunfluoreszenzstudien einzusetzen oder zur Überprüfung der endogenen PKC-vermittelten Regulation von hCAT-3 (oder SLC7A4) in verschiedenen humanen Zelllinien. In NT2-Teratokarzinom-Zellen kann die endogene Expression von Zelloberflächen-Proteinen durch den Einsatz des hCAT-3-Antikörpers untersucht und mit den Daten in überexprimierten Zellen verglichen werden. Möglicherweise könnten auch weitere Zelllinien identifiziert werden, in denen hCAT-3 endogen exprimiert wird.

V.4 Subzelluläre Verteilung des hCAT-3 in humanen Zellen

Durch das hCAT-3.-EGFP-Fusionsprotein war es möglich, die subzelluläre Verteilung des hCAT-3-Proteins in stabil transfizierten U373MG Glioblastom-Zellen untersuchen zu können. Durch Western-Blot-Analysen der biotinylierten Zelloberflächen-Proteine konnte ermittelt werden, dass intrazellulär mehr Protein vorhanden war als an der Zelloberfläche. Das Verhältnis von Gesamtlysat zu Zelloberflächen-Protein lag bei einem Faktor von 5-10, das bedeutet, dass 10-20% vom hCAT-3-Gesamtprotein der Zelle an der Zelloberfläche lokalisiert sind. Ein Grund für diese niedrigen Werte könnte eine schlechte Ausbeute bei der Biotinylierung sein, jedoch zeigen Untersuchungen an anderen Transportern ein ähnliches Bild.

Rotmann *et al.* zeigte eine ähnliche subzelluläre Verteilung von hCAT-1. Mit Hilfe konfokaler Mikroskopie an transient transfizierten Zellen (U373MG Glioblastom-Zellen, DLD-1 Kolonkarzinomzellen und EA.hy 926 Endothelzellen) wurde die Expression an der Zelloberfläche und die Akkumulation des hCAT-1.EGFP-Proteins in intrazellulären Membranen oder Vesikeln gezeigt (Rotmann *et al.*, 2003; Rotmann, Dissertation 2003). Durch Western-Blot-Analysen der biotinylierten Zelloberflächen-Proteine wurden die durch konfokale Mikroskopie erhobenen Befunde bestätigt. Für die CAT-Isoform hCAT-2B konnte wie auch für SLC7A4 in unserer Arbeitsgruppe mittels konfokaler Mikroskopie eine intrazelluläre Anhäufung gezeigt werden (Wolf *et al.*, 2001; Wolf, Dissertation 2001).

Masuda *et al.* stellten in HEK-293-Zellen (humane embryonale Nieren 293 Zellen) zwar die höchste Expression von mCAT-1.EGFP an der Zelloberfläche fest, fanden aber eine geringe Fluoreszenz in granulären Vesikeln. Immunfärbungen führten zu dem Ergebnis, dass das mCAT-1.EGFP-Protein im Golgi-Apparat lokalisiert ist. In unserer Arbeitsgruppe wurde mittels Immunfärbungen für das humane Orthologe aber keine Akkumulation im Golgi-Apparat nachgewiesen. Ebenso wurde eine Kolo-kalisation von hCAT-1.EGFP mit Endosomen und endoplasmatischem Retikulum ausgeschlossen. Dagegen wurde wurde hCAT-1.EGFP in Lysosomen nachgewiesen (Rotmann, persönliche Mitteilung).

Western-Blot-Analysen von biotinylierten Zelloberflächen-Proteinen führten zu dem Ergebnis, dass die intrazelluläre Expression des endogenen hCAT-3-Proteins auch in den humanen NT2-Teratokarzinom-Zellen höher war als an der Zelloberfläche. 10-20% des Gesamtproteins wurden an der Zelloberfläche exprimiert. Um die subzelluläre Lokalisation des hCAT-3 genauer untersuchen zu können, sollten weitere Versuchen wie z.B. Immunfärbungen mit unterschiedlichen Zellorganellmarkern sowohl in stabil transfizierten Zellen als auch für den endogen exprimierten hCAT-3 durchgeführt werden. Obwohl die mittels Biotinylierung gezeigte Verteilung des stabil transfizierten und endogen exprimierten hCAT-3 gleich zu sein scheint, muss beachtet werden, dass die subzelluläre Lokalisation je nach Zelltyp unterschiedlich sein kann. In verschiedenen Zelltypen könnten sich die CAT-Proteine in jeweils intrazellulären Vesikeln anreichern. In diesen Vesikeln könnten die CAT-Proteine gespeichert werden, um im Bedarfsfall durch eine posttranslationale Regulation zur Verfügung gestellt werden zu können.

V.4.1 PKC-vermittelte Regulation der hCAT-3 Expression

In unserer Arbeitsgruppe wurden Veränderungen der Transportaktivität an hCAT-3-exprimierenden Oozyten und U373MG-Zellen, die mit dem hCAT-3.EGFP-Konstrukt stabil transfiziert waren, nach der Behandlung mit dem PKC-Aktivator Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) untersucht. Die Experimente zur Transportaktivität in Oozyten wurden von G. Niegisch erhoben. Aufnahmestudien an transfizierten U373MG-Zellen wurden von D. Gassner durchgeführt. Fluoreszenzmikroskopische Daten stellte A. Rotmann zur Verfügung. Zusammengefasst wurden die Ergebnisse, in einer gemeinsamen Veröffentlichung (Rotmann *et al.*, 2005).

Durch das Fusionsprotein hCAT-3.EGFP konnte die Expression von hCAT-3 an der Zelloberfläche mittels fluoreszenz-mikroskopischer Untersuchungen visualisiert werden. Dabei wurde deutlich, dass die Behandlung der Zellen mit PMA zu einer Verminderung der

hCAT-3-Expression an der Zelloberfläche führt. Diese Reduktion ging mit einer Verminderung der Transportaktivität einher. Durch einen weiteren PKC-Aktivator, den Phorbol-12,13-dibutyrat (PDBu), jedoch nicht durch den inaktiven Phorbol-12,13-didecanoat (4α -PDD), wurde eine ähnliche Reduktion der Transportaktivität in U373MG-Zellen gezeigt. Dagegen hatten Forskolin und IBMX keinen Effekt auf den L-Arginin-Transport, was darauf hinweist, dass die hCAT-3-Aktivität zwar durch PKC reguliert wird, aber nicht über einen cAMP oder cGMP-abhängigen Weg. Nach diesen Ergebnissen kann davon ausgegangen werden, dass die durch PMA bedingte Reduktion der Transportaktivität und Expression von hCAT-3 durch eine Aktivierung der PKC zustande kommt. Um die für die Regulation verantwortliche Isoform der PKC identifizieren zu können, wurde Thymeleatoxin, ein selektiver Aktivator der klassischen PKC-Isoform verwendet. Mit Thymeleatoxin behandelte Zellen zeigten eine ähnliche Reduktion des Transports wie PMA. Im Gegensatz dazu konnte mit Phosphatidylinositol-3, 4, 5-triphosphatdipalmitoyl (PIP), einem Aktivator der neuen PKC-Isoformen, kein Effekt auf den hCAT-3-vermittelten Transport beobachtet werden, was für eine Beteiligung der cPKC spricht.

Weiterhin wurde mit den PKC-Inhibitoren RO 31-8221 und BIM I, die hauptsächlich Ca^{2+} -abhängige klassische PKC-Isoformen hemmen, der inhibitorische Effekt der PKC-Aktivatoren weitestgehend aufgehoben, was zusätzlich auf die Beteiligung der klassischen PKC-Isoformen hindeutet. Da von den klassischen PKC-Isoformen die PKC α und γ in U373MG-Zellen und Oozyten exprimiert werden, sind diese mögliche Kandidaten bei der Regulation der subzellulären Verteilung von hCAT-3 und auch hCAT-1.

Western-Blot-Analysen der biotinylierten Zelloberflächen-Proteine demonstrierten eine ca. 35%ige Abnahme der hCAT-3-Expression als Antwort auf die PMA-Behandlung und unterstrichen damit die Ergebnisse der konfokalen Mikroskopie. Um die Ergebnisse auch im endogenen System untersuchen zu können, wurde der von uns hergestellte Antikörper gegen das hCAT-3-Protein eingesetzt. Dazu wurden NT2 Teratokarzinom-Zellen verwendet. In diesen Zellen liegen keine Daten zur Transport-Aktivität vor, da die NT2-Zellen eine 30minütige PMA-Behandlung nicht tolerieren. Die Ergebnisse in den NT2-Zellen zeigen, dass die Reduktion der Zelloberflächenexpression des endogen exprimierten hCAT-3 in ähnlichem Ausmaß erfolgt wie beim überexprimierten Fusionsprotein. Das lässt den Schluss zu, dass sowohl der endogene als auch der überexprimierte hCAT-3 auf die gleiche Weise durch die PKC reguliert werden. Die Fusion des hCAT-3-Proteins mit dem EGFP-Protein scheint die Regulation durch die PKC nicht zu beeinflussen. Mit den gezeigten Ergebnissen

kann die Inhibition der hCAT-3-Transportaktivität durch eine Reduzierung der Zelloberflächenexpression des Transporters erklärt werden. Ob dafür der verminderte Einbau des Transporters in die Plasmamembran verantwortlich ist oder eine Internalisierung muss in weiteren Versuchen getestet werden. Es können dabei spezifische Inhibitoren für Exozytose, Endozytose oder vesikulären Transport eingesetzt werden. In Übereinstimmung mit den Daten für hCAT-3 wurde von Rotmann für hCAT-1 (auch für hCAT-2A und -2B, persönliche Mitteilung von Rotmann), dieselbe Reduktion der Transportaktivität nach PKC-Aktivierung bzw. Inhibition mit den oben genannten Aktivatoren bzw. Inhibitoren in Oozyten und Zellen gezeigt. Auch in humanen DLD-1-Kolonkarzinom-Zellen mit endogener Expression von hCAT-1 wurden ähnliche Ergebnisse erzielt. Auch hier ist eine Beteiligung der klassischen PKCs für die Reduzierung der Zelloberflächen-Expression verantwortlich (Krotova *et al.*, 2003). Für die hCAT-1-Isoform konnte festgestellt werden, dass die PKC-Aktivierung nicht zu einem gesteigerten Abbau von hCAT-1 führt und die durch PKC hervorgerufene Internalisierung reversibel ist. Die Menge an Gesamtprotein blieb dabei unverändert. hCAT-1 wird weder direkt noch indirekt durch die PKC phosphoryliert wie durch die fehlende Phosphorylierung des Transporters bei *in vivo*-Phosphorylierungen mit ^{32}P [orthophosphat] gezeigt werden konnte (Rotmann *et al.*, 2004). Womöglich wird hCAT-1 durch ein vermittelndes Protein, welches mit dem Transporter interagiert, nach PKC-Aktivierung internalisiert. Die Vermutung liegt nahe, dass die subzelluläre Verteilung von hCAT-3 auf die gleiche Weise reguliert wird wie hCAT-1. Diese Annahme wird durch das identische Verhalten von hCAT-1 und -3 bei der PKC-Aktivierung bestärkt. Es ist denkbar, dass auch bei der PKC-Regulation des hCAT-3 ein derart assoziiertes Protein involviert ist. In der Literatur sind weitere Transporter beschrieben, bei denen der Einfluß einer Änderung der PKC-Aktivität von einem vermittelnden oder assoziierten Protein abhängig ist. Zum Beispiel der GABA-Transporter GAT-1, dessen PKC-abhängige Verringerung der Zelloberflächen-Expression vom Protein SNARE abhängig ist. (Quick *et al.*, 1997). Das PKC α -Bindeprotein PICK1 ist assoziiert mit dem Dopamin-Transporter DAT und scheint für die PKC-induzierte Internalisierung des Transporters verantwortlich zu sein (Torres *et al.*, 2001). Der inhibitorische Effekt von PKC auf den Serotonin-Transporter SERT scheint durch die Abspaltung von der Phosphatase PP2A vermittelt zu sein (Ramamoorthy *et al.*, 1998). Von Bode *et al.* wurde in humanen Hepatomzellen nach PMA-Behandlung ebenfalls eine Inhibition der γ^+ -Transportaktivität beschrieben (Bode *et al.*, 1998). In Experimenten an Lungenarterien-Endothelzellen wurde von Krotova *et al.*, übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Arbeit für hCAT-3 eine Erniedrigung der CAT-1-Transportaktivität nach

PKC-Aktivierung nachgewiesen. Dabei handelte es sich ebenfalls um die klassischen PKC-Isoformen und im Besonderen um die nachgewiesene PKC α , deren Aktivierung durch PMA gezeigt wurde (Krotova *et al.*, 2003). Andere Arbeitsgruppen veröffentlichten gegenteilige Ergebnisse, nämlich eine Erhöhung der System y^+ -Transportaktivität nach PKC-Aktivierung. Pan *et al.* zeigten in HUVEC-Zellen, die mit PMA behandelt wurden, eine ca. 7fache Erhöhung (Pan *et al.*, 1995). Mit einem weiteren PKC-Aktivator (PDBu) behandelte Peritonealmakrophagen zeigten ebenfalls eine 5fach gesteigerte y^+ -Aktivität (Hortelano *et al.*, 1993). Es stellt sich die Frage, ob die verschiedenen PKC-Effekte spezifisch für die Zelllinien sind oder für die jeweilige exprimierte CAT-Isoform. Die hier gezeigten Ergebnisse sprechen gegen letztere Vermutung. Sowohl die Transportaktivität von hCAT-3 in Oozyten und U373MG-Zellen wird durch PKC-Aktivierung reduziert als auch die Transportaktivität der Isoformen hCAT-1, -2A und -2B. Somit ist es unwahrscheinlich, dass eine Erhöhung der System y^+ -Aktivität auf ein unterschiedliches Verhalten der einzelnen Isoform auf PKC-Aktivierung zurückzuführen ist. Das Phänomen, dass eine Aktivierung der PKC unterschiedliche Auswirkung auf die y^+ -Transportaktivität hat, ist wahrscheinlich ein zellspezifisches Phänomen. Auch unterschiedliche Versuchsanordnungen, z.B. längere Inkubationszeiten mit den PKC-Aktivatoren, könnten eine Erhöhung der L-Arginin-Transportaktivität hervorrufen. So zeigte Gräf nach 15stündiger Behandlung von EA.hy 926-Zellen mit PMA eine leichte Steigerung der hCAT-1 Proteinexpression (1,2-1,5 fach). Die Transportaktivität blieb dabei jedoch unverändert (Gräf 1998; Gräf *et al.*, 2001). Krotova *et al.* konnten nach einer Behandlung der Zellen (>4h) mit PMA eine gesteigerte hCAT-1-Transportaktivität messen (Krotova *et al.*, 2003). Zur Klärung dieser Frage müssen Versuche mit weiteren Zelllinien und verlängerten Inkubationszeiten vorgenommen werden. Möglicherweise ergeben sich die unterschiedlichen Effekte auch durch verschiedene assoziierte Proteine, die den PKC-Effekt vermitteln. In weiteren Untersuchungen sollte versucht werden, Proteine zu identifizieren, die mit CAT-Proteinen interagieren. So könnte besser verstanden werden, wie die Zelloberflächen-Expression durch diese Proteine reguliert wird.

VI Ausblick

Die verschiedenen CAT-Isoformen bedürfen isoformspezifischer Antikörper, um die jeweiligen Transporter voneinander unterscheiden zu können. Für die CAT-3-Isoform und das verwandte Protein SLC7A4 liegen diese nun vor. Mit ihnen ist es möglich, die Gewebeverteilung und subzelluläre Lokalisation des hCAT-3 und SLC7A4-Proteins weiter untersuchen zu können und mögliche assoziierte Proteine zu identifizieren. So könnte möglicherweise die Funktion des SLC7A4-Proteins gefunden und gegebenenfalls ein Substrat identifiziert werden, was die Transportfähigkeit aktiviert.

Mit den neu gewonnenen Antikörpern kann die Regulation von hCAT-3 und SLC7A4 durch Phorbolester noch genauer untersucht werden.

- Mit unterschiedlichen Zellorganellmarkern können Immunfärbungen durchgeführt werden, in denen Kolo-kalisationen untersucht und mit den Ergebnissen der übrigen CATs verglichen werden können.
- Auch mit neuen Versuchsanordnungen, z.B. länger Inkubation der hCAT-exprimierenden Zellen mit PMA oder anderen PKC-Aktivatoren ermöglichen eine genauere Beschreibung der System γ^+ -Transportaktivität.
- Die subzelluläre Lokalisation der CAT-Proteine ist scheinbar vom Zelltyp abhängig. Ob die Akkumulation der CAT-Proteine in intrazellulären Vesikeln eine Besonderheit der Proteine in bestimmten Zellen ist und welche Aufgaben diese Vesikel besitzen, muss weiter differenziert werden.

Unsere Experimente konnten klären, dass die Aktivierung der klassischen PKC den hCAT-3-vermittelnden Transport signifikant reduziert. Wie bei der hCAT-1-Isoform wird auch die hCAT-3-Aktivität über eine Reduzierung der Zelloberflächen-Expression erniedrigt, während die Menge an Gesamtprotein unverändert bleibt. Ob die reduzierte Zelloberflächen-Expression von hCAT-3, wie von Rotmann für hCAT-1 vermutet, nicht das Ergebnis einer direkten Phosphorylierung ist (Rotmann *et al.*, 2004), könnte in Experimenten mit mutierten PKC-Phosphorylierungsstellen geklärt werden. Der Mechanismus dieser posttranslationalen Kontrolle ist noch ungeklärt und sollte genauer untersucht werden. Möglicherweise sind für die Regulation der Oberflächen-Expression Proteine verantwortlich, die an die CATs assoziiert sind. Weitere Untersuchungen wie co-Immunfärbungen und co-Immunopräzipitationen sollten zum Ziel haben, solche Proteine zu identifizieren.

Durch *in-vivo*-Phosphorylierung von U373MG Glioblastom-Zellen mit ^{32}P -markiertem Orthophosphat und anschließender Immunpräzipitation sollte im Weiteren gezeigt werden, ob hCAT-3 (und SLC7A4) durch PKC phosphoryliert wird. Auch ob andere Kinasen bei der Regulation eine ähnliche Aufgabe wie die PKC übernehmen, sollte untersucht werden. Durch spezifische Kinaseinhibitoren könnten die beteiligten Kinasen identifiziert werden, die bei einer von der PKC regulierten Kaskade von Bedeutung sind.

Die höchste Expression von hCAT-3 wurde im Thymus gefunden; in anderen peripheren Geweben und im Hirn war sie deutlich geringer. Die spezifische Rolle, die hCAT-3 in diesen Geweben spielt, muss in weiteren Untersuchungen analysiert werden. Bisher scheint hCAT-3 weitgehend (bis auf fötalen Thymus) auf das embryonale Entwicklungsstadium beschränkt zu sein. Daher sollte fötales Gewebe weiterhin auf das Vorhandensein der hCAT-3-Expression untersucht werden. Außer RNase Verdauungsschutz-Analysen können dabei die in dieser Arbeit hergestellten Antikörper eine wichtige Rolle spielen. Sie können diese Fragen auf Proteinebene beantworten.

VII Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Charakterisierung des humanen kationischen Aminosäure-Transporters 3 (hCAT-3) und mit der Generierung spezifischer Antikörper gegen hCAT-3, mCAT-3 und das verwandte Protein SLC7A4.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde gezeigt, dass hCAT-3 glykosyliert und in der Plasmamembran lokalisiert ist. Transportstudien an hCAT-3-exprimierenden *X. laevis* Oozyten demonstrierten einen selektiven Transport von kationischen L-Aminosäuren. Die Transporteigenschaften von hCAT-3 (K_M , V_{max} , Trans-Stimulation) ähnelten den der Isoform hCAT-2B am meisten. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Untersuchungen an CAT-3 von Maus und Ratte, in denen nur eine geringe CAT-Aktivität gezeigt wurde, die zudem durch neutrale und anionische Aminosäuren und durch D-Arginin hemmbar war. Die höchste Expression von hCAT-3 wurde im Thymus gefunden, was bedeutet, dass er nicht auf neuronale Zellen beschränkt ist. Dieser Befund steht im Gegensatz zur ausschließlich neuronalen Expression von rCAT-3 bzw. mCAT-3.

Ein Schwerpunkt der Arbeit lag in der Generierung spezifischer Antikörper gegen die C-Termini des humanen und murinen CAT-3 und des verwandten Proteins SLC7A4. Dafür wurden Antiseren gegen Fusionsproteine zwischen dem bakteriellen trpE-Protein und den C-Termini der jeweiligen Isoform gewonnen. Zur Aufreinigung der Antikörpern wurden Affinitätsäulen mit Fusionsprotein aus Glutathion S-Transferase und den jeweils gleichen carboxyterminalen Aminosäuren von hCAT-3, SLC7A4 und mCAT-3 hergestellt. Zur Überprüfung der Spezifität der Affinitäts-aufgereinigten Antikörper wurden Western-Blot-Analysen mit Lysaten von *X. laevis*-Oozyten durchgeführt, die mit cRNA der jeweiligen Isoform injiziert worden waren. Weiterhin wurden humane U373MG Glioblastom-Zellen, in denen die jeweilige Isoform überexprimiert worden war, zur Überprüfung der Antikörper verwendet. Es konnte nachgewiesen werden, dass die neu gewonnenen Antikörper das jeweilige glykosylierte und deglykosylierte CAT-Protein spezifisch erkannten. Die hCAT-3 Antikörper wurden dazu verwendet die endogene Expression in NT2-Teratokarzinom-Zellen nachzuweisen. Hierbei zeigte sich, dass die intrazelluläre Expression höher war als an der Zelloberfläche. Nur etwa 10-20% des hCAT-3-Gesamtproteins wurden an der Zelloberfläche exprimiert. Die gleiche subzelluläre Verteilung zeigte sich in mit hCAT-3.EGFP stabil transfizierten U373MG -Zellen.

Um die Auswirkung einer PKC-Aktivierung auf die Aktivität und Expression von hCAT-3 untersuchen zu können, wurden Transportexperimente an Oozyten und Western-Blot Analysen mit biotinylierten Zelloberflächen-Proteinen durchgeführt. Der PKC-Aktivator

PMA reduzierte die hCAT-3 Expression um ca. 35% reduziert. Sowohl in *X. laevis* Oozyten, als auch in U373MG-Zellen war die Verminderung der Transportaktivität von einer Reduktion der Zelloberflächen-Expression von hCAT-3 begleitet. Die Vorbehandlung mit dem PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimid I (BIM I) reduzierte beide PMA-Effekt. Es ist daher davon auszugehen, dass die Reduktion der Zelloberflächen-Expression durch PKC vermittelt wurde. Ähnlich wie hCAT-1 scheint auch hCAT-3 durch eine klassische PKC, am wahrscheinlichsten PKC α und PKC γ , herunterreguliert zu werden. Durch konfokale Mikroskopie von überexprimierten hCAT-3.GFP-Konstrukten in U373MG- Zellen konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Ähnliche Ergebnisse wurden auch unter Verwendung der selbst hergestellten Antikörper gegen den endogenen hCAT-3 in NT2 Teratokarzinom-Zellen erzielt.

Literaturverzeichnis

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. (1992) A putative murine ecotropic retrovirus receptor gene encodes a multiple membrane-spanning protein and confers susceptibility to virus infection. *Cell*, **57**, 659-666.

Ayuk, P.T., Sibley C.P., Donnai P., D'Souza S. and Glazier J.D. (2000) Development and polarization of cationic amino acid transporter and regulators in the human placenta. *The American journal of physiology and cellular physiologie*, **278**, C1162-1171.

Barnett, J.E.G., Holman G.D., Chalkley R.A. and Munday K.A. (1974) Evidence for two asymmetric conformational states in the human erythrocyte sugar-transport system. *The Biochemical Journal*, **145**, 417-429

Baron, D.N., Dent C.E., Harris H., Hart E.W. and Jepson J.B. (1956) Hereditary pellagra-like skin rash with temporary cerebellar ataxie, constant renal amino-aciduria and other bizarre biochemical features. *Lancet* **II**: 421-433.

Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A radikal 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.

Braissant, O., Gotoh, T., Loup, M., Mori, M. and Bachmann, C. (1999) *Mol. Brain Res*, **70**, 231-241.

Bröer, A., Wagner C.A., Lang F. and Bröer, S. (2000) The heterodimeric amino acid transporter 4F2hc/y+LAT mediates arginine efflux in exchange with glutamine. *The Biochemical Journal*, **349**, 787-795.

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 transporter: implications for amino acid homeostasis. *J Exp Biol*, **200 (Pt 2)**, 269-286.

Chomczynski, P. and Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*, **162**, 156-159.

Christensen, H.N. (1964) A transport system serving for mono- and diamino acids. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **51**, 337-344.

Christensen, H.N. (1990) Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiological Reviews*, **70**, 43-76.

Christensen, H.N. (1993) Amino acid nutrition: a two step absorptive process. *Nutrition reviews*, **51**, 95-100.

Closs, E.I. (1996) CAT's, 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 (CAT's). *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., Albritten, 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., Gräf, P., Habermeier, A., Cunningham, J.M. and Förstermann (1997) Human cationic amino acid transporter hCAT-1, hCAT-2A, and hCAT-2B: three related carriers with distinct transporter 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 transporter. Identification of a domain that determines the transport properties of the MCAT protein. *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 laevis* oocytes via refigulated subcellular redistribution of the transporter. *J.Biol Chem*, **269**, 14759-14767.

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., 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.

Dumont, J.N. (1972) Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of Oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol*, **136**, 153-179.

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.

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. (1995a) Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control. *Biochem Pharmacol*, **50**, 1321-1332.

Förstermann, U., Kleinert, H., Gath, I., Schwarz, P., Closs E.I., Dun N.J. (1995b) in *Nitric oxide-Biochemistry molecular biology and therapeutic implications* Ignarro, L., and Murad, F., eds), pp. 171-186, Academic Press, San Diego.

Furesz, T.C., Moe, A.J. and Smith, C.H. (1991) Two cationic amino acid transport systems in human placental basal plasma membranes. *The American journal of physiology*, **261**, 246-252.

Giros, B., el Mestikawy S., Bertrand L. and Caron, M.G. (1991) clonino and funktional characterization of a cocain-sensitive dopamine transporter. *FEBS Letters*, **295**, 149-154.

Goldin, A.L. (1992) Maintenance of *Xenopus laevis* and oocyte injection. *Methods Enzymol*, **207**, 266-279.

Granger D.L., Hibbs, J.B., Perfect J.R., and Durack D.T. (1988) Specific amino acid (L-arginine) requirement for the microbistatic activity of murine macrophages. *J Clin Invest*, **81**, 1129-1136.

Gräf, P. (1998) Charakterisierung der Transportproteine für basische Aminosäuren: CAT-1, CAT-2A und CAT-2B. *Inaugraldissertation*. Fachbereich Chemie und Pharmazie. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

Gräf, P., Förstermann, 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.

Habermeier, A., Wolf, S., Martiné, U., Gräf, P. and Closs, E.I. (2003) Two amino acid residue determine the low substrate affinity of human cationic 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.

Hatanaka, T. Huang, W., Wang, H., Sugawara, M., Prasad, P.D., Leibach, F.H. and Ganpathy, V. (2000) Primary structure, functional characteristics and tissue expression pattern of human ATA2, a subtype of amino acid transport system A. *Biochimica et biophysica acta*, **1467**, 1-6.

Hatzoglou, M., James, F., Yaman, I. and Closs, E.I., (2004) Regulation of cationic amino acid transporters, the story of the CAT-1 transporter. *Annu Rev Nutr* **24**, 377-399

Helling, R.B., Goodman, H.M. and Boyer, H.W. (1974) Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lamboid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J Virol*, **14**, 1235-1244.

Hibbs, J.B., Taintor, R.R., Vavrin, Z. (1987) Macrophages cytotoxicity: role for L-arginine deiminase activity and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science*, **235**, 473-476.

Hoffmann, B.J., Mezey, E. and Brownstein, M.J. (1991) Cloning of a serotonin transporter affected by antidepressants. *Science*, **254**, 579-580.

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.

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.

Hosokawa, H., Ninomiya, H., Sawamura, T., Sugimoto, Y., Ichikawa, A., Fujiwara, K. and Masaki, T. (1999) Neuron-specific expression of cationic amino acid transporter 3 in the adult rat brain. *Brain research*, **838**, 158-165.

Huff, R.A., Vaughan, R.A., Kuhar, M.J. and Uhl, G.R. (1997) Phorbol esters increase dopamine transporter phosphorylation and decrease transport V_{max} . *J Neurochem*, **68**, 225-232.

Hyde, R., Tayler, 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.

Janne, J., Alhonen, L. and Leinonen, P. (1991) Polyamines: from molecular biology to clinical applications. *Annals of medicine*, **23**, 241-259.

Jansson, T. (2001) Amino acid transporter in the human placenta. *Pediatric Research*, **49**, 141-147.

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 transporter in *Xenopus* oocytes and show different tissue expression patterns. *Transgene*, **1**, 91-101.

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.

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., Baudet, 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.

Mandel, M. and Higa, A. (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol*, **53**, 159-162.

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 hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res*, **12**, 7035-7056.

Moncada, S. and Higgs, A. (1993) Mechanisms of disease-the L-arginine nitric oxide pathway. *N Engl J Med*, **329**, 2002-2012.

Morgan, D.M.L. (1994) Polyamines, arginine and nitric oxide. *Biochem Society transactions*, **22**, 879-883.

Musleh, W.Y., Shahi, K. and Baudry, M. (1993) Further studies concerning the role of nitric oxide in LTP induction and maintenance. *Synapse*, **13**, 370-375.

Nicholson, B., Sawamura, T., Masaki, T. and MacLeod, C.L. (1998) *J Biol Chem*, **273**, 14663-14666.

Palacin, M (2000) The family of heteromultimeric amino acid transporter reveals aminoaciduria genes. *Nephrology, dialysis, transplantation*, **15**, 5-8.

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., 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 591-600.

Quick, M.W., Corey, J.L., Davidson, N. and Lester, H.A. (1997) Second messengers, trafficking-related proteins, and amino acid residues that contribute to the functional regulation of the rat brain GABA transporter GAT1. *J Neurosci*, **17**, 2967-2979.

Racke, K., Hey, C., Mossner, J., Hammermann, R., Stichnote, C. and Wessler, I. (1998) Activation of L-arginine transport by protein kinase C in rabbit, rat and mouse alveolar macrophages. *J.Physiol. London* **511**, 813-825.

Ramamoorthy, S., Giovanetti, E., Qian, Y and Blakely, R.D. (1998) Phosphorylation and regulation of antidepressant-sensitive serotonin transporters. *J.Biol Chem*, **273**, 2458-2466.

Rotmann A. (2003) Elektrophysiologische Charakterisierung und PKC-vermittelte Regulation des humanen Transporters für basische Aminosäuren hCAT-1. *Inaugralsdissertation*. Fachbereich Biologie. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

Rotmann, A. Strand, D., Martiné, U. and Closs, E.I. (2004) Protein kinase C activation promotes the internalization of the human cationic acid transporter hCAT-1: a new regulatory mechanism for hCAT-1 activity. *J Biol Chem* **279**, 54185-54192

Rotmann, A., Vékony, N., Gassner, D., Niegisch, G., Strand, D. Martiné, U. and Closs E.I. (2005) Activation of classical protein kinase C reduces the expression of the human cationic amino acid transporter hCAT-3 in the plasma membrane. *Biochem J*, **473**, 835-844.

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.

Sambrook, J., Fritsch, S. 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 USA*, **74**, 5463-5467.

Schwartz, I.F., Schwartz, D., Traskonov, M., Chernichovsky, T., Wollman, Y., Gnession, 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.

Sperandio, M.P., Borsani, G., Incerti, B., Zollo, M., Rossi, E., Zuffardi, O., Castaldo, P., Tagliatela, 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.

Simell, O. (1994) in the metabolic and molecular basis of inherited disease (Scriver, C., Beaudet, A., Sly, W., and Valle, D., eds), pp.3603-3627, McGraw-Hill, New York.

Stein, W. D. (1990) Channels, carriers, and pumps. *Academic Press*, Inc.

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.

Thorne, H. V. (1996) 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.

Torres, G.E., Yao, W.D., Mohn, A.R., Quan, H., Kim, K.M., Levey, A.I., Staudinger, J. and Caron, M.G. (2001) Functional interaction between monoamine plasma membrane transporters and the synaptic PDZ domain-containing protein PICK. *Neuron*, **30**, 121-134.

Van Winkle, L.J. (1993) Endogenous amino acid transport systems and expression of mammalian amino acid transport proteins in *Xenopus* oocytes. *Biochim Biophys Acta*, **1154**, 157-172.

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⁺-dependent 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., Chjristensen, 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. (1999) Charakterisierung des humanen Carriere für basische Aminosäuren: hCAT-3. *Diplomarbeit*. Fachbereich Biologie. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

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.

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.

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.

Wiesinger, H. (2001) *Prog. Neurobiol*, **64**, 365-391.

Wolf, S. (2001) Funktionsanalyse des als kationischer Aminosäure-Transporter bezeichneten, humanen Membranproteins, hCAT-4. *Dissertation*. Fachbereich Medizin. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

Wolf, S. Janzen, A., Vékony, N., Martiné, 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 tyoe C ecotropic retrovirus receptor in rat liver cells. *J of Virology*, **68**, 1615-1623.

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.

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 dopamine transporter expressed in *Xenopus* oocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, **282**, 1358-1365.

Teile dieser Arbeit wurden in den folgenden Artikeln veröffentlicht

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.

Wolf, S., Janzen, A., Vékony, N., Martiné, U., Strand, D. and Closs E.I. (2001) Expression of solute carrier 7A4 (SLC7A4) in the plasma membrane is not sufficient to mediate amino acid transport activity. *Biochem J*, 364, 767-775.

Gilles, W., Vulcu, S.D., Liewald, J.F., Habermeier, A., Vekony, N., Closs, E.I., Rupp, J. and Nawrath H. (2005) Monovalent cation conductance in *Xenopus laevis* oocytes expressing hCAT-3. *Biochim Biophys Acta*, 2005 Mar 1; **1668** (2): 234-9.

Rotmann, A., Vékony, N., Gassner, D., Niegisch, G., Strand, D. Martiné, U. and Closs E.I. (2005) Activation of classical protein kinase C reduces the expression of the human cationic amino acid transporter hCAT-3 in the plasma membrane. *Biochem J*, 473, 835-844.

