

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

Lysosomaler Transport kationischer Aminosäuren durch Mitglieder der SLC7-Familie

Dissertation zur Erlangung des Grades „Doktor der
Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

von

Isabel Jaenecke

Geboren am 11.12.1983

In Gießen

Wiesbaden

2012

Dekan:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Prüfung: 19.12.2012

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Lysosomen und lysosomale Erkrankungen	1
1.2	Cystinose – Erkrankung und Therapie	4
1.3	Humane Transporter für kationische Aminosäuren	6
1.3.1	CATs als Untergruppe der SLC7-Familie	7
1.3.2	Die Bedeutung der hCATs	9
1.4	System c – Rettungsweg in der Cystinose-Therapie	10
1.5	Eine Chimäre aus hCAT-2 und SLC7A14 transportiert Arginin über die Plasmamembran	10
1.6	Ziel der Arbeit	12
2	Material und Methoden.....	13
2.1	Material	13
2.1.1	Großgeräte / spezielle Geräte	13
2.2	Molekularbiologische Methoden.....	14
2.2.1	Lösungen	14
2.2.2	Hitzeschocktransformation & Plasmidpräparation aus <i>Escherichia coli</i>	15
2.2.3	Linearisierung & <i>in vitro</i> -Transkription.....	15
2.2.4	Isolation von Gesamt-RNA	16
2.2.5	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	17
2.2.6	Quantitative „real time“ RT-PCR (qRT-PCR).....	18
2.2.7	Oligonukleotide und TaqMan Sonden für qRT-PCR.....	21
2.3	Oozyten von <i>Xenopus laevis</i> als Expressionssystem	23
2.3.1	Lösungen	23
2.3.2	Allgemeines.....	23
2.3.3	Die Oozyten von <i>Xenopus laevis</i> als Expressionssystem.....	24
2.3.4	Gewinnung der Oozyten.....	25
2.3.5	Kollagenasebehandlung & Lagerung der Oozyten	26
2.3.6	Injektion von cRNA in <i>X. laevis</i> Oozyten	27
2.3.7	Transportstudien an <i>X. laevis</i> Oozyten.....	28
2.4	Methoden der Zellkultur.....	29
2.4.1	Handhabung.....	29
2.4.2	Zelllinien und deren Kultivierung	30
2.4.3	Mikroskopie.....	31
2.4.4	Behandlung mit siRNA	32
2.4.5	Transportstudien an humanen Zellen	33
2.5	Proteinbiochemische Methoden	34
2.5.1	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	34
2.5.2	Zelllysate	35

2.5.3	Biotinylierung.....	36
2.5.4	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	39
2.5.5	Western Blot.....	41
2.5.6	Proteinnachweis durch Antikörper.....	42
2.6	RFL-6 Reporterzell-Assay	44
2.6.1	Lösungen & Substanzen.....	44
2.6.2	Transferassay.....	45
2.6.3	Radio-Immun-Assay (RIA).....	46
2.7	Versuche an isolierten Lysosomen.....	47
2.7.1	Lösungen & Materialien.....	47
2.7.2	Isolierung der granulären Fraktion C	48
2.7.3	Aufnahmeversuche mit granulären Fraktionen C	49
2.8	SSM-basierte Elektrophysiologie am SURFE ² R	51
2.8.1	Prinzip & Funktionsweise	51
2.8.2	Lösungen	53
2.8.3	Isolation von lysosomalen Membranen.....	54
2.8.4	Sensorpräparation.....	55
2.8.5	Messung.....	56
3	Ergebnisse	57
3.1	Potentielle Kandidaten für System c	57
3.1.1	hCAT-1 und SLC7A14 sind in humanen Haut-Fibroblasten exprimiert	57
3.1.2	SLC7- Familienmitglieder sind in Lysosomen lokalisiert	59
3.1.3	Mitglieder der SLC7 Familie reichern sich in der granulären Fraktion C an.....	62
3.1.4	SLC7A14 zeigt eine marginale Oberflächenexpression in verschiedenen Expressionssystemen.....	65
3.1.5	SLC7A14 vermittelt keinen Arginin-Transport über die Plasmamembran von U373MG-Zellen	67
3.2	Eine Chimäre aus der „funktionellen Domäne“ des SLC7A14 im Rückgrat des hCAT-2 transportiert kationische Aminosäuren in <i>X. laevis</i> -Oozyten.....	68
3.2.1	hCAT-2/A14_BK ist in der Plasmamembran lokalisiert	69
3.2.2	hCAT-2/A14_BK erkennt sowohl Arginin als auch Lysin	70
3.2.3	Die „funktionelle Domäne“ vermittelt die pH-Abhängigkeit der hCATs.....	70
3.2.4	Die „funktionelle Domäne“ der CATs ist nötig, aber nicht ausreichend um die Hemmung durch ϵ -Trimethyl-L-Lysin zu vermitteln.....	73
3.3	Die Bedeutung von hCAT-1 für den lysosomalen Arginin-Transport zur Versorgung der eNOS in EA.hy926 Endothelzellen.....	74
3.3.1	Reduzierung der hCAT-1-Expression mittels siRNA.....	76
3.3.2	Die Herunterregulation von hCAT-1 in EA.hy926-Zellen beeinträchtigt nicht die lysosomale Versorgung der eNOS mit Arginin.....	79
3.3.3	Reduzierte NO-Produktion in Lysin-inkubierten Zellen ist konfluenz-bedingt....	81
3.3.4	Die Erholung der NO-Produktion durch Zugabe von extrazellulärem Arginin ist durch Herunterregulation von hCAT-1 nicht reduziert	82
3.4	Messung von Transport über lysosomale Membranen mit Hilfe des SURFE ² R ..	84

3.4.1	hCAT-2B.EGFP vermittelt am SURFE ² R messbaren Arginin-Transport	85
3.4.2	Lysosomale aber auch Plasmamembran-Marker reichern sich in den Fraktionen C und 31/45 an	88
3.5	Zeitabhängiger KAS-Transport der Fraktion C.....	90
3.5.1	Arginin-Transport der Fraktion C	90
3.5.2	Lysin-Transport der Fraktion C.....	92
3.6	Falscher Alarm – SLC7A14 vermittelt keinen Histidin-Transport über die Plasmamembran	94
3.6.1	U373MG-SLC7A14.EGFP-Zellen zeigen erhöhten Histidin-Transport bei pH 7,5	95
3.6.2	SLC7A14.EGFP-exprimierende Oozyten zeigen keinen erhöhten Histidin-Transport bei pH 7,5.....	96
3.6.3	Der Na ⁺ -unabhängige Histidin-Transport in U373MG-SLC7A14.EGFP-Zellen wird durch Leucin gehemmt.....	97
3.6.4	U373MG-SLC7A14.EGFP-Zellen zeigen eine erhöhte LAT1-Expression.....	98
3.7	Generierung eines Antikörpers gegen SLC7A14.....	99
3.7.1	Wahl der Peptide	99
3.7.2	Testung der Immunsereen	100
3.8	Endogener SLC7A14 reichert sich in der granulären Fraktion C an	107
3.9	SLC7A14 wird in mit Retinsäure behandelten NT2-Zellen heraufreguliert	108
4	Diskussion	109
4.1	SLC7A14 als Kandidat für einen lysosomalen Transporter für kationische Aminosäuren	109
4.1.1	SLC7A14 – Zuordnung zu den hCATs und Lokalisation.....	109
4.1.2	Eine Chimäre aus der funktionellen Domäne des SLC7A14 im Rückgrat des hCAT-2 vermittelt Arginin-Transport.....	112
4.1.3	Messung von lysosomalem Transport in Zellen die SLC7A14.EGFP überexprimieren.....	114
4.1.4	SLC7A14 als möglicher Histidin-Transporter	116
4.1.5	Hinweise auf Funktion von SLC7A14 als Neurotransmitter-Transporter	117
4.2	Die Funktion der als Plasmamembran-Transporter etablierten hCATs als lysosomale Transporter	120
4.2.1	Intrazelluläre Lokalisation der hCATs	120
4.2.2	Messung von lysosomalen Arginin-Transport durch endogenen hCAT-1 in Endothelzellen	121
4.2.3	Messung von lysosomalen Transport in Überexpressions-systemen	124
4.3	Methodenkritik – Isolation von & Transportstudien an Lysosomen.....	125
4.4	Generierung polyklonaler Antikörper gegen SLC7A14	127
4.5	Ausblick.....	130
5	Zusammenfassung.....	133
6	Abstract	135
A	Anhang	137

A.1	Verwandtschaftsbeziehungen der SLC7-Familie.....	137
A.2	Modelle von hCAT-2A und SLC7A14	138
A.3	Die Transkription von SLC7A14 wird in NT2-Zellen durch die Behandlung mit Retinsäure gesteigert	139
A.4	Transkription von SLC7A14 in verschiedenen Geweben und Zellen.....	140
A.5	Lysosomen-Präparation aus Mäuse-Leber	141
A.6	Expression von PQLC2 in Endothelzellen und Hautfibroblasten	142
A.7	Antikörper gegen humanes γ^+ LAT1	143
	Abkürzungsverzeichnis	144
	Abbildungsverzeichnis	146
	Tabellenverzeichnis	149
	Literaturverzeichnis	150
	Teilveröffentlichungen der vorliegenden Arbeit.....	160

1 Einleitung

1.1 Lysosomen und lysosomale Erkrankungen

Lysosomen wurden erst Mitte des 20. Jahrhunderts als Organellen in der Masse zwischen Plasmamembran und Nukleus, die schlicht als Proteoplasma bezeichnet wurde, entdeckt (de Duve et al., 1955; Appelmans et al., 1955). Im Elektronenmikroskop sind sie als Organellen mit einem Durchmesser von etwa 0,5 – 1 μm und einer hohen Dichte zu erkennen (Holtzmann, 1989). Sie sind Teil des endosomal-lysosomalen Systems. Dieses besteht aus frühen Endosomen, die in der Peripherie der Zelle lokalisiert sind, aus um den Zellkern herum angeordneten späten Endosomen und den eigentlichen Lysosomen. Lysosomen sind Organellen, die durch einen niedrigen internen pH-Wert und viele hydrolytische Enzyme charakterisiert sind und die nicht nur endocytotisch aufgenommenes Material abbauen (Funato et al., 1997), sondern auch Material aus Autophagie (Lawrence & Brown, 1992). Endocytose kann dabei in die Aufnahme von gelösten Partikeln (Pinocytose) und festen Partikeln bis hin zu kleineren Zellen (Phagozytose) unterteilt werden. Autophagie bezeichnet eine spezielle Form der Phagozytose, bei der zelleigene Bestandteile, z.B. Mitochondrien abgebaut werden. Zusätzlich findet in Lysosomen auch Proteolyse von cytosolischen Proteinen statt, die über Mikroautophagie in diese gelangen (Cuervo & Dice, 1996). Daher fungieren Lysosomen auch als Regulatoren, die die Versorgung der Zelle mit Nährstoffen steuern können (Gahl, 1989). Außerdem wurden in verschiedenen Zelltypen Lysosomen identifiziert, die ihren Inhalt nach Fusion mit der Plasmamembran nach außen sekretieren (Stinchcombe & Griffiths, 1999). Eine weitere wichtige Rolle spielt die Calcium-regulierte Exocytose von Lysosomen bei der Reparatur der Plasmamembran (Reddy et al., 2001).

In Abbildung 1A ist dargestellt, wie die im rauen endoplasmatischen Reticulum („rough endoplasmatic reticulum“, RER) gebildeten lysosomalen Enzyme im Golgi Apparat in Vesikel verpackt werden. Die Sortierung der Enzyme in das Lysosom funktioniert dabei hauptsächlich über ihre Modifikation mit Mannose-6-Phosphat (M6P), das durch einen M6P-Rezeptor an der Golgi-Membran erkannt wird. Ob diese am ER gebildeten Vesikel die noch inaktiven Enzyme an primäre Lysosomen (Vellodi, 2005) oder frühe Endosomen (Brulke & Bonifacino, 2009) liefern, ist umstritten. Einig sind sich die Autoren darin, dass sich die Bindung der Enzyme an den Rezeptor nach der Verschmelzung des Vesikel mit der Zielorganelle aufgrund des nun sauren Lumens löst. Erst hier wird das Enzym durch Proteolyse, Faltung oder Aggregation aktiviert. Der M6P-Rezeptor wandert anschließend zurück zum Golgi-Apparat. Das eigentliche Lysosom ist also gekennzeichnet durch die Abwesenheit von M6P-Rezeptoren. Ein weiteres Charakteristikum ist die nur in

der lysosomalen Membran vorkommende als elektrogen oder vakuolär bezeichnete Protonenpumpe V-Typ H^+ -ATPase (Arai et al., 1993). In Abbildung 1B ist gezeigt, dass primäre Lysosomen mit Endosomen, Phagosomen und Autophagosomen verschmelzen können. Nicht gezeigt ist, dass Moleküle auch über Transporter in der lysosomalen Membran in das Lumen des Lysosoms gelangen können, um dort abgebaut zu werden.

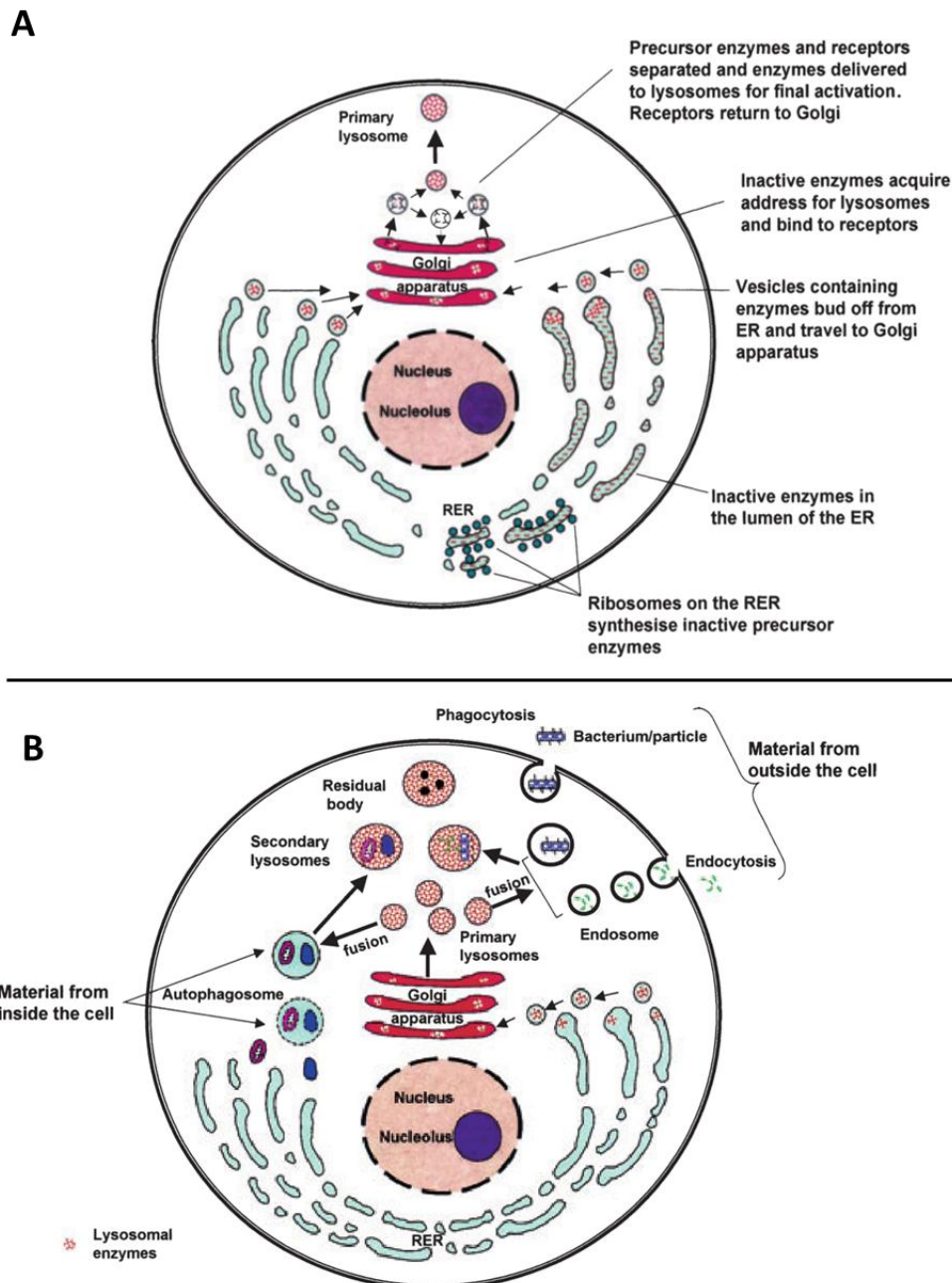


Abbildung 1: Aufbau und Funktion des endosomal-lysosomalen Systems

A zeigt wie lysosomale Enzyme zu ihrem Bestimmungsort gelangen. In B sind die verschiedenen Aufgaben, die ein primäres Lysosom erfüllen kann, dargestellt. Endocytose beschreibt in dieser Abbildung die Aufnahme kleiner Moleküle, während Phagocytose die Aufnahme größerer Partikel/ganzer Zellen bezeichnet. Die Abbildungen wurden aus dem Übersichtsartikel „Lysosomal storage disorders“ (Vellodi, 2005) entnommen.

Defekte in der lysosomalen Funktion führen zu meist schwerwiegenden Erkrankungen, da sich Metabolite in Lysosomen anreichern und diese schädigen. Bisher sind etwa 40 Erkrankungen bekannt, die in der sehr heterogenen Gruppe der „lysosomalen Speicherkrankheiten“ (LS) oder englisch „lysosomal storage disorders“ (LSD) zusammengefasst werden. Allen diesen Krankheiten liegt ein Defekt eines einzelnen Gens zugrunde und bei allen, bis auf drei, handelt es sich um autosomal rezessive Erkrankungen. Die grobe Einteilung der Krankheiten in Gruppen beruht meist auf dem durch den Ausfall des abbauenden Enzyms akkumulierenden Metaboliten. So handelt es sich bei den größten Gruppen der LS um Mukopolysaccharidosen, Mukulipidosen und Sphingolipidosen (Manger, 2010). Ende des 19. Jahrhunderts wurden mit dem Tay-Sachs-Syndrom (1881), Morbus Gaucher (1882) und Morbus Fabry (1898) erstmals LS als eigenständige Krankheiten beschrieben, die alle zu den Sphingolipidosen zählen. Die erste LS bei der 1963 das Enzym, dessen Fehlen die lysosomale Erkrankung verursacht, identifiziert wurde war die Pompe'sche Krankheit (Hers, 1963). Dieser zu den Glykogenose zählenden Erkrankung liegt ein Mangel oder das vollständige Fehlen der α -Glukosidase zugrunde. Seitdem wurde herausgefunden, dass nicht nur Fehler in der Synthese von Enzymen, sondern auch bei deren Faltung, Aktivierung oder Sortierung für Erkrankungen verantwortlich sein können. Auch Defekte in lysosomalen Transportern können zu schwerwiegenden Erkrankungen führen, wie z.B. Cystinose oder die Niemann-Pick Krankheit Typ C.

Zusätzlich zu der Bandbreite von nicht-spezifischen, rein symptomatischen Behandlungen wird die in den 60er Jahren zum ersten Mal vorgeschlagene Enzym-Ersatz-Therapie („enzyme replacement therapy“, ERT) bei mittlerweile über 20 Erkrankungen erfolgreich angewendet (de Duve, 1964; Desnick, 2004). Dabei wird das Enzym entweder direkt injiziert (Brady et al., 1973, 1974), die Restaktivität von wenig vorhandenem oder fehlerhaftem Enzym erhöht („enzyme enhancement therapy“, EET) (Frustaci et al., 2001) oder eine Knochenmarkstransplantation durchgeführt (Hoogerbrugge et al., 1995). Bei der direkten Injektion wird das mit einem MP6 gekoppelte Enzym über MP6-Rezeptoren an der Plasmamembran erkannt und nach Endocytose ins Lysosom transportiert. Nach einer Knochenmarkstransplantation kann das in den gesunden transplantierten Zellen gebildete Enzym über Zell-Zell-Kontakt oder nach Freisetzung in das Plasma in Enzym-defiziente Zellen gelangen. Eine neuere Herangehensweise ist eine Reduktion der akkumulierenden Metabolite durch Eingriffe in die Stoffwechselwege, die diese herstellen („substrate reduction therapy“, SRT) (Cox, 2005). Eine gute Zusammenfassung der LS bietet der Übersichtsartikel „Lysosomal storage disorders“ (Vellodi, 2005).

Die Erkennung lysosomaler Speicherkrankheiten ist aufgrund der sehr heterogenen Phänotypen oft sehr problematisch. Da genetische Analysen kein Standard sind, wird die Erkrankung oft erst diagnostiziert, wenn es schon zu schweren Organschäden gekommen

ist. Eine frühzeitige Diagnosestellung ist allerdings entscheidend für den Erhalt von Organfunktionen und Lebensqualität. Daher ist es wichtig, die Entstehung der Krankheit sowie deren Symptome besser zu verstehen um früher diagnostizieren und besser therapieren zu können.

1.2 Cystinose – Erkrankung und Therapie

Cystinose ist eine autosomale rezessive Erkrankung mit einer Prävalenz von etwa einer pro 100.000 – 200.000 Geburten. Die Erstbeschreibung der Erkrankung erfolgte 1903 von Abderhalden (Abderhalden, 1903) und konnte 1949 als häufigste Ursache für das sogenannte De Toni-Debré-Fanconi Syndrom bestätigt werden (Fanconi & Bickel, 1949). Dieses macht sich meist erst 3 bis 6 Monate nach der Geburt bemerkbar und manifestiert sich in Wachstumsstörungen, Erbrechen, Obstipation und großem Durst verbunden mit zeitweiser Dehydrierung. Die tubuläre Rückresorption sowie die glomeruläre Filtrationsrate nimmt dabei immer weiter ab, so dass es bei unbehandelten Patienten in einem Alter von etwa 10 Jahren zu schwerem Nierenversagen kommt. In einem solchen Fall helfen dann nur noch Dialyse bzw. eine Nierentransplantation.

Der Erkrankung liegt ein Defekt im CTNS (cystine transport nephrotic syndrome)-Gen zugrunde, das für den lysosomalen Cystin-Transporter Cystinosin kodiert (Kalatzis et al., 2001). Bisher konnten über 50 verschiedene CTNS-Mutationen identifiziert werden. Die meist verbreitete (etwa 50% aller Patienten mit Nord-Europäischer Herkunft) ist jedoch die Deletion eines 57 Kilobasen langen DNA-Fragments (Kiehntopf et al., 2002; Anikster et al., 1999; Mason et al., 2003; Shotelersuk et al., 1998; Town et al., 1998). Durch den Ausfall des Cystin-Transporters akkumuliert das beim Proteinabbau anfallende Cystin, ein Dimer aus zwei Cystein-Molekülen, in den Lysosomen (Schulman et al., 1969; Thoene & Lemons, 1982). Da das Löslichkeitsminimum von Cystin zwischen pH 4 und 6 liegt und Proteinabbau ein fortlaufender Prozess ist, kristallisiert das Cystin im Lysosom aus, was einer Schädigung der Zellen führt. Man kann in vielen Patienten Cystin-Kristalle in allen Zellen des Körpers beobachten. Besonders leicht zu erkennen sind Cystin-Ablagerungen in Form von Kristallen in der Cornea (Gahl et al., 2002). Trotz z.T. 100-fach erhöhter intra-lysosomaler Cystin-Werte im Vergleich zu gesunden Patienten, konnten allerdings noch nie Cystin-Kristalle in kultivierten Fibroblasten von Patienten beobachtet werden (Bradley et al., 1967).

Die Behandlung von Cystinose erfolgt zum einen symptomatisch durch die Aufrechterhaltung eines ausgeglichenen Wasser- und Elektrolythaushalt. Zum anderen wird oral Cysteamin verabreicht (Girardin et al., 1979). Der gängigen Arbeitshypothese nach, dringt dieses Aminothiold über ein bereits beschriebenes, aber noch nicht auf

molekularer Ebene identifiziertes Transportsystem in die Lysosomen ein (Pisoni et al., 1995). Dort interagiert es mit der Disulfidbrücke des Cystin, so dass dies in zwei Cystein-Moleküle aufgespalten wird (Gahl et al., 1985). Mit einem der beiden bildet das Cysteamin dann ein gemischtes Disulfid (Abbildung 2). Dieses Cystein-Cysteamin ähnelt stark der Aminosäure Lysin und wird vermutlich über einen auf molekularer Ebene noch unbekanntem Transporter für kationische Aminosäuren aus dem Lysosom heraus transportiert. Das andere Cystein kann das Lysosom über einen Cystein-Transporter verlassen oder mit einem weiteren Cysteamin eine Verbindung eingehen. Da das gemischte Disulfid im Cytoplasma durch Glutathion wieder aufgespalten wird, kann das Cysteamin erneut ins Lysosom eindringen und dieses weiter von Cystin depletieren (Belldina et al., 2003). Dies ist allerdings aufgrund der Halbwertszeit von Cysteamin von etwa 1,8 Stunden kein unendlicher Prozess (Tennezé et al., 1999).

Auch wenn eine Heilung der Erkrankung durch die Behandlung mit Cysteamin nicht möglich ist, kann diese Therapie die Schädigung der Nieren verzögern und das Wachstum der Patienten verbessern. 2002 stand fest, dass schon viele Patienten die dritte Lebensdekade erreicht haben ohne eine Nierentransplantation zu benötigen (Gahl et al., 2002). Der Therapieerfolg hängt jedoch auch stark von einer möglichst frühen Diagnose ab. Da eine Diagnose meist erst bei den ersten Anzeichen des Fanconi-Syndroms gestellt wird und dieses nicht reversibel ist, kann das Nierenversagen durch die Cysteamin-Therapie nicht verhindert werden (Levtchenko, 2005). Zudem ist die Cysteamin-Behandlung alles andere als unproblematisch. Die über einen sehr unangenehmen Geruch und Geschmack verfügende Substanz muss nach einem strikten Zeitplan, alle 6 Stunden eingenommen werden. Schon eine Abweichung von 2 Stunden kann zu erhöhten intra-lysosomalen Cystin-Werten führen (Levtchenko et al., 2006). Zusätzlich kommt es häufig zu Irritationen des Gastrointestinaltrakts, sowie starkem, für Schwefelverbindungen typischen, Mund- und Körpergeruch. Daher ist es wichtig, bessere Therapieoptionen zu erforschen. Eine besteht darin, Substanzen zu finden, die in Verbindung mit Cystein oder sogar Cystin ein besseres Substrat für lysosomale Transporter für kationische Aminosäuren darstellen.

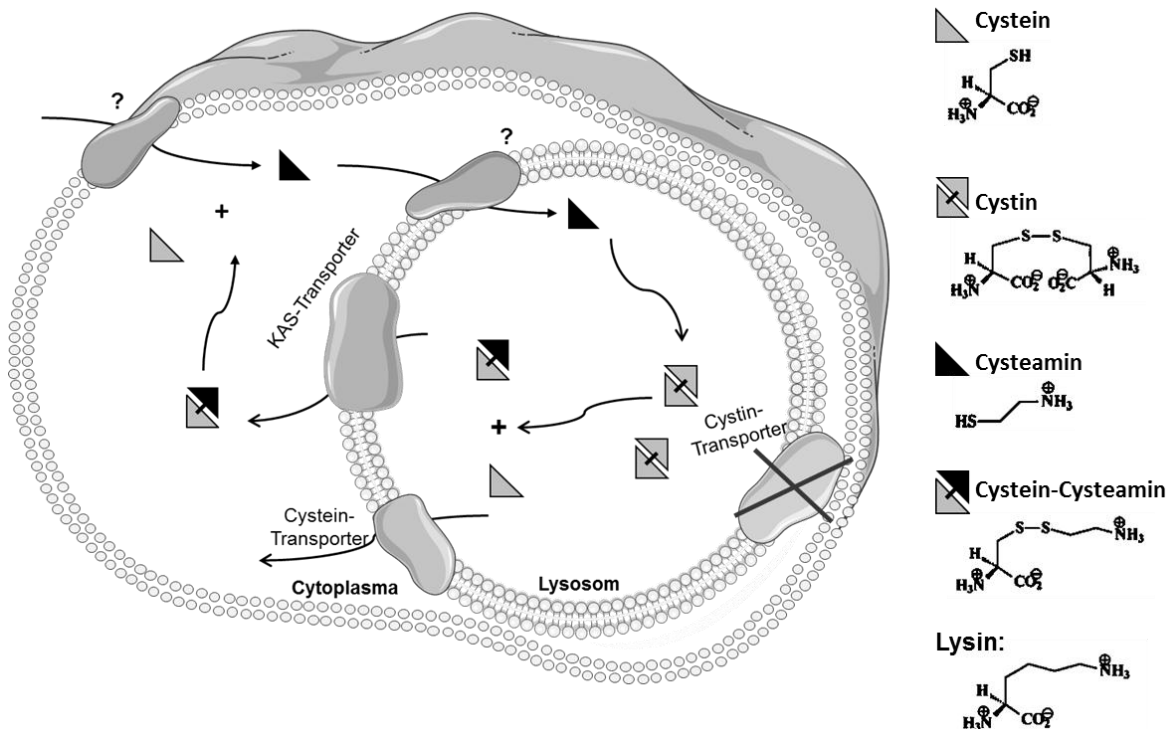


Abbildung 2: Prinzip des lysosomalen Cystin-Transports sowie der Cystinose-Therapie

Schema einer cystinotischen Zelle, in der das Cystein-Dimer Cystin im Lysosom akkumuliert. Der Grund dafür ist ein Defekt im CTNS-Gen, das für den Cystin-Transporter Cystinosin codiert. Nach der Gabe von Cysteamin gelangt dieses über auf molekularer Ebene noch nicht identifizierte Transporter in die Zelle und in das Lysosom, wo ein gemischtes Cystein-Cysteamin Disulfid und ein freies Cystein entstehen. Das Disulfid ähnelt der kationischen Aminosäure Lysin und gelangt über einen auf molekularer Ebene noch nicht identifizierten Transporter für KAS ins Cytoplasma. Das übrig bleibende Cystein wird über einen Cystein-Transporter aus dem Lysosom entfernt oder geht mit einem weiteren Cysteamin eine Verbindung ein. Im Cytoplasma wird das Disulfid durch Glutathion gespalten und das freie Cysteamin kann erneut ins Lysosom eindringen.

1.3 Humane Transporter für kationische Aminosäuren

Da ein noch nicht auf molekularer Ebene identifizierter Transporter für kationische Aminosäuren in der Cystinose-Therapie vermutlich eine entscheidende Rolle spielt, haben wir Mitglieder der SLC7 (solute carrier 7)-Familie der Aminosäuretransporter genauer untersucht. Bei dieser Familie handelt es sich um eine Gruppe aus Transportern, die entweder ausschließlich kationische Aminosäuren (KAS), sowohl KAS als auch neutrale Aminosäuren (NAS) oder nur NAS erkennen.

Eine weitere Unterteilung der SLC7-Familie in zwei Untergruppen wird aufgrund der Spezifität sowie der Struktur der Transporter vorgenommen. Während für die Unterfamilie der kationischen Aminosäuretransporter (cationic amino acid transporters; CATs) aufgrund von Hydrophobizitätsplots 14 Transmembrandomänen (TMs) vorhergesagt werden, werden für die sog. leichten Ketten der heterodimeren Aminosäuretransporter (heterodimeric amino acid transporters; HATs) nur 12 TMs postuliert (Verrey et al., 2003).

Die leichten Ketten der HATs werden im Gegensatz zu den Mitgliedern der CAT-Familie nicht direkt glykosyliert, sondern werden über eine Protein-Protein-Interaktion an ein Glykoprotein der SLC3-Familie (die sog. schwere Kette) gebunden (Torrents et al., 1998). Diese Bindung der leichten Kette (z.B. y^+ LAT1) an die schwere Kette (z.B. 4F2hc) wird über eine Disulfidbrücke stabilisiert und bringt den Mitgliedern dieser Unterfamilie zusätzlich den synonymen Namen „Glykoprotein assoziierte Transporter“ (glycoprotein associated amino acid transporters; gpaAT“) ein. Bei Abwesenheit der schweren Ketten verbleiben die leichten Ketten im endoplasmatischen Retikulum. Zu der Zeit, als der Transport von Aminosäuren charakterisiert wurde, war die molekulare Identität der Transporter noch unbekannt. Daher wurden „Transport-Systeme“ beschrieben: System y^+ , y^+L und $b^{0,+}$ (Tabelle 1). Nach und nach konnten den Systemen auf molekularer Ebene Transporter zugeordnet werden. Eine gute Zusammenfassung bietet der Übersichtsartikel „Transporters for Cationic Amino Acids in Animal Cells: Discovery, Structure, and Function“ (Devés & Boyd, 1998). Die Subfamilie der HATs beherbergt u.a. Transporter die NAS und KAS transportieren (z.B. System y^+L) als auch zwei Transporter (in Verbindung mit 4F2hc), die spezifisch NAS transportieren. Während LAT1 ausschließlich große NAS transportiert, erkennt LAT2 zusätzlich kleine NAS (Bode, 2001).

Tabelle 1: Übersicht über Plasmamembrantransporter für kationische Aminosäuren der SLC7-Familie

Vertreter	System	Unter- gruppe	Assoziiertes Glycoprotein	KAS-Transport/ Na ⁺ -abhängig	NAS-Transport/ Na ⁺ -abhängig
CAT-1, -2B, -3	y^+	CAT	-	Ja/Nein	-
CAT-2A	nicht definiert	CAT	-	Ja/Nein	-
y^+ LAT1, 2	y^+L	HAT	4F2hc	Ja/Nein	Ja/Ja
$b^{0,+}$ AT	$b^{0,+}$	HAT	rBAT	Ja/Nein	Ja/Ja

1.3.1 CATs als Untergruppe der SLC7-Familie

Die kationischen Aminosäuretransporter (CATs) bilden eine Untergruppe der SLC7-Familie. Diese Einteilung beruht auf den 14 für die Proteine vorhergesagten Transmembrandomänen und die Abwesenheit eines assoziierten Glykoproteins. Im Folgenden soll das Augenmerk auf die humanen Vertreter der CATs (hCATs) gelegt werden. Den hCATs sind 4 gut charakterisierte Transporter für kationische Aminosäuren zugeordnet: hCAT-1, -2A, -2B und -3 (Closs et al., 1997; Vékony et al., 2001), sowie zwei Proteine (SLC7A4 und SLC7A14) für die noch keine Funktion beschrieben werden konnte (Closs et al., 2006; Wolf et al., 2002).

hCAT-1 wird ubiquitär (mit Ausnahme der Leber) exprimiert und vermittelt Na⁺- und pH-unabhängigen Transport kationischer Aminosäuren mit einer relativ hohen Substrataffinität sowie einer starken Abhängigkeit von Trans-Substrat. Bei dieser sogenannten Trans-Stimulation handelt es sich um eine für viele Transportproteine typische Eigenschaft, die

sie klar von Kanälen unterscheidet. Transporter arbeiten oft besser, manchmal sogar ausschließlich als Austauscher, d.h. mit einer höheren Transportaktivität in Anwesenheit von Substrat auf der Trans-Seite der Membran (also der Seite, zu der das Substrat transportiert wird). Weniger stark trans-stimulierbar als hCAT-1 ist hCAT-2B. Er unterscheidet sich in den Transporteigenschaften von hCAT-1 weiterhin dadurch, dass er bei niedrigeren pH-Werten eine niedrigere Transportrate zeigt (Closs, 2002) und eine leicht niedrigere Substrataffinität aufweist. Die Expression von hCAT-2B kann in Zellen durch Behandlung mit Cytokinen oder Lipopolysaccharid (LPS) induziert werden. hCAT-3 konnte in Gehirn, Thymus und einigen anderen peripheren Geweben nachgewiesen werden und verfügt über ähnliche Eigenschaften wie hCAT-2B (Vékony et al., 2001). In der gleichen Veröffentlichung wurde gezeigt, dass hCAT-1 die Aminosäure Histidin, die bei niedrigem pH in ihrer protonierten Form vorliegt, unter diesen Bedingungen transportiert, während dies bei hCAT-3 nicht der Fall ist (Vékony et al., 2001).

Das SLC7A2-Gen codiert neben dem hCAT-2B noch für eine weitere Spleißvariante. Die Sequenz dieses hCAT-2A unterscheidet sich von der des hCAT-2B nur durch ein 42 Aminosäuren langes Stück innerhalb der sog. „funktionellen Domäne“ (Habermeier et al., 2003). Die Transporteigenschaften des hCAT-2A können jedoch nicht dem System y^+ zugeordnet werden. Seine Affinität für KAS ist im Vergleich zum hCAT-1 sehr viel niedriger und seine Transportraten bleiben unbeeinflusst von Trans-Substrat. Die pH-Abhängigkeit dieses Transporters liegt in einem ähnlichen Bereich wie die des hCAT-2B (Closs et al., 1997). hCAT-2A wird vornehmlich in Leber, Pankreas und Skelettmuskel exprimiert.

Das Gen SLC7A4 codiert für ein Protein das eine hohe Sequenzhomologie zu den anderen hCAT-Proteinen aufweist und deshalb auch hCAT-4 genannt wird (Sperandeo et al., 1998). Trotz Lokalisation in der Plasmamembran sowohl von *X. laevis*-Oozyten, als auch humanen Zellen konnte bisher keine Transportaktivität für dieses Protein nachgewiesen werden (Wolf et al., 2002).

SLC7A14 ist das jüngste Mitglied der SLC7 Familie. Die Zuordnung des Proteins zu dieser Familie wurde vom „HUGO Gene Nomenclature Committee“ (HGNC) vorgenommen. Durch in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Sequenzanalysen kann dieses Waisen-Protein der Unterfamilie der CATs zugeordnet werden, da es mit 42-45% eine höhere Sequenzhomologie zu den CATs als zu den HATs (16-20%) aufweist. Für SLC7A14 werden 14 TMs vorhergesagt, was die Zuordnung zu den CATs weiter untermauert (J.P. Boissel; unveröffentlicht). Zusätzlich zur Lokalisation in der Plasmamembran, wurde für hCAT-1-, -2B- und -4-EGFP-Fusionsproteine schon gezeigt, dass sie eine intrazelluläre Lokalisation in Form von Granula aufweisen (Wolf, 2001). Für

SLCA14 wurde in bisherigen Beobachtungen ausschließlich eine intrazelluläre Lokalisation beobachtet (Closs et al., 2006).

1.3.2 Die Bedeutung der hCATs

Die physiologische Bedeutung der hCATs ist bisher nur aufgrund deren Funktion als Plasmamembran-Transporter beschrieben und ergibt sich aus den Funktionen ihrer Substrate, den kationische Aminosäuren (AS). Lysin muss als essentielle AS aus der Nahrung aufgenommen werden und ist in vielen Proteinen in modifizierter Form zu finden. So kommt es z.B. in Kollagen in hydroxylierter Form vor und kann bei der Genregulation durch Histonmodifikationen acetyliert (Zhao et al., 2010) sowie methyliert werden (Martin & Zhang, 2005). Weiterhin ist es Ausgangspunkt der Carnitin-Biosynthese (Bremer, 1983). Der Abbau von Lysin führt zur Bildung von Acetyl-CoA, das in den Citratzyklus eingeschleust werden kann. Arginin kann als semi-essentielle AS zwar auch vom Körper selbst gebildet werden (aus Ornithin bzw. Citrullin durch die Enzyme des Harnstoffzyklus), doch ist die Versorgung durch diesen Weg während Wachstums- und Wundheilungsprozessen nicht ausreichend (Jenkinson et al., 1996). Da Arginin durch das Enzym Arginase in die ebenfalls kationische, aber nicht-proteinogene Aminosäure Ornithin umgewandelt werden kann, dient es auch als Vorstufe oder Ausgangssubstanz für die Polyaminsynthese (Spermidin und Spermin) aus Putrescin. Putrescin kann sowohl aus Arginin (unter Bildung von Harnstoff), als auch aus Ornithin (unter Abspaltung eines CO₂) gebildet werden. Polyamine sind wichtig für Zellproliferation und -differenzierung (Morgan, 1994). Ornithin ist außerdem Ausgangssubstanz für weitere proteinogene AS (Prolin und Glutamin). Das aus Arginin und Glycin entstehende Kreatin ist vor allem für die Muskelkontraktion (Ingwall et al., 1974), aber auch für Hirn- und Nervenfunktion wichtig (Item et al., 2001).

Arginin wird weiterhin von Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) als Substrat genutzt: Unter Anwesenheit von Sauerstoff wird das Radikal Stickstoffmonoxid (NO) gebildet, welches verschiedene physiologische Wirkungen besitzt, wie z.B. Vasodilation, Neurotransmission und unspezifische Immunabwehr (Förstermann et al., 1994, 1995; Calver et al., 1993; Knowles & Moncada, 1994). In vorhergehenden Arbeiten wurde gezeigt, dass NO-Synthasen über mehrere Arginin-Quellen verfügt. Die in endothelialen EA.hy926 Zellen exprimierte Isoform, die endotheliale NO-Synthase (eNOS), kann zusätzlich zu extrazellulärem und aus Citrullin recyceltem auch aus dem Proteinabbau stammendes Arginin als Substrat nutzen (Simon et al., 2003). Dies wird am deutlichsten unter Bedingungen bei denen die Zellen durch eine Vorinkubation in Lysin von intrazellulärem, freien Arginin depletiert wurden und das Recycling gehemmt wurde. Doch auch ohne eine Hemmung des Recycling-Weges, ist es möglich zu quantifizieren, welchen Anteil die beiden Protein-Abbauwege zur Versorgung der eNOS beitragen (Karbach et al.,

2011). Während der proteasomale Proteinabbau nur einen relativ kleinen Beitrag zur eNOS-Versorgung beisteuerte, führte eine Hemmung des lysosomalen Proteinabbaus zu einer starken Verminderung der NO-Produktion in Lysin-vorinkubierten Zellen. Auch hier könnten hCATs für den Transport des aus dem lysosomalen Proteinabbau stammenden Arginin ins Cytoplasma verantwortlich sein.

1.4 System c – Rettungsweg in der Cystinose-Therapie

Die Therapie von Cystinose beruht darauf, dass das aus Cysteamin und Cystein gebildete Disulfid aus dem Lysosom heraus transportiert wird (vgl. Kapitel 1.2). Da dieses gemischte Disulfid der kationischen Aminosäure Lysin ähnelt, kam schon früh der Verdacht auf, dass es in Lysosomen ein Transportsystem für kationische Aminosäuren geben muss. Ein solches wurde dann auch in den 1980er Jahren in humanen Hautfibroblasten beschrieben. 1985 ergaben Untersuchungen, dass [^{14}C]Lysin-Export aus Lysosomen gesunder sowie cystinotischer Fibroblasten gleichermaßen durch verschiedene kationische Aminosäuren trans-stimuliert wird (Pisoni et al., 1985). Bei den getesteten Substanzen handelte es sich unter anderem um die als Modellsubstrate für die CATs beschriebenen Aminosäuren Arginin, Lysin und Ornithin, sowie das Disulfid aus Cystein und Cysteamin. Diese Na^+ -unabhängige Trans-Stimulation war bei pH-Werten 5,5 bis 7,6 zu beobachten. Im Folgenden wurde der lysosomale Transport kationischer Aminosäuren über die lysosomale Membran näher charakterisiert. Dabei ergaben sich deutliche Unterschiede zum in der Plasmamembran lokalisierten System y^+ (Pisoni et al., 1987b), so dass das lysosomale Transportsystem mit „System c“ einen eigenen Namen bekam (c für kationisch; engl.: cationic). Die Aufnahme von [^{14}C]Arginin in Lysosomen war – wie der Lysin-Export auch – Na^+ -unabhängig und trans-stimulierbar. Als Unterschied zum pH-unabhängigen System y^+ konnte jedoch festgestellt werden, dass die Arginin-Aufnahme bei einem extralysosomalen pH von 7 etwa 10-fach höher war, als bei pH 5. Die ermittelte Affinität des System c lag 8-fach höher als die des System y^+ . Zusätzlich wurde für das System c eine kompetitive Hemmung des Arginin-Transportes durch die methylierten KAS α -N-Methyl-L-Arginin und ϵ -Trimethyl-L-Lysin beschrieben, die für System y^+ -vermittelten Transport nicht gezeigt wurden.

1.5 Eine Chimäre aus hCAT-2 und SLC7A14 transportiert Arginin über die Plasmamembran

In Vorversuchen an humanen Hautfibroblasten von vier Spendern wurde in meiner Diplomarbeit ermittelt, dass SLC7A14 und hCAT-1 die einzigen Vertreter der hCAT-Familie in diesem Zelltyp sind, in dem das lysosomale System c charakterisiert wurde. Da

bisher alle Versuche, den intrazellulär lokalisierten SLC7A14 für Transportstudien in die Plasmamembran zu lokalisieren, scheiterten (unveröffentlichte Beobachtungen von B. Gasnier/Paris und M. Lemke/Mainz), wurde im Rahmen meiner Diplomarbeit 2009 ein chimäres Protein hergestellt (Jaenecke, 2009). Dieses trug die Region des SLC7A14-Proteins, die der „funktionellen Domäne“ der hCATs entspricht, im Rückgrat des hCAT-2. Es ist bekannt, dass die als „funktionelle Domäne“ bezeichnete, 81 Aminosäuren lange Region, die das 42 Aminosäuren lange Fragment enthält, das sich zwischen hCAT-2A und -2B unterscheidet, die Affinität sowie die Trans-Stimulierbarkeit der hCATs bestimmt (Habermeier et al., 2003). Für den Austausch der „funktionelle Domäne“ auf cDNA-Ebene wurde eine per stille Punktmutation eingefügte Schnittstelle für das Restriktionsenzym BamHI (abgekürzt: B), sowie die in hCAT-1 und -2A, sowie SLC7A14 konservierte KpnI-Schnittstelle (abgekürzt: K) genutzt. Die Abkürzungen der Enzyme wurden in den Namen der Chimäre eingefügt. hCAT-2/A14_BK konnte in Biotinylierungs-Versuchen in der Plasmamembran detektiert werden und vermittelte Arginin-Transport. Das chimäre Protein erkannte Arginin in *Xenopus laevis*-Oozyten mit einer noch niedrigeren Affinität, als hCAT-2A. Seine anscheinende K_M lag bei 1,9 mM Arginin, während die parallel ermittelten K_{MS} von hCAT-2A bei 1,4 mM, die des hochaffinen hCAT-1 bei 0,6 mM lagen. Zusätzlich zeigte hCAT-2/A14_BK eine etwa 50%ige Trans-Stimulierbarkeit sowie einen stark pH-abhängigen Influx von Arginin. Zumindest für die Substrataffinität und die Trans-Stimulierbarkeit steht fest, dass diese Eigenschaften durch die „funktionelle Domäne“ bestimmt werden. Auch die pH-Abhängigkeit scheint durch diese vermittelt zu werden. Dies wurde noch durch ergänzende Versuche in dieser Arbeit bestätigt. Da die Eigenschaften der Chimäre durch die „funktionelle Domäne“ bestimmt werden, deuteten die Ergebnisse meine Diplomarbeit darauf hin, dass SLC7A14 – als Spender der „funktionellen Domäne“ - Eigenschaften aufweist, die auch für das System c beschrieben wurden (vgl. Kapitel 1.4). In den Versuchen der Diplomarbeit ergab sich für die Chimäre sowie hCAT-2A eine starke Hemmung des Arginin-Transports durch die Anwesenheit eines 100-fachen Überschusses von ϵ -Trimethyl-L-Lysin. Dabei wurde 0,1 mM Arginin und 10 mM TML eingesetzt. Doch auch hCAT-1 zeigte eine moderate Hemmung. Da bei diesem Versuchsaufbau jedoch aufgrund der begrenzten Zeit nur einige wenige Versuche durchgeführt werden konnten, war eine Erhöhung der Versuchszahlen dringend nötig. Im Rahmen der Doktorarbeit wurden allerdings die Konzentrationen beider Substanzen reduziert, da in der Veröffentlichung, die eine Hemmung des System c durch TML beschrieb nur 0,3 mM Arginin und 3 mM TML eingesetzt worden waren.

1.6 Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Frage ob Mitglieder der humanen kationischen Aminosäuretransporter (hCATs) als Untergruppe der SLC7-Familie im Lysosom den Transport von KAS vermitteln. Das Hauptaugenmerk wurde dabei auf hCAT-1 und SLC7A14 gelegt, also auf die beiden Proteine, die in humanen Hautfibroblasten exprimiert sind. Dies ist der Zelltyp, in dem das lysosomale System c beschrieben wurde. Des Weiteren sprach für hCAT-1 das fast ubiquitäre Expressionsmuster, für SLC7A14 die ausschließlich intrazelluläre Lokalisation. Daher sollte unter anderem bei diesen Proteinen die zuvor schon beobachtete intrazelluläre Lokalisation genauer analysiert werden.

Bei SLC7A14 handelt es sich um ein erst kürzlich der CAT-Familie zugeordnetes Protein mit unbekannter Funktion. Um dieses Waisen-Protein als Kandidat für das System c weiter zu etablieren, sollte die im Rahmen meiner Diplomarbeit begonnene Charakterisierung des hCAT-2/A14_BK weitergeführt werden. Dabei handelt es sich um ein chimäres Protein, das die „funktionelle Domäne“ des SLC7A14 im Rückgrat des hCAT-2 trägt und Arginin-Transport über die Plasmamembran vermittelt. Die Untersuchung von nativem SLC7A14-Protein war bisher mangels Antikörper nicht möglich. Daher war die nicht ganz triviale Generierung eines Antikörpers gegen dieses stark hydrophobe Membranprotein Teil dieser Arbeit. Mit diesem sollte sowohl die Expression als auch die Lokalisation von endogenem SLC7A14 untersucht werden.

Die Frage ob hCAT-Mitglieder in Lysosomen KAS transportieren, sollte mit Hilfe verschiedener Ansätze beantwortet werden.

- Für direkte Transportstudien an Lysosomen aus Zelllinien, die hCAT-Mitglieder als EGFP-Fusionsproteine überexprimieren, galt es zunächst sowohl die Isolation der Lysosomen, als auch Aufbau und Durchführung des eigentlichen Transportversuchs zu etablieren. Diese isolierten Lysosomen sollten auch zur weiteren Bestätigung der lysosomalen Lokalisation herangezogen werden.
- Um lysosomalen Transport kationischer Aminosäuren durch endogenen hCAT-1 nachzuweisen, wurde ein Versuchsaufbau entwickelt, bei dem aus lysosomalem Arginin im Cytoplasma generiertes NO als Reporter genutzt wurde.

Als Alternative zu Aufnahmeversuchen mit radioaktiv-markierten AS sollte die auf „Festkörper unterstützter Membran“ basierende Elektrophysiologie genutzt werden. Diese Methode sollte es ermöglichen die Verschiebung positiv geladener AS über zuvor isolierte lysosomale Membranen zu detektieren. Bei dieser Methode werden Membranfragmente oder Vesikel auf einem festen, hydrophob beschichteten Gold-Untergrund angelagert, auf dem sie elektrophysiologischen Messungen unterzogen werden können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Großgeräte / spezielle Geräte

- Szintillationszähler (β -Strahlung) TriCarb 1900CA Liquid scintillation System (Packard)
- γ -Strahlen-Zähler Cobra Quantum (Perkin Elmer)
- Konfokales Laser-Scanning Mikroskop Zeiss LSM-710
- PCR-Cycler i-Cycler (BioRad)
- Ultrazentrifuge L8-70M (Beckmann)
- Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q-Plus (Millipore/Waters)

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Lösungen

LB-Medium:

1 % (w/v) Pepton
1 % (w/v) NaCl
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
pH 7 einstellen, autoklavieren

LB+Amp

LB-Medium + 50 µg/ml Ampicillin

LB-Agar:

LB-Medium (± Ampicillin) + 1,5% (w/v) Agar-Agar

SOB-Medium:

2 % (w/v) Pepton
0,05 % (w/v) NaCl
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
pH 7 einstellen
2,5 mM KCl
Autoklavieren
5 mM MgCl

SOC-Medium:

SOB-Medium + 20mM Glucose

50x TAE:

2 M Tris-Base
5,71 % (v/v) Eisessig
50 mM EDTA

2.2.2 Hitzeschocktransformation & Plasmidpräparation aus *Escherichia coli*

Zur Vermehrung von Plasmiden wurden diese mit Hilfe einer Hitzeschocktransformation in *Escherichia coli* (*E. coli*)-Bakterien eingebracht. 50 µl kompetenter *E. coli*-Bakterien ("XL1-Blue supercompetent cells" von Stratagene) wurden auf Eis aufgetaut und mit etwa 10 ng Plasmid-DNA versetzt. Dieser Ansatz wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 45 Sekunden einem Hitzeschock in einem 42°C warmen Wasserbad unterzogen. Nach einer 2-minütigen Ruhezeit auf Eis wurde SOC-Medium zugegeben und die Bakterien für 1 Stunde bei 37°C und 180 rpm geschüttelt. Schließlich wurden die Bakterien gleichmäßig auf zwei vorgewärmte (37°C), mit Ampicilin versetzte LB-Agar-Platten ausgestrichen. Dabei wurden verschiedene Mengen des Ansatzes ausplattiert um die Chance auf Einzelkolonien zu erhöhen, Die Platten wurden über Nacht in einem 37 °C-Brutschrank gestellt und anschließend, wenn Kolonien gewachsen waren, mit Parafilm verschlossen bei 4°C gelagert.

Zur Isolation der Plasmide wurde eine einzeln liegende Bakterienkolonie mit einem sterilen Zahnstocher aus der Agar-Platte herausgestochen, in 4 ml LB-Medium + Ampicillin gegeben und mindestens 6 Stunden bei 37°C und 180 rpm inkubiert.

Anschließend wurde je nach Trübung dieser Vorkultur ein Teil der Bakteriensuspension in 250 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei denselben Bedingungen inkubiert. Aus dieser ü.N.-Kultur wurde dann mit dem HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit (Invitrogen, Löhne) die Plasmid-DNA nach Protokoll des Herstellers aufgereinigt.

2.2.3 Linearisierung & *in vitro*-Transkription

Für die *in vitro* Transkription müssen die Plasmide linearisiert vorliegen. Dabei wird hinter der abzulesenden Sequenz geschnitten, um so die Transkription zu terminieren. Dazu wurden 10 µg Plasmid für 2-4 Stunden mit 2 µl Restriktionsenzym (siehe Tabelle 2) in einem 100 µl-Ansatz bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 1 µl zur Überprüfung der Linearisierung in einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt. Nach erfolgreicher Linearisierung wurde der Restriktionsansatz mit dem NucleoSpin® Extract II-Kit (Machery-Nagel) aufgereinigt. Das linearisierte Plasmid wurde in 30 µl vorgewärmten Elutionspuffer (70°C) eluiert, wobei die resultierende DNA-Konzentration meist zwischen 0,2 und 0,4 µg/µl lag.

Tabelle 2: Plasmidkonstrukte mit den inserierten Genen

Sowohl der pSGEM- als auch pSP64T-Vektor enthalten die 3'- und 5'-UTR (untranslatierte Region) des *Xenopus laevis* β -Globin-Gens, sowie einen SP6- und T7-Promotor. Die UTRs tragen zur Stabilität der cRNA in dem Expressionssystem bei.

SLC7-Mitglied bzw. Kontrolle	Name des Konstruktes	Enzym zur Linearisierung	Kit zur <i>in vitro</i> Transkription
EGFP	pSGEM-EGFP	PacI	T7
hCAT-2A-EGFP	pSGEM-hCAT-2A_BK	PacI	T7
hCAT-1	pSP64T-hCAT-1 AB1C	EcoRI	SP6
hSLC7A14.EGFP	pSGEM-A14.EGFP	PacI	T7

Die Synthese der *in vitro*-Transkripte erfolgte mit dem „mMessage mMachine SP6 bzw. T7 Kit“ der Firma Ambion. Dieser Kit fügt am 5'-Ende der transkribierten cRNA ein 7'-Methylguanosin-Cap an, so dass die RNA in den Oozyten translatiert werden kann. Die Durchführung der Transkription erfolgte nach Anleitung des Herstellers und das aufgereinigte RNA-Pellet wurde stets in 10 μ l Nuklease-freiem Wasser gelöst. 1 μ l der RNA-Lösung wurde anschließend zur Konzentrationsbestimmung und Überprüfung der Qualität durch eine 1%ige Agarosegelelektrophorese eingesetzt. Dabei wurde 1 μ l RNA-Lösung mit 9 μ l Nuklease-freiem Wasser versetzt. 5 μ l dieser Verdünnung wurden mit weiteren 65 μ l Wasser versetzt, so dass für die Konzentrationsbestimmung eine 1:140 Verdünnung entstand. Die verbleibenden 5 μ l wurden mit 1 μ l 6x Probenpuffer versetzt und in einem 1%ige Agarosegel analysiert.

2.2.4 Isolation von Gesamt-RNA

Die Isolation von Gesamt-RNA aus Zellen erfolgte mit dem „RNeasy Mini Kit“ der Firma Qiagen. Zellen einer 24- oder 6-Loch-Platte wurden 2x mit DPBS gewaschen und mit 200-700 μ l des im Kit enthaltenen und frisch mit Mercaptoethanol (10 μ l/ml) versetzten RLT-Lysepuffer überschichtet. Die Aufreinigung der RNA erfolgte im Anschluss über die im Kit enthaltenen Säulchen nach Anleitung des Herstellers. Die Technologie basiert auf der selektiven Bindung von RNA Molekülen (> 200 Nukleotide) unter Hochsalz-Bedingungen an eine Silica-Gel Membran und anschließende Elution unter Niedrig-Salz-Bedingungen. Eluiert wurde stets in 30 μ l RNase-freiem Wasser.

1 μ l RNA-Lösung diente standardmäßig der Konzentrationsbestimmung, die verbliebenen 29 μ l wurden für den Einsatz in der qRT-PCR mit RNase-freiem Wasser auf eine Konzentration von 20 ng/ μ l verdünnt.

2.2.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen basiert auf dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren bei 260 nm, für das die aromatischen Basen verantwortlich sind. Nicht gepaarte Basen besitzen allerdings eine höhere Absorption als gepaarte. Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen wurde die optische Dichte (OD) der Proben mit Hilfe eines Photometers bestimmt. Dabei wurde Licht durch die in eine Quarzglas-Küvette gefüllte Probenlösung geleitet und die Absorptionen bei 260 nm und 280 nm gemessen. Ein OD_{260} -Wert von 1 entspricht einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA bzw. 40 $\mu\text{g/ml}$ einzelsträngiger RNA.

Da das Absorptionsmaximum von Proteinen aufgrund derer aromatischer Aminosäurereste bei 280 nm liegt, kann durch die Bestimmung des Verhältnisses der beiden Extinktionen bei 260 nm und bei 280 nm die Reinheit der Nukleinsäurelösung bestimmt werden. Eine reine DNA-Lösung besitzt einen OD_{260}/OD_{280} -Wert von $> 1,8$, eine reine RNA-Lösung von $> 2,0$.

Formeln zur Berechnung des Nukleinsäuregehaltes:

$$RNA (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = OD_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor} / 1000$$

$$DNA (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = OD_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor} / 1000$$

2.2.6 Quantitative „real time“ RT-PCR (qRT-PCR)

Um RNA mit Hilfe einer quantitativen „Real-time“ RT-PCR (qRT-PCR) nachzuweisen, muss sie in einem ersten Schritt in cDNA umgeschrieben werden. Dazu hybridisiert man ein Oligonukleotid an die RNA-Matrize und erstellt durch eine reverse Transkriptase eine cDNA-Kopie. Mittels PCR können dann bestimmte Sequenzbereiche einer DNA millionenfach amplifiziert werden. Dazu werden sequenzspezifische Oligonukleotide benötigt, die die beiden Enden der zu amplifizierenden Bereiche definieren.

Die qRT-PCR ermöglicht eine direkte Detektion von PCR-Produkten durch Fluoreszenzsignale. Aufgrund der Proportionalität von Fluoreszenzsignal und Kopienzahl des Zielmoleküls kann direkt eine Konzentrationsbestimmung der zu untersuchenden Probe erfolgen. Die Detektion kann entweder mit dsDNA bindenden Fluorochromen (z.B. SYBR GreenI, nicht-sequenzspezifisch) oder mit fluorogenen Sonden (z.B. TaqMan Sonden, FRET Sonden oder Molecular Beacons, sequenzspezifisch) erfolgen. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten TaqMan Sonden, auch als „duallabeled probes“ bezeichnet, zeichnen sich durch einen Reporter-Farbstoff am 5'-Ende (6-Carboxyfluorescein, FAM) sowie einem „Quencher“-Farbstoff am 3'-Ende (TAMRA) aus. Sind beide Fluoreszenz-Farbstoffe an der Sonde gebunden, wird die Reporterfarbstoff-Emission „gequencht“. Dies geschieht entweder durch die Energieübertragung auf den „Quencher“, der ebenfalls Licht einer bestimmten, aber anderen Wellenlänge emittiert oder aber durch einen sogenannten „Dark-Quencher“, der die erhaltene Energie in Form von Wärme abgibt. Während des Extensionszyklus der PCR-Reaktion wird die TaqMan Sonde aufgrund der 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase gespalten. So kommt es zu einer räumlichen Trennung von Reporter und Quencher und die Reporterfarbstoff-Emission wird freigesetzt. Das Fluoreszenzsignal kann dann durch die entsprechenden Wellenlängen-spezifischen Filter selektiert und durch eine interne CCD-Kamera aufgezeichnet werden (Abbildung 3).

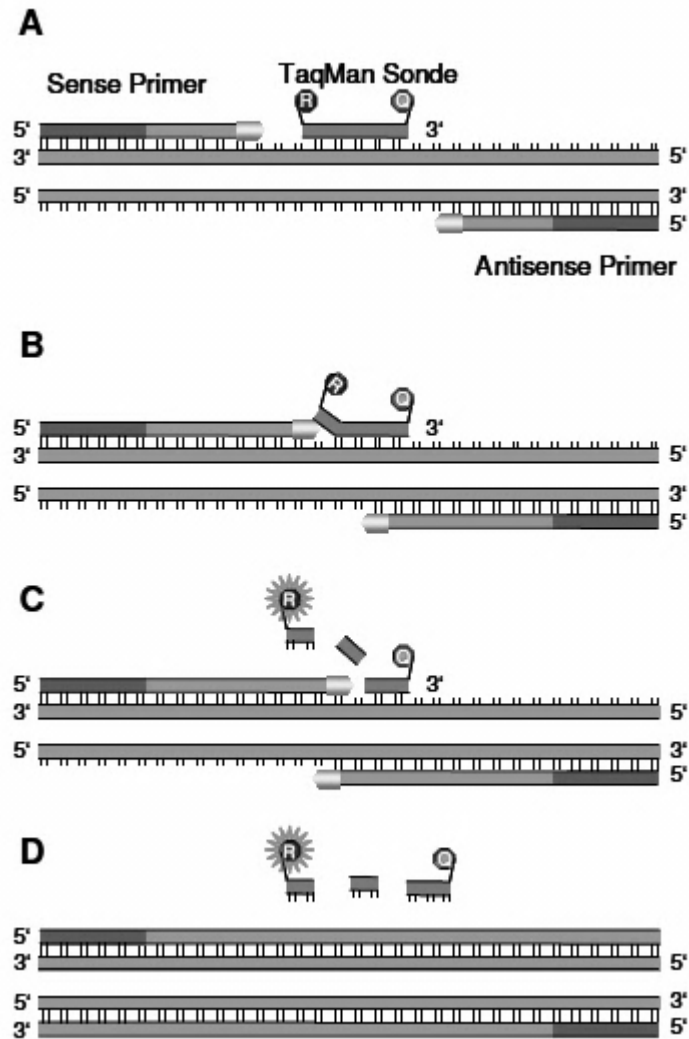


Abbildung 3: Prinzip von TaqMan Sonden in einer quantitativen „real time“ PCR.

A. Sowohl die Primer als auch die TaqMan Sonde binden während des „Annealings“ an die Zielsequenz. Die TaqMan Sonde trägt zwei Fluoreszenz-markierte Farbstoffe, einen Reporterfarbstoff (R; FAM) am 5'- und einen Quencherfarbstoff (Q; TAMRA) am 3'-Ende. Durch die räumliche Nähe des Reporters zum Quencher wird die Reporterfluoreszenz verhindert. **B.** Während der Extension verlängert die Taq-DNA-Polymerase die Primer und beginnt die Sonde abzulösen. **C.** Die 5'-Exonukleaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase spaltet den Reporterfarbstoff von der Sonde ab. **D.** Ist der Reporter einmal vom Quencher getrennt, kann er seine charakteristische Fluoreszenz abstrahlen. (Quelle: Dissertation A. Simon; 2005)

Die Auswahl der sequenzspezifischen Oligonukleotide sowie der TaqMan Sonde erfolgte mit Hilfe des Programms „Primer Express“ Version 1.5 (Applied Biosystems). Die optimale Oligonukleotidlänge beträgt 15-20 Basen mit einem G/C-Gehalt zwischen 20 und 70%. Ihr Schmelzpunkt (TM-Wert) soll nicht mehr als 1-2°C unterschiedlich sein und zwischen 58 und 60°C liegen. Die Sonde soll etwa 30 Basen lang sein, mit einem TM-Wert von 10°C über dem der beiden Oligonukleotide. Der G/C-Gehalt soll bei etwa 50% liegen. Die Sonde darf nicht mit den Oligonukleotiden überlappen oder zu ihnen

komplementär sein. Sie darf kein G an ihrem 5'-Ende haben, da diese Base die Reporterfarbstoff-Emission nach der Abspaltung „quenchen“ würde. Die optimale Amplifikatlänge für eine „real-time“ PCR liegt zwischen 100 und 150 Basenpaaren. Kürzere PCR-Fragmente amplifizieren effizienter als längere und sind toleranter gegenüber den Reaktionsbedingungen. Beim Oligonukleotid- und TaqMan-Sondendesign ist weiterhin zu beachten, dass das Amplifikat bzw. ein Oligonukleotid über eine Exon-Grenze hinwegführen sollte, um eine Amplifikation von möglicherweise vorhandener genomischer DNA zu vermeiden. Die One-Step qRT-PCR wurde mit dem „QuantiTect RT-PCR Kit“ (Qiagen) in einem 25 µl Reaktionsvolumen mit 0,1 µg Gesamt-RNA durchgeführt, dNTPs und MgCl₂ wurden zusätzlich hinzugefügt. Die cDNA wurde mit sequenzspezifischen Oligonukleotiden amplifiziert, die wie die TaqMan Sonden unten angegeben sind. In Tabelle 3 ist ein Standard qRT-PCR Ansatz, in Tabelle 4 ein Standard-qPCR-Protokoll angegeben.

Für die Auswertung einer qPCR wird der sog. CT-Wert (engl. Cycle Threshold für Schwellenwert-Zyklus) herangezogen. Dieser beschreibt den PCR-Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt.

Tabelle 3: Standard qRT-PCR Ansatz

	Volumen / Reaktion	Endkonzentration
“2 x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix”	12,5 µl	1 x
Sense-Oligonukleotid (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Antisense-Oligonukleotid (10 µM)	2 µl	0,8 µM
TaqMan Sonde (10 µM)	1 µl	0,4 µM
MgCl ₂ (25 mM)	1,75 µl	5,75 mM
dNTPs (je 10 mM)	0,5 µl	je 400 µM
QuantiTect Probe RT Mix (Enzym)	0,5 µl	0,5 µl
Gesamt-RNA (20ng/µl)	5µl	0,1 µg
Endvolumen	25µl	

Tabelle 4: Standard qRT-PCR-Cycler-Protokoll

	Anzahl der Wiederholungen	Bemerkung	Dauer des Zyklus	Temperatur
Reverse Transkription	1x	Umschreiben der RNA in cDNA	30 min	50°C
Initialer Aktivierungsschritt	1x	Aktivierung der HotStarTaq- DNA Polymerase, Inaktivierung der RT-Enzyme	15 min	95°C
2-Schritt-Zyklen	40x	Denaturierung	30 sek	95°C
		Annealing/Extension (Temperaturoptimum der Exonukleaseaktivität)	30 sek	60°C
Ende	1x	Stoppen der Reaktion	∞	4°C

2.2.7 Oligonukleotide und TaqMan Sonden für qRT-PCR

Die als Primer verwendeten Oligonukleotide wurden von MWG AG Biotech (Ebersberg) oder Operon (Qiagen) bezogen, TaqMan Sonden von TibMolBiol (Berlin) oder Operon (Qiagen). Die Namen setzen sich zusammen aus der Abkürzung der mRNA (z.B. HC1: humaner CAT-1), der Position in der codierenden Sequenz sowie der Bezeichnungen „ss“ für „sense-strand“ und „as“ für „antisense-strand“ Orientierung. Bei den Primern für SLC7A14 wurde dessen Synonym KIAA benutzt.

Name	Sequenz (5'-3')	TaqMan Sonde	Sequenz (5'-3')
<i>hCAT-1</i>			
HC1.330ss	CTT CAT CAC CGG CTG GAA CT	HC1.Taq1	6FAM-AAT CCT CTC CTA CAT CAT CGG TAC TTC AAG CGT-TAMRA-Q
HC1.429as	GGG TCT GCC TAT CAG CTC GT		
<i>hCAT-2A</i>			
HC2AB.1032ss	TTC TCT CTG CGC CTT GTC AA	HC2A.Taq1	6FAM-TCT GGG CTC TAT GTT TCC TTT ACC CCG AA-TAMRA-Q
HC2A.1125as	TCT AAA CAG TAA GCC ATC CCG G		
<i>hCAT-2B</i>			
HC2AB.1032ss	TTC TCT CTG CGC CTT GTC AA	HC2B.Taq1	6FAM-TGG ATC CAT TTT CCC AAT GCC TCG T-TAMRA-Q
HC2B.1112as	CCA TCC TCC GCC ATA GCA TA		
<i>hCAT-3</i>			
HC3ss1099	GGC CTC CTG TTC CGT GTA CTT	HC-3.Taq1	6FAM-ATC CAC ACC GGC ACA CGC ACC-TAMRA-Q
HC3as1228	TGA GGT CCA CAA GAT CAG TGA GTT		
<i>SLC7A14</i>			
KI1936ss	CTG GTG AAC ATC TAT CTC ATG C	KI1960T	6FAM-AAG CTC TCC ACC ATC ACA TGG ATC C-TAMRA-Q
KI2045as	CTG TTC CAG ATG CCA TAT CC		
<i>hGAPDH</i>			
GAPDH.502ss	AGC CTC AAG ATC ATC AGC AAT G	hGAPDH Taq1	6FAM-CTG CAC CAC CAA CTG CTT AGC ACC C-TAMRA-Q
GAPDH.588as	CAC GAT ACC AAA GTT GTC ATG GA		

2.3 Oozyten von *Xenopus laevis* als Expressionssystem

2.3.1 Lösungen

1x Ca²⁺-freier Puffer:

96 mM	NaCl
2 mM	KCl
2 mM	MgCl ₂
5 mM	HEPES

1x Ca²⁺-haltiger Puffer:

1x Ca²⁺-freier Puffer + 1,8 M CaCl₂

Kollagenaselösung (Stock 200 mg/ml)

Gentamycin (Stock 50 mg/ml)

Oozyten-Kulturmedium:

50 % (v/v)	Leibovitz L15-Medium
15 mM	HEPES
0,1 mg/ml	Gentamycin

1x Na⁺-Aufnahmepuffer:

100 mM	NaCl
2 mM	KCl
2 mM	MgCl ₂
5 mM	HEPES
5 mM	Tris (pH 7,4)

2.3.2 Allgemeines

Der glatte Krallenfrosch *Xenopus laevis* bevölkert stehende Gewässer im mittleren und südlichen Afrika, wie kleinere Gräben, schlammige Teiche und Pfützen und kann dort 15 bis 25 Jahre alt werden. Die vorderen Gliedmaßen besitzen im Gegensatz zu den kräftigen Hinterbeinen keine Schwimmhäute und werden zur Steuerung und zum Beutefang eingesetzt. Die zur Fortbewegung genutzten Hintergliedmaßen tragen jeweils an den inneren drei der fünf Zehen kräftigen, schwarzen Hornkrallen. Diese sind auch das namensgebende Merkmal dieser Tiere. Die Weibchen lassen sich durch ihre 3 lappigen Kloakalpalpillen im Genitalbereich, sowie anhand ihrer Größe (ca. 10-13 cm) von den viel kleineren Männchen (ca. 8 cm) unterscheiden. Mit ca. 2 Jahren werden die Tiere geschlechtsreif. Aufgrund ihrer Eigenschaft auf das menschliche Hormon Gonadotropin

mit Abbläichen zu reagieren, wurden diese Frösche von 1930 bis in die 1960er Jahre hinein für Schwangerschaftstests genutzt, was ihnen den Trivialnamen „Apothekerfrosch“ bescherte.

Die Frösche wurden in kleinen Gruppen von je 8 - 9 Tieren bei konstant 18 - 20°C und einem 12-Stunden Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Röhren und Steine boten naturnahe Versteckmöglichkeiten. Alle 3 - 4 Tage wurden die Tiere mit pelletierter Nahrung oder getrockneten Bachflohkrebsen gefüttert. Aus hygienischen Gründen war jeden Becken mit einem eigenen Kescher und einer eigenen Wasserfiltereinheit versehen.

Krankheiten äußern sich bei *Xenopus* meist anhand auffälliger Veränderungen des Hautbildes. In solch einem Fall wurden die betroffenen Tiere von seinen Artgenossen isoliert und behandelt.

2.3.3 Die Oozyten von *Xenopus laevis* als Expressionssystem

Die Oozyte selbst ist eine riesige Einzelzelle und kann in eine animale und eine vegetative Hemisphäre unterteilt werden. Die schwarz-braun pigmentierte animale Hemisphäre enthält neben dem Zellkern hauptsächlich Mitochondrien- und Ribosomen-reiches Zytoplasma. Die vegetative Seite erscheint durch die kristallin gepackten Dotterproteine hellgelb.

Als Besonderheit ist zu erwähnen, dass die Oozyten während ihrer Entwicklung über einen längeren Zeitraum in der Prophase I der Meiose arretiert sind. Während dieser Zeit werden die ribosomalen Gene in Form des „rolling circle“ stark amplifiziert. Durch diese zusätzlichen Kopien, die in Form von Kernkörperchen zu erkennen sind, steigt die Zahl der ribosomalen Gene auf ca. 2×10^6 . Die aufgrund der hohen Kopienzahl erhöhte Transkriptionsrate führt zu einer stark erhöhten Ribosomenzahl von bis zu 10^{12} Ribosomen in einer ausgewachsenen Oozyte. Die Oozyten werden nach Dumont (1972) in sechs Stadien eingeteilt (Abbildung 4), wobei für die Expressionsversuche nur Oozyten der Stadien V und VI genutzt wurden.

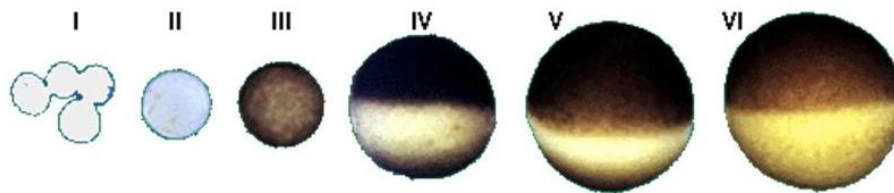


Abbildung 4: Die Reifestadien der Oozyten von *Xenopus laevis*

Die Reifestadien der Oozyten von *Xenopus laevis* werden nach Dumont (1972) in sechs Stadien eingeteilt. Das Bild stammt aus der Veröffentlichung „Oogenesis and oocyte isolation“ (Smith et al., 1991)

Die Verwendung von *Xenopus*-Oozyten birgt folgende Vorteile:

- Die Oozyten sind leicht und in großer Zahl zu gewinnen.
- Sie sind aufgrund ihrer Größe leicht zu manipulieren und haben aufgrund ihrer hohen Anzahl von Ribosomen eine starke translationale Aktivität.
- Das Versuchstier muss zur Oozyten-Entnahme nicht getötet werden und kann sogar mehrmals operiert werden.

2.3.4 Gewinnung der Oozyten

Bei einer Operation zur Gewinnung von Ovarien, wurden aufgrund der begrenzten Haltbarkeit immer nur so viele Oozyten entnommen, wie benötigt wurden. Somit konnte jeder Frosch drei bis vier Mal operiert werden. Gearbeitet wurde unter keimarmen Bedingungen, also mit sterilen Arbeitsmitteln in nicht-sterilem Arbeitsbereich.

Ein Frosch wurde betäubt, indem er in eine eiskalte 0,1%ige 3-Aminobenzoesäureethylester-Lösung gesetzt wurde. Nach 30 - 45 Minuten wurde das Tier mit dem Rücken auf eine Schale mit Eis gelegt. Direkter Hautkontakt mit dem Eis, der zu Verletzungen führen kann, wurde durch Frischhaltefolie und feuchte Tücher vermieden. Einer Austrocknung der Froschhaut wurde ebenfalls durch feuchte Tücher entgegengewirkt, wobei nur der zu operierende Bereich, sowie die Atemöffnungen ausgespart wurden.

Um keine Gefäße zu verletzen wurde ein ca. 10 mm langer Schnitt durch Ober- und Unterhaut (Fett- und Muskelgewebe) relativ weit seitlich, in der Nähe des Schenkels gesetzt. Durch diese Öffnung wurden die Ovarien mit Hilfe einer Pinzette aus der Bauchhöhle gezogen und mit einer Schere stückchenweise abgeschnitten. Diese Stücke

wurden direkt in kaltem Ca^{2+} -haltigen Puffer gewaschen und in Ca^{2+} -haltigem Puffer (+ 0,1 mg/ml Gentamycin) bei 4°C gelagert.

Beim anschließenden Vernähen der Operationsöffnung wurde darauf geachtet, dass sich zwischen Muskelgewebe und Oberhaut keine Gewebereste befanden, da dies zu Infektionen und verschlechterter Wundheilung führen kann. Die Unterhaut wurde mit resorbierbaren und die Oberhaut mit nicht-resorbierbaren sterilen chirurgischen Fäden vernäht.

Der Frosch wurde in frisches Wasser gesetzt, das mit einigen Körnern Kaliumpermanganat versetzt war. Der Kopf des Frosches wurde auf einen Stein gelegt, so dass die Atemöffnungen oberhalb der Wasseroberfläche lagen. Nach 3 - 4 Stunden wurde das Becken weiter gefüllt und der Frosch über Nacht separat gehalten. Am nächsten Tag wurde das Tier wieder zu seinen Artgenossen gesetzt.

2.3.5 Kollagenasebehandlung & Lagerung der Oozyten

Um die Oozyten aus ihrem Verbund zu befreien und zu vereinzeln, wurden sie mit Kollagenase behandelt. Dazu wurden 2 - 3 ml der Oozyten-Verbände in ca. 4 - 6 mm große Stücke zerkleinert und 8-mal mit kaltem Ca^{2+} -freiem Puffer gewaschen, bis die Lösung nicht mehr trüb war. Dadurch wurden die Oozyten einerseits gereinigt, andererseits wurde so Calcium aus der Lösung entfernt, da dieses sonst die Wirkung der Kollagenase potenziert. Dann wurden 10 ml kalter Ca^{2+} -freier Puffer sowie 100 µl Kollagenaselösung (Stock 200 mg/ml) hinzugegeben, so dass eine Kollagenase-Konzentration von 2 mg/ml gegeben war. Das Ganze wurde 20 - 40 Minuten leicht geschüttelt, bis der größte Teil der Oozyten sich aus den Verbänden gelöst hatte. Die richtige Dauer des Kollagenase-Verdau war insofern wichtig, da bei zu langer Behandlung die Oozyten stark geschädigt werden. Ist der Verdau zu kurz, löst sich die Follikelhaut um die Eier nicht, was wiederum die Transportversuche stark stört.

Um die Kollagenase wieder vollständig zu entfernen, wurde 15-mal mit kaltem Ca^{2+} -freiem Puffer und anschließend 5-mal mit kaltem Ca^{2+} -haltigem Puffer gewaschen. Beschädigte Oozyten und Restverbände wurden sofort aussortiert. Nach 2-3 Stunden wurden Oozyten in Ca^{2+} -haltigen Puffer (+ 0,1 mg/ml Gentamycin) überführt.

Gelagert wurden die Oozyten in Ca^{2+} -haltigen Puffer (+ 0,1mg/ml Gentamycin) oder in Kulturmedium bei 4°C. Die Pflege der Oozyten bestand darin täglich beschädigte oder degenerierende Oozyten auszusortieren und bei Bedarf das Lagerungsmedium zu erneuern.

2.3.6 Injektion von cRNA in *X. laevis* Oozyten

Bei der Injektion wurde mit Handschuhen gearbeitet um eine weitgehend RNase-freie Arbeitsumgebung zu schaffen. Die zu injizierenden RNA-Lösungen wurden mit frisch autoklaviertem H_2O reinst. auf die gewünschte Konzentration von 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ verdünnt.

In einer Petrischale wurde ein Kunststoffnetz mit einer Maschenweite von 1 x 1 mm mit Ca^{2+} -haltigem Puffer überschichtet. Auf dieses wurden zuvor ausgewählte Oozyten der Stadien V und VI positioniert. Beim Auswählen der Oozyten wurde darauf geachtet, dass diese nicht mehr von ihrem Follikelhäutchen umgeben waren. Im Normalfall löst sich dieses Häutchen innerhalb der ersten 10 Stunden nach der Kollagenasebehandlung von selbst ab. Ist dies nicht der Fall, kann man versuchen die Haut mit Hilfe einer dünnen Pasteurpipette abzustreifen oder man verwirft die ganze Oozyte.

Mikrokapillaren wurden mit einem Kapillarziehgerät hergestellt und mit 1,5 - 5 μl der jeweiligen cRNA-Lösung befüllt. Durch einen Mikroinjektor wurde ein definiertes Volumen (z.B. 20 nl) pro Oozyte injiziert. Das Volumen wurde anhand der Tröpfchengröße gemessen und über die Öffnungsgröße der Mikrokapillare und die Dauer des Ausstoßintervalls eingestellt. Die Kapillaröffnung wurde durch schrittweises Abknippen der Spitze vergrößert bis die gewünschte Tröpfchengröße erreicht war. Die Injektionsdauer wurde meist zwischen 4,7 und 5,3 Sekunden gewählt, so dass die Größe der injektionsbedingten Verletzung bei allen Versuchen möglichst ähnlich war. Um Verletzungen des im animalen Pol liegenden Zellkern zu vermeiden, wurde die Kapillare stets in den vegetativen Pol eingestochen. Alle 15 - 20 Injektionen wurde kontrolliert ob noch das korrekte Injektionsvolumen ausgestoßen wurde.

Die Oozyten wurden in Gentamycin-haltigem Kulturmedium bei 18°C für 48 bzw. 72 Stunden in Petrischalen inkubiert. Täglich wurden beschädigte Oozyten aussortiert und ggf. das Kulturmedium erneuert. Als Negativkontrolle wurden nicht injizierte Oozyten verwendet, die aber den gleichen Inkubationsbedingungen ausgesetzt waren, wie die injizierten.

2.3.7 Transportstudien an *X. laevis* Oozyten

Für einen Transportversuch wurden die Oozyten drei Mal in Na⁺-Aufnahmepuffer gewaschen und anschließend für 15 Minuten bei 20°C in 200 µl [³H]-Aminosäurelösung in Na⁺-Aufnahmepuffer [10 µCi/ml] der angegebenen Konzentration inkubiert. Nach erneutem 5-maligen Waschen in eiskaltem Na⁺-Aufnahmepuffer wurden die Oozyten vereinzelt, für 30 Minuten in 200 µl 2% SDS lysiert und mit 2 ml Szintillationsreagenz (Luma Safe™) versetzt.

Die Mengen radioaktiver Strahlung wurde mit Hilfe eines Flüssigszintillationszählers bestimmt. Bei dieser Methode wird die bei einem Zerfall freiwerdende Energie (ionisierende Strahlung) auf die Szintillationsflüssigkeit übertragen. Diese wird dadurch angeregt und erzeugt Lichtblitze, deren Anzahl von der Menge der freigesetzten Energie abhängt. Aufgrund der bekannten spezifischen Aktivität sowie der Zählrohrbeute kann anschließend von der Zählrate (cpm, counts per minute) auf die Zerfälle pro Minute (dpm, decays per minute) umgerechnet werden.

Zur Auswertung konnte aus der Menge der aufgenommenen und im Szintillationszähler als dpm bestimmten [³H]-Aminosäure die Gesamtmenge der pro Probe aufgenommene Aminosäure folgendermaßen berechnet werden:

- 1 µCi entspricht $2,22 \times 10^6$ dpm
- die in den Versuchen eingesetzte [³H]-Aminosäuremenge betrug 10 µCi/ml
- die Aminosäure-Konzentration der Inkubationslösungen war standardmäßig 1 mM, also 1 µmol/ml (bei Versuchen mit abweichender Aminosäurekonzentration wurden alle Werte auf 1 mM umgerechnet, indem die dpms mal der eingesetzten Aminosäure-Konzentration [mM] genommen wurden)
- damit entspricht 1 µmol/ml der Aminosäure 10 µCi/ml
- damit entspricht 1 µmol der Aminosäure $2,22 \times 10^7$ dpm
- daraus ergibt sich folgende Formel:

$$Y(AS) = G \times 1 \mu\text{mol} / (2,22 \times 10^7) = G \times 1 \text{ nmol} / (2,22 \times 10^4)$$

Y(AS): Menge der pro Probe aufgenommenen Aminosäure

G: gemessene dpm pro Probe

Die graphische Darstellung, sowie die statistische Auswertung der Aufnahmestudien erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA).

2.4 Methoden der Zellkultur

Alle Zellkulturmedien wurden von der Firma Gibco (Ausnahme: Ham's F12 von PAA), die Plastikwaren von den Firmen Greiner Bio-One und Nunc bezogen.

2.4.1 Handhabung

- Kultivierung, Passagieren & Einfrieren

Die Kultivierung von Zellen erfolgte in verschiedenen Flaschentypen:

	Fläche	Inhalt
T25	25 cm ²	5 ml
T75	75 cm ²	10 ml
T150	150 cm ²	20 ml

Konfluente Zellen wurden 1-3 mal mit 13 ml DPBS gewaschen und anschließend mit 0,5 ml (T25), 0,7 ml (T75) oder 1,3 ml (T150) Trypsin bedeckt. Nach dem erneuten Absaugen des Trypsin wurden die Zellen für 3 Minuten im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden in 5 - 10 ml Medium + FCS aufgenommen und gut resuspendiert. Ein Teil der Zellen wurde in der Flasche belassen und mit FCS-haltigem Medium aufgefüllt.

Zum Einfrieren wurden die Zellen mit Trypsin von der Flasche abgelöst und bei 800xg für 5 Minuten abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in vorgekühltem FCS-haltigem Medium + 10% DMSO aufgenommen und auf spezielle Einfriereröhrchen verteilt. Nach 24 - 48 Stunden im -80°C Gefrierschrank wurden die Zellen in den Stickstofftank umgesetzt.

- Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Teil der Zellsuspension in eine Neubauer Zählkammer gegeben. Diese besteht aus einem Objektträger mit eingezeichneten Linien, die definierte Felder eingrenzen. Zwischen Objektträger und Deckglas befindet sich eine Vertiefung definierter Höhe. Die Pipettenspitze wird an den Auflagepunkt des Deckglases auf dem Objektträger angesetzt, so dass sich ein definiertes Volumen der Zellsuspension durch die Kapillarkräfte in den Zwischenraum saugt. Nachdem man mithilfe eines

Lichtmikroskops die Anzahl der Zellen in jedem der 4 Großquadrate bestimmt hat, wird der Mittelwert dieser 4 Werte mit der Kammerkonstante (10^4) und ggf. dem Verdünnungsfaktor der Zellsuspension multipliziert. Somit erhält man die Zellzahl pro ml.

2.4.2 Zelllinien und deren Kultivierung

- U373MG Glioblastom Zellen

Eine aus einem Glioblastom eines 61 Jahre alten kaukasischen Mannes generiert Zelllinie (Ponten & Macintyre, 1968).

Herkunft: ATCC, Manassas, VA, USA

Stabil transfizierte Zelllinien wurden hier im Institut über eine Selektion mit G418 hergestellt und sind in vorhergehenden Doktorarbeiten beschrieben.

Medium: IMDM + 10% FCS

Kultivierung: bei 37°C mit 5% CO₂; 1-2 x pro Woche 1:10 – 1:20 splitten

- EA.hy 926

Eine humane endotheliale Zelllinie, die durch Fusion der humanen Alveolarepithel-ähnlichen Lungenkarzinomzelllinie A549/8 mit humanen Umbilikalvenen Endothelzellen (HUVEC) hergestellt wurde (Edgell, 1983).

Herkunft: Geschenk von Cora-Jean S. Edgell von der University of North Carolina at Chapel Hill, USA

Medium: DMEM + 10% FCS

Kultivierung: bei 37°C mit 10% CO₂; 1x pro Woche 1:10 splitten

- RFL-6

Fibroblasten aus fötalen Rattenlungen.

Da sie über eine leicht stimulierbare lösliche Guanylatcyclase, jedoch über keine endogene NOS verfügen, wurden sie als Reporterzellen im Transferassay zur Messung der NO-Produktion der EA.hy926 eingesetzt (Hay et al., 1982).

Herkunft: ATCC (CCL-192)

Medium: Ham's F12 + 15% FCS

Kultivierung: bei 37°C mit 5% CO₂; vor der Trypsinbehandlung muss sehr gut (3x) mit DPBS gewaschen werden; 3x pro Woche MW; Splitten 1:6 – 1:9

- Humane Hautfibroblasten

Die Zelllinien von gesunden Spendern (MW23, 33) waren Geschenke von Martijn Wilmer (Nijmegen), die Zelllinien von cystinotischen Spendern (FCys5, 16, 17) hatten alle die meist verbreitete 57kb-Deletion im CTNS-Gen (Zitat) und waren ein Geschenk von Elena Levtschenko (Nijmegen)

Medium: M199 + 10% FCS

Kultivierung: bei 37°C mit 5% CO₂; 3x MW pro Woche, Splitten 1:3

2.4.3 Mikroskopie

- Fixieren

Auf Deckgläschen ausgesäte Zellen wurden drei Mal mit PBS gespült und bei RT für 10 Minuten in 4% Paraformaldehyd inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wieder drei Mal mit DPBS gespült und das Glasplättchen auf einen Tropfen „ProLong[®] Gold Antifade Reagent“ (Invitrogen) auf einem Objektträger gelegt.

- Färbung an lebenden Zellen

Zellen wurden in 3cm-Glasboden-Schälchen ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Fluoreszenzfarbstoffe wie in der Tabelle beschrieben eingesetzt. Anschließend wurden an einem Laser-Scanning Mikroskop (LSM) Bilder aufgenommen.

Farbstoff	Hersteller	Anwendung	Ex / Em [nm]
Lysotracker [®] Red DND99	Invitrogen	50 nM in Medium 0,5-4 h	577 / 590
MitoTracker [®] Orange CM-H ₂ TMRos	Invitrogen	1 µM in PBS +CM, 30 min	554 / 576
ER-Tracker [™] Red Dye	Invitrogen	1 µM in PBS +CM, 20 min	587 / 615

PBS+CM

0,1 mM CaCl₂

1 mM MgCl₂

In DPBS (Gibco)

2.4.4 Behandlung mit siRNA

Zur Herunterregulation der Expression bestimmter Gene wurde siRNA (small interfering RNA) benutzt. Dabei wird der endogene Mechanismus der Gen-Stilllegung durch die RNA-Interferenz ausgenutzt. Diese beruht auf einer Wechselwirkung kurzer siRNAs mit der Erbinformation-übertragenden mRNA unter Beteiligung mehrerer Enzymkomplexe. Die siRNAs liegen als 19 bis 23 Basenpaare umfassende, doppelsträngige Ribonukleinsäure-Moleküle mit jeweils zwei endständig überstehenden Nukleotiden vor. Einer der Stränge wird dann Bestandteil des RNA-induced silencing complex (RISC) und bestimmt die Selektivität der Genstilllegung. In diesem Komplex bindet die siRNA an eine komplementäre Nukleotidsequenz der mRNA, welche dann abgebaut wird. Um die siRNAs in die Zelle einzubringen, wurde das Transfektionsreagenz SAINT-RED (Synvolux Therapeutics B.V.) benutzt. Bei SAINT handelt es sich um ein synthetisches amphiphiles (nicht-liposomales) Molekül, dessen Funktion auf einer kationischen Pyridinium-Gruppe beruht. SAINT-RED besteht aus einem Gemisch aus SAINT-18 und dem neutralen Co-Lipid DOPE (Dioleoylphosphatidylethanolamine).

Einen Tag vor der Behandlung wurden 5×10^4 (24-Loch Platte) bzw. 3×10^5 (6-Loch Platte) ausgesät, so dass die Zellen am Tag der Transfektion ca. 60% konfluent waren. Zur Transfektion wurde zunächst in getrennten Reaktionsgefäßen die siRNA und das SAINT-RED mit dem mitgelieferten Puffer „HBS“ gemischt. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden beide Ansätze gemischt und weitere 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurde mit Serum-freiem Medium auf das Endvolumen aufgefüllt und das Gemisch vorsichtig auf die zuvor ein Mal mit DPBS gewaschenen Zellen getropft. Pro Vertiefung wurde bei einer 6-Loch Platte 225 µl Transfektions-Gemisch in einem Endvolumen von 900 µl verwendet, bei einer 24-Loch Platte 50 µl Transfektions-Gemisch in einem Endvolumen von 250 µl. Die siRNA lag standardmäßig in einer Stockkonzentration von 20 µM vor und wurde so eingesetzt, dass die Endkonzentration 15 nM betrug. In Tabelle 5 sind die Standardansätze pro Vertiefung einer 6- bzw. einer 24-Loch Platte dargestellt.

Tabelle 5: Standardansatz zur Transfektion mit 15nM siRNA

	Reaktionsgefäß 1		Reaktionsgefäß 2		Medium ohne FCS
	siRNA (20µM)	HBS	SAINT-RED	HBS	
6-Loch	0,675 µl	111,875 µl	20 µl	92,5 µl	675µl
24-Loch	0,1875 µl	24,811 µl	2,5 µl	22,5 µl	200µl

Nach 4 Stunden Inkubation bei 37°C wurde die Transfektion durch die Zugabe von 2 ml (6-Loch Platte) bzw. 750 µl (24-Loch Platte) FCS-haltigen Mediums abgestoppt. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel. Die nachfolgenden Analysen erfolgten dann zu den jeweils angegebenen Zeitpunkten nach der siRNA Behandlung.

2.4.5 Transportstudien an humanen Zellen

- Lösungen

10x Locke's Lösung (LL):

154 mM NaCl
5,6 mM KCL
1 mM MgCl₂
10 mM HEPES
3,6 mM NaHCO₃
pH 7,4 einstellen

Am Versuchstag wurde die 10x LL 1:10 verdünnt und mit 2 mM CaCl₂ und 5,6 mM Glucose versetzt. Die Wasch- sowie die Aufnahmelösung wurden auf 37°C vorgewärmt. Die Aufnahmelösungen bestanden meist aus 100 µM – 1 mM Aminosäure die mit 5 – 10 µCi/ml [³H]-Aminosäure versetzt wurde.

- Durchführung

Die in 96-Loch Platten ausgesäten Zellen wurden auf einem 37°C warmen Heizblock zwei Mal mit 100 µl vorgewärmter Locke's Lösung gewaschen und anschließend für 30 Sekunden in Aufnahmelösung inkubiert. Die Aufnahmelösung wurde durch Ausschlagen der Platte auf Papier entfernt und die Zellen sofort 3 Mal in eiskalter Locke's Lösung gespült, indem die Platte in eiskalte Locke's Lösung getaucht und anschließend wieder ausgeklopft wurde. Die Zellen wurden dann für ca. 30 Minuten in 50 µl 0,5 N NaOH bei RT lysiert. Anschließend wurde die Lösung durch Zugabe von 50 µl 0,5 N HCl neutralisiert und das Volumen durch die Zugabe von 50 µl Locke's Lösung vergrößert.

Von diesen 150 µl Endvolumen wurden 100 µl zur Messung der Radioaktivität im Szintillationszähler mit 2 ml Szintillationsreagenz (Luma Safe™) versetzt und 25 µl wurden zur Proteinbestimmung mittels des BCA-Assays eingesetzt.

Die Auswertung erfolgte wie in Kapitel 2.3.7 beschrieben.

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

- **BCA-Kit**

Proteinkonzentrationen wurden mit dem „BCA Protein Assay Reagent“ Kit von Thermo Scientific bestimmt. Dieses Kit verknüpft die schon lange bekannte Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ -Ionen durch Proteine in alkalischer Umgebung (es entsteht ein hellblauer Komplex) mit der Farbreaktion von Cu^+ mit Bicinonsäure (**bicinchoninic acid**, BCA), wobei sich die Lösung violett verfärbt. Die Absorption dieses BCA/Kupfer-Komplexes bei 562 nm steigt linear zur Proteinkonzentration an.

Für die Proteinbestimmung wurde mit der im Kit enthaltenen Albumin-Lösung eine Standardkurve hergestellt. Die Lysate wurden je nach zu erwartender Konzentration unverdünnt oder als 1:5 - 1:10-Verdünnung eingesetzt. Von jeder Probe bzw. Standardlösung wurden 25 μl in eine Vertiefung einer 96-Loch-Platte gegeben. Anschließend wurden 200 μl der Analyse-Lösung, bestehend aus Reagenz A und B im Mischungsverhältnis 50:1 dazugegeben und die Platte für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Detektion erfolgte in einem Mikrotiterplatten-Photometer (Sunrise, Tecan), bei einer Wellenlänge von 562 nm.

- **nach Bradford**

Waren den BCA-Test störende Substanzen in den Proben (z.B. DTT), musste die Proteinbestimmung nach der Methode von Bradford durchgeführt werden. Die nach M.M. Bradford benannte und 1976 veröffentlichte Methode beruht auf dem Einsatz von blauen Säurefarbstoffen, die als Coomassie-Brillantblau bezeichnet werden. Der in dieser Arbeit verwendete Protein-Assay von BioRad wird mit Coomassie-Brillantblau G-250 durchgeführt, dessen Absorptionsmaximum verschiebt sich in Anwesenheit von Proteinen und im sauren Milieu von 465 nm zu 595 nm.

Zur Quantifizierung wurden standardmäßig 10 μl Proteinlösung plus 90 μl H_2O reinst. mit 100 μl BioRad-Reagenz (40%-ige Lösung von BioRad) in Vertiefungen einer 96-Loch-Platte pipettiert. Als Standard diente eine BSA-Verdünnungsreihe von 0 bis 5 μg in einem Endvolumen von 100 μl . Nach einer 5-10 minütigen Inkubation folgte die Detektion in einem Mikrotiterplatten-Photometer (Sunrise, Tecan) bei der Wellenlänge von 595 nm. Die Proteinkonzentration errechnete sich aus der anhand des Standards erstellten Eichgerade.

2.5.2 Zelllysate

RIPA-Puffer (radioimmune precipitation assay-buffer):

1 % (w/v)	Deoxycholat
0,15 mM	NaCl
1 mM	EDTA (pH 8)
0,1 mM	Tris (pH 7,2)
1 % (v/v)	Triton X100
0,1 % (w/v)	SDS

Lyse-Puffer:

RIPA + Proteinaseinhibitoren-Gemisch (1 Tablette Complete Mini (Roche) / 10 ml RIPA)

N-Glykosidase F (Roche)

Stock-Lösung: 1 U/ μ l

Das lyophilisiert gelieferte Produkt (Peptide-N-Glycosidase F) wird in Millipore-Wasser (bei einer Packungsgröße von 100 U in 100 μ l Wasser) gelöst, so dass folgende Lösung entsteht: 100 mM Natrium-Phosphat-Puffer, 25 mM EDTA, pH 7,2

- **Lysate aus *X. laevis* Oozyten**

Für die Gewinnung der Zelllysate wurden je 5 Oozyten drei Mal in Na^+ -Aufnahmepuffer (vgl. 2.3.1) gewaschen und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Die Flüssigkeit wurde so weit wie möglich entfernt und die Oozyten mit 100 μ l Lyse-Puffer überschichtet. Während der 30 - 45-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Oozyten regelmäßig aufgewirbelt um eine gleichmäßige Lyse zu gewährleisten. Anschließend wurden die Lysate bei 14.000 rpm und 4°C für 20 Minuten zentrifugiert (Eppendorf 5417c). Dabei setzte sich aus den Oozyten ausgetretener Dotter an der Oberfläche ab. Das benötigte Lysat sollte möglichst ohne Dotter entnommen werden.

- **Lysate aus humanen Zellen**

Zellen wurden einmal mit DPBS gewaschen, mit Lyse-Puffer überschichtet (T75-Flasche & 10-cm-Platte: 0,5-1 ml; 6-Loch-Platte: 100-150 μ l/Loch; 24-Loch-Platte: 50 μ l/Loch) und für ca. 45 - 60 Minuten bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Plastikschaaber abgelöst und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 14.000rpm und 4°C (Eppendorf 5417c) wurde das Pellet vorsichtig mit einer Pipettenspitze aus dem Gefäß gezogen.

- **Deglykosilierung**

Da die CAT-Proteine *in vivo* glykosyliert vorliegen, laufen sie in einem Acrylamidgel als breite Schmierbande oberhalb der berechneten Molekülgröße. Deglykosylierung führt dazu, dass klare Banden entstehen. Zusätzlich verifiziert die entstehende Größenverschiebung die Richtigkeit der Banden.

Zur Deglykosilierung wurde ein Teil des Lysats mit 0,5-1 µl N-Glykosidase (1U/µl) versetzt und für 45 Minuten bei 37°C inkubiert.

2.5.3 Biotinylierung

Bei der Methode der Biotinylierung werden intakte Zellen in einer Biotin-haltigen Lösung inkubiert. Dabei bindet Biotin an primäre Amine von Proteinen (NH₂-Gruppen). Somit sind alle Proteine mit Biotin markiert, die auf der Zelloberfläche sitzen bzw. durch sie hindurch ragen. Da alle Zellen ständig Endocytose betreiben und dies ein sehr schneller Vorgang ist, muss bei diesem Versuch ständig auf Eis gearbeitet werden!

Substanzen:

Biotin: EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin von Thermo Fisher Scientific Inc.

Avidin-gekoppelte Perlen: Immobilized NeutrAvidinTM, Thermo Fisher Scientific Inc.

- **Biotinylierung von *Xenopus laevis* Oozyten:**

PBS mod.:

100 mM	NaCl
2 mM	KCl
1,76 mM	KH ₂ PO ₄
10,1 mM	Na ₂ HPO ₄

PBS mod. + CM:

1 mM	MgCl ₂
0,1 mM	CaCl ₂
	in PBS mod.

Biotin Lösung:

1 mg/ml Biotin in PBS mod.

Stopp-Lösung:

50 mM NH₄Cl in PBS mod.

Waschpuffer I:

50 mM	Tris (pH 8)
500 mM	NaCl
1 mM	EDTA (pH 8)
0,5% (v/v)	Triton X-100
0,1% (w/v)	SDS

frisch mit 1µl/ml PMSF(Stock 0,2 M in Aceton) versetzen

Waschpuffer II:

50 mM	Tris (pH 7,4)
1 mM	EDTA (pH 8)
0,5% (v/v)	Triton X-100
0,1% (w/v)	SDS

Jeweils 10 Oozyten wurden 3-mal modifiziertem PBS (PBS mod.) gewaschen, das mit Calcium und Magnesium versetzt war (PBS mod. + CM). Anschließend folgte eine Inkubation in Biotin-Lösung. Die Biotinylierungsreaktion wurde durch eine 10-minütige Inkubation in Stopp-Lösung abgestoppt. Nach 4 Waschungen in PBS mod + CM wurden die Oozyten in 200 µl Lyse-Puffer lysiert und abzentrifugiert.

Ein kleiner Teil dieses Lysats (10-20 µl) wurde als Gesamtlisat zurückbehalten.

Zur Isolation der Oberflächenproteine aus dem Proteingemisch wurden 150 µl des Lysats (entspricht 7,5 Oozyten) auf 50µl Avidin-gekoppelte Perlen gegeben und über Nacht auf einem „end-over-end“-Schüttler inkubiert. Dabei bindet das Biotin am Avidin. Am nächsten Tag wurden die Proben abzentrifugiert (14.000 rpm, 4°C, 20 Minuten), der Überstand verworfen und das Sediment 3-mal mit Waschpuffer I und einmal mit Waschpuffer II gewaschen (je 0,7 ml; 14.000 rpm, 4°C, 20 Minuten). Das Sediment wird nach dem letzten Waschschrift in 30 µl 2x SDS-Probenpuffer (vgl. Kapitel 2.5.4) aufgenommen und für 10 Minuten bei 37°C inkubiert.

- Biotinylierung humaner Zellen

PBS:

140mM	NaCl
2,68mM	KCl
1,76mM	KH ₂ PO ₄
10,1mM	Na ₂ HPO ₄

PBS + CM:

1mM	MgCl ₂
0,1mM	CaCl ₂
	in PBS

Biotin Lösung:

1mg/ml Biotin in PBS

Quenchin-Puffer:

0,1mM	Glyzin
	in PBS+CM

Humane Zellen wurden in 10cm Zellkulturplatten bis zur Konfluenz kultiviert. Nach 3-maligem Waschen mit PBS + CM wurden die Zellen in 2 ml Biotin-Lösung inkubiert. Nach 20 Minuten wurde das Biotinylierungsreagenz abgesaugt und die Zellen zwei Mal mit 5 ml Quenching-Puffer gewaschen. Um überschüssiges Biotin abzufangen wurden die Zellen für 30 Minuten in weiteren 5 ml Quenching-Puffer bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zwei Mal mit PBS+CM gespült und in 1ml Lyse-Puffer für 60 Minuten lysiert. Nach dem Abzentrifugieren des Lysats (14.000 rpm; 4°C, 15 Minuten) und einer Bestimmung des Proteingehalts wurden die Oberflächenproteine durch Avidin-Kopplung isoliert. Hierzu wurden 100 µg (für überexprimierte Proteinen) bzw. 300 µg Protein-enthaltendes Lysat (bei endogenen Proteinen) auf 50 - 70 µl Avidin-gekoppelte Perlen gegeben und über Nacht auf einem „end-over-end“-Schüttler inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Proben abzentrifugiert (14.000 rpm, 4°C, 20 Minuten), die Überstände verworfen und das Sediment vier Mal mit je 500 µl RIPA + 200 µM PMSF (Stock 0,2 M in Aceton) gewaschen. Um die Proteine wieder von den Avidin-Perlen zu lösen, wurde das Sediment am Ende in 30 µl 2x SDS-Probenpuffer (vgl. Kapitel 2.5.4) für 10 Minuten bei 37°C inkubiert.

2.5.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine ihrem Molekulargewicht nach aufzutrennen, bedient man sich der SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Dabei lagert sich das anionische Detergenz SDS an die hydrophoben Regionen der Proteine an, denaturiert diese und verleiht ihnen so eine negative Gesamtladung. Diese Protein-SDS-Komplexe verfügen über ein konstantes Verhältnis von Ladung zu Masse. Die Denaturierung der Proteine wird unterstützt, indem das reduzierende Agens 2-Mercaptoethanol während einer 10-minütigen Inkubation in SDS-Probenpuffer bei 37°C Disulfidbrücken spaltet. Um die Auftrennung der Proteine im sog. Trenngel zu verbessern, wurden diese zunächst durch ein Sammelgel konzentriert.

Zum Gießen des Trenngels wurde die Lösung zwischen zwei, zuvor mit Ethanol gereinigten und in eine Gelkammer gespannte Glasplatten gefüllt und mit Wasser überschichtet um eine glatte Trenngeloberfläche zu schaffen. Nach der Auspolymerisierung des Trenngels wurde das Wasser abgeschüttet und Reste gründlich mit Filterpapier abgezogen. Auf das Trenngel wurde das Sammelgel gegossen und ein Kunststoffkamm zum Aussparen von Probenaschen zwischen die Glasplatten geschoben. War das Sammelgel auspolymerisiert, wurde das Gel in eine dazugehörige Elektrophorese-Kammer (Model 45-2010-i; PeqLab) überführt und diese mit SDS-Elektrophorese-Puffer gefüllt. Der Kunststoffkamm wurde vorsichtig entfernt und die Probenaschen zur Entfernung von Gelresten mit Puffer gespült. Nachdem die mit 2x SDS-Probenpuffer versetzten Proben, sowie 4 µl Marker (Proteinmarker (Page Ruler™ Prestained Protein Marker, Fermentas) aufgetragen waren, wurde zum Einlaufen der Proben in das Gel eine Spannung von 200 Volt angelegt, die nach 10 Minuten auf 120 Volt reduziert wurde.

- Lösungen:

2x SDS-Probenpuffer:

125 mM	Tris-Base
20 % (v/v)	Glycerol
5 % (w/v)	SDS
0,001 % (w/v)	Bromphenolblau
8 M	Harnstoff
2 % (v/v)	Mercaptoethanol (frisch zugeben)

Rezepte für Acrylamidgelen:

	Trenngele		
	12,5%	10%	7,5%
H ₂ Oreinst.	7,13 ml	9 ml	10,5 ml
1,5 M Tris-HCL pH 8,8	5,63 ml	5,63 ml	5,63 ml
10% SDS	225 µl	225 µl	225 µl
30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid	9,38 ml	7,5 ml	5,63 ml
APS	150 µl	150 µl	300 µl
TEMED	15 µl	15 µl	30 µl

	Sammelgele	
	6,22%	3,9%
H ₂ Oreinst.	6,1 ml	6,1 ml
0,5 M Tris-HCL pH 6,8	2,5 ml	2,5 ml
10 % SDS	100 µl	100 µl
30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid	2,3 ml	1,3 ml
APS	66 µl	200 µl
TEMED	14 µl	20 µl

SDS-Elektrophorese-Puffer (10x)

240 mM Tris Base
 1,9 M Glyzin
 1 % (m/v) SDS

2.5.5 Western Blot

Die Western Blot-Analyse stellt eine sensitive Nachweismethode zur Identifikation von Proteinen dar. Dazu müssen die Proteine aus einer SDS-PAGE auf eine Membran übertragen werden, auf der ein Nachweis durch spezifische Antikörper gegen ein zu untersuchendes Protein möglich ist.

Das Trenngel einer SDS-PAGE wurde auf eine Nitrozellulosemembran gelegt. Auf jeder Seite wurden 3 Lagen Whatman-Papier und ein Schwamm angebracht. Das Ganze wurde zwischen zwei Kunststoffplatten geklemmt und in eine Blot-Kammer überführt. Dabei war darauf zu achten, dass alles möglichst luftblasenfrei zusammengebaut wurde und dass die Nitrozellulose-Membran zur Anode zeigte. Anschließend wurde die Blot-Kammer mit Elektrobloiting-Puffer gefüllt und ü.N. bei 4°C eine konstante Stromstärke von ca. 200 mA (die Spannung sollte dann zwischen 30 und 50 Volt sein) angelegt. Zur Kontrolle des Transfer-Erfolges wurde die Membran am nächsten Tag mit Ponceau S- Lösung eingefärbt und so lange mit Wasser entfärbt, bis die Proteinbanden gut zu sehen waren. In diesem Zustand wurde die Membran auf die gewünschte Größe zurechtgeschnitten. Nach vollständiger Entfernung der Ponceau S-Färbung mit H₂Oreinst. wurde zum Nachweis der Proteine durch Antikörper-Bindung übergegangen.

Elektrobloiting-Puffer:

20 mM	Tris-Base
150 mM	Glyzin
20% (v/v)	Methanol

Ponceau S Lösung:

0,5% (w/v)	Ponceau S
1% (v/v)	Essigsäure

2.5.6 Proteinnachweis durch Antikörper

Unspezifische Bindungsstellen auf der Membran wurden durch eine ein- bis zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur (RT) in Blotto (bei späterer Benutzung von CAT-Antikörpern zusätzlich mit 4% Ziegen Serum) abgesättigt. Anschließend wurde drei Mal für 10 Minuten mit Blotto bzw. Antikörperverdünnungspuffer (AK-VP) auf einem Taumler bei RT gewaschen, je nachdem in welchem Puffer anschließend der Antikörper verdünnt wurde. Die Membran wurde zusammen mit Primärantikörperverdünnung in eine Plastikfolie eingeschweißt und auf einem "end over end" Schüttler über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran drei Mal für 10 Minuten in Blotto gewaschen. Es folgte die Inkubation für 1 Stunde bei RT auf dem Taumler mit der entsprechenden Sekundärantikörperverdünnung. Danach wurde die Membran dreimal mit 1x TBST und einmal mit 1x TBS gewaschen, auf eine Glasplatte gelegt und mit einer 1:1 Mischung des Chemilumineszenz Reagenz Plus (Perkin Elmar) überschichtet. Nach einer Minute wurde die Lösung entfernt und die Membran mit einer Folie bedeckt.

Sollte die gleiche Membran mit einem zweiten Primärantikörper inkubiert werden, wurden die gebundenen Antikörper durch „Strippen“ entfernt. Dazu wurde die Membran nach viermaligem waschen mit 1x PBS für 30 Minuten bei 50°C mit Strip-Puffer inkubiert. Danach wurde die Membran 6-mal mit 1x PBS gewaschen und konnte dann in Blotto (\pm Ziegen Serum) erneut geblockt werden.

Antikörperverdünnungspuffer:

1% (w/v)	BSA
0,1% (v/v)	Tween-20 in PBS

Blotto:

50 mM	Tris-HCl pH 8
2 mM	CaCl ₂
0,01% (v/v)	Antifoam A
5% (w/v)	Magermilchpulver in H ₂ Oreinst.

1x TBS:

10mM	Tris-HCl pH 8
150mM	NaCl
0,01% (v/v)	Antifoam A
5% (w/v)	Magermilchpulver in H ₂ Oreinst.

1x TBST:

1x TBS + 0,05% (v/v) Tween-20

Strip-Puffer:

2% (w/v)	SDS
62,5 mM	Tris-HCL pH 6,8
100 mM	Mercaptoethanol

Tabelle 6: Verwendete Erst- und Zweitantikörper

Primäre Antikörper	Verdünnung	Hersteller
rabbit-anti-hCAT-1	1:10.000 in AK-VP	Eigenproduktion Institut für Pharmakologie (Mainz) 2010
rabbit-anti-hCAT-2 aff. pur.	1:100 in AK-VP	Eigenproduktion Institut für Pharmakologie (Mainz)*
Anti-GFP “Full-Length A.v. Polyclonal Antibody” Rabbit polyclonal Cat.#: 632382	1:3000-5000 in Blotto	BD Living Colours™
anti-β-Tubulin mouse monoclonal Cat.#: A9044	1:5000 In Blotto	Sigma-Aldrich
anti-Cathepsin-D (C20) goat polyclonal Cat.#: sc-6486	1:500-1000 in Blotto	Santa Cruz Biotechnology
anti-LAMP-1 (H-228) rabbit polyclonal Cat.#: sc-5570	1:250-500 in Blotto	Santa Cruz Biotechnology
anti-Na/K-ATPase α1 (C464.6) mouse monoclonal Cat.#: sc-21712	1:500 in Blotto	Santa Cruz Biotechnology
Sekundäre Antikörper	Verdünnung	Hersteller
goat-anti-rabbit IgG H&L chain specific Peroxidase Conjugate Cat.#: 401393	1:15.000-50.000 in Blotto	Sigma-Aldrich
Anti-mouse IgG-Peroxidase; Produced in rabbit Cat.#: T4026	1:5000-1:10.000 in Blotto	Sigma-Aldrich
Rabbit anti-goat IgG HRP Cat.#: sc-2768	1:10.000 in Blotto	Santa Cruz Biotechnology

*) Zur Herstellung vgl. Dissertation von Petra Gräf (1998)

2.6 RFL-6 Reporterzell-Assay

Die Aktivität der NO-Synthase in endothelialen Zellen (hier EA.hy926) wurde mithilfe des RFL-6-Reporterzell-Assays bestimmt. Dabei wird ausgenutzt, dass das gasförmige NO aus Zellen heraus in die darüber liegende Lösung diffundiert. Die nun NO-haltigen Überstände können auf sogenannte Reporterzellen (hier: RFL-6) gegeben werden. Diese Zellen enthalten endogen eine leicht stimulierbare Guanylat-Cyklase, aber keine eigene NO-Synthase, so dass das exogen zugegebene NO für eine gesteigerte cGMP-Produktion verantwortlich ist. Das cGMP der Reporterzellen wird anschließend in einem Radio-Immun-Assay bestimmt, in dem radioaktiv markiertes cGMP (I^{125} -cGMP) mit dem endogenen cGMP um die Bindung an einen cGMP Antikörper konkurriert. Je mehr endogenes cGMP gebildet wurde, desto weniger radioaktives cGMP kann an den Antikörper binden. Anhand einer Standardkurve kann so ermittelt werden, wie viel cGMP von den Reporterzellen gebildet wurde.

2.6.1 Lösungen & Substanzen

1x Lockes Lösung (LL):

Am Versuchstag wurde 10x LL (vgl. Kap. 2.4.5) 1:10 verdünnt und mit 2 mM $CaCl_2$ und 5,6 mM Glucose versetzt.

20x Natrium-Acetat-Puffer (NaOAc):

1 M Na-Acetat zu 1 M Essigsäure geben, bis pH 4,0 erreicht ist (etwa 250 ml NaAcetat pro 500 ml Essigsäure). Für den Assay 1:20 verdünnen (1x).

Wichtige Substanzen:

3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX): 600 mM Stock in DMSO; von Serva

3-Morpholino-Sydnonimin (SIN-1): 1 mM in Phosphatpuffer pH 5,5; von Sigma

Bovine serum albumine (BSA): 0,01% (w/v) in 1x NaOAc; von MP Biomedicals

Calcium-Ionophor (A23187): 10 mM in DMSO; von Sigma

Chloroquin: 100 mM in $H_2O_{entmin.}$; von Sigma

Epoxomicin: 2 mM Stock in DMSO; von Biomol

^{125}I -cGMP (γ -Strahler): Biotrend

γ -Globulin: 1% (w/v) in 1x NaOAc; von Sigma

MG-132: 10 mM Stock in DMSO; von Biomol

Superoxid-Dismutase (SOD): 1000 U/ μ l in KH_2PO_4 ; von Sigma

2.6.2 Transferassay

Der Transferassay wurde standardmäßig in 24-Loch Platten und bei 37°C mit vorgewärmten Lösungen durchgeführt. Die Zellen wurden zunächst drei Mal mit 1xLL gewaschen und anschließend für 60 Minuten in Lockes Lösung (LL) vorinkubiert. Die Anwesenheit von 1 mM Arginin sollte die optimale Versorgung der eNOS mit ihrem Substrat Arginin gewährleisten und diene als 100%-Bedingung. Die Inkubation in LL mit 1 mM Lysin statt Arginin führte zur Depletion der Zellen, da intrazelluläres Arginin durch das extrazelluläre Lysin ausgetauscht wurde. Halbstündlicher Pufferwechsel (PW) diene zur Erhöhung der Depletionseffizienz. Es folgte eine 30-minütige Inkubation in LL, die 20 U/ml SOD, 600 µM IBMX sowie gegebenenfalls verschiedene Inhibitoren enthielt. Hier wurde alle 10 Minuten der Puffer gewechselt. Für den eigentlichen Transfer wurde den entsprechenden Lösungen noch 10 µM Calcium (Ca)-Ionophor A23187 zugesetzt, so dass die NO-Synthase durch einströmendes Calcium aktiviert wurde. Nach einer 2-minütigen Inkubation wurden die Überstände der EA.hy926- auf RFL-6 Zellen gegeben, die zuvor für 30 Minuten in LL mit SOD inkubiert worden waren. Nach 2-minütiger Inkubation der RFL-6 Zellen bei 37°C wurde die Lösung abgesaugt, die Zellen in 100 µl 1x NaOAc lysiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Für Erholungsmessungen wurden die EA.hy926 für 2 Minuten in einer Arginin-haltiger Lösung inkubiert, woraufhin sich eine weitere, 2-minütige Inkubation in Ca-Ionophor haltiger Lösung sowie der Transfer der Lösung auf Reporterzellen anschloss.

Ein Standardschema des Versuchsaufbaus ist in Tabelle 7 dargestellt, wurde aber je nach Versuchsaufbau wie in den Abbildungsbeschriftungen beschrieben leicht variiert.

Tabelle 7: Schema eines RFL-6 Reporterzell-Assays

Dauer	-----60'-----		30' (PW alle 10')	2' Transfer	2' Erholung	2' Transfer
	30'	30'				
Inhalt	Arg / Lys	Arg / Lys ± Chloroquin	Arg / Lys ± Chloroquin ± Epoxomicin ± MG132 + SOD	Arg / Lys ± Epoxomicin ± MG132 + SOD + IBMX + Ca-Ionophor	Arg ± Epoxomicin ± MG132 + SOD	Arg ± Epoxomicin ± MG132 +SOD +IBMX +Ca-Ionophor

2.6.3 Radio-Immuno-Assay (RIA)

Die Lysate der RFL-6 Zellen aus dem Transferassay wurden aufgetaut, in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und für 10 Minuten bei 14.000 rpm (RT) abzentrifugiert. Der Überstand wurde dann im Radio-Immuno-Assay eingesetzt.

Die Standardkurve aus nicht-markiertem cGMP wurde als Verdünnungsreihe angesetzt:

S9:	5 µl 20 µM cGMP + 995 µl 50 mM NaOAc (pH 4)	= 100 nM
S8:	500 µl S9 + 500 µl 50 mM NaOAc (pH 4)	= 50 nM
S7:	500 µl S8 + 500 µl 50 mM NaOAc (pH 4)	= 25 nM
S6:	500 µl S7 + 500 µl 50 mM NaOAc (pH 4)	= 12,5 nM
S5:	500 µl S6 + 500 µl 50 mM NaOAc (pH 4)	= 6,25 nM
S4:	500 µl S5 + 500 µl 50 mM NaOAc (pH 4)	= 3,13 nM
S3:	500 µl S4 + 500 µl 50 mM NaOAc (pH 4)	= 1,56 nM
S2:	500 µl S3 + 500 µl 50 mM NaOAc (pH 4)	= 0,78 nM
S1:	500 µl S2 + 500 µl 50 mM NaOAc (pH 4)	= 0,39 nM

Pipettierschema:

Röhrchen	Puffer [µl]	Probe/ Standard [µl]	¹²⁵ J-cGMP mit 10.000 cpm [µl]	Antikörper (1:10.000 in 0,01% BSA) [µl]
Totalwert (T)	-	-	100	-
Leerwert (L)	200	-	100	100 µl 0,01% BSA (ohne AK!)
Bindung (B)	200	-	100	100
Standard (S1-9)	150	50	100	100
Proben	150-190	50-10	100	100

5 ml-Kunststoffröhrchen wurden in der im Pipettierschema angegebenen Reihenfolge gefüllt, gevortext, herunterzentrifugiert, mit Parafilm[®] überzogen und über Nacht bei 4°C inkubiert. In dieser Zeit konkurrierte das radioaktiv markierte cGMP mit dem in den Zellen aufgrund von NO gebildetem cGMP um die Bindung mit dem Antikörper. Je mehr cGMP in den RFL-6 Zellen gebildet wurde, desto weniger radioaktiv markiertes cGMP bindet an den Antikörper. Am nächsten Tag wurde in jedes Röhrchen (außer in T) jeweils 50 µl 1% γ -Globulin und 2,5 ml eiskaltes Isopropanol zugegeben. Dadurch wurden die Antikörper mit dem an sie gebundenen cGMP gefällt. Nachdem die Röhrchen mit einem Deckel verschlossen und für 30 Minuten bei 4000 rpm (4°C) zentrifugiert worden sind, wurde der Überstand dekantiert und die Pellets an der Luft getrocknet. Anschließend wurde der I¹²⁵-Gehalt in einem γ -Counter (Cobra Quantum 5200 von PerkinElmer) bestimmt und in pmol nicht-markiertes cGMP angegeben.

2.7 Versuche an isolierten Lysosomen

2.7.1 Lösungen & Materialien

- MST (MOPS-Sucrose-Tris):

250 mM Sucrose
50 mM MOPS
1 mM EDTA
Mit Tris auf pH 7,6 eingestellt

- Hexosaminidaseassay – Substrat

4 mM 4-Nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide
gelöst in:
0,043 M Zitronensäure
0,11 M Na_2HPO_4
pH 4,9

- Hexosaminidaseassay – Stop-Lösung

0,8 M Glyzin
Mit NaOH auf pH 10,4 eingestellt

- Proteinaseinhibitor

Complete Mini (Roche); 7x Stock (1 Tablette Complete Mini / 1,5 ml H_2O reinst.)

- Filterpapiere

Membranfilter aus Mischgewebe (Celluloseacetat und Cellulosenitrat, Durchmesser 25 mm), Porengröße 0,45 μm (Hartenstein)

- Filteranlage

1225-Vielfach Filtrationsgerät zur gleichzeitigen Verarbeitung von max. 12 Proben, 2,7 cm^2 Filterfläche pro Filter (Millipore)

2.7.2 Isolierung der granulären Fraktion C

Das Protokoll wurde aus den Veröffentlichungen von Harms und Pisoni et al. (Harms et al., 1980; Pisoni et al., 1987a) modifiziert.

- Zellen ernten und Zellaufschluss

- Die Zellen einer konfluenten T150-Zellkulturflasche wurde auf 10 große Zellkulturplatten (d = 145 mm) verteilt und in je 20 ml Medium ca. 8 Tage kultiviert, so dass die Zellen 2-3 Tage lang konfluent waren.
- Nachdem das Medium abgesaugt worden war, wurden die Zellen in 4 ml kaltem MST pro Platte abgeschabt und in einem 50 ml-Röhrchen vereint.
- Die Zellen wurden bei 582xg (1900 rpm; Megafuge 1.0R, Beckmann) für 10 Minuten abzentrifugiert, einmal in 10 ml MST gewaschen und anschließend in 3 ml kaltem MST (+ 100 µl 7x Complete Mini/3 ml MST) aufgenommen.
- Zum Aufbrechen wurden die Zellen auf Eis mit 15-20 Auf- und Ab-Bewegungen eines Homogenisators (Abbildung 5), dessen Kolben sich mit Hilfe einer Bohrmaschine drehte, gemörsert.



Abbildung 5: Homogenisator mit Kolben

Ab hier wurden alle Schritte bei 4°C und in einer Eppendorf-Zentrifuge (5417c) durchgeführt.

- Differentielle Zentrifugation

- Nach der Homogenisierung wurde ein Teil als „Fraktion A“ abgenommen.
- Der Rest wurde auf zwei 1,5 ml-Reaktionsgefäße verteilt und bei 900xg für 5 Minuten zentrifugiert, so dass sich ganze Zellen und Zelltrümmer absetzten.
- Der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und es folgte eine Zentrifugation bei 3000xg für 15 Minuten.
- Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt und sollte dazu dienen Kerne und schwere Mitochondrien zu entfernen.
- Anschließend wurde der Überstand in neuen Gefäßen für 15 Minuten bei 10.000xg zentrifugiert um die Entfernung der Mitochondrien zu verbessern.
- Schließlich wurden in neuen Gefäßen aus dem Überstand bei 20.000xg (für 15 Minuten) die Lysosomen pelletiert.

- Die Pellets wurden in je 500 µl MST resuspendiert, vereint und 4 Mal in je 1 ml MST gewaschen (10 Minuten, 20.000xg).
- Das resultierende Pellet wurde am Ende je nach Ausbeute in 80-250 µl MST gelöst und als „Fraktion C“ bezeichnet.

- **Proteinbestimmung & Latenzassay**

Zur Bestimmung der Qualität der Präparation wurde zum einen eine Proteinbestimmung mittels BCA-Assay durchgeführt (vgl. Kap. 2.5.1), zum anderen wurde die Latenz mittels eines β -Hexosaminidase-Assays bestimmt. Die Latenz gibt an wie viele Lysosomen noch intakt sind.

- Zur Latenzbestimmung wurden je 10 µl der Fraktion C in zwei Vertiefungen einer 96-Loch Platte gegeben. Eine der Proben wurde mit 2 µl Triton X-100 versetzt um alle Membranen aufzubrechen.
- Zu beide Proben wurden je 50 µl 4 mM 4-Nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide gegeben und das Gemisch für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.
- Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 µl 0,8 M Glyzin/NaOH pH 10,4 abgestoppt. Dabei kam es zu einer gelblichen Farbreaktion, deren Intensität als Absorption bei 400 nm gemessen werden konnte.
- Die Gleichung $(Abs. \text{ mit Triton} - Abs. \text{ ohne Triton}) / Abs. \text{ mit Triton} \times 100$ gab den Prozentsatz intakter Lysosomen an.

2.7.3 Aufnahmeversuche mit granulären Fraktionen C

Für Aufnahmeversuche wurden sowohl die Fraktionen C, als auch eine 200 µM Aminosäurelösung [10 µCi/ml] in MST in 1,5 ml Reaktionsgefäßen in einem Wasserbad vorgewärmt. Anschließend wurde die Fraktion C im Verhältnis 1:1 mit der „heißen“ Aminosäurelösung gemischt und einmal durch Auf- und Ab-Pipettieren gemischt. An jedem Messzeitpunkt wurde ein Teil des Gemischs entnommen und zum Abstoppen in 4 ml eiskalten MST gegeben. Diese Lösung wurde direkt auf einen Membranfilter gegeben. Mithilfe einer Vakuum-Filteranlage wurden die Filter drei Mal mit 2 ml eiskaltem MST gewaschen, anschließend in ein Szintillationsröhrchen überführt, mit 100 µl 2% SDS benetzt und für ca. 30 Minuten bei RT inkubiert. Jeder Filter wurde dann mit 2 ml Szintillationsreagenz (Luma SafeTM) überschichtet, über Nacht bei RT stehen gelassen und am nächsten Tag in einem Flüssigszintillationszähler gemessen.

Bei der Etablierung des Protokolls kristallisierte sich folgende Methode als sehr gut reproduzierbar heraus: Das Pellet der Fraktion C wurde in 250 µl MST gut resuspendiert. Von dieser Lösung wurden 5 µl für die Proteinbestimmung und 20 µl für das Latenz-Assay

eingesetzt. Dabei ergab sich meist eine Proteinkonzentration von 1,5 - 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ und eine Latenz zwischen 70 und 90%. Von der verbleibenden Lösung wurden für den Aufnahmeversuch zwei Mal 80 μl in neue Gefäße überführt und der Rest für eine Western Blot Analyse in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Beim Aufnahmversuch wurden dann die 80 μl der Fraktion C mit 80 μl der doppelt konzentrierten Aufnahmelösung gemischt und an jedem Zeitpunkt wurden 30 μl des Gemischs entnommen. Dies entsprach 15 μl der Fraktion C pro Zeitpunkt.

Dier Inkubation der Filter ü.N. in Szintillationsflüssigkeit führte dazu, dass sich dieser zersetzte und offensichtlich nicht mehr bei der Messung störte. Mit dieser Methode wurden besser reproduzierbare Ergebnisse produziert.

2.8 SSM-basierte Elektrophysiologie am SURFE²R

Zur Testung des Transports kationischer Aminosäuren über lysosmale Membranen kam in dieser Arbeit die Methode der SSM (solid supported membrane)-basierten Elektrophysiologie zum Einsatz. Die Messungen wurden auf dem kommerziellen System SURFE²R One (Surface Electrogenic Event Reader) der Firma Scientific Devices Heidelberg GmbH (Heidelberg) durchgeführt.

2.8.1 Prinzip & Funktionsweise

Die Grundlage für Messungen mit dem SURFE²R bildet die Technologie der festkörperunterstützten Membran, SSM (solid supported membrane). Dabei nutzt man aus, dass Alkanthiole mit Edelmetallen kovalente Bindungen ausbilden, was zur spontanen Entstehung von SAMs (self assembled monolayers) führt. Aus der von der Oberfläche wegweisenden Anordnung der Alkanreste resultiert eine hydrophobe Schicht, auf die in einem nachfolgenden Schritt eine Schicht aus Phospholipiden aufgebracht werden kann. In Abbildung 6A ist der dabei entstehende Hybrid-*bilayer* aus einer Alkanthiolschicht (c) und einer Lipidschicht (d) auf einer Goldgrundlage (b) dargestellt. Die Immobilisierung der SSM auf einem Glassubstrat (a) ermöglicht die Messung von Ladungsverschiebungen in Kombination mit einem schnellen Lösungswechsel (Pintschovius et al., 1999). In Abbildung 6B ist ein mit Gold beschichtetes Glassubstrat dargestellt. Auf der SSM können nun proteinhaltige Membranfragmente, Vesikel oder Proteoliposomen durch Adsorption angelagert werden, wobei es zur kapazitiven Kopplung über die Verbundmembranen kommt (Florin & Gaub, 1993; Seifert et al., 1993).

Aufgrund der isolierenden Eigenschaft von Lipidschichten besitzt eine reine SSM eine vernachlässigbare Leitfähigkeit. Von Transportproteinen generierte Ladungsverschiebungen über die Membran (Abbildung 6C) werden daher als kapazitive Ströme an der SSM detektiert. Durch die kapazitive Kopplung werden stationäre Transportprozesse nicht auch als stationäre Ströme wiedergegeben, sondern von der SSM in transiente Ströme konvertiert, die mit der sogenannten System-Zeitkonstante abfallen, welche die Aufladung der Vesikel beschreibt (Pintschovius et al., 1999).

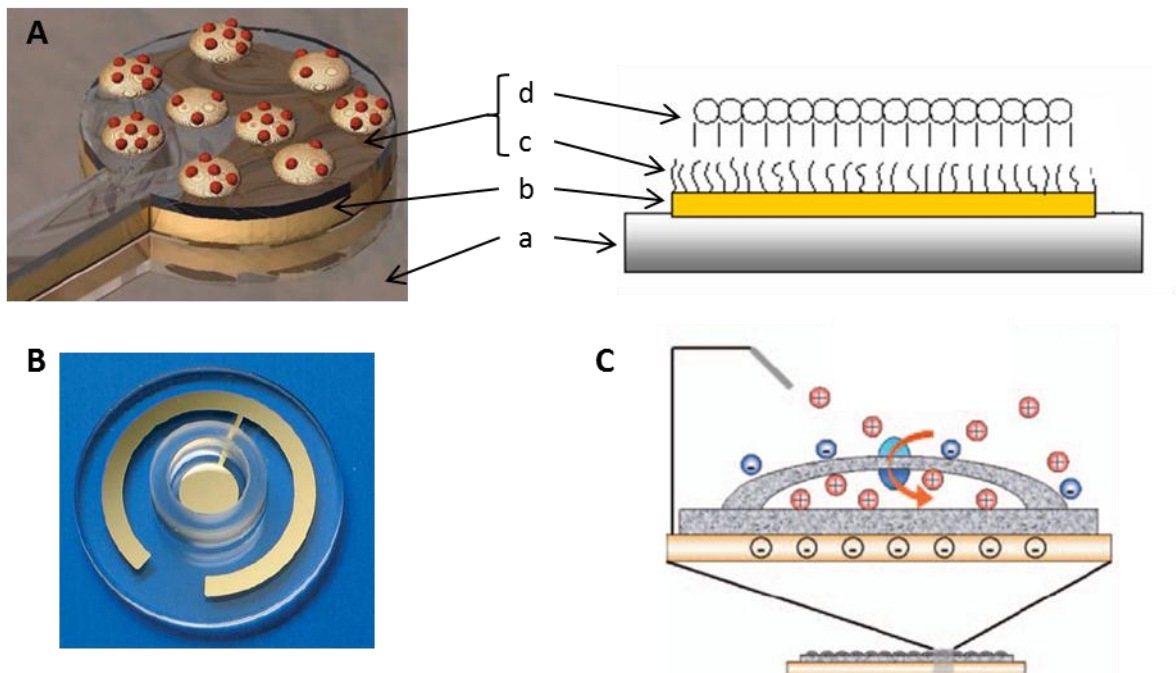


Abbildung 6: Prinzip des SURFE²R

A) Links: Schematische Darstellung von auf dem Sensor angelagerten Membranfragmenten. Die roten Strukturen deuten Transportproteine an. Rechts: Schichtaufbau der SSM. Eine auf einem Glassubstrat (a) immobilisierte Goldschicht (b) wird durch Reaktion mit Alkanthilolen (c) hydrophobisiert (SAM). Durch die Bindung von Phospholipiden (d) entsteht ein Hybrid-bilayer. B) Glassubstrat mit Goldoberfläche. C) Eine selektive, Transporter-vermittelte Verschiebung eines geladenen Substrates durch eine Proteoliposomenmembran führt zu einem kapazitiv veränderten Strom. Bilder aus „A novel electrogenic screening tool for membrane transporter assays“ (2005) und dem SURFE²R-Handbuch

Der SURFE²R One basiert auf der SSM-Technik und bietet einen gewissen Grad an Automatisierung. Das Gerät besteht aus einer zentralen Mess-Einheit, die eine Messküvette mit Biosensor, ein Fluidiksystem sowie einen Messverstärker beinhaltet (Abbildung 7). Zur Automatisierung und Erhöhung des Durchsatzes kommt ein „Autosampler“ zum Einsatz, der die Durchführung von Mess-Serien ermöglicht. Die Steuerung erfolgt über einen PC durch die Software SURFE²R One Control. Neben der automatisierten Puffer-Verwaltung besteht auch die Möglichkeit, mehrere Sensoren vorzubereiten, die bei Bedarf schnell gewechselt werden können.

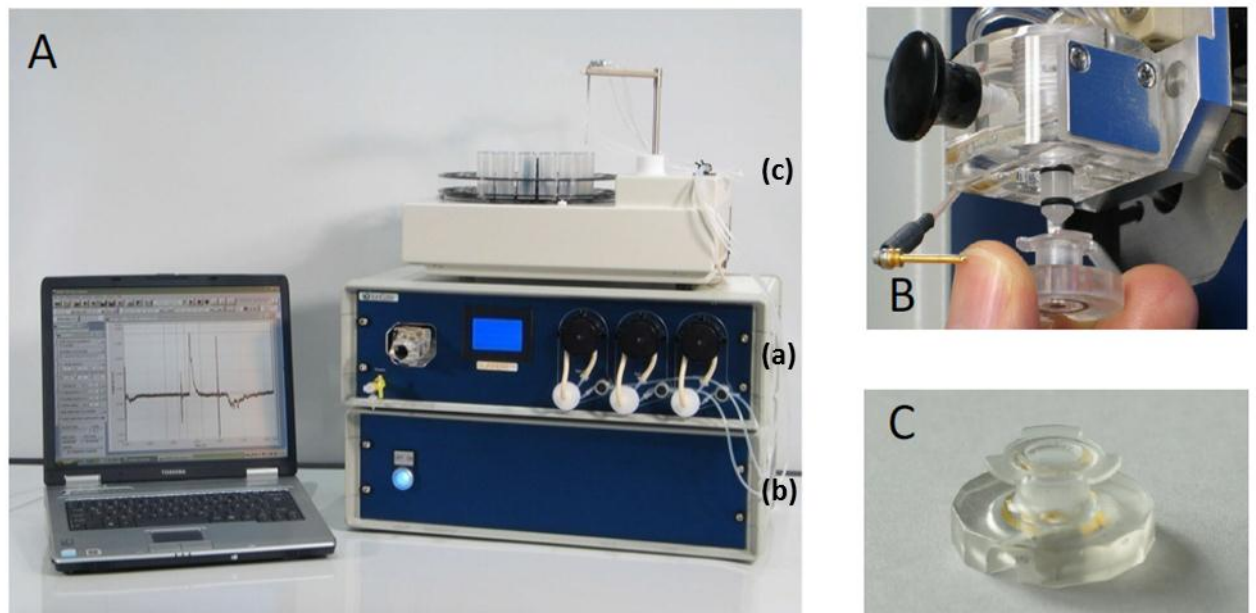


Abbildung 7: SURFER One Messeinrichtung

A) Mess-Einheit (a), Stromversorgung mit Drucküberwachung (b) und Autosampler (c) sind zur Steuerung und Datenausgabe an einem Laptop angeschlossen. B) Die Messküvette wird in den Sensor eingesteckt und über den Kontaktstift mit diesem verbunden. C) Sensor mit Bajonettverschluss. (Iongate SURFE²R One Operator's Manual)

2.8.2 Lösungen

Aufschlusspuffer

250 mM	Sucrose
10 mM	Tris (pH 7,5)
2 mM	DTE
2 mM	PMSF
10% (v/v)	Complete Mini (7x Stock)

Ruhepuffer

140 mM	NaCl
30 mM	HEPES (pH 7,2)
2 mM	MgCl ₂
1 mM	Cholin-Chlorid

Aktivierender Puffer

140 mM	NaCl
30 mM	HEPES (pH 7,2)
2 mM	MgCl ₂
1 mM	Arginin

2.8.3 Isolation von lysosomalen Membranen

- **Zellen ernten und Zellaufschluss**
 - U373MG-EGFP, -SLC7A14.EGFP und -hCAT-2B.EGFP wurden in 175 cm² Schalen 2-3 Tage konfluent kultiviert (5-7 Stk. für ca. 0,4 g Zellmasse).
 - Zum Ernten wurden die Zellen mit 10 ml eiskaltem PBS + 1mM EDTA überschichtet und für 10 Minuten bei 4°C unter leichtem Schwenken inkubiert.
 - Anschließend wurden die Zellen abgekratzt und bei 3000xg für 10 Minuten (4°C) zentrifugiert.
 - Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen zwei Mal mit 10 ml eiskaltem PBS/EDTA gewaschen.
 - Die Zellpellets wurden in 1 ml PBS/EDTA aufgenommen und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß, das zuvor gewogen wurde, erneut zentrifugiert (10 Minuten, 3000xg, 4°C).
 - Das resultierende Zellpellet wurde gewogen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum Aufschluss bei -80°C gelagert.
 - Das gefrorene Zellpellet wurde in 3 ml eiskaltem Aufschlusspuffer aufgetaut und in einem Potter mit 20 Auf- und Ab-Bewegungen aufgebrochen.

- **Sucrosedichtegradient**
 - Die Suspension aus aufgebrochenen Zellen wurde für 10 Minuten bei 800xg (4°C) zentrifugiert, um Zellen und Zell-Reste zu entfernen.
 - Der Überstand wurde abgenommen und erneut bei nun 3000xg (4°C) zentrifugiert, um mehr Trümmer, Kerne und z.T. schwere Mitochondrien zu entfernen.
 - Der Überstand wurde erneut vorsichtig abgenommen, auf 10 ml aufgefüllt und die Membranen für 30 Minuten bei 100.000xg (4°C) pelletieren (Ultrazentrifuge (UZ), Ti 40.1 Rotor)
 - Die Pellets wurden in 500 µl 10 mM TRIS pH 7,5 resuspendiert, durch Zugabe von 1,5 ml 70% Sucrose ((w/v) in 10 mM TRIS pH 7,5) auf ca. 51% Sucrose eingestellt und die Proben (ohne Schaumbildung) gut durchmischt.
 - In einem Zentrifugenröhrchen wurde die Probe mit 3 ml 45%, 3 ml 31% und 3 ml 9% Sucrose ((w/v) in 10 mM TRIS pH 7,5) vorsichtig überschichtet und die Gradienten für 3 Stunden bei 100.000 x g (4°C) zentrifugiert.
 - Die Banden an den Phasengrenzen (9/31, 31/45 und 45/51 % Sucrose) wurden mit einer Pasteurpipette abgenommen und jeweils in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt.
 - Die Proben wurden mit 10 ml Ruhepuffer gemischt und erneut die Membranen bei 100.000 x g (30 Minuten, 4°C) pelletiert.

- Die Pellets wurden in 40 - 100 μ l Ruhepuffer (+ 10% Glycerol, 2 mM DTE, Complete Mini) sehr gut resuspendiert (Schaumbildung vermeiden)
- Aliquots (5 μ l) wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert

2.8.4 Sensorpräparation

Die Sensoren (Scientific Devices Heidelberg GmbH) bestehen beim SURFE²R One aus einem runden Glassubstrat, das mit einer Goldschicht bedampft wurde. Diese Glasplatte ist in ein Kunststoffgehäuse eingeklebt, welches das Gegenstück zum Bajonettverschluss an der Küvette bildet. Die elektrische Kontaktierung des Sensors geschieht über eine Buchse seitlich am Sensor. Vor der Messung mussten die Sensoren in mehreren Schritten vorbereitet werden.

- Thiolierung

Auf den trockenen Goldsensor wurden 50 μ l der vom Hersteller bereitgestellten SensorPrepA-Lösung (Alkanethiol in 2-Propanol) pipettiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur (RT) in einer geschlossenen Petrischale inkubiert. Danach wurde die Lösung vorsichtig ausgeschüttelt, der Sensor dreimal mit destilliertem Wasser gespült und im Anschluss bei RT getrocknet.

- Aufbau der Lipidmembran

Mit der Pipette wurden vorsichtig (ohne direkte Berührung der Sensoroberfläche) 3 μ l der Lipidlösung (SensorPrep B1) auf den Sensor pipettiert. Danach wurde der Sensor mit 50 μ l Ruhepuffer (R), der frisch mit 0,2 mM DTE versetzt wurde, überschichtet und für 15 - 20 Minuten bei RT inkubiert.

- Proteinvorbereitung

Verwendet wurden sowohl Fraktion C-, als auch Fraktion 31/45-Präparationen, die alle in Ruhepuffer (+ 10% Glycerol, 2 mM DTE, Complete Mini) gelöst und bei -80°C gelagert waren. Die Membransuspension wurde schnell aufgetaut und direkt mit Ruhepuffer (+ DTE) im Verhältnis 1:10 verdünnt. Nach der Beschallung der Probe mit einem Ultraschallstab (UP 50H, Dr. Hielscher GmbH, mit einer MS 1 Spitze) mit 10 Pulsen (25 % Leistung, Intervall: 0,5 s) wurde die Probe sofort auf Eis gestellt.

- Probenauftrag und Zentrifugation

Pro Sensor wurden 8 μ l der Membransuspension unter die 50 μ l Ruhepuffer (+ DTE) geschichtet. Im Anschluss wurden die Sensoren für 60 Minuten bei 2500xg (10°C)

zentrifugiert (2800 rpm; Megafuge 1.0R, Beckmann). Nach der Zentrifugation wurden die Sensoren bis zur Messung bei 4°C gelagert.

2.8.5 Messung

Zur Messung wurde ein Protokoll gewählt, bei dem der Sensor zunächst mit Ruhepuffer (1 sek, 200 µl/sek), dann mit aktivierendem Puffer (1 sek, 200 µl/sek) wieder gefolgt von Ruhepuffer (2 sek, 200 µl/sek) überspült wurde. Nach einer 30-sekündigen Ruhepause wurde erneut mit Ruhepuffer gespült (1 sek, 200 µl/sek). Es folgte eine 5-minütige Erholungsphase, bevor die Messung von vorne begann. Nach einer 4-maligen Wiederholung der Messung wurde der nächste Sensor gemessen.

3 Ergebnisse

3.1 Potentielle Kandidaten für System c

Diese Arbeit befasst sich mit der Suche nach lysosomalen Transportern für kationische Aminosäuren (KAS). Ein solcher spielt unter anderem eine wichtige Rolle in der Behandlung der Krankheit Cystinose mit der Substanz Cysteamin. Der therapeutische Effekt von Cysteamin beruht darauf, dass dieses Aminothiolen in Zellen und dort in Lysosomen eindringt und dabei eine Verbindung mit einem der dort akkumulierten Cystin-Moleküle eingeht (vgl. Kapitel 1.2). Das resultierende gemischte Disulfid ähnelt stark der kationischen Aminosäure Lysin und wird wahrscheinlich über ein Transportsystem für KAS aus dem Lysosom heraustransportiert. Pisoni et al. beschrieben in den 1980ern ein solches Transportsystem in humanen Hautfibroblasten und nannte es System c (Pisoni et al., 1985, 1987b).

Eine weitere wichtige Rolle spielt der Transport von KAS aus dem Lysosom bei der Versorgung der endothelialen NO-Synthase (eNOS). Dieses Enzym konvertiert Arginin zu Citrullin und Stickstoffmonoxid (NO). Die in früheren Arbeiten identifizierten Substrat-Quellen der eNOS sind extrazelluläres, frei vorliegendes intrazelluläres, aus Citrullin recyceltes und aus dem Proteinabbau stammendes Arginin (Simon et al., 2003). Gerade in Zellen, denen extrazelluläres Arginin entzogen und die von intrazellulärem Arginin depletiert sind, ist das aus dem Proteinabbau – und zwar insbesondere aus dem Lysosom – stammende Arginin essentiell für die Funktion der eNOS (Karbach et al., 2011).

3.1.1 hCAT-1 und SLC7A14 sind in humanen Haut-Fibroblasten exprimiert

Wir vermuten, dass es sich bei den lysosomalen KAS-Transportern um ein oder mehrere Mitglieder der SLC7-Unterfamilie der humanen kationischen Aminosäuretransporter (hCATs) handeln könnte. Daher wurde bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit gezeigt, dass hCAT-1- und SLC7A14-mRNA in humanen Hautfibroblasten exprimiert werden. Dies ist der Zelltyp, in dem das lysosomale System c identifiziert wurde. Zu dieser Zeit standen uns je 2 Gesamt-RNA-Präparationen von gesunden und an Cystinose erkrankten Spendern zur Verfügung. Diese 4 untersuchten RNA-Präparationen stammten aus dem Labor von B. Gasnier (Paris). Um dieses Ergebnis zu verifizieren und um zu untersuchen ob sich die Expressionen möglicherweise in kranken und gesunden Spendern unterscheiden, wurden Hautfibroblasten von weiteren 5 Spendern (zwei gesunde und drei erkrankte, aus den Laboren von M. Wilmer/Niederlande und E. Levtschenko/Belgien) auf

die Expression der hCAT-Familienmitglieder untersucht, so dass nun insgesamt Proben von 9 Spendern analysiert wurden.

Mit der aus den Zellen isolierten Gesamt-RNA wurde mittels den in Kapitel 2.2.7 beschriebenen Oligonukleotiden und TaqMan-Sonden eine qRT-PCR durchgeführt. Die für die Transporter-mRNAs ermittelten Werte wurden anschließend auf die für die mRNA des Haushaltsgens GAPDH ermittelten Werte bezogen, so dass die Expression von GAPDH dem Wert 1 entsprach. Die humanen Hautfibroblasten wiesen für hCAT-1 das $0,61 \times 10^{-2}$ -fache der GAPDH-Expression auf. Die SLC7A14-Expression lag beim $0,25 \times 10^{-2}$ -fachen der GAPDH-Expression (Abbildung 8A). Damit liegt die Expression von hCAT-1 und SLC7A14 in einem nennenswerten Bereich. hCAT-2A-mRNA konnte gar nicht nachgewiesen werden. Für hCAT-2B und hCAT-3 kann eine nennenswerte Expression aufgrund der durchschnittlichen delta-CT Werte zur GAPDH-mRNA von 15,5 bzw. 14 ausgeschlossen werden. Im direkten Vergleich der einzelnen Zelllinien miteinander, war die Expression von hCAT-1 in allen Zelllinien ähnlich. Die Expression von SLC7A14 variierte zwar sehr stark, es konnte aber kein Unterschied zwischen gesunden und cystinotischen Zellen festgestellt werden (Abbildung 8B).

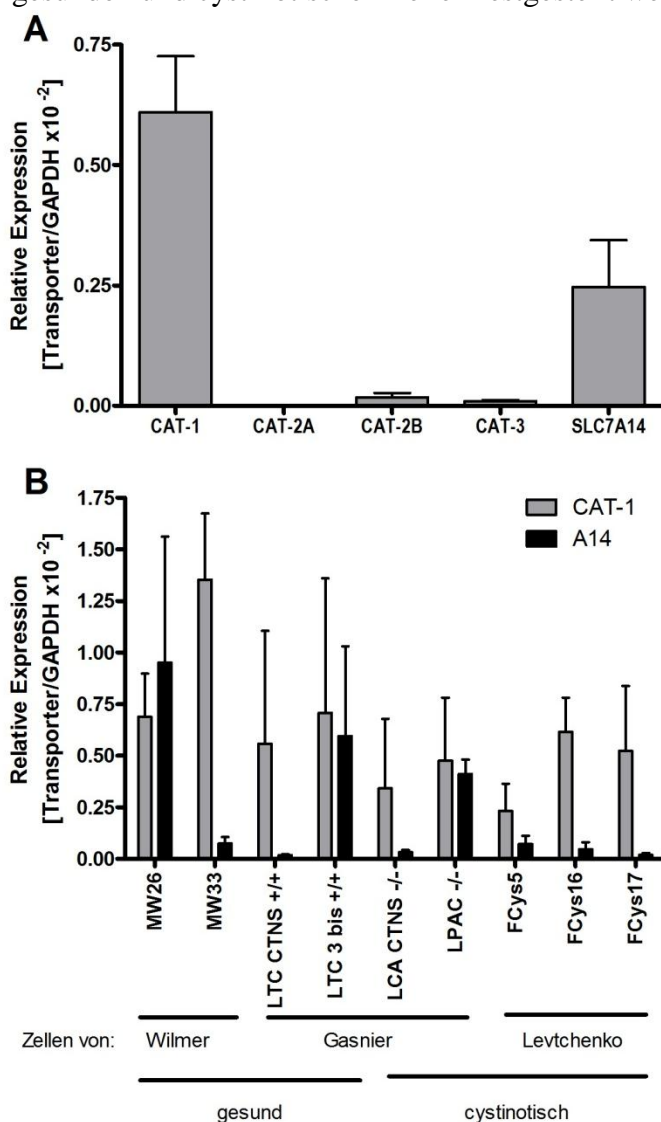


Abbildung 8: Analyse von mRNA humaner Hautfibroblasten auf Expression bestimmter hCAT-Familienmitglieder

Gezeigt sind die relativen Expressionsstärken der verschiedenen hCAT-Isoformen, sowie des SLC7A14 bezogen auf die Expression der GAPDH mRNA. Nach den RT-PCR Reaktionen wurde zur Normalisierung der Daten der CT-Wert des Haushaltsgens (GAPDH) von dem des entsprechenden Transporters subtrahiert (Δ CT). Die relative Expression wurde anschließend anhand der Formel $2^{-(1 \times \Delta$ CT)} berechnet, so dass die Expression der GAPDH als 1 definiert ist. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM. A zeigt die Werte aller Proben (N=9). In B sind die Ergebnisse bezüglich der CAT-1 und SLC7A14-Expression nach den einzelnen Zelllinien aufgeschlüsselt (N=2). Die Namen der Zelllinien sind von den Ursprungslaboren vorgegeben; diese waren die Labore von Martijn Wilmer (Radboud University Nijmegen Medical Centre, Niederlande), Elena Levtchenko (Gasthuisberg Hospital Leuven, Belgien) und Bruno Gasnier (Université Paris Descartes, Frankreich)

In einer Western-Blot-Analyse konnte anschließend exemplarisch in der Zelllinie FCys5 die hCAT-1 Expression auch auf Proteinebene verifiziert werden (Abbildung 9). Das glykosylierte hCAT-1-Protein war in einer breiten Bande oberhalb der 72 kDa-Marker-Bande zu erkennen, während das deglykosylierte Protein in einer distinkten Bande bei 55 kDa detektiert wurde. Ein SLC7A14-Antikörper war zwar zum Zeitpunkt der Analyse nicht verfügbar, die Expression des SLC7A14-Proteins in diesen Zellen konnte aber im Rahmen der Generierung dieses Antikörpers nachgewiesen werden (vgl. Kapitel 3.7.2). hCAT-1 und SLC7A14 sind demnach die einzigen, in nennenswerten Mengen exprimierten Vertreter der hCAT-Familie in humanen Hautfibroblasten. Da System c in diesen Zellen beschrieben wurde, kommen diese beiden SLC7-Mitglieder als Kandidaten für System c in Frage.

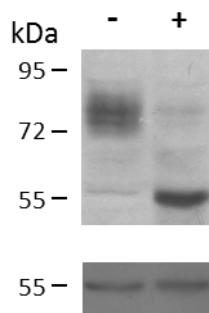


Abbildung 9: Nachweis des hCAT-1 in humanen Haut-Fibroblasten auf Protein-Ebene

Lysate der humanen Hautfibroblasten Zelllinie FCys5 wurden nicht (-) oder für 45 Minuten (+) mit dem Enzym Peptide-N-Glykosidase F (Roche) behandelt, anschließend über eine SDS-PAGE (Trenngel 7,5% Acrylamid) aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit hCAT-1- (oben) sowie β -Tubulin-Antikörpern (Ladekontrolle, unten) behandelt.

3.1.2 SLC7- Familienmitglieder sind in Lysosomen lokalisiert

Die Lokalisation der SLC7-Familienmitglieder wurde mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie überprüft. In vorangegangenen Arbeiten wurde gezeigt, dass hCAT-1- sowie SLC7A4-Fusionsproteine mit EGFP (enhanced green fluorescent protein) bei einer Überexpression in U373MG Glioblastomzellen zusätzlich zu ihrer Lokalisation in der Plasmamembran auch in intrazellulären Vesikeln lokalisiert sind (Rotmann et al., 2004; Wolf et al., 2002). Diese Beobachtung konnte auch für alle anderen Mitglieder der hCAT-Unterfamilie gemacht werden, während EGFP alleine im Cytoplasma zu finden war (A. Rotmann, unveröffentlichte Beobachtung). In dieser Arbeit wurde diese intrazelluläre Lokalisation der System-c-Kandidaten hCAT-1.EGFP (Abbildung 10) und SLC7A14.EGFP (Abbildung 11) genauer untersucht. Dazu wurden U373MG, die diese Fusionsproteine überexprimieren mit Farbstoffen angefärbt, die spezifische Organellen anfärben. Während hCAT-1.EGFP zusätzlich zur Plasmamembran auch in intrazellulären Vesikeln detektiert wurde, war für den SLC7A14.EGFP ausschließlich eine Lokalisation in

intrazellulären Granula detektierbar. Sowohl hCAT-1.EGFP, also auch SLC7A14.EGFP co-lokalisierte intrazellulär mit dem lysosomalen Marker LysoTracker®. Färbungen mit den Markern für Mitochondrien (MitoTracker®) sowie das endoplasmatische Retikulum (ER-Tracker™) zeigten dagegen keine Co-Lokalisation mit den EGFP-Fusionsproteinen.

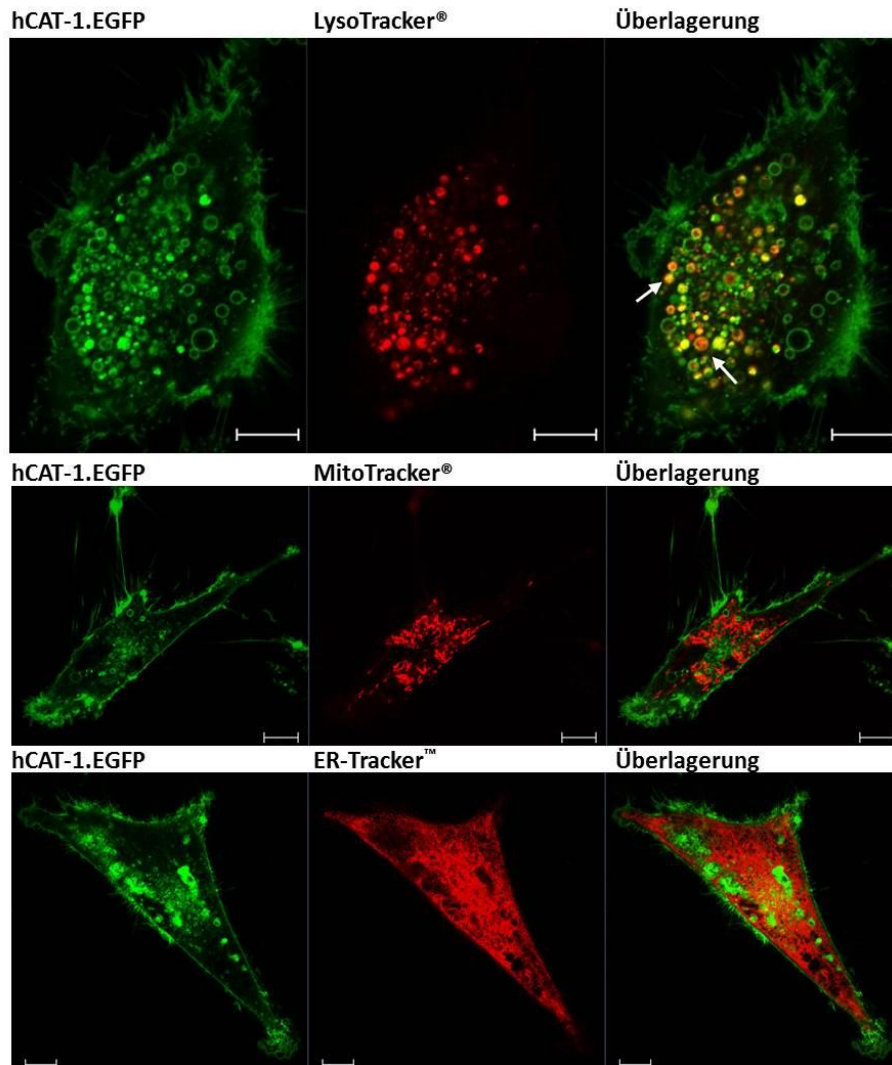


Abbildung 10: Färbungen von U373MG-Glioblastomzellen die ein hCAT-1.EGFP-Fusionsprotein überexprimieren (U373MG-hCAT-1.EGFP) mit Markern für verschiedene Organellen

U373MG-Zellen, die das Transportprotein hCAT-1 in Fusion mit EGFP überexprimierten, wurden in 3cm-Glasboden-Schälchen ausgesät, am nächsten Tag mit dem Fluoreszenzfarbstoff LysoTracker® (oben, 50 nM in PBS+CM, 2 Stunden), MitoTracker® (mitte, 1 µM in PBS+CM, 30 Minuten) oder ER-Tracker™ (unten, 1 µM in PBS+CM, 20 Minuten) gefärbt (alle von Molecular Probes, Invitrogen) und mit Hilfe eines Laser-Scanning Mikroskops fotografiert (Maßstab repräsentiert 10 µm).

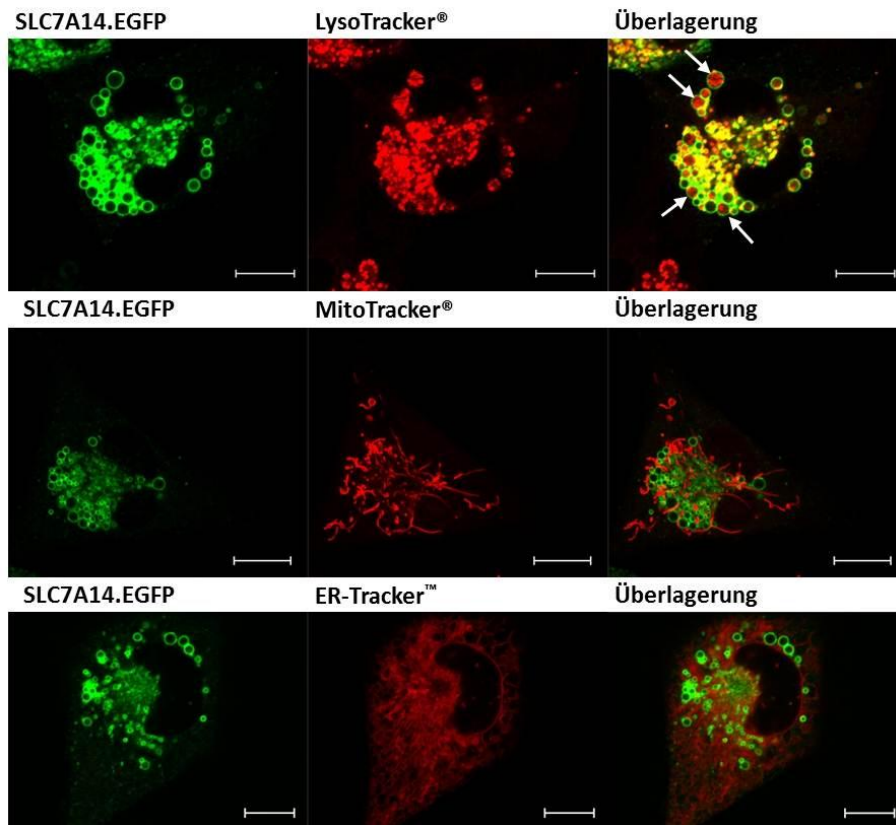


Abbildung 11: Färbungen von U373MG-Glioblastomzellen die ein SLC7A14.EGFP-Fusionsprotein überexprimieren (U373MG-A14.EGFP) mit Markern für verschiedene Organellen

U373MG-Zellen, die das Waisenprotein SLC7A14 in Fusion mit EGFP überexprimierten, wurden in 3cm-Glasboden-Schälchen ausgesät, am nächsten Tag mit dem Fluoreszenzfarbstoff LysoTracker® (oben, 50 nM in PBS+CM, 2 Stunden), MitoTracker® (mitte, 1 µM in Medium, 30 Minuten) oder ER-Tracker™ (unten, 1 µM in PBS+CM, 20 Minuten) gefärbt (alle von Molecular Probes, Invitrogen) und mit Hilfe eines Laser-Scanning Mikroskops fotografiert (Maßstab repräsentiert 10 µm).

Als Kontrolle für die Spezifität der LysoTracker®-Färbung wurden auch U373MG mit diesem Marker angefärbt, die das lysosomale Protein LAMP-1 (lysosome associated membrane protein 1) als EGFP-Fusionsprotein überexprimieren (Abbildung 12). LAMP-1.EGFP zeigte, wie SLC7A14.EGFP auch, eine ausschließlich intrazelluläre Lokalisation in Vesikeln, die von LysoTracker® angefärbt wurden. Von einer lysosomalen Lokalisation des SLC7A14.EGFP und des hCAT-1.EGFP kann also sicher ausgegangen werden.

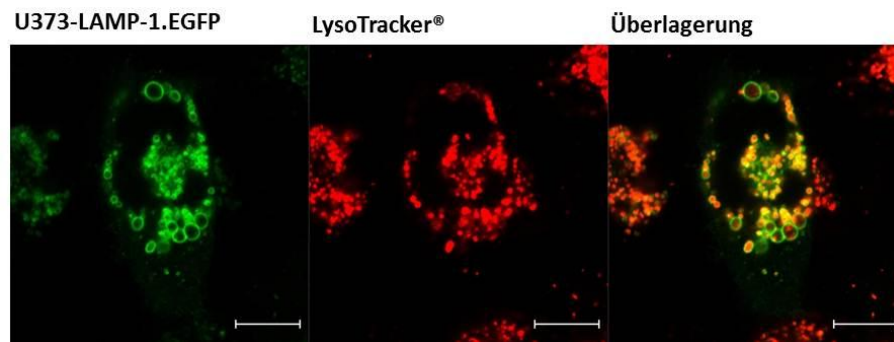


Abbildung 12: Färbungen von U373MG-Glioblastomzellen die ein LAMP-1.EGFP-Fusionsprotein überexprimieren (U373MG-LAMP-1.EGFP) mit einem Marker für Lysosomen

U373MG-Zellen, die ein Fusionsprotein aus dem lysosomalen Protein LAMP-1 und EGFP überexprimieren wurden in 3cm-Glasboden-Schälchen ausgesät, am nächsten Tag mit dem Fluoreszenzfarbstoff LysoTracker® (50 nM in PBS+CM, 2 Stunden; Molecular Probes, Invitrogen), gefärbt und mit Hilfe eines Laser-Scanning Mikroskops fotografiert (Maßstab repräsentiert 10 µm).

3.1.3 Mitglieder der SLC7 Familie reichern sich in der granulären Fraktion C an

Die mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie festgestellte lysosomale Lokalisation von hCAT-1.EGFP und SLC7A14.EGFP konnte zusätzlich bestätigt werden, indem diese Organellen isoliert und untersucht wurden. Mittels differentieller Zentrifugation kann aus humanen Zellen eine granuläre, Lysosomen-haltige, Fraktion isoliert werden. Harms et al. beschrieben die Isolation dieser sogenannten Fraktion C (Harms et al., 1980). Da Pisoni und Kollegen die Versuche zur Charakterisierung des lysosomalen Systems c zum Teil an Fraktion-C-Proben durchgeführt hatten (Pisoni et al., 1987b), wurde auch in dieser Arbeit mit dieser Fraktion gearbeitet. In einem modifizierten Isolationsprotokoll wurden die Fraktion C aus humanen Zellen isoliert, indem nicht-lysosomale Bestandteile wie Zelltrümmer, Kerne, endoplasmatisches Retikulum und ein Großteil der Mitochondrien sukzessive bei Geschwindigkeiten zwischen 900 und 10.000xg abzentrifugiert und anschließend die Lysosomen bei 20.000xg pelletiert wurden (vgl. Kapitel 2.7.2). Leichtere Endosomen, Plasmamembranfragmente und cytoplasmatische Proteine sollten im Überstand verbleiben. Das in Pufferlösung aufgenommene Pellet stellte nun die Fraktion C dar. Ein Teil der als Ausgangsmaterial dienenden homogenisierten Zellen (Fraktion A) wurde stets zurückbehalten.

Aus verschiedenen stabil transfizierten U373MG Zelllinien wurde die Fraktion C isoliert. In einem Western Blot wurden jeweils gleiche Proteinmengen der Fraktionen A und C analysiert. Dabei wurde gezeigt, dass sich die EGFP-Fusionsproteine SLC7A14.EGFP, hCAT-1.EGFP und hCAT-2B.EGFP zusammen mit den lysosomalen Proteinen LAMP-1 und/oder Cathepsin D in der Fraktion C anreichern (Abbildung 13). Wurde EGFP alleine überexprimiert, war der Gehalt dieses cytoplasmatisch lokalisierten Proteins in der Fraktion C sehr viel niedriger als in der Fraktion A.

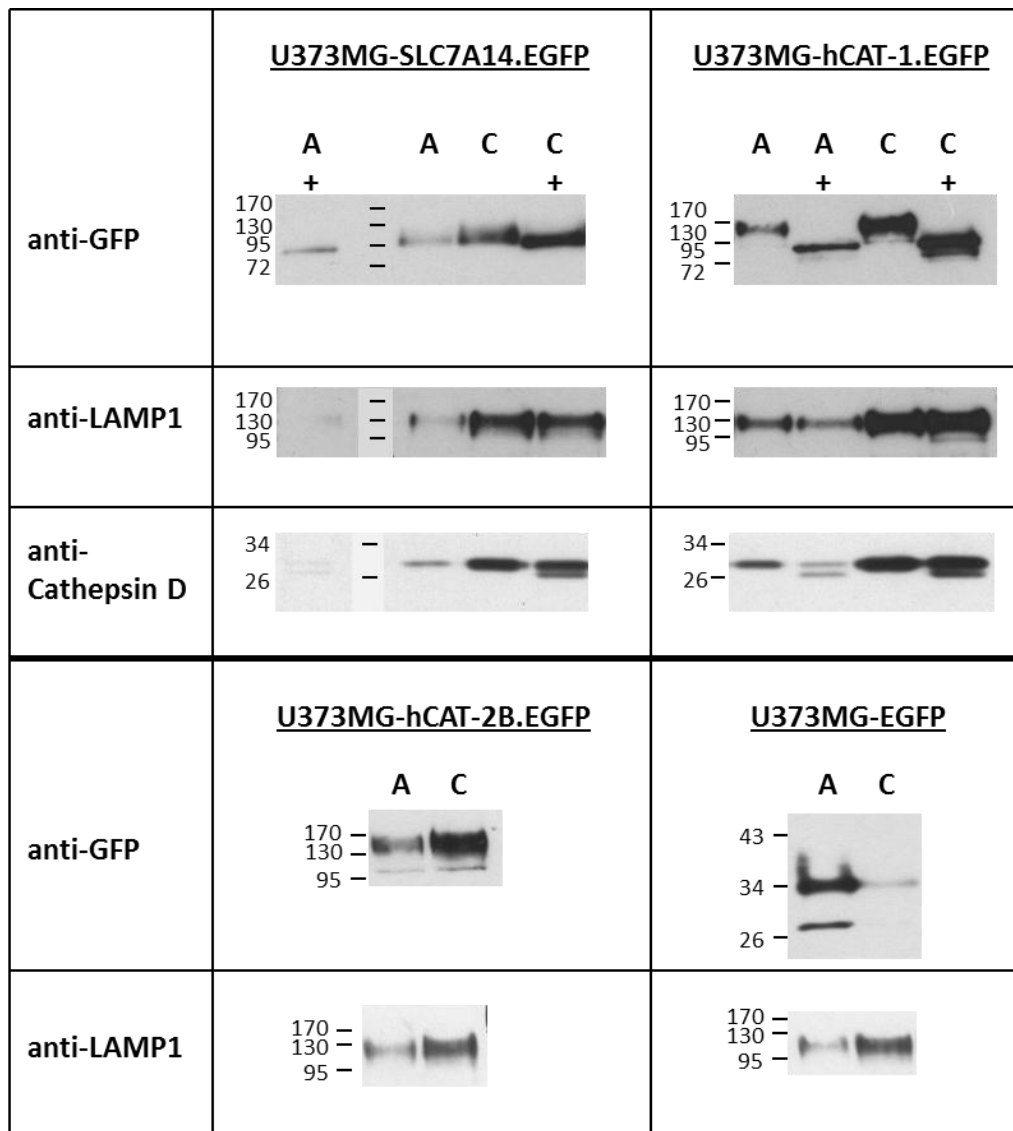


Abbildung 13: Analyse der Fraktionen A und C aus U373MG Zellen, die CAT-Familienmitglieder stabil überexprimieren

Von den Fraktionen A und C, die aus verschiedenen stabil transfizierten Zelllinien isoliert wurden, wurden Lysate in RIPA-Puffer angefertigt, in denen jeweils die gleiche Proteinmengen enthalten waren (je nach Western Blot 15 - 30 µg Protein pro Spur). Nach 1 Stunde auf einem Schüttler bei 4°C wurden die Lysate abzentrifugiert (20 Minuten, 14.000 rpm, 4°C), ggf. eine 45 minütige N-Glykosidasebehandlung durchgeführt (+) und die Überstände mit 2x Probenpuffer versetzt, in einer 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit den angegebenen Antikörpern behandelt. Hier wurde ein 12,5%iges Trenngel gewählt, da mit EGFP und Cathepsin D nur 27 kDa schwere Proteine analysiert werden sollten.

Da es sich bei der lysosomalen Lokalisation in Überexpressionsmodellen auch um ein Artefakt handeln könnte, war es wichtig zusätzlich die endogene Lokalisation der Proteine zu untersuchen. Zum Zeitpunkt der Analysen war kein SLC7A14-Antikörper verfügbar. Daher wurde zunächst nur der hCAT-1-Gehalt in Fraktion-C-Proben aus nicht transfizierten, nativen U373MG- und endothelialen EA.hy926-Zellen untersucht. In den Proben aus beiden Zelllinien wurde eine Anreicherung des endogenen hCAT-1 zusammen

mit lysosomalen Proteinen in Fraktion-C-Proben nachgewiesen (Abbildung 14). Bei diesen handelte es sich zum einen um das lysosomale Membranprotein LAMP-1, zum anderen um das intra-lysosomale Enzym Cathepsin D. Diese Co-Anreicherung belegt eine lysosomale Lokalisation auch des endogenen hCAT-1. Die Anreicherung von Cathepsin D belegt außerdem das Vorhandensein intakter Lysosomen in der Fraktion C. Später konnte auch für den endogenen SLC7A14 mit Hilfe des in dieser Arbeit produzierten Antikörpers die Anreicherung in der Fraktion C aus humanen Hautfibroblasten gezeigt werden (vgl. Kapitel 3.8).

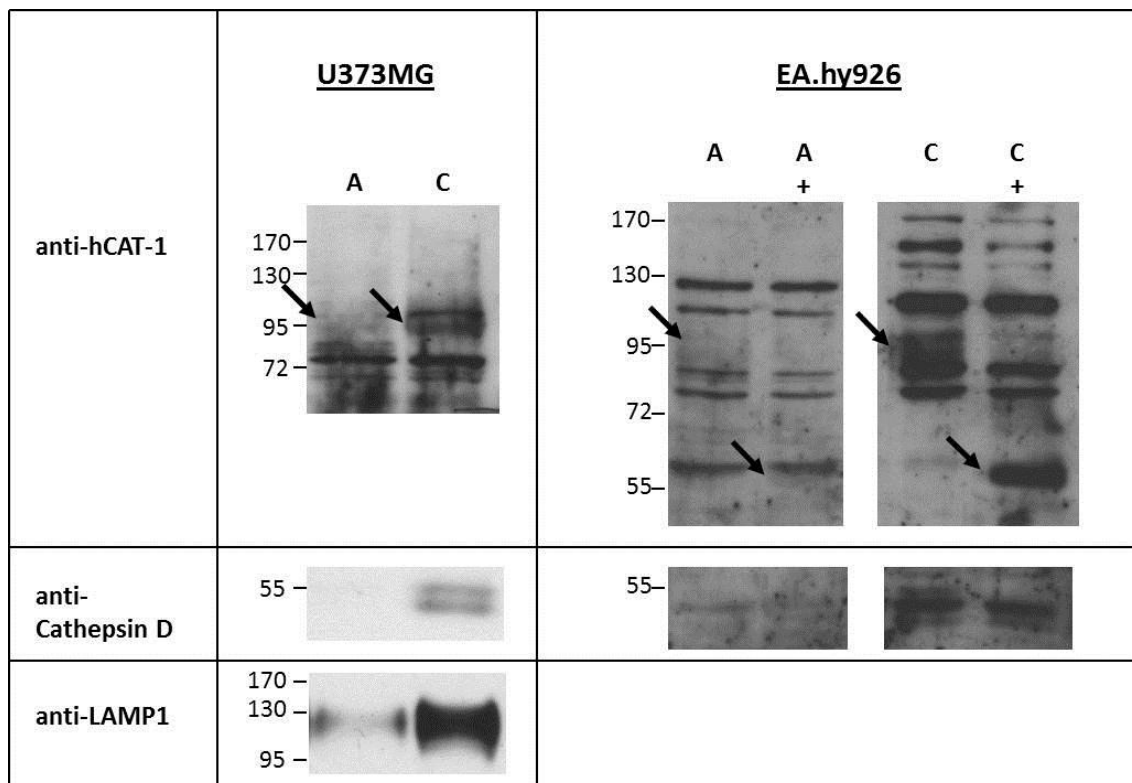


Abbildung 14: Analyse der Anreicherung des endogenen hCAT-1-Proteins in den Fraktionen C aus U373MG Glioblastom- und EA.hy926 Endothelzellen

Fractionen A und C aus verschiedenen Zelllinien (U373MG: 30 µg/Spur, EA.hy926: 10 µg/Spur) wurden wie in Abbildung 13 lysiert, ggf. mit N-Glykosidase behandelt (+), in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit den angegebenen Antikörpern behandelt.

3.1.4 SLC7A14 zeigt eine marginale Oberflächenexpression in verschiedenen Expressionssystemen

Als zusätzliche Kontrolle der scheinbar ausschließlich intrazellulären Lokalisation von SLC7A14 wurde die Technik des Biotinylierens von Oberflächenproteinen angewendet (vgl. Kapitel 2.5.3). Dabei wurden zuvor in intakten Zellen an der Oberfläche mit Biotin markierte Proteine, aus Zelllysaten isoliert und mittels Western-Blot analysiert. Bei der Untersuchung der Oberflächen-expression verschiedener SLC7-EGFP-Fusionsproteine in U373MG Glioblastomzellen wurde als zusätzliche Kontrolle auch Zellen untersucht, die LAMP-1.EGFP überexprimieren. Von LAMP-1 ist bekannt, dass es von seinem Synthesort, dem sogenannten *trans*-Golgi Netzwerk, einen direkten und einen indirekten Weg ins Lysosom nutzt (Janvier & Bonifacino, 2005). Beim direkten Weg verbleibt das Protein ausschließlich intrazellulär, während es beim indirekten Weg zunächst in die Plasmamembran transportiert wird und über Endocytose in die lysosomale Membran gelangt. Durch diese beim indirekten Weg vorkommende kurzfristige Plasmamembran-Lokalisation sind stets kleine Mengen (0,2 - 3%) des gesamten LAMP-1 in der Plasmamembran detektierbar. Auch für SLC7A14.EGFP wurde ein marginales Signal in der Plasmamembran von U373MG-Zellen detektiert (Abbildung 15). Die Stärke des Signals für SLC7A14.EGFP in der Oberflächenfraktion im Verhältnis zum Gesamtprotein lag in einem ähnlichen Bereich wie das des LAMP-1.EGFP, war aber erheblich niedriger als das Plasmamembran-Signal des hCAT-1.EGFP. Bei Zellen, die EGFP alleine überexprimierten konnte mit dem GFP-Antikörper kein Signal in der Fraktion der Oberflächenproteine detektiert werden. Dies diente zusätzlich zum Nachweis von β -Tubulin als Kontrolle der erfolgreichen Aufreinigung der Oberflächenproteine.

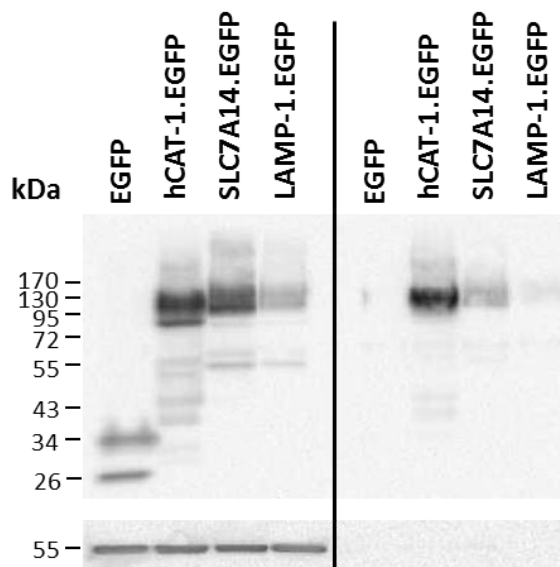


Abbildung 15: Oberflächenexpression von Mitgliedern der SLC7-Familie in humanen U373MG Zellen

In humanen U373MG Glioblastomzellen, die die jeweils angezeigten Proteine überexprimierten, wurden Proteine an der Zelloberfläche biotinyliert. Nach der Lyse wurden Volllysate (je 20 μ g Protein aufgetragen; linke Seite) und Oberflächenproteine, die mit Hilfe von Avidin-beschichteten Kügelchen aufgereinigt worden waren (je 200 μ g Protein eingesetzt; rechte Seite), über eine SDS-PAGE (Trenngel 12,5% Acrylamid) aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Fusionsproteine wurden mit Hilfe eines GFP-Antikörpers detektiert (oberes Bild). Der Nachweis von β -Tubulin diente als Ladekontrolle (unten links) und als Kontrolle des erfolgreichen Entfernens der intrazellulären Proteine (unten rechts). Gezeigt ist ein repräsentativer Western Blot.

Zum Ausschluss von Einflüssen des Expressionssystems auf die Lokalisation der Proteine wurden auch Oozyten von *Xenopus laevis* als Expressionssystem genutzt. Diese wurden mit cRNA der entsprechenden Proteine injiziert und nach einer 3-tägigen Expression ebenfalls auf die Oberflächenexpression der Proteine untersucht. Als Positiv-Kontrolle wurde hier statt hCAT-1.EGFP ein EGFP-Fusionsprotein des hCAT-2A mitgeführt. hCAT-2A ist ebenso wie hCAT-1 ein Plasmamembran-Transporter für KAS und weist eine ähnliche Oberflächenexpression wie hCAT-1 auf. Für hCAT-2A.EGFP konnte ein deutliches Signal in der biotinylierten Fraktion detektiert werden (Abbildung 16). Das sehr viel schwächere, nur nach längerer Belichtungszeit erkennbare Signal des SLC7A14.EGFP deutete auf ein marginales Vorkommen in der Membran hin. Das cytoplasmatisch lokalisierte EGFP war nicht in der Oberflächenfraktion zu detektieren. Zusätzlich zu den Kontrollen mit β -Tubulin bewies dies das erfolgreiche Entfernen aller intrazellulären Proteine aus der Fraktion der Oberflächenproteine. Das β -Tubulin-Signal in den Volllysaten diente als Ladekontrolle.

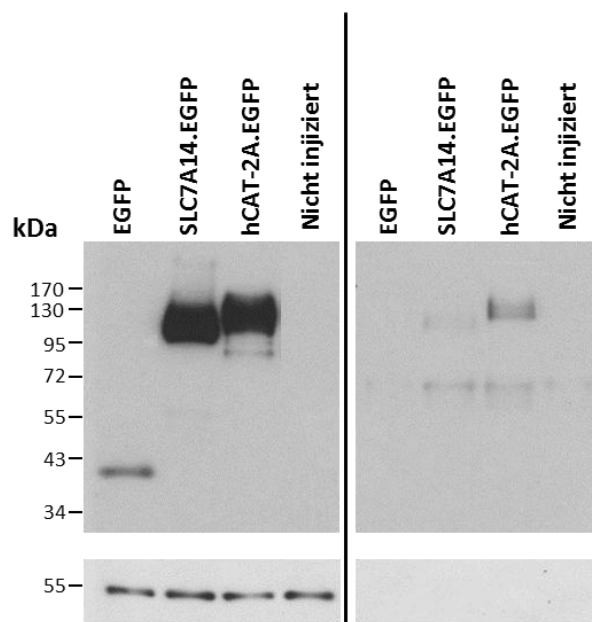


Abbildung 16: Oberflächenexpression von Mitgliedern der SLC7-Familie in *Xenopus laevis*-Oozyten

Proteine von *X. laevis*-Oozyten wurden 3 Tage nach der Injektion der angegebenen cRNA an der Zelloberfläche biotinyliert. Nach der Lyse wurden Volllysate (Menge entsprach 0,5 Oozyten; linke Seite) und Oberflächenproteine (Menge entsprach 7,5 Oozyten; rechte Seite), die mit Hilfe von Avidin-beschichteten Kügelchen aufgereinigt worden waren, über eine SDS-PAGE (Trenngel 10% Acrylamid) aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem GFP-Antikörper behandelt (oberes Bild). β -Tubulin diente als Ladekontrolle (unten links) und als Kontrolle des erfolgreichen Entfernens der intrazellulären Proteine (unten rechts).

SLC7A14.EGFP kommt also unabhängig vom Expressionssystem marginal in der Plasmamembran vor. In U373-Glioblastomzellen lag die detektierte Menge von SLC7A14 dabei in einem ähnlichen Bereich, wie es für LAMP-1 beschrieben und auch hier gezeigt wurde. Dies weist darauf hin, dass SLC7A14 kurzzeitig in die Plasmamembran lokalisiert wird, um dann über Endocytose in die Lysosomen verbracht zu werden.

3.1.5 SLC7A14 vermittelt keinen Arginin-Transport über die Plasmamembran von U373MG-Zellen

Da SLC7A14.EGFP als möglicher kationischer Aminosäuretransporter in Biotinylierungs-Versuchen zu einem sehr kleinen Teil in der Plasmamembran detektiert werden konnte, wurde getestet, ob die Menge des Proteins ausreicht um Transport des Modellsubstrats Arginin zu vermitteln. Dazu wurde die Aufnahme von 0,1 (Abbildung 17A) und 1 mM [³H]Arginin (Abbildung 17B) in U373MG-Zellen, die hCAT-1.EGFP, SLC7A14.EGFP oder EGFP stabil überexprimieren, bei pH 5 und 7,5 gemessen. In den U373MG-SLC7A14.EGFP-Zellen kam es im Vergleich zu den EGFP-Kontrollzellen zu keiner erhöhten Arginin-Aufnahme, unabhängig von der eingesetzten Arginin-Menge und dem pH-Wert. Die U373MG-hCAT-1.EGFP-Zellen zeigten dagegen wie erwartet eine erhöhte, pH-unabhängige Arginin-Aufnahme. SLC7A14.EGFP vermittelt also keinen Arginin-Transport über die Plasmamembran von U373MG-Zellen. Ob der Grund dafür die mangelhafte Plasmamembran-Expression ist oder Arginin kein Substrat für SLC7A14 darstellt, bleibt offen.

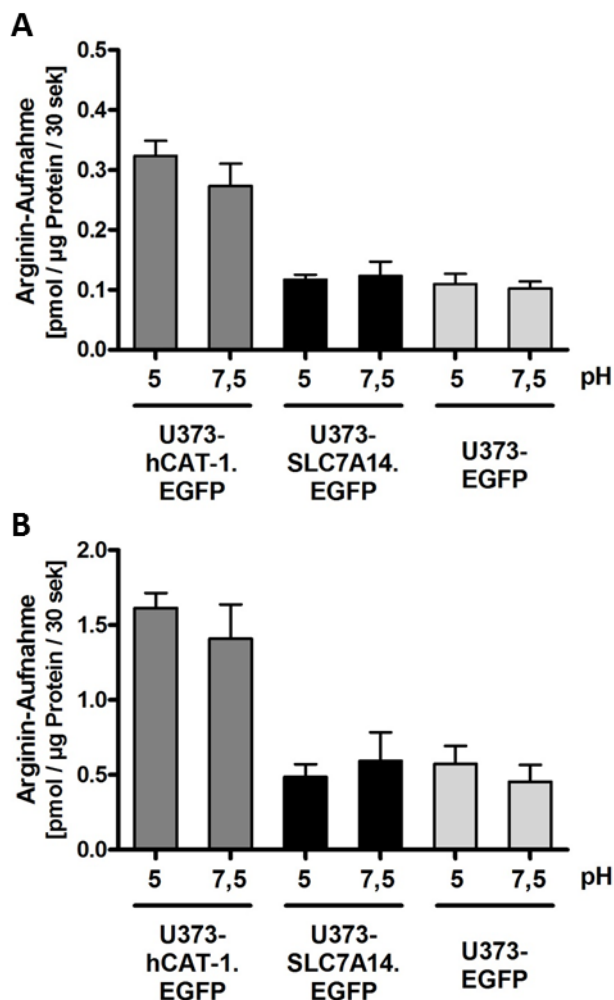


Abbildung 17: Arginin-Aufnahme in U373MG-Zellen

Aufnahme von 0,1 mM (A) bzw. 1 mM [³H]Arginin [10 µCi/ml] (B) bei pH 5 und 7,5 in U373MG-Zellen die hCAT-1.EGFP, SLC7A14.EGFP oder EGFP überexprimierten. Gemessen wurden initiale Transportraten im linearen Bereich. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM (N=8).

3.2 Eine Chimäre aus der „funktionellen Domäne“ des SLC7A14 im Rückgrat des hCAT-2 transportiert kationische Aminosäuren in *X. laevis*-Oozyten

Nachdem in humanen Zellen gezeigt wurde, dass die marginale Oberflächenexpression des SLC7A14 keinen Arginin-Transport vermittelt, wurde zusätzlich das Expressionssystem der *X. laevis*-Oozyten genutzt um dieses Ergebnis zu verifizieren. Aufgrund eines besseren Verhältnisses zwischen endogenem Transport der Oozyten und Transport durch überexprimierte hCATs, ist dieses Expressionssystem besser dafür geeignet auch geringe Transportraten zu detektieren. In einem Transportversuch an *X. laevis*-Oozyten, die mit cRNA für SLC7A14.EGFP, hCAT-1 (ohne Fusion an EGFP), hCAT-2A.EGFP oder nur EGFP injiziert worden waren, wurde drei Tage nach Injektion die Aufnahme von 0,1 mM [³H]Arginin bei pH 7,5 gemessen. SLC7A14.EGFP-exprimierende Oozyten zeigten mit $5 \pm 0,2$ pmol/Oozyte/h keinen im Vergleich zu EGFP-exprimierenden Kontroll-Oozyten ($4 \pm 0,3$ pmol/Oozyte/h) erhöhten Arginin-Transport (Abbildung 18). hCAT-1- (778 ± 85 pmol/Oozyte/h) sowie hCAT-2A.EGFP-exprimierende Oozyten (187 ± 29 pmol/Oozyte/h) zeigten wie erwartet hohen Arginin-Transport. SLC7A14.EGFP vermittelt also auch in Oozyten keinen Arginin-Transport über die Plasmamembran.

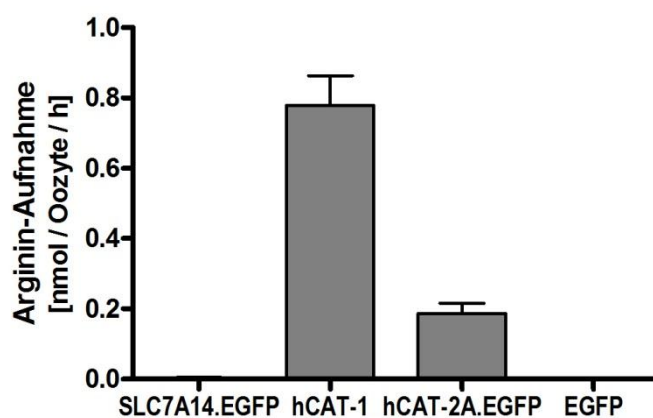


Abbildung 18: Arginin-Aufnahme in *X. laevis*-Oozyten

Aufnahme von 0,1 mM [³H]Arginin [10 μ Ci/ml] bei pH 7,5 in *X. laevis*- Oozyten, die die angezeigten Transporter bzw. EGFP überexprimierten. Gemessen wurden initiale Transportraten im linearen Bereich. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM (N=6-8).

Versuche SLC7A14 durch die Mutation verschiedener als lysosomale Sortiermotive vorhergesagter Sequenzen möglichst vollständig in der Plasmamembran zu lokalisieren waren bisher leider nicht erfolgreich. Eine solche Lokalisation hätte es ermöglicht Transportstudien an ganzen Zellen durchführen. Daher wurde im Rahmen meiner Diplomarbeit (2009) eine Chimäre angefertigt, die die sog. „funktionelle Domäne“ des

SLC7A14 im Rückgrat des hCAT-2 trägt. Von dieser „funktionellen Domäne“ ist bekannt, dass sie die scheinbare Substrataffinität, sowie die Trans-Stimulierbarkeit vermittelt. Im Laufe der Diplomarbeit konnte gezeigt werden, dass diese als hCAT-2/A14_BK bezeichnete Chimäre pH-abhängigen, trans-stimulierten Arginin-Transport mit niedriger Affinität vermittelt (vgl. Kapitel 1.5). Diese Daten waren erste konkrete Hinweise darauf, dass das intrazellulär lokalisierte Waisen-Protein SLC7A14 einen lysosomalen Transporter für kationische Aminosäuren darstellen könnte. Um die Erkenntnisse bezüglich dieser hCAT-2/A14_BK-Chimäre zu erhärten und zu erweitern, wurden im Rahmen dieser Dissertation weitere Versuche mit dem chimären Protein durchgeführt. Auch Kontrollversuche mit anderen hCAT-Mitgliedern waren noch nötig um die Eigenschaften der Chimäre besser einschätzen zu können.

3.2.1 hCAT-2/A14_BK ist in der Plasmamembran lokalisiert

Durch Biotinylierungs-Versuche konnte schon in der Diplomarbeit gezeigt werden, dass hCAT-2/A14_BK in der Plasmamembran von *X. laevis*-Oozyten lokalisiert ist. Die Menge der Chimäre in der Zelloberfläche war ähnlich der des hCAT-2A. Die Plasmamembran-Lokalisation ist eine genuine Eigenschaft von hCAT-2A als Donor des Rückgrats der Chimäre. Der Austausch der „funktionellen Domäne“ hat also keinen Einfluss auf die Lokalisation des Proteins. Diese Ergebnisse wurden nun auch durch Fluoreszenzmikroskopie bestätigt (Abbildung 19). Dazu wurden Oozyten, die EGFP-Fusionsproteine bzw. EGFP alleine überexprimierten in Einbettmedium eingefroren und anschließend 12 µm dicke Schnitte angefertigt. Mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops wurden Bilder aufgenommen die zeigten, dass hCAT-2/A14_BK.EGFP sowie hCAT-2A.EGFP in der Plasmamembran lokalisiert waren. EGFP sowie SLC7A14.EGFP konnte nur intrazellulär detektiert werden. Eine Unterscheidung zwischen Cytoplasma und intrazellulärer Organellen war bei dieser Technik nicht möglich.

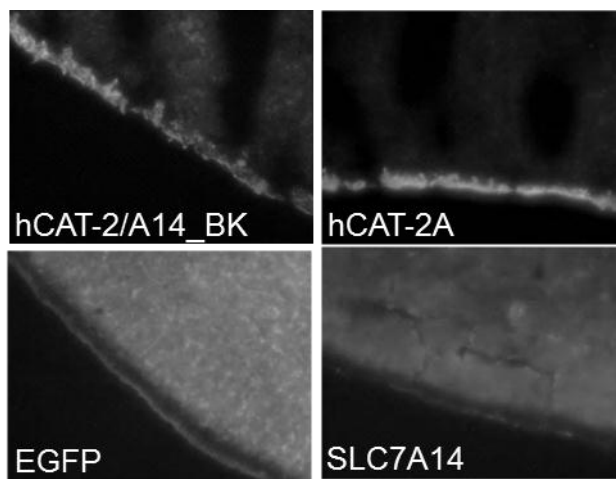


Abbildung 19: Fluoreszenzaufnahmen von *X. laevis*-Oozyten-Schnitten

X. laevis-Oozyten, die die angegebenen EGFP-Fusionsproteine bzw. EGFP alleine exprimierten wurden in Einbettmedium eingefroren. Die aus den gefrorenen Oozyten hergestellten 12µm dicken Gefrierschnitte wurden mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops analysiert.

3.2.2 hCAT-2/A14_BK erkennt sowohl Arginin als auch Lysin

Während der Diplomarbeit wurde bei allen Versuchen Arginin als Modells substrat für die hCATs verwendet. Für die hCATs ist auch bekannt, dass sie nicht zwischen den kationischen Aminosäuren Arginin und Lysin differenzieren (Closs, 2002; Devés & Boyd, 1998). Das bei der Behandlung von Cystinose entstehende Cysteamin-Cystein-Disulfid, das für den therapeutischen Effekt verantwortlich ist, ähnelt jedoch Lysin. Daher wurde getestet, ob die Chimäre aus SLC7A14 und hCAT-2 auch Lysin erkennt. Bei einem vergleichenden Transportversuch mit je 1 mM Arginin und Lysin war kein Unterschied zwischen den beiden Aminosäuren festzustellen (Abbildung 20). Die Transportwerte der Chimäre lagen für Arginin bei $0,5 \pm 0,07$, für Lysin bei $0,6 \pm 0,06$ nmol/h/Oozyte. Bei hCAT-2A überexprimierenden Oozyten lagen die Transportwerte für Arginin ($1,4 \pm 0,13$ nmol/h/Oozyte) und Lysin ($1,1 \pm 0,08$ nmol/h/Oozyte) - wie auch schon in meiner Diplomarbeit gezeigt - zwar insgesamt höher als bei der Chimäre, aber unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

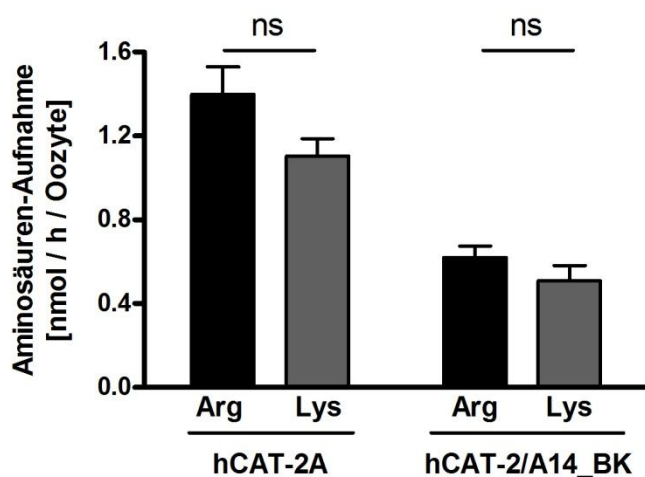


Abbildung 20: Vergleich der Aufnahme von Arginin und Lysin in *X. laevis*-Oozyten

Aufnahme von 1 mM [3 H]Arginin bzw. [3 H]Lysin in hCAT-2A- bzw. hCAT-2/A14_BK-überexprimierende Oozyten. Von allen Messwerten wurde die basale Aufnahme nicht injizierter Oozyten abgezogen (Arginin: $0,04 \pm 0,005$; Lysin: $0,12 \pm 0,012$ nmol/h/Oozyte) Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM (N=7)

3.2.3 Die „funktionelle Domäne“ vermittelt die pH-Abhängigkeit der hCATs

Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurde der Influx von Arginin in hCAT-2/A14_BK-, hCAT-2A- sowie hCAT-2/1_BK-exprimierende Oozyten bei verschiedenen pH-Werten zwischen 5 und 8 (in Schritten von 0,5) untersucht. Dabei zeigte sich, dass hCAT-2/A14_BK, wie hCAT-2A auch, pH-abhängig transportiert (mit niedrigen Transportraten bei niedrigen extrazellulären pH-Werten). Die pH-Abhängigkeit des hCAT-2A konnte stark abgeschwächt werden, indem die „funktionelle Domäne“ durch die des weitgehend

pH-unabhängigen hCAT-1 ersetzt wurde (hCAT-2/1_BK). Dies waren erste Hinweise darauf, dass die pH-Abhängigkeit durch die funktionelle Domäne vermittelt wird und somit auch eine genuine Eigenschaft des SLC7A14 ist. Um dies zu verifizieren, wurden eine Chimäre, die die „funktionelle Domäne“ des hCAT-2A im Rückgrat des hCAT-1 (hCAT-1/2A_BK) trug, sowie hCAT-1 als Kontrolle, auf ihre pH-Abhängigkeit hin getestet (Abbildung 21A). Dabei zeigte hCAT-1, wie erwartet, nur sehr geringe Unterschiede der Transport-Aktivitäten bei den untersuchten pH-Werten zwischen 5 und 8. Im Gegensatz dazu wies hCAT-1/2A_BK bei pH 5 eine stark erniedrigte Aktivität im Vergleich zu pH 7,5 auf. In Abbildung 21B ist eine Übersicht aller im Rahmen der Diplom- sowie der Doktorarbeit getesteten hCATs bzw. Chimären dargestellt. Die Transportraten wurden stets auf die Werte bei pH 7,5 bezogen (= 100%) und lagen für hCAT-2/A14_BK mit $24,7 \pm 3,1\%$, bei hCAT-2A mit $38,6 \pm 5,4\%$ und bei hCAT-1/2A mit $51,8 \pm 6,1\%$ bei pH 5 sehr viel niedriger als bei pH 7,5. Dagegen wurde bei hCAT-2/1_BK und hCAT-1 mit $81,7 \pm 4,5\%$ bzw. $80,6 \pm 6,1\%$ bei pH 5 im Vergleich zum Transport bei pH 7,5 nur eine sehr schwache pH-Anhängigkeit festgestellt.

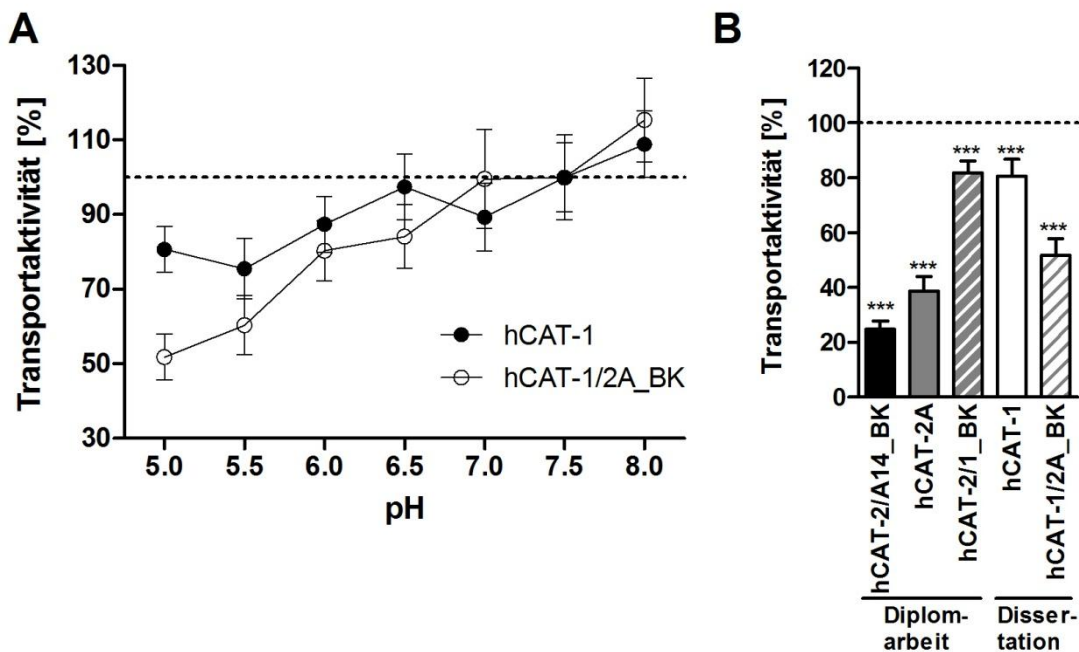


Abbildung 21: Arginin-Aufnahme in *X. laevis*- Oozyten bei verschiedenen pH-Werten

X. laevis-Oozyten wurden mit cRNA der angegebenen Transporter injiziert. A) Aufnahme von 1mM Arginin in Abhängigkeit verschiedener extrazellulärer pH-Werte. B) Vergleich der Arginin-Aufnahme durch die angegebenen Transporter bei pH 5 im Vergleich zu pH 7,5 (100%). Die statistische Auswertung erfolgte mit einem t-Test (3 Sterne stehen für $p < 0,001$). In A und B wurde von allen Messwerten eine basale Arginin-Aufnahme nicht-injizierter Kontroll-Oozyten abgezogen (je nach pH 0,07 - 0,09 nmol/h/Oozyte) und die Arginin-Aufnahme bei pH 5 auf die Aufnahme bei pH 7,5 bezogen (100% = hCAT-2/A14_BK: $0,6 \pm 0,1$; hCAT-2A: $1,4 \pm 0,2$; hCAT-1/2A_BK: $0,7 \pm 0,1$; hCAT-1: $1,5 \pm 0,2$; hCAT-2/1_BK: $2,4 \pm 0,2$ nmol/h/Oozyte). Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM (N=14-45).

Da CAT-Proteine stets mit ihren N- und C-Termini zum Cytoplasma hin lokalisiert sind, entspricht Influx in Oozyten über die Plasmamembran dem Efflux aus Lysosomen ins Cytoplasma. Um auch den Influx in Lysosomen nachzustellen, wurde Efflux aus Oozyten untersucht. Dazu wurde radioaktiv markiertes Arginin in Oozyten injiziert und nach 30-minütiger Inkubation bei 20°C die Menge der Radioaktivität im Überstand bestimmt. Dieser Versuch zeigte, dass der hCAT-2/A14_BK-vermittelter Efflux von Arginin bei einem extrazellulären pH von 5 sehr viel schlechter war als bei pH 7,5 (=100%) (Abbildung 22). Dieser Effekt war unabhängig davon, ob außen Trans-Substrat angeboten wurde ($26,9 \pm 9,5\%$) oder nicht ($17,3 \pm 9,1\%$). hCAT-2A zeigte als pH-abhängige Kontrolle ein ähnliches Verhalten mit einem Transport von $40,3 \pm 4,1\%$ ohne und $32,3 \pm 5,9\%$ mit Trans-Substrat bei pH 5 jeweils im Vergleich zu 7,5. Beim pH-unabhängigen hCAT-1 konnten wie erwartet keine bzw. nur sehr schwache Unterschiede zwischen den Transportwerten bei pH 5 und 7,5 festgestellt werden, unabhängig davon ob Trans-Substrat vorhanden war oder nicht.

Zusammengefasst zeigen die Versuche aus der Diplom- sowie der Doktorarbeit, dass die funktionelle Domäne die pH-Abhängigkeit der hCATs vermittelt. Dementsprechend weisen diese Versuche darauf hin, dass es sich bei SLC7A14 um einen pH-abhängigen Transporter handelt.

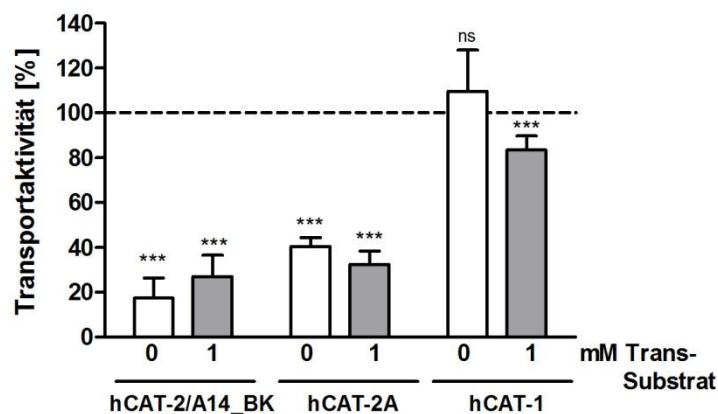


Abbildung 22: Arginin-Efflux aus *X. laevis*-Oozyten bei verschiedenen pH-Werten

X. laevis-Oozyten, die die angegebenen Transporter überexprimierten wurden für 4-6 Stunden in Aminosäure-freiem Puffer depletiert und dann mit 36 nl 100 mM [^3H]Arginin [100 $\mu\text{Ci/ml}$] injiziert. Jeweils 3 Oozyten wurden dann für 30 Minuten in Puffer des angegebenen pH mit oder ohne 1 mM Arginin als Trans-Substrat (TS) bei 20°C inkubiert. Anschließend wurde die Radioaktivität im Überstand bestimmt. Werte nicht mit cRNA-injizierter Oozyten wurden von allen Messwerten abgezogen (0 mM TS: 173 ± 49 ; 1 mM TS: 217 ± 74 dpm). Gezeigt sind die bei pH 5 bestimmten Werte, die auf die entsprechenden Werte bei pH 7,5 bezogen wurden (100% = CAT-2/A14_BK: 271 ± 48 (0 mM TS); 349 ± 60 (1mM TS); CAT-2A: 1283 ± 170 (0 mM TS); 1420 ± 206 (1mM TS); CAT-1: 371 ± 49 (0 mM); 3153 ± 240 dpm (1mM TS)). Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM (N=15-20). Die statistische Auswertung erfolgte mit einem t-Test (3 Sterne stehen für $p < 0,001$, ns= nicht signifikant).

3.2.4 Die „funktionelle Domäne“ der CATs ist nötig, aber nicht ausreichend um die Hemmung durch ϵ -Trimethyl-L-Lysin zu vermitteln

Pisoni und Kollegen beschrieben eine kompetitive Hemmung des System-c-vermittelten lysosomalen Arginin-Transports durch ϵ -Trimethyl-L-Lysin (TML). Dabei kam es bei Anwesenheit der 100-fachen Menge von TML zu einer 50%igen Reduktion der System-c-vermittelten Arginin-Aufnahme in isolierte Lysosomen (Pisoni et al., 1987b). Der System- y^+ -vermittelte Arginin-Transport über die Plasmamembran blieb dagegen unbeeinflusst. Schon in der Diplomarbeit konnte gezeigt werden, dass der Arginin-Transport durch die hCAT-2/A14_BK-Chimäre sowie hCAT-2A (als nicht-System- y^+ -Vertreter) durch die Anwesenheit von TML auf $66 \pm 4,4$ bzw. $73,3 \pm 4,3\%$ reduziert wurde. Bei dem System- y^+ -Vertreter hCAT-1 war die Hemmung nicht signifikant. Im Rahmen dieser Dissertation wurden nun gezeigt, dass auch die weiteren System- y^+ -Vertreter hCAT-2B und hCAT-3 nicht durch TML gehemmt werden (Abbildung 23). Auch die Tatsache, dass die Chimäre hCAT-2/1_BK nicht gehemmt wurde, spricht dafür, dass die „funktionelle Domäne“ von hCAT-2A oder SLC7A14 für die Hemmung durch TML notwendig ist. Da jedoch auch die Chimäre hCAT-1/2A nicht durch TML gehemmt wurde, scheint diese nicht ausreichend für die Vermittlung der Hemmung zu sein.

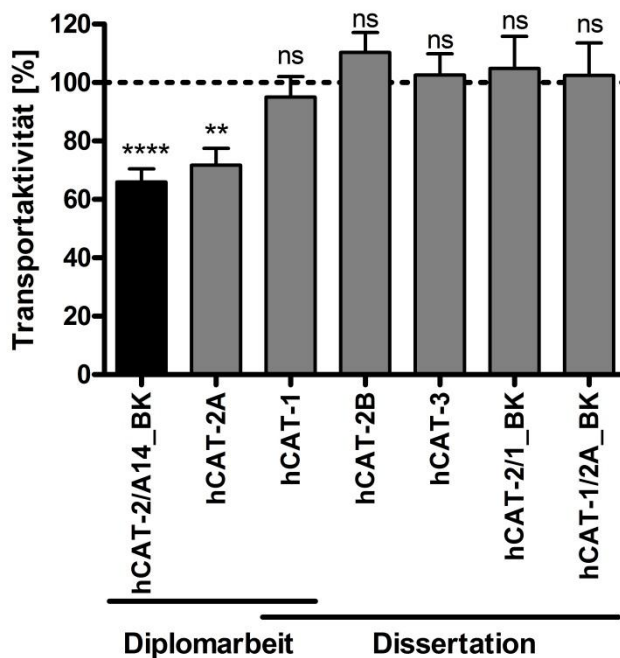


Abbildung 23: Arginin-Aufnahme in *X. laevis*-Oozyten in Ab- bzw. Anwesenheit von ϵ -Trimethyl-L-Lysin

X. laevis-Oozyten wurden mit der cRNA der angegebenen Transporter injiziert. Nach drei Tagen wurde die Aufnahme von 30 μ M Arginin in Ab- bzw. Anwesenheit von 3 mM ϵ -Trimethyl-L-Lysin (TML) bestimmt. Werte nicht-injizierter Oozyten waren vom TML unbeeinflusst und wurden von allen Messwerten abgezogen (15 ± 1 pmol/h/Oozyte). Die Werte in Anwesenheit von TML wurden auf die Werte in Abwesenheit von TML bezogen (100% = hCAT-2/A14_BK: 56 ± 5 ; hCAT-2A: 117 ± 6 ; hCAT-1: 232 ± 22 ; hCAT-2B: 90 ± 9 ; hCAT-3: 49 ± 5 ; hCAT-2/1_BK: 251 ± 16 ; hCAT-1/2A: 76 ± 9 pmol/h/Oozyte). Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM (N=17-49). Die statistische Auswertung erfolgte mit einer One-Way Anova und anschließendem Bonferroni-Test (4 Sterne stehen für $p < 0,0001$, 2 Sterne stehen für $p < 0,005$) und bezieht sich immer auf die Aktivität des jeweiligen Transporters in Abwesenheit von TML.

3.3 Die Bedeutung von hCAT-1 für den lysosomalen Arginin-Transport zur Versorgung der eNOS in EA.hy926 Endothelzellen

Im folgenden Versuchsaufbau wollten wir uns das Enzym endotheliale NO-Synthase (eNOS) als Reporter für den Arginin-Transport aus den Lysosomen zu Nutze machen. Da die eNOS durch Calcium aktiviert wird, kann die Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) durch Behandlung der Zellen mit Ca^{2+} -Ionophor, das einen Calcium-Einstrom in die Zellen bewirkt, stimuliert werden. Dadurch liegt die NO-Produktion in einem gut messbaren Bereich. Unter Bedingungen bei denen das freie intrazelluläre Arginin gegen Lysin ausgetauscht, sowie das Proteasom gehemmt ist, bleibt als einzige Substratquelle der eNOS der lysosomale Proteinabbau sowie das Recycling. Die Herunterregulation des lysosomalen Arginin-Transporters müsste unter diesen Bedingungen also zu einer starken Reduktion der eNOS-Aktivität führen.

In Abbildung 24 ist schematisch dargestellt welche Substratquellen der eNOS in EA.hy926-Zellen zur Verfügung stehen und wie sie in dieser Arbeit beeinflusst wurden. Die Zellen wurden von austauschbarem Arginin depletiert, indem extrazellulär Lysin angeboten wurde. Dieses wurde über die Plasmamembrantransporter γ^+ LAT-1, -2 und hCAT-1, die in diesen Zellen exprimiert sind (Rotmann et al., 2007), gegen intrazelluläres Arginin ausgetauscht. Epoxomicin wurde zur proteasomalen Hemmung, Chloroquin zur lysosomalen Hemmung und MG132 als unspezifischer Inhibitor beider Proteinabbauwege eingesetzt. Die Hemmung des Recycling-Weges durch den Austausch von intrazellulärem Citrullin gegen extrazellulär zugegebenes Glutamin wurde in dieser Arbeit nicht genutzt.

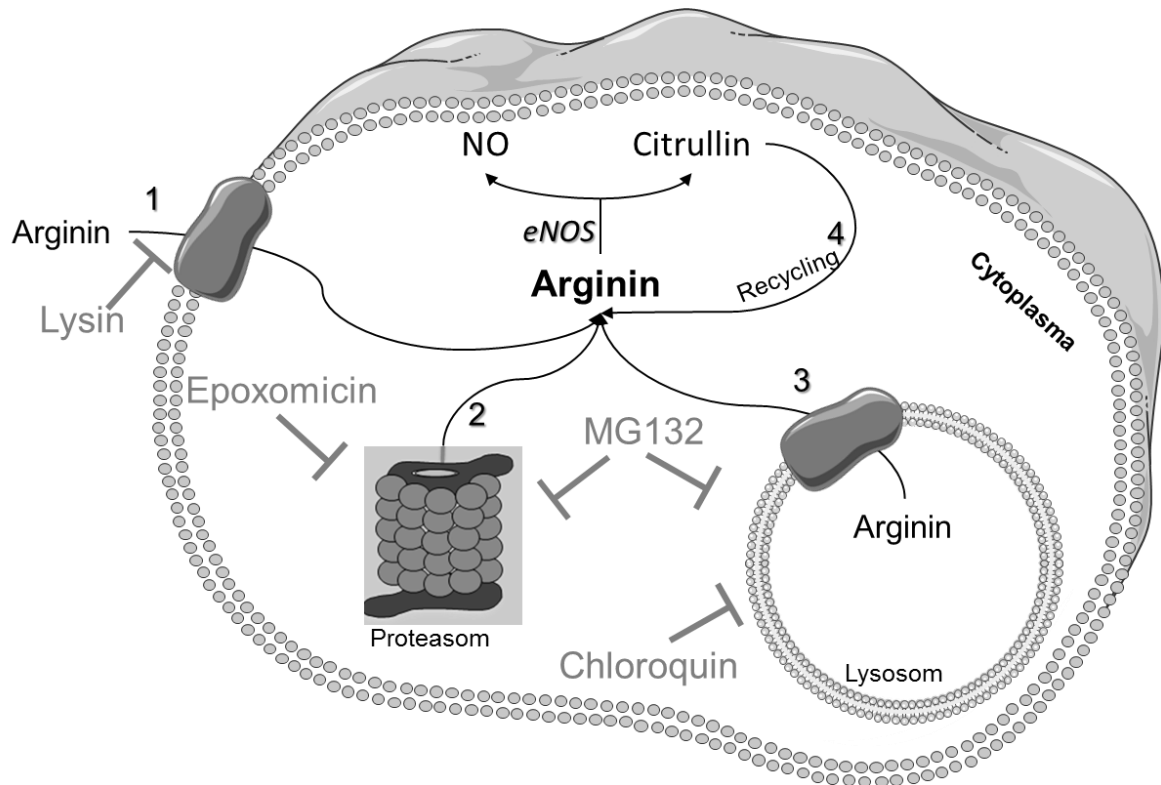


Abbildung 24: Schema der eNOS- Versorgung in einer endothelialen Zelle

Gezeigt ist eine schematische Endothelzelle mit allen für die eNOS verfügbaren Arginin-Quellen. Arginin kann mit Hilfe der hCATs bzw. der Transporter γ -LAT1 und 2 über die Plasmamembran aufgenommen werden (1). Aus dem Proteinabbau stammendes Arginin kann entweder aus dem Proteasom freigesetzt (2) oder über einen noch unbekanntem Transporter aus dem Lysosom heraustransportiert werden (3). Zusätzlich kann Citrullin zu Arginin recycelt werden (4). Die in den folgenden Versuchen verwendeten Inhibitoren sind grau dargestellt: Lysin inhibiert kompetitorisch die Arginin-Aufnahme und depletiert die Zelle zusätzlich durch Austausch von intrazellulärem Arginin. Epoxomicin inhibiert das Proteasom, Chloroquin das Lysosom. Bei MG132 handelt es sich um einen unspezifischen Inhibitor, der sowohl Lysosom, als auch Proteasom hemmt.

Da in vorangegangenen Arbeiten schon gezeigt und in dieser Arbeit bestätigt wurde, dass hCAT-Familienmitglieder im Lysosom lokalisiert sind, wurde zunächst auf mRNA Ebene überprüft, welche hCAT-Vertreter in EA.hy926-Zellen exprimiert werden. Dazu wurde eine qRT-PCR mit den in Kapitel 2.2.7 beschriebenen Oligonukleotiden und TaqMan-Sonden durchgeführt und alle Werte der hCATs auf die des Haushaltsgens GAPDH bezogen. Diese Untersuchung zeigte, dass hCAT-1 der einzige Vertreter der hCAT-Familie ist, der in EA.hy926-Zellen in nennenswerten Mengen exprimiert wird (Abbildung 25). hCAT-2A- sowie SLC7A14-mRNA konnten gar nicht nachgewiesen werden. Für hCAT-2B sowie hCAT-3 wurde aufgrund der durchschnittlichen delta-CT Werte von 13,6 bzw. 13 nur auf eine marginale Expression geschlossen.

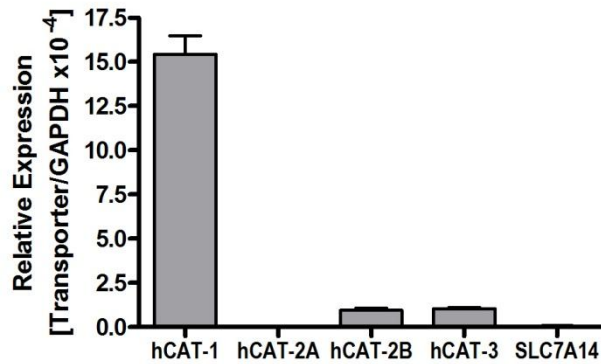


Abbildung 25: Analyse von EA.hy926 auf Expression der Vertreter der hCAT-Unterfamilie auf mRNA-Ebene

Gezeigt ist die Expression der verschiedenen hCAT-Isoformen in Relation zum Haushaltsgen GAPDH. Nach den RT-PCR Reaktionen wurde zur Normalisierung der Daten der CT-Wert des Haushaltsgens GAPDH von dem des entsprechenden Transporters subtrahiert (ΔCT). Die relative Expression wurde anschließend anhand der Formel $2^{(-1 \times \Delta CT)}$ berechnet, so dass die Expression der GAPDH als 1 definiert ist (N=14).

Während humanen Hautfibroblasten hCAT-1 und SLC7A14 exprimieren, ist die Expression dieser SLC7-Subfamilie in EA.hy926-Endothelzellen weitgehend auf den hCAT-1 beschränkt. Die Eigenschaften der Chimäre hCAT-2/A14_BK lassen darauf schließen, dass SLC7A14 über System-c-Eigenschaften verfügt. Selbst wenn SLC7A14 nun also das System c in humanen Hautfibroblasten darstellt, muss es in Endothelzellen einen anderen Transporter geben, der KAS aus dem Lysosom transportiert. Da auch hCAT-1 im Lysosom lokalisiert ist, stellte sich nun also die Frage, ob dieser in Endothelzellen den lysosomalen KAS-Transport vermittelt.

3.3.1 Reduzierung der hCAT-1-Expression mittels siRNA

Für die Herunterregulation des hCAT-1 in EA.hy926-Zellen wurde eine von der Firma Eurogentec entworfene siRNA (small interfering RNA) benutzt. Tests ergaben, dass die siRNA „si-hCAT-1b“ bei einer eingesetzten Menge von 15 nM schon 2 Tage nach der Transfektion den Gehalt an hCAT-1-mRNA auf $12,4 \pm 1,1\%$ des Gehaltes in nicht-transfizierten Kontrollzellen vermindert (Abbildung 26). Die Transfektion mit einer siRNA ohne Zielsequenz (OZ) veränderte die hCAT-1 Expression dagegen nicht signifikant. Auch die marginalen Expressionen von hCAT-2B und hCAT-3 blieben durch die si-hCAT-1 Transfektion unverändert.

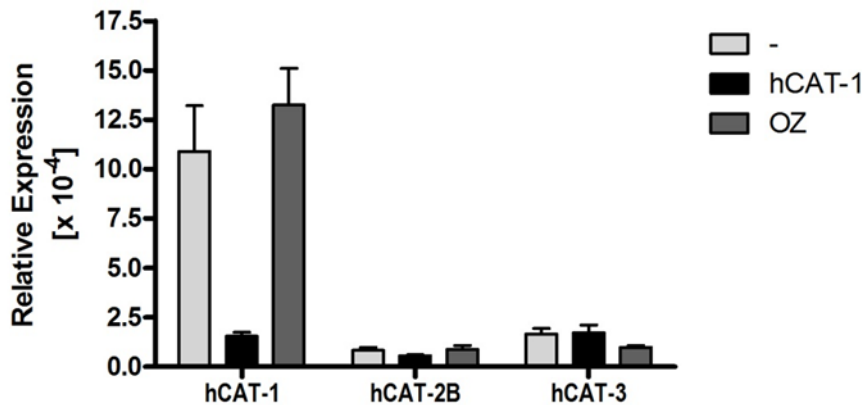


Abbildung 26: Analyse der hCAT-1 mRNA-Expression nach Transfektion von EA.hy926-Zellen mit siRNA

Gezeigt ist die Expression von hCAT-1, -2B und -3 in Relation zur GAPDH in unbehandelten Zellen (-) sowie zwei Tage nach Transfektion der Zellen mit siRNA gegen hCAT-1 bzw. ohne Zielsequenz (OZ-siRNA). Nach den RT-PCR Reaktionen wurde zur Normalisierung der Daten der CT-Wert des Haushaltsgens GAPDH von dem des entsprechenden Transporters subtrahiert (ΔCT). Die relative Expression wurde anschließend anhand der Formel $2^{-(1 \times \Delta CT)}$ berechnet, so dass die Expression der GAPDH als 1 definiert ist (N=4).

Eine Western Blot-Analyse an Glykosidase-behandelten Proben zeigte eine Reduktion des hCAT-1-Proteins auf $9,7 \pm 2,3\%$ in den mit siRNA behandelten Proben (Abbildung 27) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen. Der hCAT-1-Gehalt in den mit OZ-siRNA behandelten Zellen war nicht signifikant verändert.

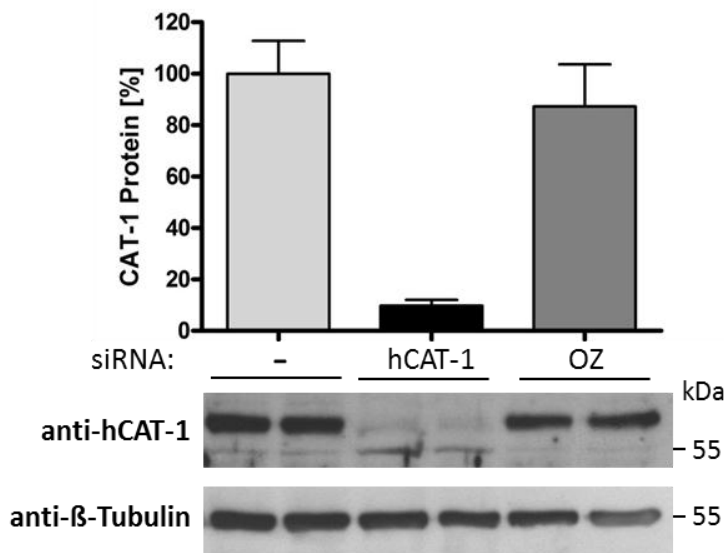


Abbildung 27: Analyse der Proteinexpression nach Transfektion von EA.hy926-Zellen mit siRNA

EA.hy926-Zellen wurden in 24-Loch Platten ausgesät, mit 15 nM hCAT-1- oder Kontroll-siRNA transfiziert und 2 Tage nach der Transfektion in RIPA lysiert. Die Lysate wurden für 45 min bei 37°C mit N-Glykosidase behandelt. Anschließend wurden die Proteine über eine SDS-PAGE (Trenngel 10% Acrylamid) aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und auf hCAT-1 und β -Tubulin-Expression untersucht. Die quantitative Auswertung (Graph, oben) zeigt Mittelwerte \pm SEM (N=4). Darunter ist ein repräsentativer Western Blot abgebildet, auf dem je 2 Proben von nicht transfizierten Kontrollzellen, von mit hCAT-1-siRNA und mit siRNA ohne Zielsequenz (OZ) transfizierten Zellen analysiert wurden.

Zur Überprüfung der Herunterregulation des hCAT-1 auf funktioneller Ebene, wurden Transportstudien mit [^3H]Arginin durchgeführt. Um dabei den hCAT-vermittelten Transport vom γ^+ LAT-vermittelten Transport unterscheiden zu können, wurde Arginin-Aufnahme in EA.hy926-Zellen in An- und Abwesenheit von Leucin gemessen. Die im Verhältnis zum Arginin 10-fach höhere Menge Leucin verhinderte auf kompetitive Weise, dass die γ^+ LATs Arginin transportierten (Rojas & Deve, 1999; Kamath et al., 1999). Unter diesen Bedingungen kann also davon ausgegangen werden, dass der verbleibende Arginin-Transport durch hCAT-1 vermittelt wurde. In den mit hCAT-1-siRNA behandelten Zellen war der hCAT-vermittelte Transport im Vergleich zu den Kontrollzellen auf $20,3 \pm 1,3 \%$ reduziert (Abbildung 28). Der Transport der mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen unterschied sich nicht signifikant von dem der Kontrollzellen.

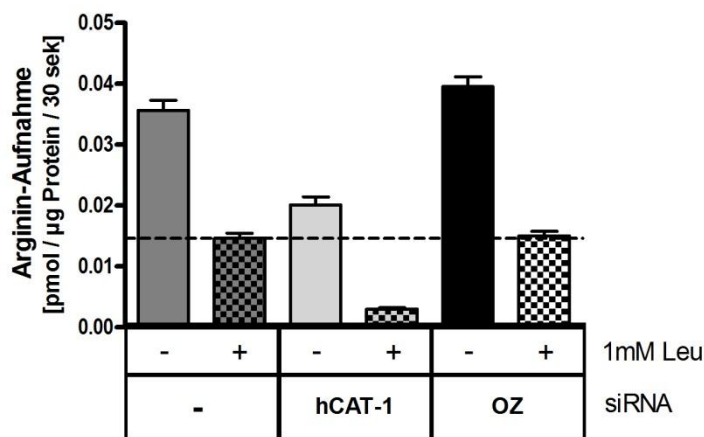


Abbildung 28: Analyse des Arginin-Transports nach Transfektion von EA.hy926-Zellen mit siRNA

Aufnahme von 0,1 mM [^3H]Arginin [10 $\mu\text{Ci/ml}$] in An- (+) bzw. Abwesenheit (-) von 1 mM Leucin in EA.hy926-Zellen, die 2 Tage vorher nicht (-) oder mit hCAT-1- bzw. OZ-siRNA (ohne Zielsequenz) transfiziert worden waren. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM (N=8).

Drei Tage nach Transfektion mit der siRNA lag der mRNA-Gehalt des hCAT-1 immer noch auf ähnlich niedrigem Niveau wie nach zwei Tagen, stieg aber ab dem vierten Tag wieder an (nicht gezeigt). Gleiches galt für den Proteingehalt und die hCAT-vermittelte Transportaktivität (nicht gezeigt). Die folgenden Versuche wurden stets zwei Tage nach der Transfektion der Zellen durchgeführt.

3.3.2 Die Herunterregulation von hCAT-1 in EA.hy926-Zellen beeinträchtigt nicht die lysosomale Versorgung der eNOS mit Arginin

Nachdem gezeigt worden war, dass eine Behandlung mit siRNA erfolgreich zur Herunterregulation des hCAT-1 führt, wurde getestet, ob es sich bei hCAT-1 um einen lysosomalen Arginin-Transporter handeln könnte. Dazu wurde mit Hilfe eines in der Dissertation von S. Karbach (2008) entworfenen Versuchsschemas in einem RFL-6 Transferassay überprüft, ob sich der Anteil der lysosomalen Versorgung der eNOS durch die Herunterregulation des hCAT-1 in EA.hy926-Zellen verringert. Hintergrund war die Annahme, dass in Zellen, in denen der für den lysosomalen Arginin-Export verantwortliche Transporter ausgeschaltet ist, der lysosomale Proteinabbau nicht mehr zur Substratversorgung der eNOS beitragen kann. Unter diesen Bedingungen wäre bei einer zusätzlichen Hemmung des Lysosom keine weitere Reduktion der eNOS zu beobachten. Eine zusätzliche Hemmung des proteasomalen Proteinabbaus sollte die lysosomale Versorgung der eNOS besser sichtbar machen, sowie ausschließen, dass der proteasomale Proteinabbau die fehlende Versorgung der eNOS aus dem Lysosom (teilweise) kompensiert. Die Aktivität der eNOS in Zellen, die in 1 mM Arginin inkubiert worden waren, wurde jeweils 100% gesetzt. Da in einem RFL-6 Transferassay die NO-Produktion der Endothelzellen indirekt als NO-vermittelte cGMP-Produktion der Reporterzellen gemessen wird, ist in den Abbildungen stets die cGMP-Produktion in Prozent angegeben. Von dieser kann aber direkt auf die NO-Produktion geschlossen werden. Zellen, die in Lysin inkubiert, also von intrazellulärem Arginin depletiert worden waren, hatten nur noch den Proteinabbau sowie das Recycling von Citrullin zu Arginin als Arginin-Quellen zur Verfügung. Für die proteasomale Hemmung wurden die Zellen für 60 Minuten mit 1 μ M Epoxomicin behandelt. Eine Hemmung der Lysosomen wurde durch eine Behandlung für 30 Minuten mit 100 μ M Chloroquin vorgenommen. Die Konzentrationen und Inkubationszeiten wurden aus der Dissertation von S. Karbach (Karbach, 2008) übernommen.

Wurde der Versuch mit OZ-siRNA-behandelten Zellen durchgeführt (Abbildung 29A), kam es wie erwartet zu einer signifikanten Reduktion der NO-Produktion in Zellen in denen Proteinabbau im Lysosom, sowie das Recycling die einzig verbleibenden Arginin-Quellen waren. Hier lag die NO-Produktion bei $55 \pm 3,7\%$ der in Arginin-inkubierten Zellen. Durch eine zusätzliche Inhibition des lysosomalen Proteinabbaus sank die NO-Produktion weiter auf $37,1 \pm 5,5\%$ der Arginin-inkubierten Zellen. In Zellen, in denen hCAT-1 herunterreguliert worden war (Abbildung 29B), kam es jedoch ebenfalls zu einer weiteren Reduzierung der NO-Produktion von $71,9 \pm 5,2\%$ in Lysin und Epoxomicin inkubierten Zellen auf $42,5 \pm 6\%$ der Arginin-inkubierten Zellen durch die zusätzliche Inkubation mit Chloroquin.

Eine zweite Messung, bei der auf alle Versuchsgruppen Arginin gegeben und erneut die NO-Produktion gemessen wurde, zeigte, dass alle Hemmeffekte wieder aufhebbar, die Zellen also noch vital und die eNOS noch voll funktionsfähig waren. Alle Hemmeffekte konnten also auf die mangelnde Substratversorgung zurückgeführt werden.

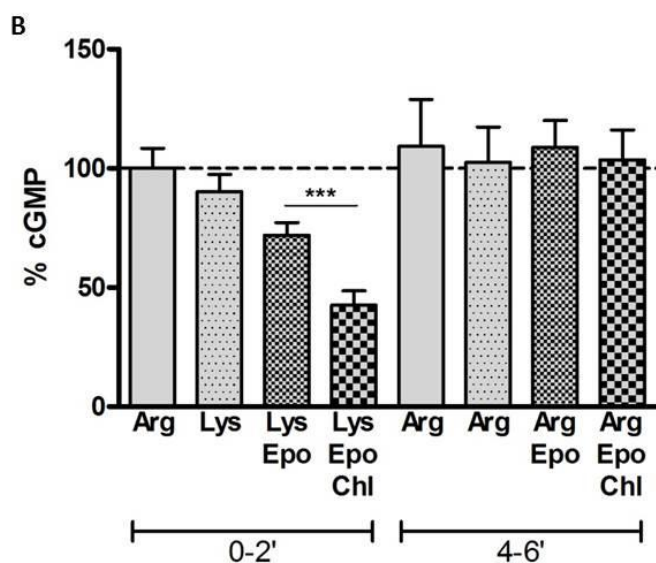
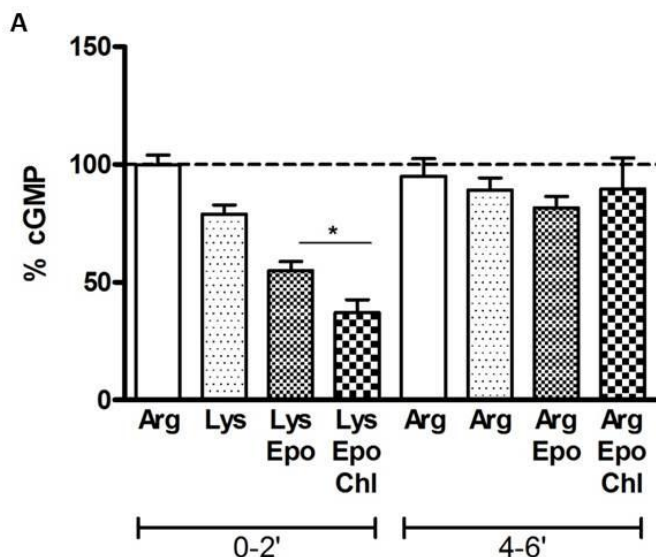


Abbildung 29: Analyse des lysosomale Anteils der Arginin-Versorgung der eNOS in mit hCAT-1-siRNA behandelten Zellen

Mit siRNA ohne Zielsequenz (A) oder mit hCAT-1-siRNA behandelte EA.hy926-Zellen (B) wurden für 90 Minuten in Locke's Lösung + 1 mM Arginin (Arg) oder Lysin (Lys) inkubiert. In den letzten 30 Minuten dieser Vorinkubation wurde auf die entsprechend gekennzeichneten Versuchsgruppen zusätzlich Epoxomicin (Epo, 1 μ M) und ggf. Chloroquin (Chl, 100 μ M) gegeben. Einer ersten Messung der durch Calcium-Ionophor stimulierten NO-Produktion (0-2') folgte eine 2-minütige Inkubation aller Zellen in den jeweils selben für die erste Messung verwendeten Puffern, die nun alle Arginin enthielten und

anschließend eine zweite Messung der NO-Produktion (4-6'). Während den Messungen war Epoxomicin stets anwesend, Chloroquin nur während den letzten 30 Minuten der Vorinkubation, da es max. 30 Minuten auf die Zellen einwirken durfte (vgl. Dissertation S. Karbach, 2008). Zur Messung der NO-Produktion wurden die Überstände direkt auf RFL-6 Zellen transferiert und diese für weitere 2 Minuten inkubiert. Die Detektion des von den RFL-6 Zellen durch NO-induzierte Stimulation der löslichen Guanylatcyklase produzierten cGMPs erfolgte durch einen RIA. Von allen Messwerten wurde eine basale cGMP-Produktion der Reporterzellen von $0,31 \pm 0,1$ pmol cGMP pro Vertiefung abgezogen. Die Werte der mit Kontroll-siRNA bzw. mit si-hCAT-1 behandelten Zellen beziehen sich jeweils auf die in Arginin inkubierten Zellen (100% = Kontroll-siRNA: $2,77 \pm 0,4$ pmol cGMP pro Vertiefung; si-hCAT-1-Behandlung: $2,1 \pm 0,3$ pmol cGMP pro Vertiefung). Die Balken stellen Mittelwerte \pm SEM aus 8-12 Einzelwerten dar. Die statistische Auswertung erfolgte mit einer One-Way Anova und anschließendem Bonferroni-Test (3 Sterne stehen für $p < 0,001$, 1 Stern für $p < 0,05$).

3.3.3 Reduzierte NO-Produktion in Lysin-inkubierten Zellen ist konfluenz-bedingt

In der Dissertation von S. Karbach (2008), sowie verschiedenen Publikationen unserer Arbeitsgruppe (Simon et al., 2003; Karbach et al., 2011) wurde berichtet, dass die NO-Produktion trotz Depletion von Arginin durch 90- oder 120-minütige Inkubation der Zellen in Lysin unbeeinflusst bleibt. Die Zellen hatten durch Recycling sowie Proteinabbau stets genügend Arginin für die NO-Produktion zur Verfügung. Im Gegensatz dazu ergaben meine Versuche jedoch eine geringfügig, aber signifikant reduzierte NO-Produktion nach 90-minütiger Arginin-Depletion mit Lysin. (Abbildung 22).

Um diesem Phänomen auf den Grund zu gehen, wurden Zellen vier Tage vor dem Versuch unter Transfektionsbedingungen ausgesät (ca. 60% konfluent, Abbildung 30A). Zusätzlich wurden zum gleichen Zeitpunkt Zellen konfluent ausgesät (Abbildung 30B). Die subkonfluent ausgesäten Zellen zeigten nach 120-minütiger Lysin-Inkubation eine signifikante Verminderung der NO-Produktion, während diese in Zellen, die konfluent ausgesät worden waren, nicht beeinträchtigt war. Rein optisch unterschied sich die Konfluenz der Zellen, die subkonfluent ausgesät worden waren am Versuchstag nicht von den schon konfluent ausgesäten Zellen. Die Dauer des konfluenten Zustands könnte allerdings Auswirkungen auf den Stoffwechsel haben, so dass die Zellen die schon länger engen Zell-Zell-Kontakt haben weniger Proteine für Wachstum bereitstellen müssen und daher mehr Protein-Abbau betreiben können. Dadurch könnten diese Zellen extrazellulären Arginin-Entzug durch Proteinabbau ausgleichen. Da bei den Versuchen, bei denen die Zellen mit hCAT-1 bzw. OZ-siRNA behandelt wurden, die Konfluenz aller Zellen gleich waren, kann ausgeschlossen werden, dass die diese Einfluss auf die lysosomale Versorgung der eNOS hat.

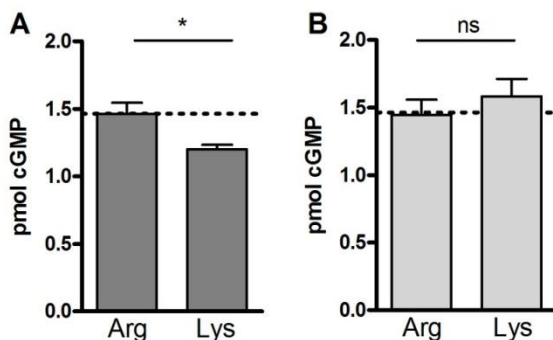


Abbildung 30: Analyse der NO-Produktion nach Arginin-Depletion

EA.hy926 wurden subkonfluent (A) oder konfluent (B) in 24-Loch-Platten ausgesät. Nach 4 Tagen lagen rein optisch alle Zellen in konfluentem Zustand vor und es wurde ein Transfer-Assay durchgeführt (dies entspricht bei den subkonfluent ausgesäten Zellen den Bedingungen wie sie bei Versuchen mit

transfizierten Zellen vorliegen). Dazu wurden die Zellen für 90 Minuten in Locke's Lösung + 1 mM Arginin (Arg) bzw. Lysin (Lys) inkubiert. Es folgte eine 30-minütige Inkubation in den selben Lösungen, die nun zusätzlich 20 U/ml SOD und 0,6 mM IBMX enthielten. Anschließend wurden die Zellen für 2 Minuten in den jeweils selben für die Vorinkubation verwendeten Puffern, die nun auch Calcium-Ionophor enthielten inkubiert. Die Überstände wurden direkt auf RFL-6 Zellen transferiert und diese für weitere 2 Minuten inkubiert. Die Detektion des von den RFL-6 Zellen durch NO-induzierte Stimulation der löslichen Guanylatcyklase produzierten cGMPs erfolgte wie in Abbildung 29. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM als pmol cGMP pro Vertiefung (N=3). Die statistische Auswertung erfolgte mit einem t-Tests (1 Stern steht für $p < 0,05$; ns = nicht signifikant).

3.3.4 Die Erholung der NO-Produktion durch Zugabe von extrazellulärem Arginin ist durch Herunterregulation von hCAT-1 nicht reduziert

Die in Kapitel 3.3.2 dargestellten Versuche zeigen, dass die vollständige Erholung der NO-Produktion durch Zugabe von großen Mengen (1 mM) extrazellulärem Arginin – also durch Transport über die Plasmamembran – trotz der Herunterregulation von hCAT-1 möglich war. Daher wurde genauer untersucht, wie gut sich die NO-Produktion in Zellen, die zuvor von freiem Arginin depletiert und deren gesamter Proteinabbau durch MG132 gehemmt war, durch Zugabe von extrazellulärem Arginin erholen kann. Für den Versuch wurden alle Zellen zunächst durch eine 90-minütige Inkubation in Lysin von intrazellulärem Arginin depletiert. In drei der vier Versuchsgruppen wurde zusätzlich durch eine 30-minütige Behandlung der Zellen mit 1 μ M MG132 der gesamte Proteinabbau gehemmt. Dadurch sank die NO-Produktion sowohl in den mit OZ-siRNA als auch in den mit hCAT-1-siRNA-behandelten Zellen wie erwartet stark, auf ca. 50% der nur in Lysin inkubierten Zellen, ab (Abbildung 31A). Während einer anschließenden 2-minütigen Erholungsphase, der sich ein Mediumwechsel und eine 2-minütige Messung in den gleichen Lösungen anschloss, wurde auf die Versuchsgruppen verschiedene geringe Konzentrationen Arginin (50 bzw. 10 μ M) in An- oder Abwesenheit von einem Überschuss an Leucin (1 mM) gegeben. Die Anwesenheit von großen Mengen Leucin führte zu einer kompetitiven Hemmung des γ^+ LAT-vermittelten Arginin-Transports, so dass unter diesen Bedingungen beobachtete Transporteffekte auf hCAT-vermittelten Transport zurückzuführen sein sollten.

In den mit OZ-siRNA behandelten Zellen reichte die Zugabe von 50 μ M Arginin aus, um die NO-Produktion in den MG132-behandelten Zellen wieder über den 100% Wert der in Lysin inkubierten Zellen hinaus steigen zu lassen. Auch in Anwesenheit von zusätzlich 1 mM Leucin erholte sich die NO-Produktion zwar wieder auf den 100%-Wert, erreichte aber nicht die Werte der Zellen, auf die nur Arginin gegeben worden war. Erst bei einer geringeren Arginin-Konzentration von 10 μ M in Anwesenheit von 1 mM Leucin war der hCAT-vermittelte Arginin-Transport nicht ausreichend um die NO-Produktion wieder auf den 100%-Wert zu regenerieren. Hier stieg sie lediglich auf $77,7 \pm 8,7\%$ des Ausgangswertes. In den mit siRNA gegen den hCAT-1 behandelten Zellen zeigte sich das gleiche Bild: eine auf ca. 50% verminderte NO-Produktion unter Einfluss von MG132, eine vollständige Erholung der NO-Produktion nach Zugabe von 50 μ M Arginin, sowie eine reduzierte Erholung auf $75,3 \pm 5,2\%$ der Lysin-inkubierten Zellen bei Zugabe von nur 10 μ M Arginin in Anwesenheit von 1 mM Leucin (Abbildung 31B). Die Erholung der NO-Produktion war in Zellen, in denen der hCAT-1 herunterreguliert ist also nicht schlechter als in mit OZ-siRNA-behandelten Kontrollzellen.

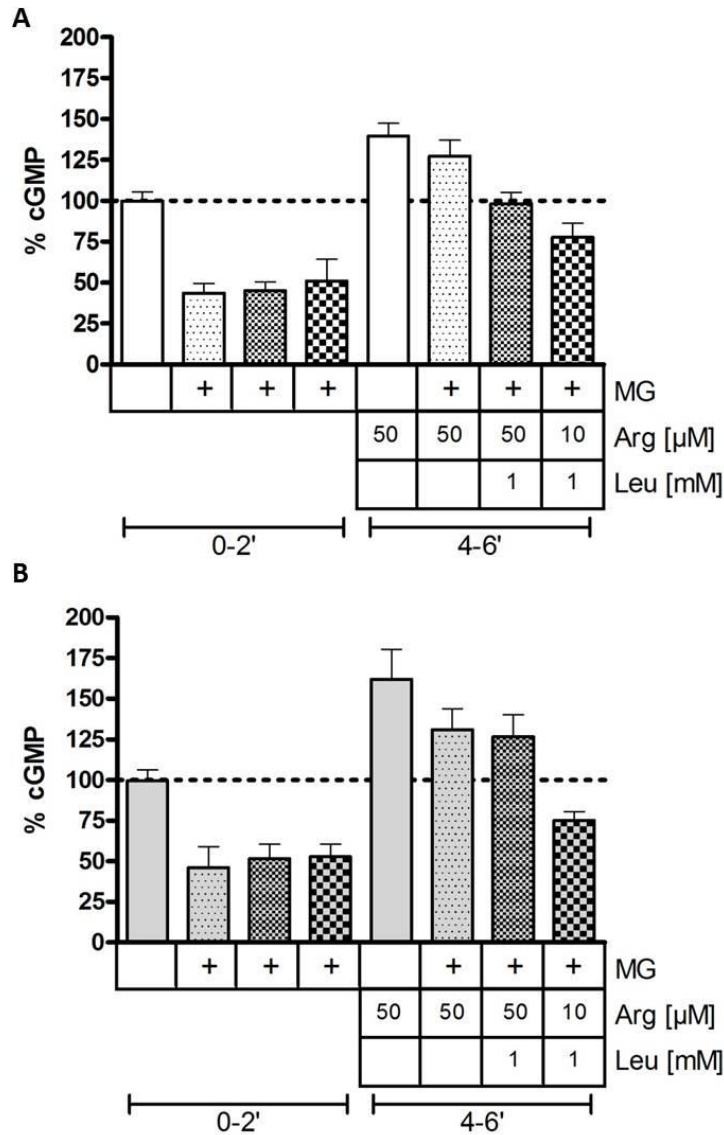


Abbildung 31: Erholung der NO-Produktion durch Zugabe von extrazellulärem Arginin

EA.hy926-Endothelzellen, die mit OZ-siRNA (A) bzw. mit siRNA gegen hCAT-1 (B) behandelt worden waren, wurden in einer 24-Loch-Platte für 90 Minuten in Locke's Lösung + 1 mM Lysin inkubiert. Während der letzten 30 Minuten dieser Vorinkubation wurden alle Lösungen mit 20 U/ml SOD versetzt und auf drei der 4 Versuchsgruppen zusätzlich noch 1 μ M MG132 (+) gegeben. Einer ersten Stimulation der NO-Produktion (0-2') durch Calcium-Ionophor folgte eine 2-minütige Inkubation in verschiedenen Konzentrationen Arginin \pm 1 mM Leucin, sowie eine weitere 2-minütige Stimulation der NO-Produktion in den entsprechenden Lösungen + Calcium-Ionophor (4-6'). Die Überstände wurden stets direkt auf RFL-6 Zellen transferiert und diese für weitere 2 Minuten inkubiert. Die Detektion des von den RFL-6 Zellen in Abhängigkeit von NO produzierten cGMPs erfolgte wie in Abbildung 29. Die Balken stellen Mittelwerte \pm SEM dar (N=6). Von allen Messwerten wurde eine basale cGMP-Produktion der Reporterzellen von $0,2 \pm 0,05$ pmol cGMP pro Vertiefung abgezogen. Die Werte der mit OZ-siRNA bzw. mit hCAT-1-siRNA behandelten Zellen beziehen sich jeweils auf die in Lysin inkubierten Zellen (100% = Kontroll-siRNA: $1,1 \pm 0,2$ pmol cGMP pro Vertiefung; sihCAT-1-Behandlung: $0,8 \pm 0,1$ pmol cGMP pro Vertiefung).

3.4 Messung von Transport über lysosomale Membranen mit Hilfe des SURFE²R

Mit Hilfe des Gerätes SURFE²R One (Surface Electrogenic Event Reader) der Firma Scientific Devices Heidelberg GmbH (Heidelberg) können Ladungsverschiebungen über Membranen detektiert werden. Der Transport von KAS über eine Membran hat die Verschiebung einer positiven Ladung zur Folge. Unter der Voraussetzung, dass der untersuchte Transporter nicht als stringenter Austauscher fungiert, generiert dieser KAS-Transport ein elektrisches Signal. Dieses Gerät nutzt dabei die auf einer Festkörper-unterstützten Membran basierten Elektrophysiologie (vgl. Kapitel 2.8). Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass nicht zwingend intakte Lysosomen benötigt werden. Alternativ zu ganzen Lysosomen, können sich auch lysosomale Membranfragmente an den Sensor anlagern (Abbildung 32). Dabei bildet sich ein Lumen zwischen Membran und Sensor, so dass Transport in dieses Lumen gemessen werden kann. Auch Verunreinigungen mit anderen Organellen stören meist nicht, da durch den Vergleich von Proben aus Kontrollzellen mit Zellen die ein bestimmtes Protein überexprimieren entstehende Signale den untersuchten Proteinen zugeordnet werden können.

Diese Technik wurde genutzt um zu überprüfen, ob hCAT-2B (als ein elektrogen transportierender Vertreter der hCAT-Familie) und SLC7A14 (als ein der hCAT-Familie zugeordnetes Protein mit noch nicht näher charakterisierten Eigenschaften) Arginin über lysosomale Membranen transportieren

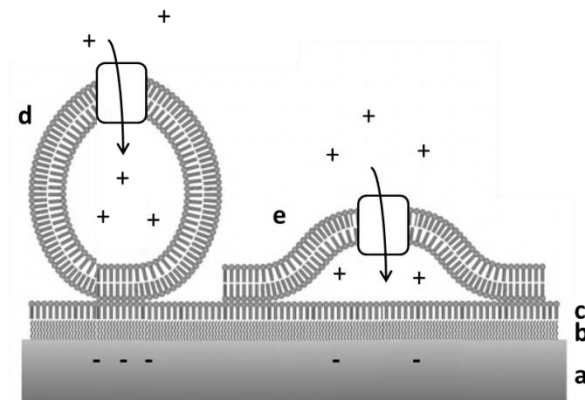


Abbildung 32: Schema von auf der SSM aufgelagerten Vesikeln bzw. Membranen

Auf einer festkörperunterstützten Membran (solid supported membrane; SSM), die aus einer auf einem Golduntergrund (a) aufgelagerten Schicht aus Alkanthiolen (b) besteht. Die darauf aufgebrachte Schicht Phospholipide (c) ermöglicht die Anlagerung von biologischen Zellmembranen als Vesikel (d) oder Membranfragmente (e).

3.4.1 hCAT-2B.EGFP vermittelt am SURFE²R messbaren Arginin-Transport

Die vorbereiteten Sensoren (vgl. Kapitel 2.8.4) wurden zunächst mit Fraktion C-Proben aus einer differentiellen Zentrifugation (vgl. Kapitel 2.7.2) beladen (Abbildung 33). Pro Zelllinie wurden je zwei Fraktion-C-Präparationen getestet. Diese enthielten hauptsächlich intakte Lysosomen. Pro Präparation wurden je zwei Sensoren beladen. Zur eigentlichen Messung (vgl. Kapitel 2.8.5) wurde zunächst für 1 Sekunde Ruhepuffer (ohne Arginin) über den Sensor geleitet. Dann wurde für 1 Sekunde auf aktivierende Lösung (1 mM Arginin) umgeschaltet, gefolgt von 2 Sekunde Ruhepuffer. Nach einer 30-sekündigen Ruhephase, in der in die Lysosomen transportiertes Arginin wieder in den Überstand zurück gelangen sollte, wurde erneut mit Ruhepuffer gespült. Es folgte eine 5-minütige Erholungsphase in Ruhepuffer, bevor die Messung von vorne begann. Jeder Sensor wurde 4 Mal gemessen.

In Abbildung 33 sind repräsentative Signalverläufe von Sensoren, die mit Fraktion-C-Proben aus U373MG-EGFP- (A), -hCAT-2B.EGFP- (B) und -SLC7A14.EGFP-Zellen beladen wurden, dargestellt. Bei den hCAT-2B.EGFP-Proben war nach der Zugabe von 1 mM Arginin (aktivierende Lösung) ein Signal zu sehen, das steil anstieg und langsam wieder abfiel, wie es typisch für hCATs ist. Bei den Proben der EGFP- und der SLC7A14-EGFP-Zellen blieb die Messlinie unverändert. Die Zusammenfassung aller Einzelmessungen (Abbildung 33D) ergab für die hCAT-2B.EGFP-Proben eine durch Arginin-Zugabe vermittelte Amplitude von 90 ± 7 pA. Diese war signifikant höher ($p < 0,0001$), als bei den Proben der EGFP-Zellen (14 ± 4 pA). Bei den SLC7A14.EGFP Proben konnte gegenüber den EGFP-Zellen kein signifikant höheres Signal gemessen werden (18 ± 1 pA). Die sehr kurzen Ausschläge nach 1 und 2 Sekunden der Messung rühren vom Umschalten der Ventile in den Lösungsschläuchen beim Pufferwechsel her und waren in allen Messungen zu sehen.

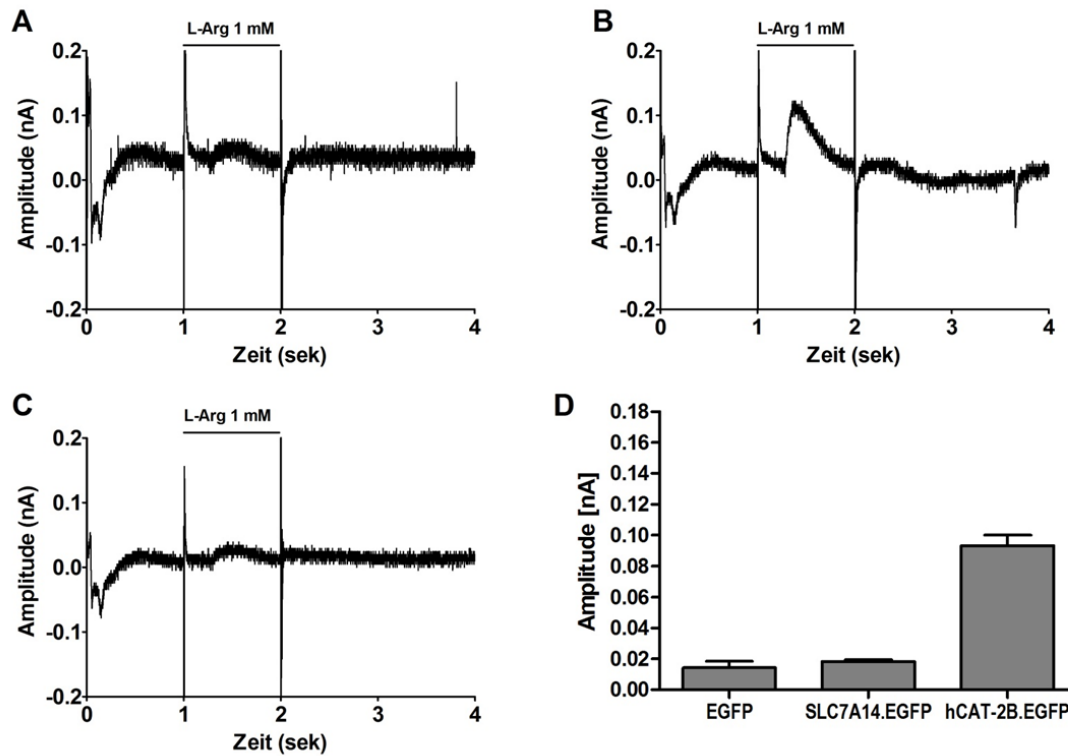


Abbildung 33: Messung von Arginin-Transport der Fraktion C-Proben im SURFE²R

Sensoren wurden mit Fraktion C-Proben, die aus U373MG-EGFP (A), -hCAT-2B.EGFP (B) oder -SLC7A14.EGFP (C) isoliert wurden, beladen. Im SURFE²R wurden die Sensoren für 1 Sekunde mit Arginin-freiem Puffer, für 1 Sekunde mit Arginin-haltigem Puffer und anschließend wieder mit Arginin-freiem Puffer überspült. Dabei generieren Transporter-vermittelte Ladungsverschiebungen über die Membranen der aufgelagerten Proben elektrische Signale. A-C zeigen für die jeweiligen Proben typische Messergebnisse, D zeigt die Zusammenfassung aller Amplituden (Mittelwerte \pm SEM, N=4).

Alternativ zu den Fraktion-C-Proben wurde eine weitere Methode für lysosomale Membranpräparationen verwendet, bei der keine intakten Lysosomen, sondern nur lysosomale Membranfragmente gewonnen werden. Hierbei wurden mittels eines Sucrosegradienten Membranen aus zuvor schockgefrorenen Zellen aufgetrennt. Die 2008 veröffentlichte Methode (Schulz et al., 2008) beschreibt eine Anreicherung von lysosomalen Membranen an der Grenze zwischen der 31- und der 45-prozentigen Sucroselösung des Gradienten, so dass vorbereitete Sensoren mit dieser Fraktion 31/45 beladen wurden (vgl. Kapitel 2.8.4). Pro Zelllinie wurden je zwei Fraktion-31/45-Präparationen getestet. Pro Präparation wurden je zwei Sensoren beladen. Die eigentlichen Messungen wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Jeder Sensor wurde 3-4 Mal gemessen. Wie zuvor mit Fraktion C, generierte auch hier die Zugabe von 1 mM Arginin bei den hCAT-2B.EGFP-Proben ein deutliches elektrisches Signal, während bei den Proben der EGFP- und der SLC7A14-EGFP-Zellen die Messlinie nur eine sehr geringe Veränderung zeigte (Abbildung 34). Die Zusammenfassung aller Einzelmessungen (Abbildung 34D) ergab für die hCAT-2B.EGFP-Proben eine durch Arginin-Zugabe

vermittelte Amplitude von 160 ± 9 pA. Diese war signifikant höher ($p < 0,0001$), als bei den Proben der EGFP-Zellen (32 ± 8 pA). Bei den SLC7A14.EGFP Proben konnte kein im Vergleich zu den EGFP-Proben signifikant höheres Signal gemessen werden (22 ± 8 pA).

Während hCAT-2B.EGFP wie erwartet elektrogenen Arginin-Transport vermittelte, war in den SLC7A14.EGFP-Proben kein Signal detektierbar. Ob dies daran liegt, dass SLC7A14 kein Arginin transportierte oder als reiner Austauscher fungiert.

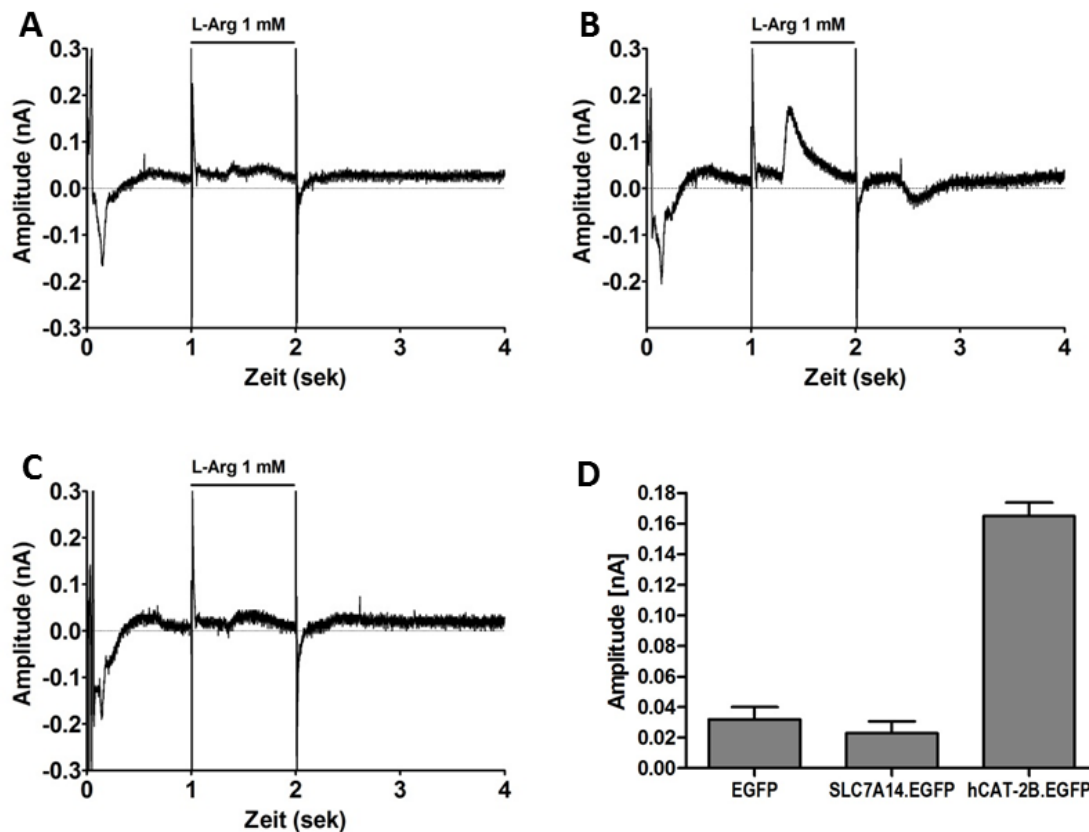


Abbildung 34: Messung von Arginin-Transport der Fraktion 31/45-Proben im SURFE²R

Sensoren wurden mit Fraktion 31/45-Proben aus U373MG-EGFP (A), -hCAT-2B.EGFP (B) oder -SLC7A14.EGFP (C) beladen. Ladungsverschiebungen wurden wie in Abbildung 33 gemessen. A-C zeigen für die jeweiligen Proben typische Messergebnisse, D zeigt die Zusammenfassung aller Amplituden (Mittelwerte \pm SEM, N=4).

3.4.2 Lysosomale aber auch Plasmamembran-Marker reichern sich in den Fraktionen C und 31/45 an

Zur qualitativen Überprüfung der in den SURFE²R-Analysen eingesetzten lysosomalen (Membran-) Fraktionen wurden diese zusammen mit je einer Probe der unfraktionierten Zellysate (Fraktion A) in einem Western Blot analysiert. In Abbildung 35 ist ein repräsentativer Western Blot von den für die SURFE²R-Messungen angefertigten Fraktion C-Präparationen dargestellt. In beiden Präparationen der Fraktion C für die SURFE²R-Messungen konnte gezeigt werden, dass sich die Fusionsproteine hCAT-2B.EGFP und SLC7A14.EGFP in der Fraktion C anreichern. Die quantitative Auswertung ergab, dass sich hCAT-2B.EGFP in der Fraktion C auf das 3,1-fache und SLC7A14.EGFP auf das 2,9-fache, bezogen auf den Gehalt in der Fraktion A, anreicherte. Der Gehalt von EGFP in der Fraktion C sank dagegen auf das 0,28-fache. Die Menge des lysosomalen Markers LAMP-1 reicherte sich in den Fraktion-C-Proben aller Zelllinien auf das etwa 1,9-fache an. Da bei SURFE²R-Messungen Verunreinigungen durch Plasmamembran stören können, wurde zusätzlich der Plasmamembranmarker Na⁺/K⁺-ATPase untersucht. Der Gehalt der Na⁺/K⁺-ATPase nahm in den Fraktion-C-Proben um das 3,2-fache (EGFP), 2,6-fache (hCAT-2B.EGFP) und 2,3-fache (SLC7A14.EGFP) zu.

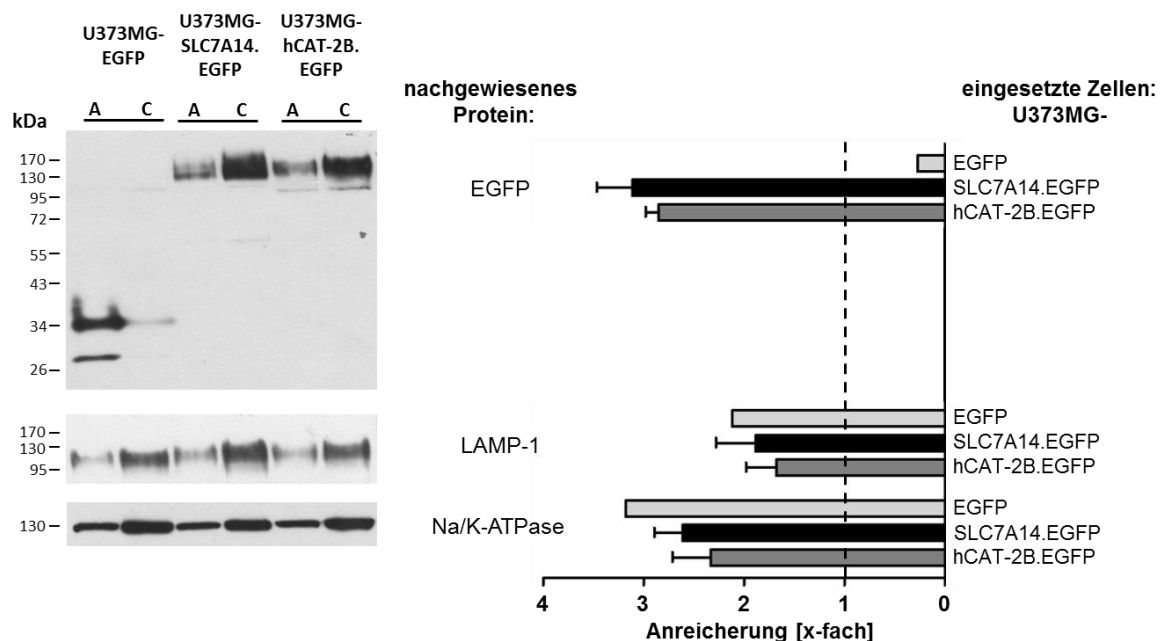


Abbildung 35: Analyse der Fraktionen A und C von U373MG-EGFP, -SLC7A14.EGFP und -CAT-2B.EGFP im Western Blot

Die speziell für Messungen am SURFE²R-Gerät präparierten Fraktionen A und C wurden wie in Abbildung 13 behandelt und im Western Blot (30 µg Protein pro Spur) auf GFP-, LAMP1- und Na/K-ATPase-Expression analysiert. Links ist ein repräsentativer Western Blot gezeigt, der Graph rechts zeigt die Anreicherungen der angegebenen Proteine in der Fraktion C im Vergleich zur Fraktion A. Die Signalintensitäten der Fraktionen A wurde für jede Zelllinie als 1 definiert und das entsprechende Signal der Fraktion C-Proben darauf bezogen. Von den Zelllinien U373MG-hCAT-2B.EGFP und -A14.EGFP wurden 2 Präparationen in getrennten Western Blots analysiert, von den U373MG-EGFP-Zellen konnte nur eine der beiden im SURFE²R eingesetzten Präparationen analysiert werden.

Auch die Fraktionen der beiden Membranpräparationen mittels eines Sucrosegradienten wurden in einem Western Blot analysiert. In Abbildung 36A ist einer der beiden Blots dargestellt. Aufgrund des fehlenden Homogenats der Zellen (Ausgangsmaterial) in einer der beiden Präparationen konnte jedoch nur ein Blot quantitativ ausgewertet werden. Beide Blots zeigten jedoch, dass sich in allen untersuchten Zelllinien die EGFP-Fusionsproteine hauptsächlich in der für die Messungen eingesetzten Fraktion 31/45 anreicherten (Abbildung 36B). LAMP-1 reichte sich in allen Fraktionen gleichermaßen an, während die Na^+/K^+ -ATPase besonders in den Fraktionen 9/31 und 31/45 vertreten war (Abbildung 36C+D). Obwohl also die Fraktion benutzt wurde, in der sich die EGFP-Fusionsproteine besonders stark anreicherten, war diese Fraktion stark mit Plasmamembran verunreinigt.

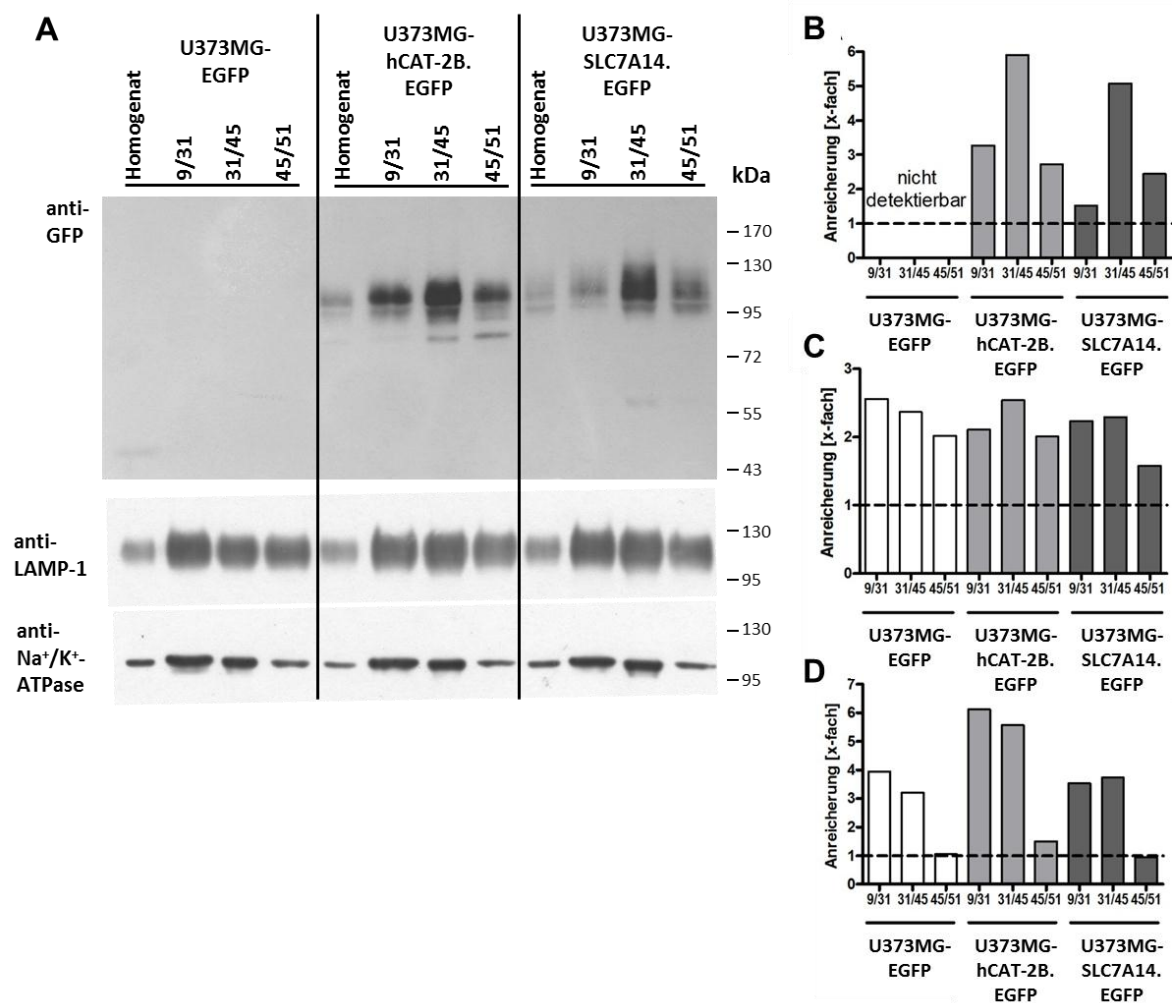


Abbildung 36: Analyse der Fraktionen der Membranpräparation von U373MG-EGFP, -SLC7A14.EGFP und -CAT-2B.EGFP-Zellen im Western Blot

Die speziell für Messungen am SURFE²R-Gerät präparierten Fraktionen des Sucrosegradienten wurden wie die Proben in Abbildung 13 behandelt und im Western Blot (10 µg Protein pro Spur) auf GFP-, LAMP1- und Na/K-ATPase-Gehalt analysiert. A zeigt einen repräsentativen Western Blot. B-D zeigt die Anreicherung der EGFP-Fusionsproteine bzw. EGFP alleine (A), von LAMP-1 (B) sowie der Na^+/K^+ -ATPase (C) in den verschiedenen Fraktionen der Zelllinien. Die Signal-Intensität aus den Homogenisierten Zellen entsprach 1.

3.5 Zeitabhängiger KAS-Transport der Fraktion C

Um die Funktion der hCAT-Familienmitglieder in intakten Lysosomen zu untersuchen, wurde die granuläre Fraktion C aus U373MG-Zellen isoliert, die verschiedene EGFP-Fusionsproteine bzw. EGFP alleine (als Kontrolle) überexprimierten (vgl. Kapitel 2.7.2). Da diese Fraktion intakte Lysosomen enthält, konnte die direkte Aufnahme von [³H]Aminosäuren gemessen werden. Dazu wurden Fraktion-C-Proben mit dem gleichen Volumen 200 µM [³H]Arginin bzw. [³H]Lysin gemischt, so dass eine Endkonzentration von 100 µM [³H]Aminosäure zustande kam. Nach einmaligem Mischen durch Auf- und Ab-pipettieren wurde direkt ein Teil der Lösung entnommen und in 4 ml eiskalten Puffer (MST) gegeben. Dadurch wurden alle Transportprozesse abgestoppt. Die komplette Lösung wurde direkt auf einen Filter gegeben und dieser sofort 3 Mal mit je 2 ml MST gewaschen. Dieser erste Zeitpunkt entsprach einer etwa 5 Sekunden dauernden Inkubation. An den Zeitpunkten 30, 60, 90 und 120 Sekunden wurde jeweils ein weiteres Aliquot des Gemischs entnommen und auf einem Filter gewaschen. Nach Lyse der auf dem Filterpapier haftenden Lysosomen in 100 µl 2% SDS und der Zugabe von 2 ml Szintillationsflüssigkeit wurde die aufgenommene Radioaktivität bestimmt. Um die unspezifische Bindung der Filterpapiere zu bestimmen, wurde nur „heiße“ Lösung in die Stopp-Lösung gegeben. Die Wasch- und Lyse-Schritte blieben gleich. Diese so erhaltenen Leerwerte wurden von allen Messwerten abgezogen.

3.5.1 Arginin-Transport der Fraktion C

Zunächst wurde der Transport von Arginin als Modells substrat der hCATs untersucht. Getestet wurden der ubiquitär exprimierte hCAT-1, der mit dem SURFE²R positiv getestete hCAT-2B sowie der ausschließlich intrazellulär lokalisierte SLC7A14 (alle als in U373MG überexprimierte EGFP-Fusionsproteine). Sowohl für hCAT-1 als auch für hCAT-2B ist bekannt, dass sie zumindest in der Plasmamembran als Transporter für kationische Aminosäuren fungieren und dabei nicht zwischen Arginin und Lysin differenzieren (Closs et al., 1997).

Während nach 5 Sekunden Inkubation noch alle Werte der Arginin-Aufnahme in einem nicht signifikant unterschiedlichen Bereich lagen, stieg die Aufnahme der EGFP-Proben nach 120 Sekunden lediglich auf 216 ± 2 fmol/µg Protein (Abbildung 37). Die Arginin Aufnahme der hCAT-1.EGFP-Proben stieg auf 404 ± 38 fmol Arginin/µg Protein (Abbildung 37A), die der hCAT-2B-Proben auf 414 ± 52 fmol/µg Protein (Abbildung 37B). Die signifikant höhere Transportaktivität der hCAT-1.EGFP- sowie der hCAT-2B-Proben im Vergleich zu den EGFP-Kontroll-Proben nach 120 Sekunden kann nur auf die Expression der hCATs zurückgeführt werden.

Lediglich die Transportaktivität der SLC7A14.EGFP-Proben unterschied sich an allen Zeitpunkten nicht signifikant von der der EGFP-Kontroll-Proben (Abbildung 37C).

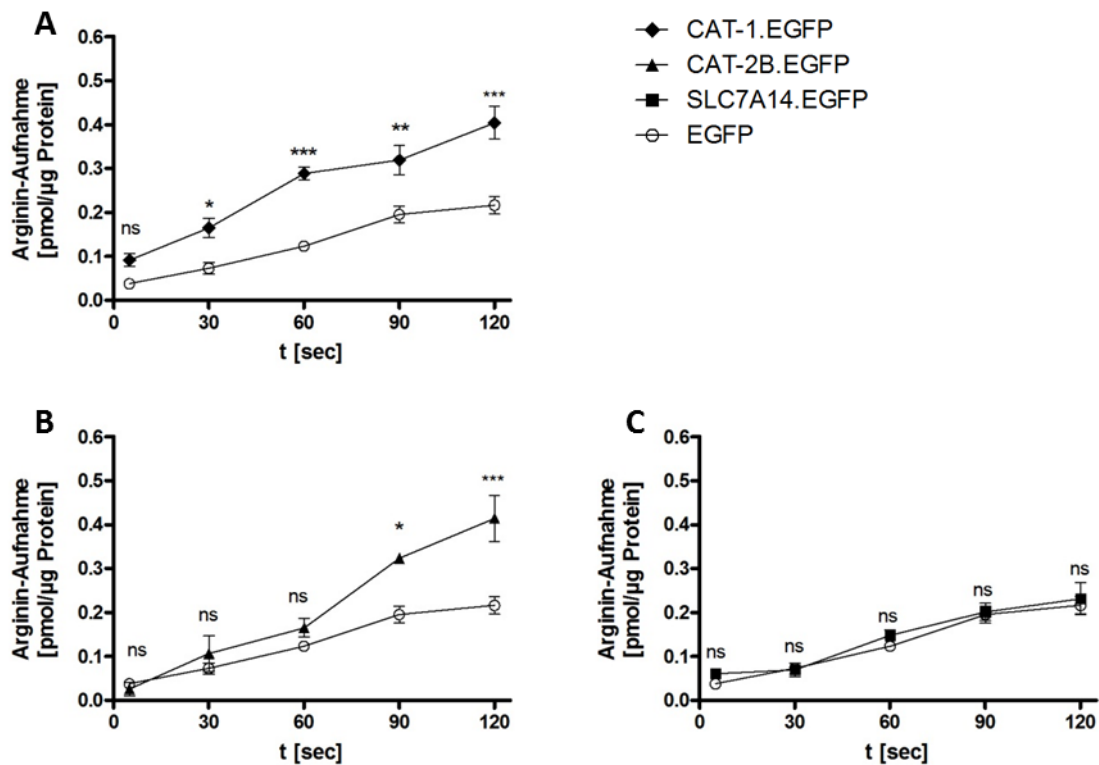


Abbildung 37: Arginin-Aufnahme der Fraktion C

Die aus verschiedenen stabil transfizierten Zelllinien isolierten und vortemperierten Fraktionen C wurden 1:1 mit 200 μM [^3H]Arginin gleicher Temperatur gemischt, so dass sich eine Endkonzentration von 100 μM [^3H]Arginin ergab. Zu jedem Zeitpunkt ab 5 Sek wurde ein Teil des Gemischs, das in einem Wasserbad (20°C) inkubiert wurde, entnommen und auf ein Filterpapier gegeben. Die auf den Filtern zurückgehaltenen Lysosomen wurden 3 Mal mit 2 ml eiskaltem MST-Puffer gewaschen, zur Lyse mit 100 μl 2% SDS versetzt und zur Messung der in die Lysosomen aufgenommenen Radioaktivität im Flüssigszintillationszähler mit 2 ml Lumasafe versetzt. Dargestellt ist die Arginin-Aufnahme der Fraktion C aus U373MG-hCAT-1.EGFP-Zellen (A), -hCAT-2B.EGFP-Zellen (B) und -SLC7A14.EGFP-Zellen (C) stets im Vergleich zur Fraktion C aus EGFP-Kontrollzellen. Von allen Messwerten wurden Werte von Filterpapieren, auf die die entsprechende Menge der in den Gemischen enthaltenen Radioaktivität gegeben worden und die ebenfalls gewaschen und mit SDS und Lumasafe versetzt worden waren, abgezogen. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM (N= 4-8) aus 2-4 Fraktion C-Präparationen. Die statistische Auswertung erfolgte mit einer Zwei-Faktoriellen-Multivarianzanalyse (Two-Way Anova) und anschließendem Bonferroni-Test (1 Stern steht für $p < 0,05$, 2 Sterne für $p < 0,01$ und 3 Sterne für $p < 0,001$; ns= nicht signifikant, jeweils bezogen auf die U373MG-EGFP-Proben).

3.5.2 Lysin-Transport der Fraktion C

Da das gemischte Disulfid (Cystein-Cysteamin), das bei der Cystinose-Therapie entsteht eher Lysin, als Arginin ähnelt, wurde auch die Aufnahme dieser Aminosäure getestet. In Abbildung 38 sind die Messwerte der hCAT-1.EGFP- (A), hCAT-2B.EGFP- (B) bzw. SLC7A14.EGFP-Proben (C), im Vergleich zu den Werten der EGFP-Kontrollproben, dargestellt. Der Lysin-Transport der hCAT-1.EGFP-Proben hatte nach 5 Sekunden mit 147 ± 41 fmol Lysin/ μ g Protein einen ähnlich niedrigen Ausgangswert wie die EGFP-Kontrollproben (123 ± 17 fmol/ μ g Protein), die Lysin-Aufnahme stieg dann aber auf 444 ± 30 fmol/ μ g Protein (Abbildung 38A). Dieser Wert war signifikant höher als der der EGFP-Proben nach 120 Sekunden (254 ± 24 fmol/ μ g Protein). Auch der Transport der hCAT-2B.EGFP-Proben lag nach 5 Sek nur bei 109 ± 38 fmol Lysin/ μ g Protein, nach 120 Sek mit 414 ± 55 fmol Lysin/ μ g Protein aber signifikant höher als der Transport der Kontrollproben (Abbildung 38B). Allein die Lysin-Aufnahme der SLC7A14.EGFP-Proben blieb mit einer Zunahme des aufgenommenen Lysins von 152 ± 32 fmol/ μ g Protein (5 Sek) auf 220 ± 31 fmol Lysin/ μ g Protein (120 Sek) im Bereich der Kontrollproben (Abbildung 38C).

hCAT-1.EGFP und hCAT-2B.EGFP vermitteln also in gleichem Maße sowohl Arginin- als auch Lysin-Transport in der lysosomalen Fraktion C. Für SLC7A14.EGFP konnte in diesem Versuchsaufbau keine Transportaktivität nachgewiesen werden.

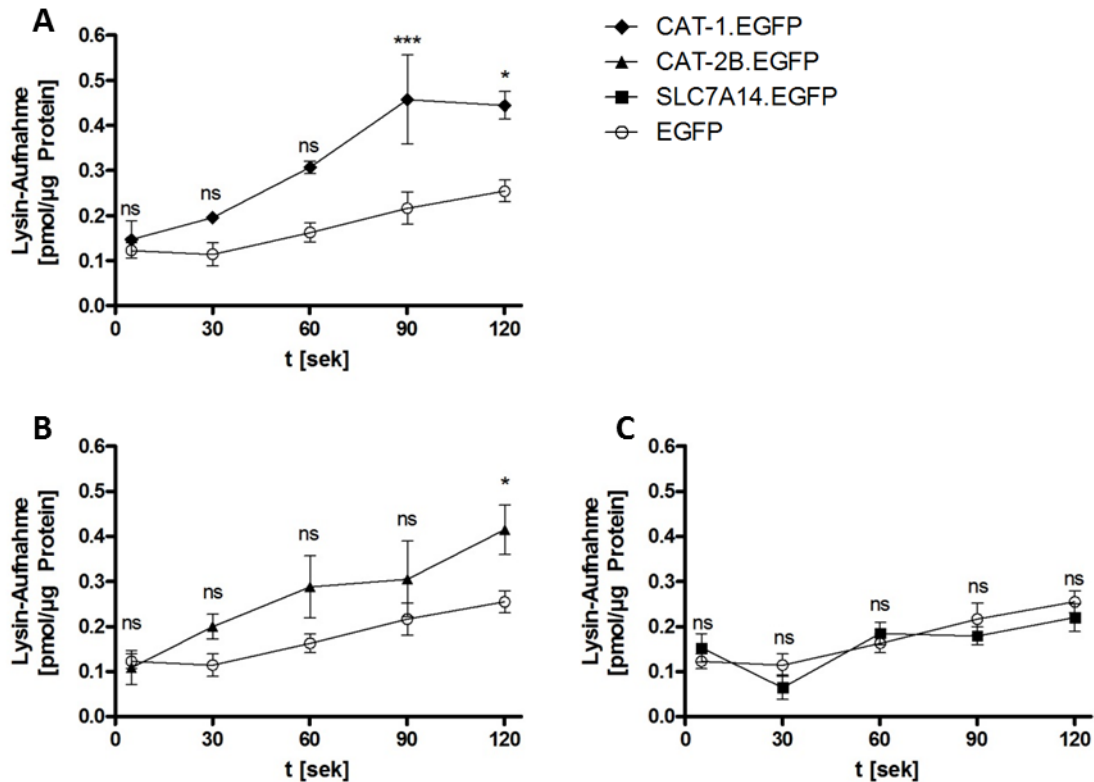


Abbildung 38: Lysin-Aufnahme der Fraktion C

Die Aufnahme von $100 \mu\text{M}$ [^3H]Lysin [$5 \mu\text{Ci/ml}$] der Fraktion C aus den angegebenen Zelllinien wurde wie in Abbildung 37 durchgeführt. Dargestellt ist die Lysin-Aufnahme der Fraktion C aus U373MG-hCAT-1.EGFP-Zellen (A), -hCAT-2B.EGFP-Zellen (B) und -SLC7A14.EGFP-Zellen (C) stets im Vergleich zur Fraktion C aus EGFP-Kontrollzellen. Von allen Messwerten wurden Werte von Filterpapieren, auf die die entsprechende Menge der in den Gemischen enthaltenen Radioaktivität gegeben worden und die ebenfalls gewaschen und mit SDS und Lumasafe versetzt worden waren, abgezogen. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM ($N=4-10$) aus 2-5 Fraktion C-Präparationen. Die statistische Auswertung erfolgte mit einer Zwei-Faktoriellen-Multivarianzanalyse (Two-Way Anova) und anschließendem Bonferroni-Test (1 Stern steht für $p < 0,05$, 2 Sterne für $p < 0,01$ und 3 Sterne für $p < 0,001$. ns= nicht signifikant, jeweils bezogen auf die U373MG-EGFP-Proben).

3.6 Falscher Alarm – SLC7A14 vermittelt keinen Histidin-Transport über die Plasmamembran

2011 wurde im Gelbfieber-Moskito *Aedes aegypti* ein Protein der SLC7-Familie untersucht, dessen Funktion bisher nicht bekannt war. Die Forscher fanden heraus, dass dieses als AaCAT1 bezeichnete Protein bei einem neutralem pH von 7,2 spezifisch Histidin transportiert, während Lysin und Arginin nicht transportiert werden (Hansen et al., 2011). Histidin ist bei neutralem pH eine ungeladene Aminosäure, während es bei pH 5 eine positive Ladung trägt. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz des AaCAT1 mit den humanen CAT-Mitgliedern ergab, dass die Sequenz des Waisenproteins SLC7A14 sogar eine höhere Ähnlichkeit zu diesem Protein aufweist als zu hCAT-1 oder -2 (Abbildung 39). Daher sollte getestet werden ob es sich bei SLC7A14 um einen Histidin-Transporter handelt. Dazu wurde Histidin-Transport in U373MG-Zellen gemessen, die SLC7A14.EGFP überexprimieren. In diesen Zellen weist SLC7A14.EGFP eine marginale Expression in der Plasmamembran auf, die möglicherweise ausreichen könnte um Transport zu vermitteln.

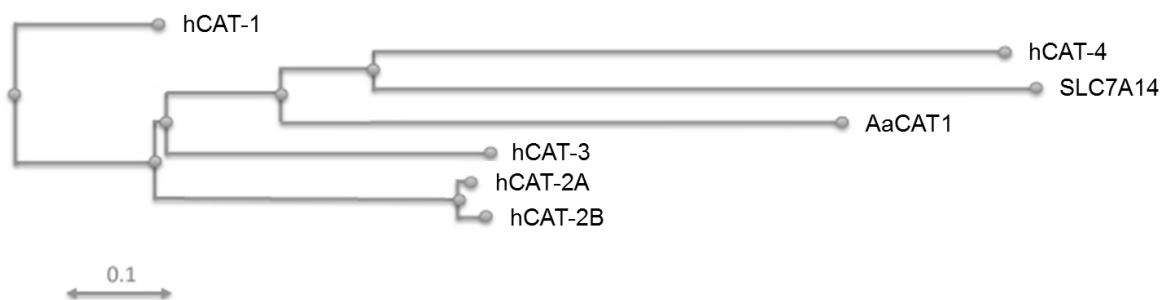


Abbildung 39: Verwandtschaftsbeziehung des Moskito-AaCAT1 mit hCAT-1, -2A und SLC7A14

Die Protein-Sequenzen von hCAT-1 (hSLC7A1), hCAT-2A (hSLC7A2A), hCAT-2B (hSLC7A2B), hCAT-3 (hSLC7A3), hCAT-4 (hSLC7A4), hSLC7A14 und aACAT-1 (AAT73699.1) wurden mit einem "Neighbor-Joining tree building algorithm" miteinander verglichen (durchgeführt von Dr. Jean-Paul Boissel). Die Skala gibt die Rate der Veränderungen pro Aminosäurerest an.

3.6.1 U373MG-SLC7A14.EGFP-Zellen zeigen erhöhten Histidin-Transport bei pH 7,5

Einen Tag, nachdem U373MG-hCAT-1.EGFP-, -SLC7A14.EGFP- und -EGFP-Zellen in 96-Loch Platten ausgesät worden waren, wurde die Aufnahme von 0,1 und 1 mM [³H]Histidin bei pH 5 und 7,5 gemessen. In U373MG-SLC7A14.EGFP kam es bei beiden getesteten Histidin-Konzentrationen zu einer signifikant höheren Histidin-Aufnahme bei pH 7,5 im Vergleich zu den EGFP-Kontrollzellen (Abbildung 40B & C). Die U373MG-hCAT-1.EGFP-Zellen zeigten unter diesen Bedingungen wie erwartet keine erhöhte Histidin-Aufnahme. Bei pH 5 kam es erwartungsgemäß bei den hCAT-1.EGFP-überexprimierenden Zellen zu einem erhöhten Histidin-Transport, während nun die SLC7A14.EGFP-überexprimierenden Zellen keinen signifikant höheren Transport zeigten (Abbildung 40C & D). Die marginale Oberflächenexpression von SLC7A14.EGFP schien also Histidin-Transport bei pH 7,5 zu vermitteln.

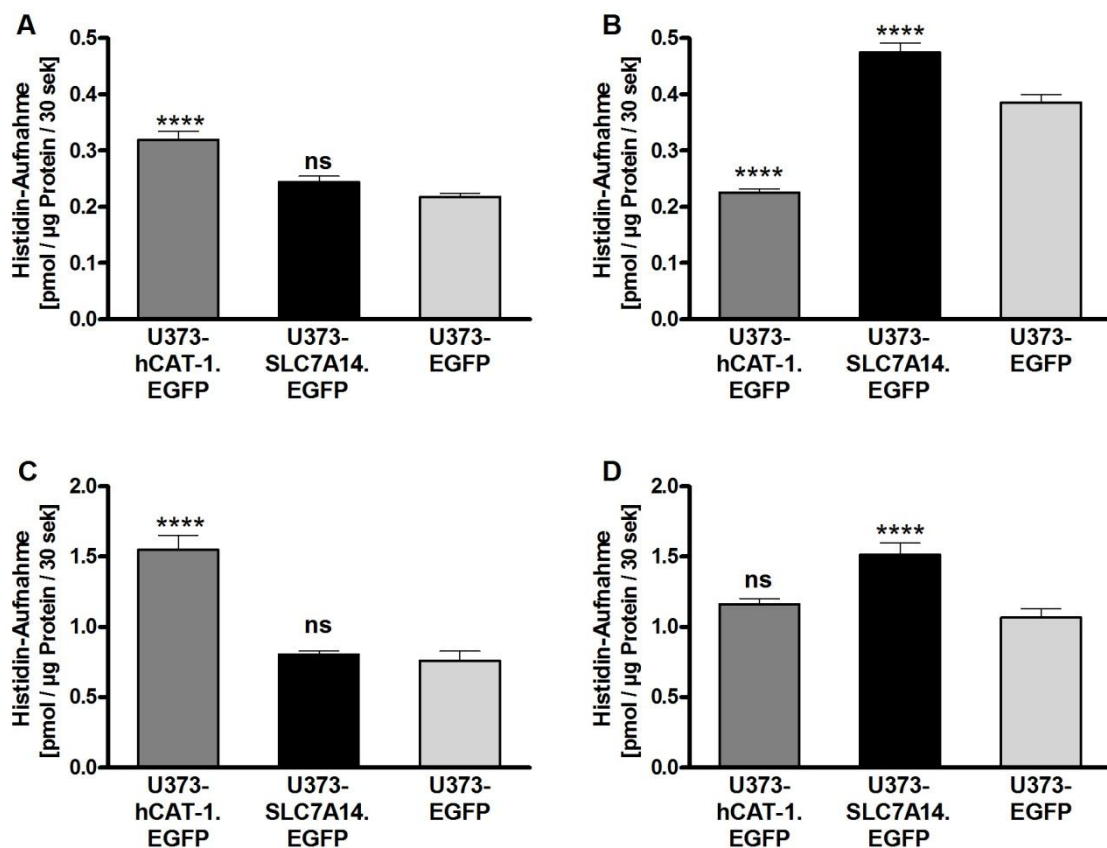


Abbildung 40: Histidin-Aufnahme in U373MG-Zellen

Aufnahme von 0,1 mM Histidin bei pH 5 (A) und 7,5 (B) bzw. 1 mM Histidin [5 µCi/ml] bei pH 5 (C) und 7,5 (D) in U373MG-Zellen, die hCAT-1.EGFP, SLC7A14.EGFP oder EGFP überexprimierten. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM (N=12). Die statistische Auswertung erfolgte mit einer One-Way Anova und anschließendem Bonferroni-Test (ns: nicht signifikant, 4 Sterne stehen für $p < 0,0001$ und bezieht sich immer auf den Transport der U373MG-EGFP-Zellen).

3.6.2 SLC7A14.EGFP-exprimierende Oozyten zeigen keinen erhöhten Histidin-Transport bei pH 7,5

Da in SLC7A14.EGFP-überexprimierenden U373MG-Zellen bei pH 7,5 ein erhöhter Histidin-Transport beobachtet werden konnte, wurden diese Bedingungen auch in *Xenopus laevis*-Oozyten überprüft. In diesem Expressionssystem ist die Oberflächenexpression von SLC7A14.EGFP vergleichbar mit der in U373MG-Zellen. Aufgrund eines besseren Verhältnisses zwischen endogenem Transport der Oozyten und Aktivität von überexprimierten Transportern ist dieses Expressionssystem jedoch besser geeignet, auch geringe Transportraten zu detektieren. Oozyten wurden mit cRNA für SLC7A14.EGFP, hCAT-1, hCAT-2A.EGFP oder EGFP injiziert. Drei Tage später wurde die Aufnahme von 1 mM [³H]Histidin bei pH 7,5 gemessen (Abbildung 41). Dabei zeigten hCAT-1-überexprimierende Oozyten eine schwache Transportaktivität, die nur etwa 1/10 der Transportaktivität von Arginin entsprach (vgl. Abbildung 18), aber signifikant höher war als der Transport der mit EGFP-cRNA injizierten Kontroll-Oozyten. Weder die Expression von SLC7A14.EGFP noch die von hCAT-2A.EGFP führten zu einem signifikant höheren Histidin-Transport als der der EGFP-Kontroll-Oozyten.

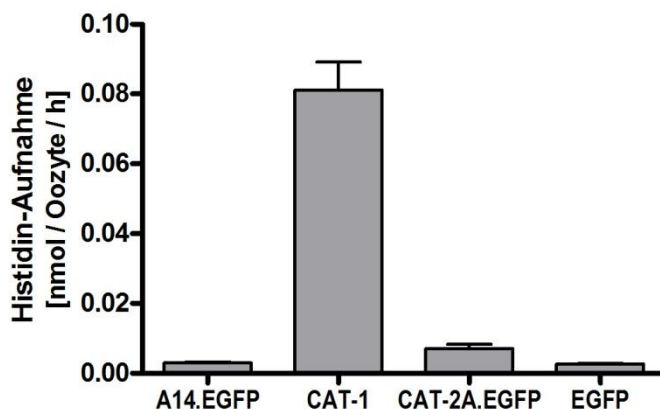


Abbildung 41: Histidin-Aufnahme in *X. laevis*-Oozyten

Aufnahme von 1 mM Histidin [10 μ Ci/ml] bei pH 7,5 in Oozyten, die 3 Tage zuvor mit 10ng cRNA für SLC7A14.EGFP, hCAT-1, hCAT-2A.EGFP oder EGFP injiziert worden waren. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM (N=6-8).

3.6.3 Der Na⁺-unabhängige Histidin-Transport in U373MG-SLC7A14.EGFP-Zellen wird durch Leucin gehemmt

Um den Histidin-Transport in den U373MG-SLC7A14.EGFP weiter zu charakterisieren, wurde die Aufnahme von 0,1 mM [³H]Histidin in An- und Abwesenheit von Natrium und 1 mM Leucin gemessen. Dieser Versuchsaufbau zeigte, dass der Histidin-Transport in die U373MG-A14.EGFP Natrium-unabhängig war (102 ± 20 in An- und 107 ± 30 fmol Histidin/ μ g Protein/30sek in Abwesenheit von Natrium). Durch Zugabe der 10-fachen Menge Leucin (1 mM) wurde die Histidin-Aufnahme in Anwesenheit von Natrium auf 18% (19 ± 2 fmol Histidin/ μ g Protein/30sek) in Abwesenheit von Natrium auf 9% (10 ± 2 fmol Histidin/ μ g Protein/30sek) reduziert. Der Unterschied der Transportwerte in An- und Abwesenheit von Natrium bei Zugabe von Leucin war jedoch nicht signifikant. Die Hemmung durch Leucin ist also nicht anhängig von der An- bzw. Abwesenheit von Natrium.

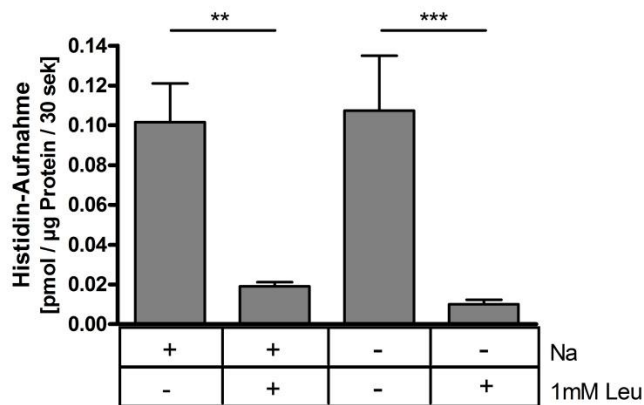


Abbildung 42: Histidin-Transport in U373MG-A14.EGFP-Zellen in An- bzw. Abwesenheit von Natrium und Leucin

Aufnahme von 0,1 mM Histidin [10μ Ci/ml] in U373MG-A14.EGFP-Zellen bei pH 7,5 in An- bzw. Abwesenheit von Natrium und 1mM Leucin Die Transportwerte von EGFP-Kontrollzellen unter jeweils gleichen Bedingungen ($0,4 [+Na^+]$ bzw. $0,06$ pmol/ μ g Protein/30sek $[-Na^+]$) waren unbeeinflusst durch die Anwesenheit von Leucin und wurde von den entsprechenden Messwerten der U373MG-A14.EGFP-Zellen abgezogen. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM (N=8). Die statistische Auswertung erfolgte mit einer One-Way Anova und anschließendem Bonferroni Test (2 Sterne stehen für $p < 0,01$, 3 Sterne für $p < 0,001$).

3.6.4 U373MG-SLC7A14.EGFP-Zellen zeigen eine erhöhte LAT1-Expression

Da Histidin bei pH 7,5 als neutrale Aminosäure vorliegt und die Eigenschaften eines Natrium-unabhängigen, durch Leucin hemmbaren Transports charakteristisch für die beiden Isoformen der heterodimeren Aminosäuretransporter LAT1 und 2 sind (Pineda et al., 1999; Kanai et al., 1998), wurde deren Expression in den in den Transportstudien verwendeten U373MG-Linien, sowie in nativen U373MG, untersucht. Bis auf U373MG-hCAT-1.EGFP wurden von allen Zelllinien zwei unabhängige RNA-Präparationen bzw. RNA-Präparationen zweier verschiedener Klone untersucht. In der Zelllinie, die SLC7A14.EGFP überexprimierte, wurde eine 6-fach erhöhte LAT1 Expression im Vergleich zu allen anderen Zelllinien detektiert (U373MG, U373MG-EGFP Klon 1 & Klon 6 und U373-hCAT-1.EGFP Klon 3) (Abbildung 43A).

Die LAT-2 Expression war in allen getesteten Zelllinien und RNA-Präparationen etwa 100-fach niedriger als die des LAT1 und lag in allen getesteten Zelllinien in etwa auf dem gleichen Niveau (Abbildung 43B).

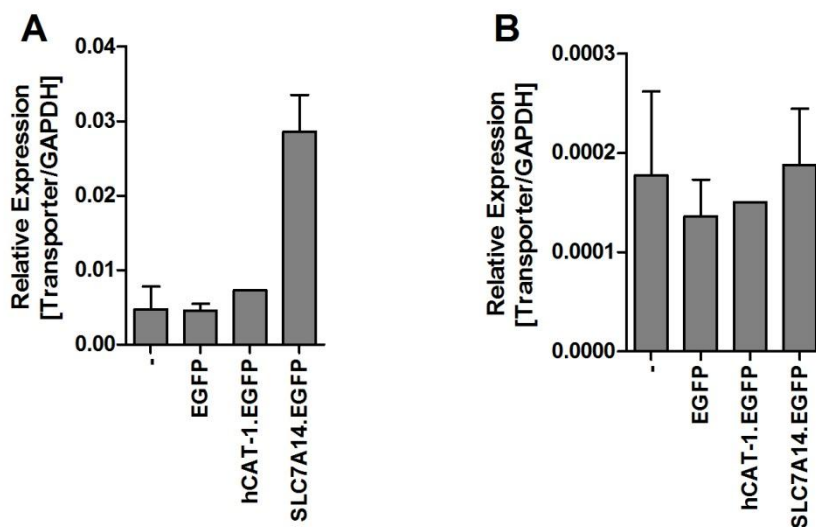


Abbildung 43: qRT-PCR-Analyse von RNA verschiedener U373MG-Klone auf LAT1 und LAT2-Expression

Gesamt-RNA wurde aus nativen (-) bzw. aus U373MG-Zellen, die das jeweils angezeigte Protein überexprimierten isoliert und in einer quantitativen RT-PCR auf LAT1 (A) und LAT2-Expression überprüft. Die Expression der Transporter wurde auf die Expression der GAPDH als Haushaltsgen bezogen (GAPDH=1). Es wurden je zwei RNA-Präparationen der gleichen Zelllinie bzw. zwei Präparationen verschiedener Klone (hCAT-1) getestet.

3.7 Generierung eines Antikörpers gegen SLC7A14

Endogene Expression von SLC7A14 konnte aufgrund eines fehlenden spezifischen Antikörpers bisher nur auf RNA-Ebene, die Lokalisation des Proteins nur in Überexpressionssystemen in Fusion mit Fluoreszenzproteinen untersucht werden. Um endogene Expression auch auf Protein-Ebene verifizieren, sowie Daten zum endogenen Verteilungsmuster innerhalb der Zelle erheben zu können, wurde ein polyklonaler Antikörper gegen den C-Terminus des humanen SLC7A14-Proteins generiert.

3.7.1 Wahl der Peptide

Für die Immunisierung von Kaninchen wurden mithilfe des Computerprogramms Antigen Profiler™ von Thermo Fisher Scientific Proteinsequenzen aus dem cytoplasmatischen, C-terminalen Ende des SLC7A14-Proteins ausgewählt (Abbildung 44). Der cytoplasmatische C-Terminus eines Membranproteins wird oft für Immunisierungen eingesetzt, weil dieser auch als kurzes Peptid den nativen Zustand des Proteins wieder spiegelt. Zusätzlich ist die Wahrscheinlichkeit einer guten Zugänglichkeit dieses Proteinteil auch im nativen Zustand für den Antikörper hier am größten. Dies ist wichtig, falls der Antikörper für immunohistochemische Versuche eingesetzt werden soll. Das Programm berücksichtigte dabei den voraussichtlichen Synthese-Erfolg, die Löslichkeit sowie die Antigenität. Die Kriterien für die Auswahl von zwei der vier vorgeschlagenen Peptiden zur Immunisierung wurden nach den „Tips for designing a good peptide immunogen“ von der Firma Abcam, sowie der Veröffentlichung „Design of useful peptide antigens“ (Angeletti, 1999) festgelegt. So wurde darauf geachtet, dass in den Peptiden möglichst viele Proline (P), Tyrosine (Y) und Lysine (K) vorhanden waren. Die gewählten Sequenzen entsprachen den in Abbildung 44 angegebenen Sequenzen 2 und 4 und wurden N-terminal mit einem Cystein versehen. Somit wurden von der Firma Eurogentec die Peptide EP112155 (H₂N - CEE GFS YAT EGE SQE DWG GPT EDK GFY YQ - COOH) und EP112156 (H₂N - CSS KAK SKS KHK QNS EAL IAN DEL DYS PE - COOH) synthetisiert und zur Immunisierung eingesetzt.

```

STLEISAREEALHQSTYQRYDVDDPFSVEEGFSYATEGESQEDWGG
      1                               2
PTEDKGFYYQQMSDAKANGRTSSKAKSKSKHKQNSEALIANDEL DY
      3                               4
SPE

```

Abbildung 44: Proteinsequenz des C-Terminus von SLC7A14

Gezeigt ist die Proteinsequenz (Einbuchstabencode) von SLC7A14 ab Aminosäure 654, also hinter der letzten vorhergesagten Transmembrandomänen. Die mit durchgezogenen und unterbrochenen Linien markierten Bereiche kennzeichnen die vier von dem Computerprogramm Antigen Profiler™ von Thermo Fisher Scientific für eine Immunisierung vorgeschlagenen Peptide.

Die Synthese der Peptide sowie die Immunisierung von zwei Kaninchen wurden von der Firma Eurogentec (Seraing/Belgien) durchgeführt. Der Zeitplan der Immunisierung ist in Tabelle 8 dargestellt. Immunisiert wurde zu jedem angegebenen Zeitpunkt (Immunisierung/Boost) mit 250 µg jeden Peptids pro Kaninchen. Aufgrund eines fehlenden spezifischen Signals wurde ein Kaninchen (SA7085) nach dem Standardprogramm eingeschläfert.

Tabelle 8: Immunisierungsplan des Kaninchens SA7086

	Datum	Tag des Zeitplans:	
Präimmunblutung (PPI)	05.09.11	d=0	Standardprogramm
Erste Immunisierung			
Boost Nr. 1	19.09.11	d=14	
Boost Nr. 2	03.10.11	d=28	
Testblutung Nr. 1 (PP1)	13.10.11	d=38	
Boost Nr. 3	31.10.11	d=56	
Testblutung Nr. 2 (PP2)	10.11.11	d=66	Verlängerungsprogramm
Boost Nr. 4	05.12.11	d=91	
Testblutung Nr. 3 (PP3)	15.12.11	d=101	
Boost Nr. 5	02.01.12	d=119	
Testblutung Nr. 4 (PP4)	12.01.12	d=129	
Boost Nr. 6	30.01.12	d=147	
Testblutung Nr. 5 (PP5)	09.02.12	d=158	
Boost Nr. 7	27.02.12	d=175	
Testblutung Nr. 6 (PP6)	08.03.12	d=185	
Finale Entblutung (PP7)	22.03.12	d=199	

3.7.2 Testung der Immunseren

Eine erste Testung der Seren erfolgte nach dem Ende des 8-wöchigen Standardprogramms. Dazu wurden Lysate von Überexpressionssystemen genutzt. Lysate aus *X. laevis*-Oozyten, die mit SLC7A14.EGFP-cRNA injiziert worden waren, sowie SLC7A14.EGFP-überexprimierende U373MG-Zellen fungierten als Positiv-, Lysate aus nicht injizierten Oozyten sowie U373MG-EGFP-Zellen als Negativ-Kontrollen (je 20µg Gesamtprotein pro Spur). Für diese erste Testung wurde ein 12,5%iges Acrylamid-Trenngel benutzt und darauf geachtet, dass die Laufmittelfront noch im Gel war. So konnte überprüft werden, ob die Seren unspezifische Signale produzierten.

In Abbildung 45 ist der Western Blot für das Präimmunserum (PPI), sowie die Testseren 1 (PP1) und 2 (PP2) des Tiers mit der Kennung SA7086 abgebildet. Die Seren wurden in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt, der Peroxidase-konjugierte Zweitantikörper

(Anti-Kaninchen) in der Verdünnung 1:15.000. Sowohl bei den Lysaten aus SLC7A14.EGFP-exprimierenden Oozyten, als auch aus U373MG-SLC7A14.EGFP-Zellen konnte durch die Immunsereen PP1 und PP2 ein spezifisches Signal bei etwa 130 kDa detektiert werden. Das Präimmunsereum detektierte nur bei den Lysaten aus humanen Zellen unspezifische Banden (bei etwa 80 kDa und bei etwa 50 kDa), deren Intensität im Laufe der Immunisierung aber nur leicht zunahm, während das spezifischen Signal sehr viel ausgeprägter wurde.

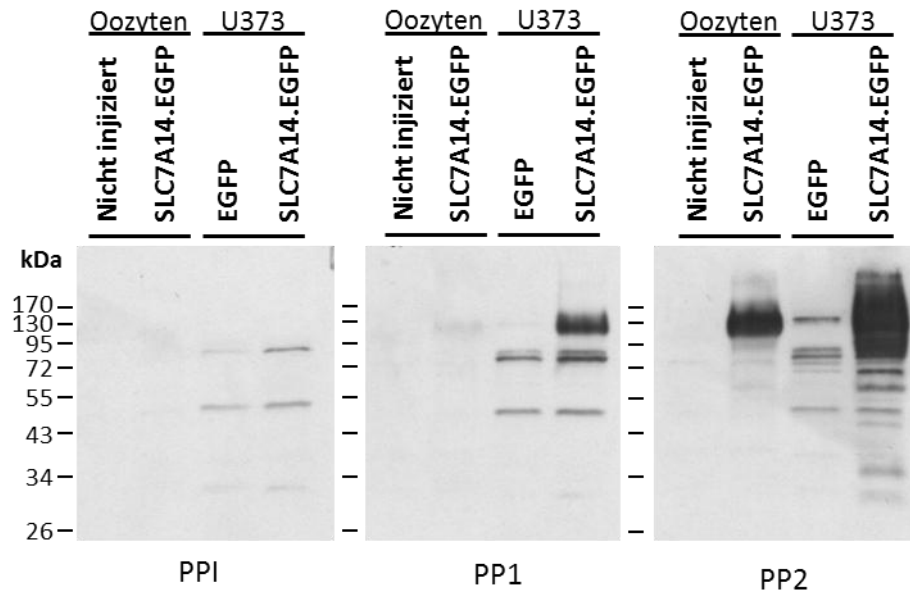


Abbildung 45: Testung der Seren des Standardprogramms an Überexpressionssystemen

Proteine aus Lysaten von nicht injiziert, bzw. SLC7.A14.EGFP-exprimierenden *X. laevis*-Oozyten (10ng cRNA injiziert, 3 Tage Expression), sowie Lysate aus U373MG.EGFP- und U373MG-A14.EGFP-Zellen wurden in einer SDS-PAGE (Trenngel 12,5% Acrylamid) aufgetrennt (je 20µg Gesamtprotein/Spur) und per Western Blot analysiert. Als Primärantikörper wurden hier Seren eines Kaninchens eingesetzt. PPI ist das Präimmunsereum, PP1 und 2 sind Seren, die entnommen wurden nachdem das Kaninchen 2 bzw. 4 Mal mit den in Abbildung 44 gezeigten Peptiden immunisiert worden war. Die Seren wurden je 1:5000, der Peroxidase-konjugierte (POD-konj.) anti-Kaninchen-IgG-Antikörper 1:15.000 eingesetzt. Die Antikörperbehandlung fand nach dem Standardprotokoll statt, sowohl die Belichtungs- (10 Sekunden) als auch die Entwicklungsdauer waren sehr kurz.

Das humane SLC7A14-Protein besteht aus 771 Aminosäuren. Verschiedene Programme (z.B. der „Protein Molecular Weight Calculator“ von Science Gateway) geben für SLC7A14 ein Molekulargewicht von etwa 84 kDa an. Das EGFP-Fusionsprotein verfügt aufgrund des zusätzlichen Gewichts des EGFPs von etwa 27 kDa demnach über ein Molekulargewicht von 111 kDa. Dass das Signal der Fusionsproteine oberhalb der errechneten Größe liegt, könnte durch eine Glykosylierung des Proteins zustande kommen. Um zu überprüfen ob SLC7A14 glykosyliert vorliegt, wurde nicht (-) und mit N-Glykosidase behandeltes (+) Lysat von U373MG-SLC7A14.EGFP in einem Western Blot mit einem GFP-Antikörper analysiert (Abbildung 46). Das aufgrund des niedrigprozentigen Trenngels (7,5% Acrylamid) sehr breite Signal der glykosylierten

Proben lag zwischen der 95- und der 130-kDa-Bande des Markers. In der Glykosidase-behandelten Probe war das Signal schmäler und lag bei etwa 90 kDa. Dieser Versuch zeigte, dass SLC7A14 in humanen Zellen glykosyliert vorliegt. Das Laufverhalten hydrophober Membranproteine ist nicht immer klar vorhersagbar, da sie aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften mehr SDS einlagern und daher mehr Ladungen aufweisen. Dies führt in einer Western-Blot Analyse zu einem Signal bei einem niedrigeren Molekulargewicht, als errechnet. Daher stellt die Veränderung des Laufverhaltens nach einer Deglykosylierung eine gute Kontrolle der spezifischen Banden dieser Glykoproteine dar. Dies ist insbesondere bei Analysen endogener Proteine wichtig. In den folgenden Testungen der Immunsereen, konnte also der Vergleich glykosylierter mit deglykosylierten Proben zur Identifizierung und Verifizierung spezifischer Signale eingesetzt werden

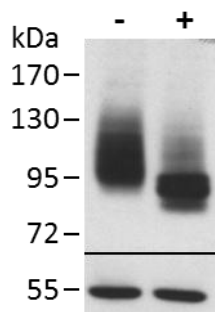


Abbildung 46: Detektion des SLC7A14.EGFP ohne und mit Behandlung mit N-Glykosidase

Lysate von U373MG, die SLC7A14.EGFP überexprimieren, wurden nicht (-) oder für 45 Minuten (+) mit dem Enzym N-Glykosidase F (Roche) behandelt, anschließend über eine SDS-PAGE (Trenngel 7,5% Acrylamid) aufgetrennt (30 µg Gesamtprotein/Spur), auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit GFP (oben) sowie β -Tubulin-Antikörpern (Ladekontrolle, unten) behandelt.

Das Serum PP2 wurde nach erfolgreicher Testung an Überexpressionssystemen zusätzlich an Lysaten humaner Hautfibroblasten sowie HUVECs in einer Verdünnung von 1:10.000 getestet. In diesen beiden Zelltypen konnte in vorangegangenen Versuchen auf mRNA-Ebene eine SLC7A14-Expression nachgewiesen werden (vgl. Abbildung A. 4). In beiden Lysaten konnte in der mit N-Glykosidase behandelten Probe eine spezifische Bande bei etwa 70 kDa ausgemacht werden, die im unbehandelten Lysat nicht zu sehen war. In diesem war dagegen eine Bande bei etwa 110 kDa zu erkennen, die wiederum in der deglykosylierten Probe fehlt. Diese Verschiebung des Signals durch die Glykosidase-Behandlung ließ auf ein SLC7A14-spezifisches Signal schließen. Dass das Signal der glykosylierten Probe sehr viel schwächer war, als das der deglykosylierten, kann darauf zurückgeführt werden, dass glykosylierte Proteine meist eine breitere Banden ergeben, die gleiche Menge Protein also auf einer größeren Fläche verteilt ist und daher weniger Intensität erzeugt.

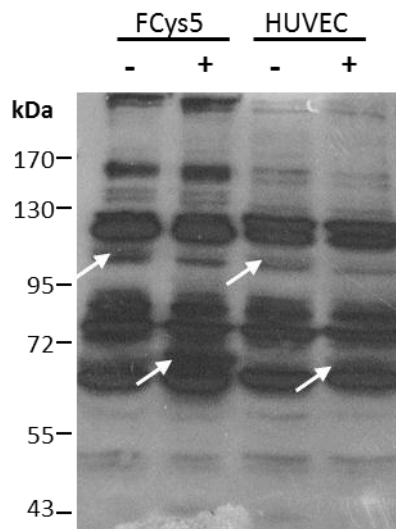


Abbildung 47: Testung des Serum PP2 an Lysaten von Zellen mit endogener SLC7A14-Expression

Lysate humaner Hautfibroblasten (FCys5) sowie humaner Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVEC) wurden nicht (-) oder für 45 Minuten mit N-Glykosidase behandelt (+). Die Proteine (je 30µg Gesamtprotein/Spur) wurden in einer SDS-PAGE (Trenngel 7,5% Acrylamid) aufgetrennt und per Western-Blot analysiert. Als Primärantikörper diente das Serum PP2 (vgl. Abbildung 45) in der Verdünnung 1:10.000. Der Zweitantikörper (POD-konj. anti-Kaninchen-IgG) wurde 1:15.000 eingesetzt.

Die weiteren, im Rahmen des Verlängerungsprogramms gewonnenen Seren wurden ausschließlich an Lysaten der humanen Hautfibroblasten FCys5 (Abbildung 48A) und MW26 (Abbildung 48B) getestet. Im Laufe der Verlängerungen wurde das Signal des glykosylierten Proteins immer deutlicher. Auf der Höhe des spezifischen Signals in der deglykosylierten Probe schien zusätzlich ein unspezifisches Signal zu liegen. Insgesamt nahm die Stärke der unspezifischen Banden zwar ab (besonders bei den FCys5-Lysaten), der unspezifische Hintergrund der gesamten Membran verstärkte sich jedoch massiv, so dass im Fall der Abbildung 48A nur ein sehr kurz belichteter Film, im Fall der Abbildung 48 B nur eine stark aufgehellte Abbildung gezeigt werden kann.

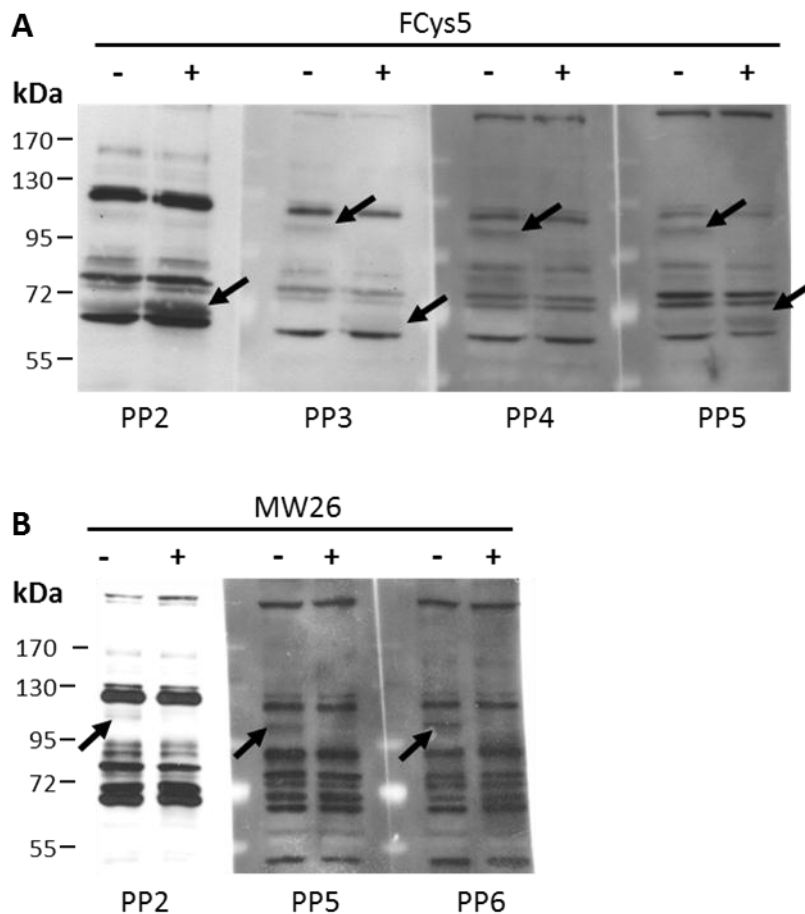


Abbildung 48: Testung der Seren PP2-PP6 an Lysaten humaner Hautfibroblasten

Lysate der humanen Hautfibroblasten FCys5 (A) bzw. MW26 (B) wurden nicht (-) oder für 45 Minuten mit N-Glykosidase behandelt (+). Die Proteine (je 30µg Gesamtprotein/Spur) wurden in einer SDS-PAGE (Trenngel 7,5% Acrylamid) aufgetrennt und per Western-Blot analysiert. Als Primärantikörper dienten Seren verschiedener Testblutungen (PP2-5) in der Verdünnung 1:10.000. Der Zweitantikörper (POD konj. anti-Kaninchen-IgG) wurde 1:15.000 eingesetzt. Die Belichtungszeit betrug 1 Minute mit anschließender sehr kurzer Entwicklungszeit.

Aufgrund des starken Gesamthintergrunds und der doch recht zahlreichen unspezifischen Banden wurde das Serum der finalen Blutung (PP7) von der Firma Eurogentec aufgereinigt. Die Affinitätsaufreinigung erfolgte in zwei Ansätzen, wobei pro Ansatz eins der beiden zur Immunisierung benutzten Peptide benutzt wurde. Die Peptide wurden jeweils über die freie Thiolgruppe des N-terminalen Cysteins an eine Sepharosematrix-Säule gekoppelt. Dann wurden die Säulen mit dem Serum beladen und mit PBS gewaschen bis die Absorption (280 nm) des Puffers bei Null lag. Die Antikörper wurden mit einem Glyzin-Puffer (100 mM Glyzin pH 2,5) eluiert und das Eluat sofort in 1/10 Volumen Neutralisationspuffer (1,5 M Tris pH 8,5) neutralisiert, so dass der pH etwa bei 7 lag. Anschließend wurden die Antikörper über Nacht gegen PBS dialysiert. Am nächsten Tag wurde dann noch 0,01% Thiomersal (zur Konservierung) und 1 mg/ml BSA zugegeben. Genauere Informationen zur Aufreinigung konnten aus Vertraulichkeitsgründen von

Eurogentec nicht herausgegeben werden. Die mit dem Peptid EP112155 aufgereinigten Antikörper wurden mit „anti-A14 aff.pur.EP55“, die mit EP112156 aufgereinigten Antikörper mit „anti-A14 aff.pur.EP56“ bezeichnet.

Das finale Serum PP7 sowie die aufgereinigten Antikörper wurden an Lysaten von FCys5 sowie MW26 (beides humane Hautfibroblasten; vgl. Abbildung 48) getestet. Basierend auf in unserer Arbeitsgruppe vorhandenen Erfahrungen mit der Produktion von Antikörpern, wurden die aufgereinigten Antikörper mit 1:1000 in einer höheren Konzentration eingesetzt als das Rohserum (1:10.000). Beide Affinitätsaufreinigungen konnten den insgesamt sehr dunklen Hintergrund stark verringern (Abbildung 49), jedoch nur der Antikörper aff.pur.EP56 zeigte noch ein spezifisches Signal. Dies konnte sowohl an den FCys5 als auch an den MW26-Lysaten beobachtet werden.

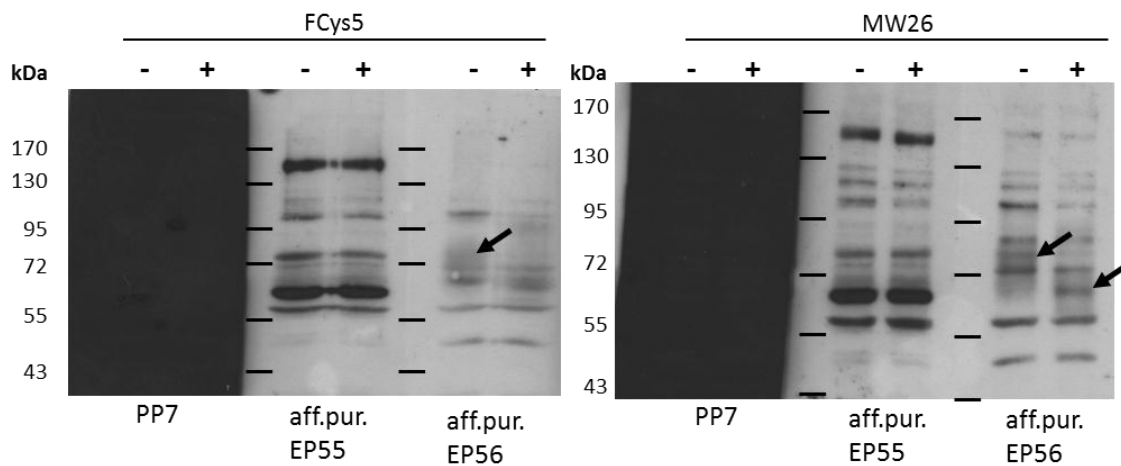


Abbildung 49: Testung des Serums PP7 und der aus ihm aufgereinigten Antikörper

Lysate der humanen Hautfibroblasten FCys5 (A) bzw. MW26 (B) wurden nicht (-) oder für 45 Minuten mit N-Glykosidase behandelt (+). Die Proteine (je 30µg Gesamtprotein/Spur) wurden in einer SDS-PAGE (Trenngel 7,5% Acrylamid) aufgetrennt und per Western-Blot analysiert. Als Primärantikörper diente das Serum der finalen Blutung (PP7) sowie aus diesem Serum mit den Peptiden der Immunisierung (EP112155 kurz EP55 bzw. EP112156 kurz EP56) aufgereinigte Antikörper. Das Serum wurde in der Verdünnung 1:10.000, die aufgereinigten Antikörper 1:1000 eingesetzt. Der Zweitantikörper (POD konj. anti-Kaninchen-IgG) wurde 1:15.000 eingesetzt. Die Belichtungszeit betrug 10 Minuten. Bei den mit PP7 behandelten Membranen überwog auch bei sehr kurzer Belichtungszeit der schwarze Hintergrund.

Um die Bedingungen für den anti-A14 aff.pur.EP56 noch genauer auszutesten, wurde ein Western Blot mit Proben aus MW26-Fibroblasten angefertigt und mit drei verschiedenen Konzentrationen dieses Antikörpers behandelt (Abbildung 50). Nach einer 1-minütigen Belichtungszeit (A) konnte bei einer Verdünnung von 1:100 ein klares Signal detektiert werden. Die Verdünnung 1:500 ergab ein schwaches, die Verdünnung 1:1000 ein fast nicht zu erkennendes Signal. Nach 5-minütiger Belichtung (B) überwog bei der 1:100-Verdünnung schon der Hintergrund, während das Signal der 1:1000-Verdünnung immer noch verhältnismäßig schwach war. Die 1:500-Verdünnung zeigte also das beste

Verhältnis zwischen Hintergrund und spezifischem Signals. Hier wurde im Gegensatz zu den vorherigen Western Blots ein 10%iges Acrylamid-Gel verwendet. Es fällt auf, dass die Bande des deglykosylierten Proteins sehr viel näher an einer unspezifischen Bande liegt als bei den zuvor verwendeten 7,5%igen Trenngelen.

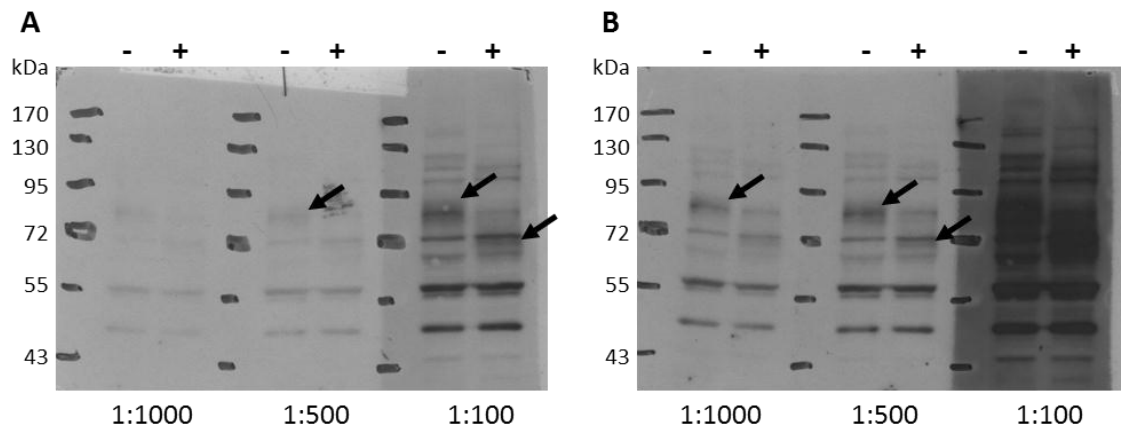


Abbildung 50: Testung verschiedener Konzentrationen des anti-A14 aff.pur.EP56

Lysate der humanen Hautfibroblasten MW26 wurden nicht (-) oder für 45 Minuten mit N-Glykosidase behandelt (+). Die Proteine (je 30µg Gesamtprotein/Spur) wurden in einer SDS-PAGE (Trenngel 10% Acrylamid) aufgetrennt und per Western-Blot analysiert. Als Primärantikörper dient der Antikörper anti-A14 aff.pur.EP56 in den angegebenen Verdünnungen. Der Zweitantikörper (POD konj. anti-Kaninchen-IgG) wurde 1:15.000 eingesetzt. Die Belichtungszeit betrug 1 Minute (A) bzw. 5 Minuten (B).

3.8 Endogener SLC7A14 reichert sich in der granulären Fraktion C an

Mit dem neu generierten Antikörper gegen SLC7A14 wurden erste Versuche zur endogenen Expression und Lokalisation durchgeführt. Während der Testung der Immunseren konnte generell schon die Expression des SLC7A14-Proteins in humanen Hautfibroblasten von zwei Spendern (FCys5 und MW26) bestätigt werden. Aus den humanen Hautfibroblasten FCys5 wurde über eine differenzielle Zentrifugation die granuläre Fraktion C isoliert (vgl. Kapitel 2.7.2). Da diese Primärzellen sehr langsam wachsen, konnte nur eine sehr geringe Menge Zellen und somit Fraktion C gewonnen werden. Für eine Western Blot-Analyse wurden je 10 µg Gesamtprotein von Fraktion A und C jeweils nicht oder für 45 Minuten mit N-Glykosidase behandelt und in einer 7,5%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine wurde die Membran zunächst mit einer 1:500 Verdünnung des anti-A14 aff.pur.EP56 analysiert. Anschließend wurde die Membran mit anti-LAMP-1 und anti-β-Tubulin behandelt. Sowohl endogener SLC7A14, als auch das lysosomale Markerprotein LAMP-1 reicherten sich in der Fraktion C an (Abbildung 51A). Der Gehalt von SLC7A14 in der Fraktion C lag bei dem 3,7-fachen, der Gehalt von LAMP-1 beim 2,5-fachen der Fraktion A. Der Gehalt des cytoplasmatisch lokalisierten β-Tubulin nahm auf das 0,46-fache ab (Abbildung 51B). Ausgewertet wurden nur die glykosylierten Banden, da die Effizienz der Deglykosylierung nicht immer konstant war.

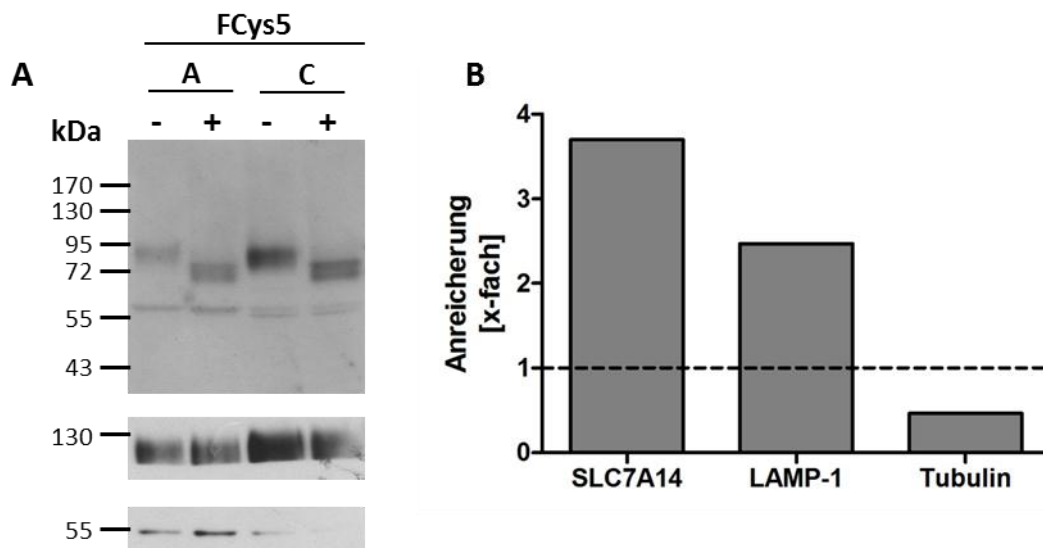


Abbildung 51: Nachweis des SLC7A14 in den Fraktionen A und C aus humanen Hautfibroblasten

Aus den humanen Hautfibroblasten FCys5 wurde die granuläre Fraktion C isoliert und in RIPA lysiert. Eine Probe der als Ausgangsmaterial dienenden homogenisierten Zellen (Fraktion A) wurde identisch behandelt. A) Je 10 µg Gesamtprotein wurde nicht (-) oder für 45 Minuten mit N-Glykosidase behandelt (+), in einer SDS-PAGE (Trenngel: 7,5% Acrylamid) aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit Kaninchen anti-A14 aff.pur.EP56 (1:500; oben), Kaninchen anti-LAMP-1 (mitte) und Maus anti-Tubulin (unten) behandelt. B) Quantitative Auswertung der glykosylierten Banden des in A gezeigten Western Blots. Angegeben ist also die X-fache Anreicherung bezogen auf die Fraktion A (=1).

3.9 SLC7A14 wird in mit Retinsäure behandelten NT2-Zellen heraufreguliert

Humane NT2 Teratokarzinomzellen können durch eine 6-wöchige Behandlung mit Retinsäure zu Neuronen (NT2N) ausdifferenziert werden (Andrews, 1994). Vorangegangene Arbeiten ergaben, dass durch die Behandlung schon nach etwa 10 Tagen die Expression des SLC7A4 induziert wird, während die Expression der in unbehandelten NT2-Zellen vorkommenden SLC7 Mitglieder hCAT-1 und -3 herunterreguliert wird. (Wolf et al., 2002). In einer qRT-PCR Analyse konnte zusätzlich auch die Induktion des SLC7A14 auf der Transkriptionsebene nachgewiesen werden (Abbildung A. 3). Mithilfe des neu generierten Antikörpers gegen SLC7A14 konnte auch auf Proteinebene eine Induktion des SLC7A14-Proteins gezeigt werden. Sieben Tage nach Beginn der Retinsäurebehandlung (10 μ M Retinsäure in DMEM/Ham's F12) war bereits ein deutliches Signal zu erkennen, das nach 14-tägiger Behandlung noch einmal stark zunahm. Eine Quantifizierung war aufgrund des fehlenden Signals in den unbehandelten Zellen nicht möglich.

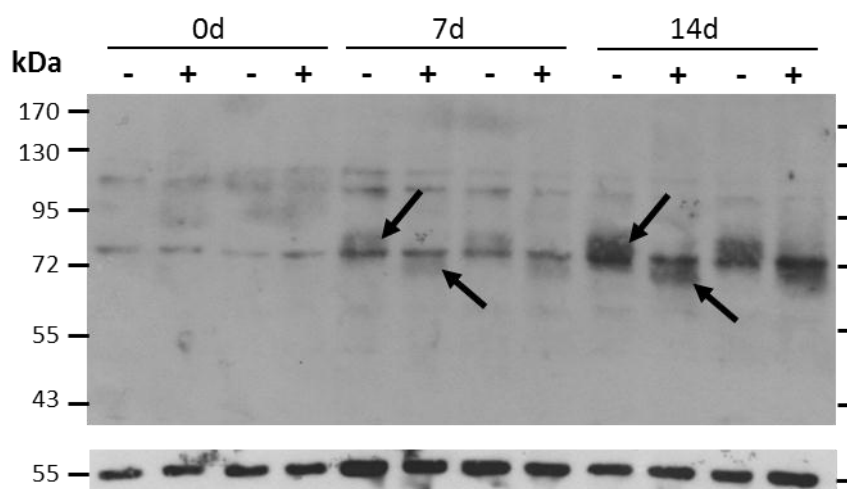


Abbildung 52: Nachweis des SLC7A14 in NT2-Zellen auf Proteinebene

NT-2 Zellen wurden auf 6 Zellkulturflaschen aufgeteilt. Je 2 Flaschen wurden ohne (0d), nach 7-tägiger (7d) und nach 14-tägiger (14d) Behandlung mit 10 μ M Retinsäure (2 Mediumwechsel/Woche) in RIPA lysiert. Pro Probe wurden 30 μ g Gesamtprotein nicht (-) oder für 45 Minuten mit N-Glykosidase behandelt (+), in einer SDS-PAGE (Trenngel: 7,5% Acrylamid) aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit Kaninchen anti-A14 aff.pur.EP56 (1:500; oben) und Maus anti-Tubulin (unten) behandelt.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, den lysosomalen Transport von kationischen Aminosäuren (KAS) zu untersuchen und möglichst die molekulare Identität des in den 1980ern beschriebenen lysosomalen System c aufzuklären. Dazu wurde die schon zuvor beobachtete intrazelluläre Lokalisation der humanen kationischen Aminosäuretransporter (hCATs) genauer untersucht, mögliche Kandidaten für kationische Aminosäuretransporter in Lysosomen aus dieser SLC7-Unterfamilie herausgefiltert und Methoden entwickelt um lysosomalen Transport zu messen.

4.1 SLC7A14 als Kandidat für einen lysosomalen Transporter für kationische Aminosäuren

4.1.1 SLC7A14 – Zuordnung zu den hCATs und Lokalisation

Das humane Waisen-Protein SLC7A14 wird aufgrund von Sequenz-Ähnlichkeiten der Aminosäuretransporter-Familie SLC7 (solute carrier 7) zugeordnet. Innerhalb dieser Familie ist SLC7A14 dabei eher der Untergruppe der kationischen Aminosäuretransporter (CATs; 42-45% Identität der Aminosäuresequenz) als den leichten Ketten der heterodimeren Aminosäuretransportern (HATs, 16-20% Sequenzidentität mit den leichten Ketten der HATs) (Abbildung A. 1) zuzuordnen. Als zusätzliches Kriterium zählt, dass für das SLC7A14-Protein ebenso wie für die anderen hCAT-Mitglieder 14 Transmembrandomänen (TMs) vorhergesagt werden (Abbildung A. 2). Für die leichten Ketten der HATs werden im Gegensatz dazu nur 12 TMs vorhergesagt (Verrey et al., 2003).

Für ein Fusionsprotein von SLC7A14 und EGFP wurde bisher bei Überexpression in U373MG Glioblastom-, A673 Neuroepitheliom-, NT2 Teratocarcinom-, Huh7 Hepatom- und TGW Neuroblastom-Zellen eine ausschließlich intrazelluläre Lokalisation beobachtet (unveröffentlichte Daten von Dr. J.P. Boissel) (Closs et al., 2006). In dieser Arbeit wurde nun gezeigt, dass diese Lokalisation den Lysosomen entspricht. Bei einer Färbung mit dem Fluoreszenz-Farbstoff LysoTracker[®] kam es in U373MG-Zellen, die SLC7A14.EGFP überexprimieren zu einer weitgehenden Überlagerung der Fluoreszenzen. Gleiches galt für die Behandlung von Zellen, die das lysosomale Membranprotein LAMP-1 in Fusion mit EGFP überexprimierten, mit LysoTracker[®]. Daher kann davon ausgegangen werden, dass der Marker LysoTracker[®] wirklich Lysosomen anfärbt. Da LysoTracker[®] nur saure Vesikel anfärbt, könnte es sich bei Vesikeln, die zwar die EGFP-Fusionsproteine beinhalteten aber nicht angefärbt wurden, um Endosomen handeln. Frühe Endosomen

haben etwa einen pH von 6,2 - 6,5, während in Lysosomen ein pH von 4 - 5 herrscht (Tjelle et al., 1996). Eine Lokalisation des SLC7A14.EGFP in mitochondrialen Membranen sowie ein Verbleib der Proteine im endoplasmatischen Retikulum (ER) konnte durch Anfärbung der Zellen mit den Fluoreszenz-Farbstoffen MitoTracker[®] bzw. ER-Tracker[™] ausgeschlossen werden. Bei diesen Versuchen kam es zu keinerlei Überlagerungen der Fluoreszenzen der Farbstoffe mit der Fluoreszenz des EGFP-Fusionsproteins. Die leichten Ketten der HATs verbleiben beim Fehlen der schweren Kette (z.B. 4F2hc) im ER (Feliubadaló et al., 1999). Da dies beim SLC7A14 nicht der Fall ist, festigten diese Versuche zusätzlich die Zuordnung des SLC7A14 zu den hCATs.

Ein weiterer Hinweis auf die lysosomale Lokalisation von SLC7A14 ist die Anreicherung des in U373MG-Zellen überexprimierten EGFP-Fusionsproteins in der lysosomalen Fraktion C. Mithilfe differenzieller Zentrifugation wurden dabei Lysosomen angereichert und andere, sich von der Dichte her unterscheidende Organellen größtenteils entfernt. Zur Kontrolle wurde die Anreicherung von Proteinen überprüft, deren lysosomale Lokalisation etabliert ist. Cathepsin D ist als lysosomale Aspartyl-Endopeptidase dafür verantwortlich, dass Proteine in mehrere Polypeptidfragmente gespalten werden um anschließend weiter verdaut zu werden (Minarowska et al., 2008). Da dieses Enzym im Lumen der Lysosomen vorkommt, ist es zusätzlich ein Marker für die Anreicherung intakter Lysosomen. Als Marker für lysosomale Membranen fungierte das „Lysosomen-assoziierte Membranprotein-1“ LAMP-1 (Fukuda, 1991). LAMP-1 (und auch die Isoform LAMP-2) spielt u.a. eine Rolle bei der Fusion von Phagosomen mit Lysosomen (Huynh et al., 2007). Beide Markerproteine reichernten sich zusammen mit SLC7A14.EGFP in Fraktion C-Präparationen an.

Um auszuschließen, dass die lysosomale Lokalisation von SLC7A14.EGFP ein Artefakt der Überexpression oder Fusion mit EGFP ist, wurde auch eine Zelllinie analysiert, die endogen SLC7A14 exprimiert. Dazu wurde aus der humanen Hautfibroblasten-Linie FCys5, bei der schon in einer qRT-PCR-Analyse eine SLC7A14-Expression nachgewiesen wurde, die Fraktion C präpariert. Diese wurde in einer Western Blot-Analyse mit dem im Rahmen dieser Arbeit generierten Antikörper gegen das humane SLC7A14-Protein untersucht. Da dieser Zelltyp sehr langsam proliferiert dauerte es mehrere Wochen, bis genügend Zellmasse für eine Präparation vorhanden war. Die Ausbeute war so gering, dass es gerade für eine Western Blot-Analyse ausreichte. Dabei konnte sowohl in Fraktion A, als auch in Fraktion C ein spezifisches Signal für das glykosylierte sowie das deglykosylierte Protein detektiert werden. Dieses zeigte eine Anreicherung in der Fraktion C im Vergleich zum unfraktionierten Zell-Homogenat. Auch der lysosomale Marker LAMP-1 reichernte sich in dieser Fraktion an, während der Gehalt des cytoplasmatischen Proteins β -Tubulin stark abnahm. Die Anzahl der unspezifischen Banden war hier sehr viel niedriger, als in vorhergehenden Western Blots mit anderen Zelllysaten, was u.U. an der

geringen Gesamtproteinmenge von nur 10µg pro Spur liegen könnte. In folgenden Western Blot-Analysen sollte also auch für andere Zelllinien ausgetestet werden, ob das Reduzieren der eingesetzten Gesamtproteinmenge zu einer Verbesserung des Verhältnisses zwischen unspezifischen und spezifischen Signalen führt. Eine quantitative Auswertung des glykosylierten Signals ergab, dass sich SLC7A14 in der lysosomalen Fraktion 3,7-fach anreicherte. Der Gehalt des lysosomalen Markerproteins LAMP-1 nahm um das 2,5-fache zu, während der Gehalt des cytoplasmatisch lokalisierten β -Tubulin auf das 0,46-fache abnahm. Die Auswertung beschränkte sich aus zwei Gründen auf die glykosylierte Probe: Zum einen muss davon ausgegangen werden, dass eine enzymatische Deglykosylierung u.U. nicht vollständig ist, zum anderen war die Qualität des Western Blots im Bereich der Spur der deglykosylierten Fraktion C nicht ausreichend gut. Diese Anreicherung des endogenen SLC7A14 Proteins liegt leicht höher als die Anreicherung der SLC7A14-EGFP-Fusionsproteine in Fraktion C-Proben aus U373MG-Zellen (etwa 3-fache Anreicherung). Die Qualität der Präparation war hier, wenn man die Anreicherung von LAMP-1 betrachtet, etwas besser (2,5-fach zu 1,9-fach), was in etwa mit der leicht höheren Anreicherung des endogenen SLC7A14 übereinstimmt. Mit diesem Versuch wurde also gezeigt, dass nicht nur überexprimiertes sondern auch endogenes SLC7A14-Protein in Lysosomen lokalisiert ist. Eine lysosomale Lokalisation ausschließlich aufgrund der Kopplung an das EGFP oder der Überexpression kann also weitgehend ausgeschlossen werden. Sie scheint vielmehr eine genuine Eigenschaft des SLC7A14 zu sein. Eine zusätzliche Bestätigung dieser Ergebnisse müsste noch durch immunhistochemischer Analysen fixierter Hautfibroblasten erfolgen. Die Findung der passenden Bedingungen für Erst- und Zweit-Antikörper nimmt viel Zeit in Anspruch. Auch ist noch nicht klar, ob der Antikörper gegen SLC7A14, der erst gegen Ende der praktischen Arbeiten verfügbar war, gut genug ist um Immun-Färbungen durchzuführen. Daher konnte dieser Versuch nicht mehr im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt werden.

Die marginalen Mengen von SLC7A14.EGFP, die in Biotinylierungs-Versuchen an der Zelloberfläche von humanen U373MG-Zellen sowie *X. laevis*-Oozyten gefunden wurden, sind vermutlich darauf zurückzuführen, dass das Protein auf seinem Weg zum Lysosom die Plasmamembran passiert. Dieses Phänomen, bei dem das Protein erst in die Plasmamembran gelangt, um dann über Endocytose internalisiert zu werden, ist auch schon für andere lysosomale Proteine, z.B. LAMP-1 beschrieben (Janvier & Bonifacino, 2005). Dafür spricht u.a. dass die Mengen des Proteins die in der Plasmamembran zu detektieren waren in dem Bereich lagen, der auch für LAMP-1 beschrieben und in dieser Arbeit gezeigt wurde. Auch dies spricht also dafür, dass es sich bei SLC7A14 um ein lysosomales Protein handelt. Da SLC7A14 also fast ausschließlich in Lysosomen lokalisiert zu sein scheint, ist dieses Protein ein aussichtsreicher Kandidat für die Vermittlung von KAS-Transport in humanen Lysosomen. Zusätzlich spricht auch die

Expression in Haut-Fibroblasten, also den Zellen in denen System c beschrieben wurde, für diese Hypothese.

4.1.2 Eine Chimäre aus der funktionellen Domäne des SLC7A14 im Rückgrat des hCAT-2 vermittelt Arginin-Transport

Bisher war kein Versuch, SLC7A14 durch Mutation lysosomaler Sortiermotive in die Plasmamembran zu lokalisieren, erfolgreich (unveröffentlichte Daten B. Gasnier/Paris und M. Lemke/Mainz). Daher wurde schon im Rahmen meiner Diplomarbeit eine Chimäre hergestellt, die die „funktionelle Domäne“ des SLC7A14 im Rückgrat des hCAT-2 trug. Die „funktionelle Domäne“ bezeichnet ein 81 Aminosäuren langes Proteinfragment der hCATs, das das 42 Aminosäuren lange Stück, in dem sich die beiden Spleiß-Varianten hCAT-2A und -2B voneinander unterscheiden, enthält. In vorhergehenden Arbeiten wurde schon gezeigt, dass diese Region die scheinbare Substrataffinität sowie die Sensitivität für die Trans-Stimulierbarkeit vermittelt (Habermeier et al., 2003). Trans-Stimulierbarkeit bezeichnet die Eigenschaft, dass der Transport durch Anwesenheit von Substrat auf der trans-Seite der Membran – also die Seite zu der hin transportiert wird – stimuliert wird. Da das chimäre Protein Arginin und auch Lysin transportierte, scheint es plausibel, dass es sich bei SLC7A14 um einen Transporter für kationische Aminosäuren handelt.

Im Laufe der Charakterisierung der Chimäre hCAT-2/A14_BK, ergab sich als neue Erkenntnis, dass die „funktionelle Domäne“ auch die pH-Abhängigkeit vermittelt. Dies konnte durch Austausch der „funktionellen Domänen“ zwischen dem pH-unabhängigen hCAT-1 sowie dem pH-abhängigen hCAT-2A bewiesen werden. So transportierte die Chimäre hCAT-2/1_BK ebenso wie der Spender der „funktionellen Domäne“ (hCAT-1) Arginin weitgehend pH-unabhängig. Die umgekehrte Chimäre hCAT-1/2A_BK transportierte, wie hCAT-2A auch, bei niedrigem pH deutlich schlechter als bei pH 7,5. Da die Chimäre hCAT-2/A14_BK pH-abhängig arbeitete, ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich bei SLC7A14 um einen pH-abhängigen Transporter handelt, so wie es für das System c beschrieben wurde. Die pH-Abhängigkeit von System c favorisiert die Aufnahme von KAS in das Lysosom, da der Transport weg vom cytoplasmatischen pH-Wert von 7 schneller ist, als der Transport weg vom intra-lysosomalen pH von 5,3 (Pisoni et al., 1987b). Berücksichtigt man bei den hier durchgeführten Versuchen in *X. laevis*-Oozyten die Orientierung der Proteine in der Membran, entspricht Influx in die Oozyten dem lysosomalen Efflux, Efflux aus Oozyten dem lysosomalen Influx. In diesem Versuchsaufbau kann also nur der pH-Wert der Lösung variiert werden, die das intralysosomale Milieu darstellt. Dabei zeigte sich, dass die Chimäre bei Influx-Versuchen in Oozyten eine höhere Transportaktivität aufweist, wenn der pH-Wert 7 im Außenmilieu beträgt, als bei pH 5. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Pisoni und Kollegen überein, so dass auch SLC7A14 eher für die Aufnahme von Aminosäuren in Lysosomen

verantwortlich sein könnte. Eine solche Eigenschaft könnte eine Rolle für die Bildung eines Aminosäure-Reservoirs spielen, das unter Mangel-Bedingungen zur Versorgung der Zelle genutzt werden könnte. Auch bei Efflux-Versuchen war die Transportaktivität der Chimäre jedoch bei einem niedrigen extrazellulärem pH-Wert schlecht (unabhängig von Trans-Substrat). Dies könnte eine Folge des veränderten Membranpotentials und pH-Gradienten der Plasmamembran sein, wie es auch von Smith et al. für die lysosomale Membran diskutiert wurde (Smith et al., 1987). Hier wurde postuliert, dass eine Erniedrigung des pH-Gradienten durch Alkalisierung des Lysosoms zu einem verminderten Cystin-Efflux führt. Dieses Phänomen könnte auch für die niedrige Transportaktivität der Chimäre verantwortlich sein. Cystin wird zwar durch ein anderes Protein transportiert, da aber auch hier eine positive Ladung in Form von H^+ verschoben wird, während KAS direkt eine positive Ladung tragen, ist es möglich, dass das Membranpotential bei diesen Ladungsverschiebungen eine Rolle spielt. Insgesamt weisen die Versuche darauf hin, dass SLC7A14 in der lysosomalen Membran eine eher schwache Transportaktivität aufweist. Das chimäre Protein mit der „funktionellen Domäne“ des SLC7A14 weist aber noch weitere Eigenschaften auf, die dem System c sehr ähnlich sind und sich von den Eigenschaften des System y^+ (hCAT-1) unterscheiden: eine niedrige scheinbare Substrataffinität, eine moderate Trans-Stimulierbarkeit sowie die kompetitive Inhibition durch ϵ -Trimethyl-L-Lysin.

Die Frage, ob die Eigenschaften des hCAT-2/A14_BK die des SLC7A14 widerspiegelt wurde im Rahmen einer anderen Arbeit (M. Lemke) mit Experimenten zur Substraterkennung versucht zu beantworten. In früheren Experimenten wurde schon gezeigt, dass Histidin bei niedrigen pH-Werten (wenn es also eine positive Ladung trägt) ein gutes Substrat für hCAT-1 darstellt, während das für hCAT-3 nicht der Fall ist (Vékony et al., 2001). Für hCAT-2A war noch nichts über die Erkennung von Histidin bekannt. Im Gegensatz zum hCAT-1 erkannte die Chimäre hCAT-1/2A_BK, ebenso wie hCAT-2A Histidin bei pH 5 nur sehr schlecht (Jaenecke et al., 2012). Dies zeigte, dass die „funktionelle Domäne“ durchaus wichtig für die Erkennung von Substraten ist. Da die „funktionelle Domäne“ des hCAT-1 im Rückgrat des hCAT-2 nicht imstande war die Histidin-Erkennung wiederherzustellen, müssen allerdings noch andere Proteinregionen für die Substraterkennung eine Rolle spielen. Die Rolle der „funktionelle Domäne“ für die Substraterkennung sowie die Tatsache, dass die Chimäre Arginin und Lysin transportiert weist darauf hin, dass es sich bei SLC7A14 um einen Transporter für KAS handelt. Auch die kompetitive Hemmung des Transports der Chimäre durch ϵ -Trimethyl-L-Lysin (TML) spricht dafür, dass dies durch die Erkennung des TML durch die „funktionelle Domäne“ geschieht. Der Austausch der „funktionellen Domäne“ des ebenfalls durch TML gehemmten hCAT-2A durch die des nicht beeinflussten hCAT-1 hob die Hemmbarkeit auf. Die „funktionelle Domäne“ des hCAT-2A im Hintergrund des hCAT-1 reichte jedoch nicht aus um die TML-Hemmung zu vermitteln. Dies lässt den gleichen Schluss zu, wie

die Transport-Versuche mit Histidin: Die „funktionelle Domäne“ scheint nötig, aber nicht ausreichend zu sein, um die Substraterkennung der hCATs zu vermitteln.

Die scheinbare Substrataffinität, die pH-Abhängigkeit sowie die Hemmung der Chimäre durch TML, trafen allerdings auch auf den hCAT-2A zu, also den Transporter, der das Rückgrat der Chimäre darstellt. Ein klarer Unterschied zwischen hCAT-2A und dem hCAT-2/A14_BK war jedoch die Trans-Stimulierbarkeit, also die Eigenschaft eines erhöhten Transports bei Anwesenheit von Substrat auf der trans-Seite der Membran. Dazu wurden Efflux-Versuche mit Oozyten durchgeführt. Eine [³H]Arginin-Lösung wurde in die Oozyten injiziert und anschließend der Efflux in Arginin-haltigen bzw. Aminosäure-freiem Puffer gemessen. Während hCAT-2A nicht trans-stimuliert wurde, exportierte hCAT-2/A14_BK doppelt so viel Arginin, wenn Trans-Substrat vorhanden war, als in aminosäurefreiem Puffer. Der System y^+ -Transporter hCAT-1 wies mit einer 7,6-fachen Steigerung seiner Aktivität durch Trans-Substrat eine sehr viel stärkere Trans-Stimulation auf als die Chimäre. Daher passen die Eigenschaften der Chimäre sehr gut zu denen des System c, denn auch System-c-vermittelter Lysin-Efflux ist 2-fach erhöht, wenn im Außenmedium Lysin zugesetzt wird (Pisoni et al., 1987b).

Alles in Allem scheint die Chimäre also die genuinen Eigenschaften des SLC7A14 widerzuspiegeln. Um dies zu verifizieren wurden verschiedene lysosomale Transport-Messungen etabliert, um lysosomales SLC7A14.EGFP aus überexprimierenden Zellen untersuchen zu können.

4.1.3 Messung von lysosomalem Transport in Zellen die SLC7A14.EGFP überexprimieren

Um zu testen, ob SLC7A14 KAS über lysosomale Membranen hinweg transportiert, wurden zwei Versuchsansätze mit U373MG-Zellen, die ein SLC7A14.EGFP-Fusionsprotein überexprimierten, verfolgt. Zum einen wurden lysosomale Membranen (Fraktion 31/45) sowie die Fraktion C, die intakte Lysosomen enthielt, mittels der Festkörper-unterstützten Membran (SSM) basierenden Elektrophysiologie untersucht. Zum anderen wurde an der Fraktion C direkt die Aufnahme von [³H]-markierten KAS gemessen.

Die Technik der SSM-basierenden Elektrophysiologie kam in den letzten 20 Jahren vielfach erfolgreich zur Charakterisierung von elektrogenen Transportproteinen zum Einsatz (Schulz et al., 2008; Seifert et al., 1993). Diese Technik bietet die Möglichkeit, die Aktivität vesikulärer Transporter direkt zu untersuchen. Ein zusätzlicher Vorteil ist, dass Methoden zur Membranpräparation genutzt werden können, welche keine intakten Lysosomen hervorbringt, da bei der SSM-Technik nur Membranfragmente benötigt

werden. Daher habe ich versucht diese Technik anzuwenden, um zu testen, ob SLC7A14.EGFP elektrogenen Transport von Arginin – als KAS – über lysosomale Membranen vermittelt. Die Methode zur Präparation von lysosomalen Membranen (Fraktion 31/45) aus zuvor schockgefrorenen Zellen ist in Kapitel 2.8.3 beschrieben und stammt aus einer an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main angefertigten Doktorarbeit (Schulz, 2010). Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass Zellen über einen längeren Zeitraum gesammelt werden können. Somit hat man eine größere Zellmasse zur Verfügung, die auf einmal verarbeitet werden kann. Intakte Lysosomen (Fraktion C) sowie die lysosomalen Membranfragmente (Fraktion 31/45) wurden auf spezielle Sensoren aufgebracht. Diese wurden dann im SURFE²R mit Arginin-freier, Arginin-haltiger und anschließend wieder Arginin-freier Lösung überspült. Um falsch positive Signale aufgrund unterschiedlicher Osmolarität der Lösungen zu vermeiden wurde das Arginin in der Arginin-freien Lösung equimolar durch Cholin ersetzt. Arginin-Zugabe führte weder bei Fraktion 31/45 noch bei Fraktion C-Proben aus Zellen, die SLC7A14.EGFP überexprimierten zu einem Arginin-induzierten Strom. Entsprechende Proben aus EGFP-Kontrollzellen verhielten sich identisch. Vergleicht man die Signalstärken der gemessenen Amplituden, ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Membranen der SLC7A14.EGFP- und den EGFP-überexprimierenden Zellen.

Man könnte nun also folgern, dass SLC7A14.EGFP keinen Arginin-Transport über lysosomale Membranen vermittelt. Allerdings bleibt die Möglichkeit, dass SLC7A14 als reiner Austauscher agiert und somit kein messbares elektrisches Signal verursacht. Daher blieb nach diesem Versuch die Frage, ob das fehlende Signal beim SLC7A14 aufgrund fehlender Aktivität oder fehlender Messbarkeit zustande kam. Ein lysosomaler Arginin-Transport durch SLC7A14 konnte mit diesem Versuchsansatz also weder nachgewiesen noch definitiv ausgeschlossen werden.

In einem direkten Transportversuch mit der Fraktion C, die intakte Lysosomen enthält, wurde diese in [³H]Lysin bzw. [³H]Arginin inkubiert. Um zu vermeiden, dass die AS-Konzentrationen in den im Durchschnitt 1 µm-kleinen Lysosomen durch die hohe Geschwindigkeit der Transportvorgänge zu schnell ein Gleichgewicht erreichten, wurden die Versuche bei 20°C durchgeführt und alle Lösungen auf diese Temperatur vortemperierte. Dadurch wurden die Transportvorgänge etwas verlangsamt, so dass eine Messung im linearen Bereich möglich war. Denn sobald die Lysosomen so viel [³H]-AS aufgenommen haben, dass bei weiteren Transportprozessen eine [³H]-AS von außen gegen eine von innen ausgetauscht wird, ist somit keine Änderung der aufgenommenen Menge der [³H]-AS mehr messbar. In einer Kurve, bei der die aufgenommene Menge [³H]-AS gegen die Zeit aufgetragen wird, entsteht in diesem Zustand ein Plateau. Man muss also immer darauf achten, dass Messungen zu einem Zeitpunkt durchgeführt werden, zu dem

der Transportprozess noch nicht diese Plateau-Phase erreicht hat. Tatsächlich kam es bei den Proben aus EGFP-Kontrollzellen zu einer zeitabhängigen Aufnahme von Arginin sowie Lysin. Die Menge der aufgenommenen Aminosäure lag sowohl bei Arginin als auch bei Lysin nach 2 Minuten etwa bei dem doppelten Wert von 5 Sekunden. Proben aus Zellen, die SLC7A14.EGFP überexprimieren, zeigten allerdings keinen, im Vergleich zu den Kontroll-Proben, erhöhten Transport – weder von Arginin noch von Lysin. Demnach weist auch dieser Versuch darauf hin, dass es sich bei SLC7A14 um keinen Transporter für kationische Aminosäuren handelt. Weitere Aminosäuren wurden aus Zeitgründen nicht mehr getestet.

Eine Analyse von Protein-Datenbanken des NCBI verschiedener bilateraler Spezies bezüglich SLC7A14-Analoga zeigte ein Vorkommen in vielen bilateralen Spezies: Fadenwurm (*Caenorhabditis elegans*), Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*), Zebrafisch (*Danio rerio*), Kugelfisch (*Takifugu rubripes*), Haushuhn (*Gallus gallus*), Hausmaus (*Mus musculus*) und Mensch (*Homo sapiens*) (Sreedharan et al., 2011). SLC7A14 ist also ein evolutionär hoch konserviertes Protein, das mit Sicherheit eine Funktion hat.

4.1.4 SLC7A14 als möglicher Histidin-Transporter

Ein im Gelbfieber-Moskito *Aedes aegypti* beschriebenes SLC7-Protein, transportiert bei einem neutralem pH von 7,2 spezifisch Histidin (Hansen et al., 2011). Arginin und Lysin werden weder bei neutralem, noch bei saurem pH erkannt. Das humane SLC7A14-Protein weist zu diesem als AaCAT1 bezeichneten Protein eine noch höhere Sequenzähnlichkeit auf als zu hCAT-1 oder -2 (vgl. Kapitel 3.6). Daher sollte in einem Vorversuch getestet werden, ob SLC7A14 Histidin-Transport vermittelt. Da SLC7A14 marginal in der Plasmamembran exprimiert ist, wurde zunächst Histidin-Transport an intakten U373MG-Zellen getestet. Histidin ist insofern eine besondere Aminosäure, da sie bei neutralem pH-Wert keine Ladung trägt, während sie in saurem Milieu positiv geladen ist. Unter den letzteren Bedingungen ist Histidin auch ein Substrat für hCAT-1 an der Plasmamembran, während es von hCAT-3 nicht erkannt wird (Vékony et al., 2001).

Initiale Versuche zeigten tatsächlich, dass U373MG-SLC7A14.EGFP-Zellen bei neutralem pH-Wert einen signifikant höheren Transport aufwiesen, als die EGFP-Kontrollzellen (sowohl bei 0,1 als auch bei 1 mM Histidin). Dass der Transport nur leicht erhöht war, schien im ersten Moment nachvollziehbar, da ja nur eine geringe Menge SLC7A14.EGFP in der Plasmamembran zu finden war (vgl. Kapitel 0). Um diesen scheinbar durch SLC7A14.EGFP vermittelten Transport weiter zu charakterisieren wurde getestet, ob der Transport von der Anwesenheit von Natrium-Ionen und Leucin beeinflusst wurde. Dabei ergab sich, dass der Histidin-Transport in die U373MG-SLC7A14.EGFP-Zellen Natrium-unabhängig und durch die Anwesenheit durch Leucin hemmbar war. Ein anschließender

Versuch an SLC7A14.EGFP-überexprimierenden *X. laevis*-Oozyten stellte allerdings infrage, dass der Histidin-Transport wirklich durch den SLC7A14.EGFP vermittelt wurde. Bei diesem Versuch wurde kein im Vergleich zu Kontroll-Oozyten erhöhter Histidin-Transport gemessen, obwohl die Oberflächenexpression von SLC7A14.EGFP in beiden Expressionssystemen vergleichbar war. Die Eigenschaften des Histidin-Transports in U373MG-SLC7A14.EGFP-Zellen bezüglich der Natrium-Abhängigkeit und der Sensitivität gegenüber Leucin lenkten den Verdacht auf zwei Mitglieder der SLC7-Familie die allerdings zur Untergruppe der heterodimeren Aminosäuretransporter (HATs) gehören. Die Expression der neutralen Aminosäuretransporter LAT1 und 2 wurde den verwendeten U373MG-Linien, sowie nativen Zellen untersucht. Eine qRT-PCR-Analyse ergab, dass LAT2 in allen U373MG-Linien nur marginal exprimiert wurde. LAT1 war dagegen in allen Linien stark vertreten. Die Expression des LAT1 war in U373MG-SLC7A14.EGFP etwa 6-fach höher als in nativen bzw. EGFP-Kontrollzellen, sowie in U373MG-hCAT-1.EGFP-Zellen. Da Histidin bei neutralem pH ohne Ladung – also neutral – vorliegt, ist also sehr wahrscheinlich, dass die erhöhte Histidin-Aufnahme in die U373MG-SLC7A14.EGFP durch die erhöhte Expression des neutralen Aminosäuretransporter LAT1 bedingt war. Der Grund dieser erhöhten Expression bleibt jedoch fraglich. Eine Heraufregulation durch die Überexpression von SLC7A14.EGFP scheint unwahrscheinlich und könnte durch eine erneute stabile Transfektion des SLC7A14.EGFP in native U373MG ausgeschlossen werden.

4.1.5 Hinweise auf Funktion von SLC7A14 als Neurotransmitter-Transporter

SLC7A14 wird in Datenbanken als wahrscheinlicher Transporter für kationische Aminosäuren aufgeführt (Quelle: NCBI). Meinen Untersuchungen nach ist SLC7A14 zusammen mit hCAT-1 der einzige hCAT-Vertreter, der in humanen Hautfibroblasten in nennenswerter Menge exprimiert wird, also den Zellen, in denen System c beschrieben wurde (vgl. Kapitel 3.1.1). Gerade diese Expression in humanen Hautfibroblasten qualifiziert SLC7A14 durchaus als einen Kandidaten für System c. Da aber die Transportversuche an der Fraktion C mit [³H]-Aminosäuren sowie mit der SSM-basierten Elektrophysiologie keinen Beweis dafür erbrachten, dass SLC7A14.EGFP Transport von KAS vermittelt, sollte auch anderen Funktionen für SLC7A14 in Betracht gezogen werden.

Eine Expressionsanalyse unter Zuhilfenahme einer Sammlung von RNA verschiedener humaner Organe zeigte, dass SLC7A14 nicht ubiquitär exprimiert wird (Abbildung A. 4A). Allein diese Tatsache schließt aus, dass SLC7A14, selbst wenn das Protein KAS transportieren würde, das einzige Protein sein könnte, das System c repräsentiert. Es fiel jedoch auf, dass SLC7A14 gerade in Geweben des zentralen Nervensystems (Gehirn, Zerebellum, Rückenmark) stark vertreten ist. Eine geringe Expression war für Trachea,

Niere, Prostata, Speicheldrüse, Testis und Haut, keine Expression in Herz, fötaler Leber, Thymus und Schilddrüse feststellbar. In einer Studie aus 2011 zeigten die Autoren, dass auch in der Ratte das entsprechende SLC7A14-Analoge im ZNS stark exprimiert war, während in peripheren Geweben keine Expression zu finden war (Sreedharan et al., 2011). Diese Untersuchung einer Sammlung von Ratten-mRNAs stimmt also weitgehend mit unseren Untersuchungen humaner RNAs überein. Haut wurde allerdings nicht untersucht, so dass wir leider nicht wissen ob SLC7A14 der Ratte in Haut exprimiert wird.

Beim Test verschiedener humaner Zelllinien auf SLC7A14-Expression zeigten neben humane Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC), auch neuronale Zellen (NB-OK-1- und TGW-1-Neuroblastom-Zellen) ein positives Ergebnis (Abbildung A. 4B). Im Zuge der Ausdifferenzierung von NT2-Zellen zu neuronalen Zellen durch Behandlung mit Retinsäure (Andrews, 1994) wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Induktion der SLC7A14-Expression auf mRNA- sowie Proteinebene festgestellt (vgl. Abbildung A. 3 und Kapitel 3.9). Diese Expression in neuronalen Zellen, zusammen mit der nahezu ausschließlich intrazellulären Lokalisation (vgl. Kapitel 4.2.1) lässt die Vermutung zu, dass SLC7A14 in diesen Zelltypen eine Rolle in synaptischen Vesikeln als Transporter für Neurotransmitter einnehmen könnte.

Die Sequenzhomologie zu dem Histidin-Transporter AaCAT1 der SLC7-Familie aus dem Gelbfieber-Moskito *Aedes aegypti* (Hansen et al., 2011) legt nahe, dass es sich bei SLC7A14 um einen Histidin-Transporter handeln könnte. Da durch die Decarboxylierung von Histidin der Neurotransmitter Histamin entsteht und SLC7A14 stark im ZNS exprimiert wird, sollte auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass es sich bei SLC7A14 um einen Histidin- oder Histamin-Transporter handeln könnte. Bisher wurde in Neuronen noch kein effektives System zur Aufnahme von Histamin in Zellen beschrieben. Histamin entsteht im Gehirn durch die Decarboxylierung von Histidin durch die Histidin-Decarboxylase (HDC) (Brown et al., 2001). Seine Funktion als Neurotransmitter wird durch den Abbau durch die Histamin-N-Methyltransferase (HNMT) abgestoppt. Da das Enzym HDC zwar in Nervenendigungen (Barbin et al., 1980), dort aber hauptsächlich im Cytoplasma (und z.T. in Mitochondrien) lokalisiert ist (Snyder et al., 1974), ist unwahrscheinlich, dass SLC7A14, sollte es in der Membran synaptischer Vesikel sitzen, dort Histidin transportiert. Wahrscheinlicher wäre in dem Fall ein Transport von Histamin. Für den Histamin-Transport in synaptische Vesikel sind schon zwei andere Proteine beschrieben: die vesikulären Monoamin-Transporter VMAT-1 und -2 (Erickson et al., 1996). Dies schließt aber nicht aus, dass SLC7A14 die Funktion eines weiteren vesikulären Histamin-Transporters übernehmen könnte. Es sollte also in naher Zukunft unbedingt auch die Aufnahmen von [³H]-Histamin in der Fraktion C SLC7A14-überexprimierender Zellen überprüft werden.

NT2-Zellen differenzieren bei Behandlung mit Retinsäure (RS) aufgrund der Aktivierung des HOX2-Genclusters zu Neuronen aus (Simeone et al., 1990). Die Gene dieses Clusters werden konzentrationsabhängig durch RS induziert und sind im Embryo im Allgemeinen für die Gliederung der Körperachse verantwortlich. Das von RS bei der Schwellenkonzentration von 10^{-5} M aktivierte HOX2A-Gen markiert dabei die Grenze zwischen den Genen, die bei niedriger und denen, die bei hoher Konzentration aktiviert werden. In der Maus ist bekannt, dass Hox-2.1 als Homolog zu diesem Gen die Grenze zwischen Hinterhirn und Rückenmark markiert. Die meisten Bestandteile des Hinterhirns spielen eine wichtige Rolle bei der Motorik. Da auch wir die Konzentration von 10^{-5} M RS verwendet haben, ist zu vermuten, dass sich die NT2-Zellen eher in motorische (glutamaterge) als in histaminerge Neuronen, die hauptsächlich im Hypothalamus vorkommen und den Wach-Schlaf-Rhythmus steuern (Haas & Selbach, 2007) ausdifferenzieren. Für eine andere humane Neuroblastomzelllinie, die Paju-Zellen, ist allerdings beschrieben, dass sich deren Histamin-Gehalt nach RS-Behandlung (2 Tage, 10^{-7} M) stark erhöht (Hegyesi et al., 2004). Die Paju-Zellen können, ebenso wie die NT2-Zellen, durch die Behandlung mit RS zu Neuronen ausdifferenziert werden (Pösö et al., 1984). Es wäre also sinnvoll auch diese Paju-Zellen hinsichtlich der Expression (vor und nach RS-Behandlung) auf SLC7A14-Expression zu untersuchen.

Auch hCAT-4 ist ein Protein der CAT-Familie, dem bisher trotz Lokalisation in der Plasmamembran keine Funktion als Aminosäuretransporter nachgewiesen werden konnte (Wolf et al., 2002). Für das CAT-4 Homolog GC13248 in *Drosophila melanogaster* wurde nun gezeigt, dass es stark in DIMM-positiven neuroendokrinen Zellen exprimiert und von diesem Protein induziert wird (Park et al., 2011). Neuroendokrine Zellen setzen Hormone oder Neuropeptide frei. Die Anwesenheit von DIMM sorgt dafür, dass Zellen sich nicht in Richtung der schnellen Neurotransmission entwickeln, sondern neuroendokrine (peptiderge) Eigenschaften ausbilden. Als Marker fungiert dabei die vollständige Prozessierung des MII-Peptids (Hamanaka et al., 2010). Eine Herunterregulation von GC13248 in DIMM-positiven Zellen hat einen stark reduzierten MII-Gehalt zur Folge. Da unter diesen Bedingungen keine Akkumulation von Intermediaten erfolgt, scheint GC13248 in einem anderen Schritt als der Prozessierung beteiligt zu sein. Park und Kollegen (2011) schlussfolgern, dass das GC13248 kritisch für die normale Regulation neuroendokriner Eigenschaften ist. In azinösen Zellen des Maus-Pancreas, die vom DIMM-Ortholog MIST1 reguliert werden, ist CAT-4 in Membranen sekretorischer Granula zu finden. CAT-4 ist neben SLC7A14 das zweite Mitglied der hCAT-Familie, für das bisher keine Transportaktivität nachgewiesen werden konnte. Eine Funktion von hCAT-4 in neuroendokrinen Zellen könnte daher auch auf eine ähnliche Funktion von SLC7A14 hinweisen.

4.2 Die Funktion der als Plasmamembran-Transporter etablierten hCATs als lysosomale Transporter

4.2.1 Intrazelluläre Lokalisation der hCATs

Für hCAT-1 und -2B wurde in vorangegangenen Arbeiten schon gezeigt, dass EGFP-Fusionsproteine zusätzlich zur Lokalisation in der Plasmamembran eine intrazelluläre Lokalisation in Form von Granula aufweisen (Wolf, 2001; Rotmann, 2003). In dieser Arbeit wurde nun exemplarisch für hCAT-1 gezeigt, dass diese intrazelluläre Lokalisation den Lysosomen entspricht. Bei einer Färbung mit dem Fluoreszenz-Farbstoff LysoTracker[®] kam es in U373MG-Zellen, die ein Fusionsprotein aus hCAT-1 und EGFP überexprimierten, zu einer weitgehenden Überlagerung der Floreszenzen. Dass es sich bei Vesikeln, die zwar die EGFP-Fusionsproteine beinhalten aber nicht angefärbt wurden, um Endosomen handeln könnte, wurde schon in Kapitel 4.1.1 diskutiert. Eine Lokalisation von hCAT-1.EGFP in mitochondrialen sowie ER-Membranen konnte durch Färbungen der Zellen mit MitoTracker[®] bzw. ER-Tracker[™] ausgeschlossen werden.

Ein weiterer Beweis für die lysosomale Lokalisation von hCAT-1 und -2B ist die Anreicherung der in U373MG-Zellen überexprimierten EGFP-Fusionsproteinen zusammen mit lysosomalen Markern in der Fraktion C und der Fraktion 31/45 der lysosomalen Membran-Präparation mittels Sucrosegradient. Dass sich Lysosomen in diese Fraktionen anreichern wurde schon in Kapitel 4.1.1 diskutiert. Die Beobachtungen an den EGFP-Fusionsproteinen konnten auch für endogen exprimierten hCAT-1 in Fraktion C-Präparationen aus nativen U373MG-Glioblastom- sowie EA.hy926-Endothelzellen gemacht werden. Somit konnte eine lysosomale Lokalisation der hCATs ausschließlich aufgrund der Kopplung an das EGFP weitgehend ausgeschlossen werden.

Auch das murine CAT-2A-Protein reichert sich in einer, über einen Nycodenz-Gradienten aufgereinigten, lysosomalen Fraktion aus Mäuseleber an (vgl. Kapitel A.5). Diese im Labor von B. Gasnier (Paris) durchgeführte und von mir in einem Western Blot analysierte lysosomale Präparation bestätigen die lysosomale Lokalisation der CATs auch in der Maus (unveröffentlicht). Ein zusätzliches Argument für die lysosomale Lokalisation des mCAT-2A ist, dass diese lysosomale Fraktion durch die weitere Aufreinigung über einen Dichtegradienten vermutlich noch wesentlich weniger durch andere Organellen verunreinigt war, als die einfache Fraktion C-Präparation.

Da für CATs – sowohl humane, als auch murine - die lysosomale Lokalisation nun nachgewiesen ist, stehen diese Proteine als aussichtsreiche Kandidaten für die Vermittlung von KAS-Transport in Lysosomen fest. Für hCAT-1 spricht zusätzlich die ubiquitäre Expression, mit Ausnahme der Leber, in der allerdings der dort exprimierte hCAT-2A –

analog zum mCAT-2A – die Funktion des lysosomalen KAS-Transporters übernehmen könnte. Auch der induzierbare hCAT-2B könnte lysosomalen KAS-Transport vermitteln.

4.2.2 Messung von lysosomalen Arginin-Transport durch endogenen hCAT-1 in Endothelzellen

Da die endotheliale NO-Synthase (eNOS) in Endothelzellen unter anderem lysosomales Arginin als Substratquelle nutzt (Karbach et al., 2011), kann dessen Aktivität ein Maß dafür sein, ob der lysosomale Arginin-Transport funktioniert. Das Prinzip dieses Versuchs beruht darauf, dass dieses Enzym Arginin zu NO und Citrullin konvertiert. NO ist als reaktionsfreudiges Radikal ein sehr kurzlebiges Molekül und schwer zu messen. Daher wurde auf die etablierte Methode des RFL-6-Reporterzellassay zurückgegriffen. In diesem kann das in endothelialen EA.hy926-Zellen produzierte NO, indirekt durch die von ihm stimulierte cGMP-Produktion in RFL-6-Reporterzellen bestimmt werden. Dabei wird ausgenutzt, dass das gasförmige NO aus den Endothelzellen in den Überstand diffundiert. Dieser wird auf die Reporterzellen gegeben, in denen dann in Abhängigkeit von NO cGMP produziert wird. Dieses kann anschließend in einem Radio-Immuno-Assay quantifiziert werden.

In früheren Versuchen wurde schon gezeigt, dass die durch die Depletion der Zellen von freiem Arginin und die Hemmung des proteasomalen Proteinabbaus leicht verringerte NO-Produktion durch Hemmung des lysosomalen Proteinabbaus weiter stark reduziert wurde (Karbach et al., 2011). Durch die Herunterregulation des lysosomalen Arginin-Transporters stünde lysosomales Arginin nicht mehr für die NO-Produktion zur Verfügung. Eine zusätzliche Hemmung des lysosomalen Proteinabbaus würde in diesem Fall keine weitere Hemmung der NO-Produktion bewirken. Durch das Ausschalten des Transporters erwarteten wir also den gleichen oder zumindest einen, durch die nicht 100%ige Herunterregulation, ähnlichen Effekt, wie bei der Hemmung des lysosomalen Proteinabbaus.

Da wir das lysosomale System c unter den hCATs vermuten, wurde zunächst überprüft, welche Mitglieder dieser Familie überhaupt in EA.hy926-Endothelzellen exprimiert werden. In einer qRT-PCR-Analyse mit Oligonukleotiden und TaqMan-Sonden gegen alle hCAT-Mitglieder (mit Ausnahme des hCAT-4, für den bisher keine Funktion als Transporter gefunden wurde), wurde festgestellt, dass hCAT-1 das einzige der getesteten Protein ist, das in diesen Zellen in nennenswerten Mengen exprimiert wird. Für hCAT-2B und -3 konnte nur eine sehr schwache Expression festgestellt werden, die 15-fach schwächer war als die des hCAT-1. mRNA für hCAT-2A sowie SLC7A14 konnte gar nicht detektiert werden. Mittels siRNA konnte hCAT-1 erfolgreich auf 10-20% herunterreguliert werden, was sowohl auf mRNA-, Protein- und funktioneller Ebene

(Transport über die Plasmamembran) gezeigt wurde. Sicherheitshalber wurde auf transkriptioneller Ebene ausgeschlossen, dass andere hCAT-Mitglieder durch diese Herunterregulation des hCAT-1 kompensatorisch heraufreguliert wurden. Die Transfektion von Zellen mit siRNA ohne Zielsequenz (OZ-siRNA) hatte keinen Einfluss auf die Expression der untersuchten hCATs. Dies schließt einen Einfluss der Transfektionsreagenzien auf die Expression der untersuchten Proteine aus.

Obwohl Arginin als nicht-essentielle Aminosäure beschrieben ist, trifft dies nur auf gesunde Erwachsene zu (Rose & Wixom, 1955). In sich im Wachstum befindenden, jungen Tieren wurde gezeigt, dass sie zu einer essentiellen AS wird (Mertz et al., 1951). Da die Versorgung mit Arginin durch ein Zusammenspiel von Aufnahme mit der Nahrung, Protein-Umsatz, Arginin-Synthese und -Metabolismus aufrecht erhalten wird, kann der Ausfall einer dieser Komponenten dazu führen, dass es zu Engpässen in der Versorgung kommt (Böger & Bode-Böger, 2001). Und das, obwohl die intrazelluläre Arginin-Konzentration theoretisch mehr als ausreichend ist, um die eNOS zu versorgen. Dieses sog. Arginin-Paradox kann der Grund sein, warum es in pathophysiologischen Bedingungen dazu kommt, dass Arginin limitierend auf die eNOS-Aktivität wirkt (Förstermann et al., 1994). Bei einer Endothelläsion infolge Chirurgie, Trauma oder Erkrankung kommt es infolge des Heilungsprozesses zu Zellteilung. In diesem Stadium ähneln die Zellen in und um die Läsion den subkonfluenten Zellen aus meinem Versuch, deren Stoffwechsel ebenfalls auf „Wachstum“ eingestellt ist. Im Gegensatz zu vorherigen Versuchen (Simon, 2005) kam es nach 90-minütiger Depletion von Arginin zu einer verminderten NO-Produktion in subkonfluent ausgesäten Zellen. In konfluent ausgesäten Zellen hatte die Arginin-Depletion keinen negativen Effekt auf die NO-Produktion. Für eine siRNA-Behandlung durften die Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion nur zu 60% konfluent vorliegen. Rein optisch waren die Zellen 2 Tage später (zum Zeitpunkte der optimalen Herunterregulation des hCAT-1 und somit des Versuchs) zwar konfluent, anscheinend benötigen die Zellen aber mehrere Tage im konfluenten Zustand um ihren Stoffwechsel so umzustellen, dass mehr Proteinabbau betrieben werden kann. Konfluent ausgesäte Zellen schienen dagegen genug Arginin aus dem Proteinabbau zur Verfügung zu haben, um die Depletion von freiem Arginin zu kompensieren. Dieses Phänomen zeigt, dass in einem Stadium des Wachstums, ein höherer Arginin-Bedarf vorliegt. Dadurch wird die Bedeutung des aus dem Proteinabbau stammenden Arginins besonders hoch. Ist in einer Läsion, bzw. in wachsenden Zellen nun zusätzlich der lysosomal Arginin-Transport gestört, müsste dies einen gravierenden Einfluss auf die Versorgung der eNOS und somit auf die sowieso schon gestörte Endothelfunktion haben.

In den folgenden NO-Messungen wurde allerdings keine Verminderung des lysosomalen Anteils der eNOS-Versorgung durch die Herunterregulation des hCAT-1 festgestellt. Dies zeigte, dass auch in den Zellen, in denen hCAT-1 herunterreguliert worden war, das im

Lysosom freigesetzte Arginin noch ins Cytoplasma transportiert wurde. Hierfür kann es mehrere Gründe geben. (I) Da eine Herunterregulation mittels siRNA nie zu 100% erfolgreich ist, könnte das verbleibende Protein (hier etwa 10%) ausreichen, um die eNOS mit Substrat zu versorgen. Dies erscheint möglich, da die Affinität der eNOS zu Arginin mit einer K_M von ca. 2 μM sehr hoch ist (Bredt & Snyder, 1990). Eine kleine Menge Arginin könnte ausreichen um eine relativ stabile NO-Produktion zu gewährleisten. Für diese Theorie spricht auch, dass die Erholung der NO-Produktion durch Zugabe von extrazellulärem Arginin nicht durch die siRNA-Behandlung beeinträchtigt wurde. Die zuvor durch Arginin-Depletion und Hemmung des gesamten Proteinabbaus reduzierte NO-Produktion erholte sich durch extrazelluläre Zugabe von 50 μM Arginin wieder vollständig. Da unter diesen Bedingungen das Arginin auch über die Transporter y^+ LAT1 und 2 in die Zelle gelangen kann, wurden diese Transporter kompetitiv durch die Zugabe von 1 mM Leucin gehemmt. Doch auch unter diesen Bedingungen, sowie bei einer weiteren Reduzierung der angebotenen Arginin-Menge auf 10 μM in Anwesenheit von 1 mM Leucin, war kein Unterschied in der Erholung der NO-Produktion zwischen OZ-siRNA- und hCAT-1-siRNA-behandelten Zellen zu erkennen. (II) Eine weitere Möglichkeit ist, dass ein zusätzlicher lysosomaler Transporter für Arginin den Ausfall des hCAT-1 kompensiert. Nach Abschluss meiner experimentellen Arbeiten veröffentlichte eine chinesische Arbeitsgruppe die Identifikation des lysosomalen Aminosäure-Transporters LAAT-1 (lysosomal amino acid transporter 1) in *Caenorhabditis elegans* (Liu et al., 2012). Eine Herunterregulation von LAAT-1 führte zu 8 bzw. 16-fach erhöhten Arginin- bzw. Lysin-Mengen in den Lysosomen. Die intra-lysosomalen Histidin und Cystin-Spiegel blieben unverändert. Bei einer zusätzlichen Herunterregulation von Cystinosin, konnte Cysteamin die Lysosomen nicht mehr von Cystin depletieren. Nach Mutation des lysosomalen Sortiermotivs wurde LAAT1 bei Überexpression in COS-7-Zellen in die Plasmamembran lokalisiert und vermittelte dort Arginin- und Lysin-Aufnahme bei einem niedrigem extrazellulärem pH-Wert von 4,5. Das humane Gegenstück, PQLC2 (PQ loop repeat containing protein 2) verhielt sich identisch. Diese beiden Proteine exportiert also offensichtlich Arginin und Lysin aus Lysosomen. Da ich humanes PQLC2 sowohl in Endothelzellen (u.a. in den hier verwendeten EA.hy926-Zellen), als auch in humanen Hautfibroblasten nachweisen konnte (vgl. Abbildung A. 7), ist dieses Protein ein zusätzlicher Kandidat für System c.

Auch in der Plasmamembran könnte noch ein weiterer Transporter für Arginin existieren. Für diese Theorie spricht, dass in EA.hy926-Zellen in denen die y^+ LATs kompetitiv durch Leucin und die hCATs spezifisch durch NEM gehemmt werden immer noch ein Rest Transport verbleibt (Slenzka, 2012). Dieser könnte möglicherweise durch einen weiteren nicht SLC7-Transporter in der Plasmamembran bedingt sein.

4.2.3 Messung von lysosomalen Transport in Überexpressionssystemen

Die in U373MG überexprimierten Fusionsproteine zwischen hCAT-1 oder hCAT-2B und EGFP wurden mit den gleichen Methoden, wie schon SLC7A14.EGFP hinsichtlich lysosomaler Transportaktivität untersucht. Da hCAT-1 vorwiegend als Austauscher agiert, generiert dieses Protein nur sehr schwache elektrische Signale (Rotmann, 2003). Daher wurden nur Proben des hCAT-2B.EGFP mit der SSM-basierten Elektrophysiologie untersucht. Die Lysosomen (Fraktion C) sowie die lysosomalen Membranfragmente (Fraktion 31/45) wurden auf spezielle Sensoren aufgebracht. Diese wurden dann im SURFE²R mit Arginin-freier, Arginin-haltiger und anschließend wieder Arginin-freier Lösung überspült. Arginin-Zugabe führte bei Proben aus Zellen, die hCAT-2B.EGFP überexprimierten, zu einem elektrischen Signal, das steil anstieg und etwas flacher abfiel. Diese Art von elektrischem Signal ist typisch für hCAT-vermittelten Arginin-Transport (Nawrath et al., 2000). Dass dieses Signal durch den hCAT-2B verursacht wurde ist dadurch bestätigt, dass Proben aus EGFP-Kontrollzellen kein derartiges Signal erzeugten. Bei Membranen bzw. Lysosomen aus EGFP-Kontroll-Proben erzeugte die Zugabe von Arginin keine erhöhte Amplitude. Abgesehen von der absoluten Signalstärke, die bei den Fraktion-31/45-Proben aus hCAT-2B.EGFP-exprimierenden Zellen etwas höher lag als bei den entsprechenden Fraktion C-Proben, verhielten sich die Proben aus beiden Präparationsmethoden gleich. Die höhere Signalstärke bei den Proben der Membranfragmente im Vergleich zu intakten Lysosomen, könnte dadurch zustande kommen, dass die Fraktion 31/45 stärker aufgereinigt war als die Fraktion C. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass das Lumen, in das sich die positive Ladung verschiebt hier direkt am Sensor lag (vgl. Abbildung 32). Bei der Messung mit ganzen Vesikeln, befindet sich eine zusätzliche Doppellipidschicht zwischen Lumen und Sensor, was zu einer Abschwächung der Signalstärke geführt haben könnte. Da die Technik der SSM-basierten Elektrophysiologie sehr sensitiv auf Ladungsverschiebungen reagiert, kann ein falsch positives Signal durch die Verunreinigung sowohl der Fraktion C als auch der Fraktion 31/45-Proben mit Plasmamembran jedoch nicht ausgeschlossen werden. Aufgrund fehlender Kenntnis und Erfahrung mit Lysosomen-spezifischen elektrogenen Transportern, deren Aktivität uns hätte Aufschluss geben können, ob eher Plasma- oder lysosomale Membranaktivität gemessen wurde, kann nicht ganz ausgeschlossen werden, dass das gemessene Signal von Transportern der Plasmamembran kam und die lysosomale Membran nicht messbar war.

In einem weiteren Ansatz wurde Transport von kationischen Aminosäuren direkt an isolierten Lysosomen gemessen. Dazu wurde isolierte Fraktion C in [³H]Lysin bzw. [³H]Arginin inkubiert (vgl. Kapitel 4.1.3). Bei Proben des im SURFE²R schon positiv getesteten hCAT-2B.EGFP sowie beim hCAT-1.EGFP kam es zu einer signifikant höheren

Menge aufgenommener Aminosäuren als in Proben aus EGFP-Kontrollzellen. Dies legt nahe, dass diese erhöhte Aufnahme auf die überexprimierten Proteine im Lysosom zurückzuführen ist. Da hCAT-1.EGFP nicht in Mitochondrien lokalisiert ist (vgl. Kapitel 4.2.1) – was aller Wahrscheinlichkeit nach auch für hCAT-2B.EGFP zutrifft – kann auch ausgeschlossen werden, dass der Effekt auf Aufnahme in Mitochondrien beruht, die aller Wahrscheinlichkeit nach auch einen Großteil der Verunreinigungen der Fraktion C darstellen.

Nimmt man die mit der SSM-basierten Elektrophysiologie gewonnenen Ergebnisse und die direkten Transportversuche zusammen, ist es sehr wahrscheinlich, dass hCAT-1.EGFP und hCAT-2B.EGFP KAS-Transport über lysosomale Membranen vermitteln.

4.3 Methodenkritik – Isolation von & Transportstudien an Lysosomen

Keine der beiden angewendeten Methoden zur Messung von lysosomalem Transport an Überexpressionssystemen ist frei von möglichen Fehlerquellen.

Die Präparation von intakten Lysosomen schien der entsprechenden Literatur nach sehr leicht zu sein. Man findet die unterschiedlichsten Protokolle, die alle mit einer differentiellen Zentrifugation starten um die gröberen Verunreinigungen mit schweren Organellen und Zelltrümmern zu entfernen. Fast immer geht es anschließend mit einer „Free-Flow-Elektrophorese“ (Harms et al., 1980) oder einer Dichtegradientenzentrifugation in einer Ultrazentrifuge weiter. Da man für eine „Free-Flow-Elektrophorese“ spezielle Apparaturen benötigt, wurde in dieser Arbeit auf die Dichtegradientenzentrifugation zurückgegriffen. Wichtig hierbei ist, stets ein isosmotisches Milieu zu bewahren, um eine Schädigung der empfindlichen Lysosomen zu vermeiden. Problematisch ist dabei, dass es nur geringe Dichteunterschiede zwischen den intrazellulären Organellen gibt. Daher wird in den meisten Protokollen eine Mikrosoemenpräparation beschrieben, die nicht zwischen Lysosomen, Endosomen und ähnlichen Organellen unterscheidet. Auch in dem in dieser Arbeit angewandten Protokoll muss von einer gewissen Mischpräparation ausgegangen werden. Als Gradient wird häufig Percoll, Metrizamid (in neueren Protokollen häufig durch das weniger toxische Nycodenz ersetzt) oder Sucrose verwendet. Auch wurden meist Lysosomen aus ganzen Organen (z.B. humane Plazenta, Nager-Lebern) isoliert, so dass in vielen Protokollen von sehr viel mehr Ausgangsmaterial ausgegangen wird, als es mit kultivierten Zellen erreicht werden konnte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Percoll-Gradienten getestet, die nach den entsprechenden Veröffentlichungen alle gemeinsam hatten, dass die Lysosomen nach der

Zentrifugation im unteren Drittel des Gradienten zu finden sein sollten. Das isoosmotische Percoll hat den Vorteil, dass man keinen Gradienten schichten muss, sondern dieser sich beim Zentrifugieren von selbst bildet. Dabei musste man die Fraktion C nur vorsichtig auf die Percoll-Lösung auflagern. Getestet wurde eine 35-minütige Zentrifugation bei 37.000xg mit einer 30%igen Percoll-Lösung (Pisoni et al., 1987a), eine 60-minütige Zentrifugation bei 50.000xg ebenfalls mit 30% Percoll (Alquier et al., 1985), eine 60-minütige Zentrifugation bei 60.000xg mit 27% Percoll (Casey et al., 2007), sowie eine 30-minütige Zentrifugation bei 26.500xg mit 17,5% Percoll auf einem 2,5-molaren Sucrose-Kissen, auf dem die Lysosomen liegen bleiben sollten (Schaub et al., 2005). In allen Fällen kam es zur Bildung einer Bande im oberen Drittel des Gradienten. In dieser waren zwar Lysosomen enthalten, die Qualität der Aufreinigung war aber im Vergleich zur Fraktion C nicht verbessert. Das untere Drittel der Gradienten, in dem sich laut Literatur die Lysosomen sammeln sollten, blieb stets frei von Banden. Auch zeigten Proteinbestimmungen dieser Fraktion, dass hier keine Proteine enthalten waren. Da es durch den Gradienten zu einem immensen Verlust an Probe kam, wurden die Versuche eingestellt. Ein Weiterarbeiten mit der granulären Fraktion C schien sinnvoll, da auch Pisoni und Kollegen einen Teil ihrer Versuche zur Charakterisierung des System c an Fraktion C-Proben durchgeführt haben.

Die Fraktion C ist allerdings sehr wahrscheinlich noch stark verunreinigt mit Mitochondrien und nachgewiesenermaßen mit Plasmamembran. In Isolationsprotokollen für Plasmamembranvesikel wird zwar mit leicht bis viel höheren Geschwindigkeiten sedimentiert – 35.000xg (Riordan & Ling, 1979), 47.000xg (Inoues et al., 1983), 81.000xg (Kelley et al., 1983) – es werden jedoch anscheinend keine besonderen Bedingungen benötigt, damit sich die Plasmamembran zu Vesikeln zu schließt. Problematisch scheint nur zu sein, die Membranen so zu beeinflussen, dass die Zellaußenseite auch weiterhin außen ist. Es scheint Zufall zu sein ob sich sog. „right-side-out“- oder „inside-out“-Vesikel bilden. Da die hCATs jedoch in beide Richtungen transportieren, würde man in jedem Fall Transport messen können. Die Möglichkeit, dass bei den Messungen mit der Fraktion C die Aufnahme von Arginin in Plasmamembranvesikel gemessen wurde, besteht also durchaus und sollte überprüft werden. Dazu könnte Transport der Fraktion C aus Zellen gemessen werden, die einen reinen Plasmamembrantransporter für KAS überexprimieren (z.B. y^+ LAT1 oder 2). Als Positivkontrolle könnten den neuesten Erkenntnissen nach Zellen verwendet werden, die den lysosomalen Transporter für Arginin und Lysin PQLC2 überexprimieren (Liu et al., 2012).

Ebenso wie die Fraktion C war auch die Fraktion 31/45 mit Plasmamembran verunreinigt. Für die Arbeit aus der das Isolationsprotokoll stammte, war dies nicht störend, weil dort ein ausschließlich lysosomal lokalisiertes Protein untersucht wurde. Eine Abnahme von Plasmamembran-Markern in der untersuchten Fraktion wurde in dieser Arbeit aber nicht

überprüft. Da der im SURFE²R untersuchte hCAT-2B.EGFP zusätzlich zum Lysosom auch in der Plasmamembran lokalisiert ist, kann dies durchaus das Ergebnis verfälscht haben. Auch hier könnte überexprimiertes PQLC2 zur Validierung der Methode eingesetzt werden.

Für die hCATs ist zwar bekannt, dass die Fusion mit EGFP den Transport über die Plasmamembran nicht beeinflusst, für SLC7A14 ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Fusion mit EGFP zu einem Verlust der Funktion führte. Dies könnte z.B. durch eine sterische Behinderung der Substraterkennungsstelle oder einer Interaktion verschiedener Domänen und somit einer fehlerhaften Faltung verursacht werden. Die Schaffung einer SLC7A14-überexprimierenden Zelllinie (ohne Fusion mit EGFP) war jedoch bisher aufgrund fehlender Nachweismöglichkeiten eines ungekoppelten SLC7A14-Proteins nicht möglich. Da im Rahmen dieser Arbeit ein Antikörper generiert wurde, kann dies nun in Angriff genommen werden.

4.4 Generierung polyklonaler Antikörper gegen SLC7A14

Da zum Nachweis der Expression sowie der Lokalisation des endogenen humanen SLC7A14-Proteins Antikörper benötigt werden, wurden im Rahmen dieser Arbeit polyklonale Antikörper generiert.

Antikörper gegen die SLC7-Mitglieder zu generieren erwies sich schon von jeher als schwierig, da nur sehr kurze Bereiche dieser hydrophoben Membranproteine aus der Membran herausragen (Kim & Cunningham, 1993). Ein zusätzliches Problem ist, dass die CAT-Proteine für Bakterien toxisch sind und daher eine Überexpression in diesen Organismen ausscheidet. Selbst die Expression kleinerer Fragmente kann problematisch sein. Es wurden allerdings schon oft kleinere Sequenzbereiche (12-20 Aminosäuren) aus den im Cytoplasma frei vorliegenden C-Termini zur Immunisierung eingesetzt. Vor allem die Arbeit mit Fusionsproteinen aus TrpE und Fragmenten der C-Termini hat sich bewährt, wie schon in einigen Publikationen (Closs et al., 1993b; a) und Dissertationen (Gräf, 1998; Vékony, 2006) unserer Arbeitsgruppe gezeigt wurde. Es konnten jedoch auch mehr oder weniger überzeugende Erfolge mit ungekoppelten, synthetisch hergestellten Peptiden verzeichnet werden (Woodard et al. 1994; Gräf 1998).

Im Fall des SLC7A14 wurde auf Fusionsproteine verzichtet und mit wesentlich längeren Peptiden (28 bzw. 29 Aminosäuren) als üblich (10-16 Aminosäuren) immunisiert. Die Wahl auf lange Peptide fiel aufgrund einer Veröffentlichung die beschreibt, dass bei einer Impfung mit solch langen Peptiden (22-45 Aminosäuren) die Wahrscheinlichkeit einer

Toleranz des Antigens durch den Organismus reduziert und die Produktion von Antikörpern wahrscheinlicher wird (Melief & van der Burg, 2008). Durch den synthetischen Herstellungsprozess schließt man auch aus, dass der Organismus auf mögliche Verunreinigungen des aus Bakterien gewonnenen Fusionsproteins reagiert, statt auf das gewünschte Antigen. Mithilfe des Computerprogramms Antigen Profiler™ von Thermo Fisher Scientific sowie Literatur mit Tipps zum Design von Antigenen (Angeletti, 1999) wurden zwei 28 Aminosäuren lange Peptide gewählt, die Teilen des cytoplasmatischen C-Terminus des SLC7A14 entsprechen (vgl. Kapitel 3.7.1). Besonders wichtig war bei der Wahl der Peptide, (i) dass sie möglichst wenig hydrophob waren, (ii) dass eins der Peptide den echten C-Terminus des Proteins beinhaltet und (iii) dass keine Cysteine in den Sequenzen vorkamen. Zwischen Cysteinen können sich Disulfidbrücken und somit kovalent verbundene Aggregate oder eine unnatürliche dreidimensionale Struktur bilden, was zu einer reduzierten Immunogenität führen kann.

Eins der Kaninchen wurde, da mit dem Serum keine spezifische Bande detektiert werden konnte und da das Serum des zweiten Kaninchens eine starke spezifische Bande detektierte, eingeschläfert. Nur das zweite Kaninchen wurde in einem Verlängerungsprogramm weiter immunisiert. Diese Entscheidung war im Nachhinein betrachtet etwas voreilig, da alle weiteren Testseren des weitergeführten Kaninchens einen starken dunklen Hintergrund produzierten. Dieser war am Ende des Programms so stark, dass Banden auf den Röntgenfilmen nur nach starker Aufhellung durch ein Grafikprogramm zu erkennen waren. Die Entstehung eines solchen Hintergrundes ist nach Auskunft der Firma Eurogentec ein zufälliges Ereignis. So hätte auch das zuvor eingeschläferte Kaninchen durch eine längere Immunisierung noch ein spezifisches Signal hätte entwickeln können, möglicherweise ohne einen starken Hintergrund zu entwickeln. Trotzdem war die Antikörperproduktion erfolgreich. Eine Affinitätsaufreinigung durch die Firma Eurogentec mit dem Peptid, das dem C-terminalen Ende des Proteins entsprach (EP112155), ergab eine fast vollständige Reduktion des dunklen Hintergrundes. Diese als „anti-A14 aff.pur.EP55“ bezeichneten Antikörper generierten an Lysaten humaner Hautfibroblasten zwar immer noch unspezifische Banden, aber durch den Vergleich von glykosylierten mit deglykosylierten Proben konnten eindeutig spezifische Banden ausgemacht werden. Humane Hautfibroblasten wurden in vorhergehenden qRT-PCR-Analysen positiv auf die mRNA-Expression von SLC7A14 getestet. Dass SLC7A14 glykosyliert vorliegt, wurde im Vorfeld mithilfe eines GFP-Antikörpers an Lysaten von U373MG-SLC7A14.EGFP geklärt. Bei den glykosylierten Proben ergab das spezifische Signal eine breiten Bande zwischen 95 und 130 kDa, während die spezifische Bande bei den mit N-Glykosidase behandelten Lysaten sehr viel schmaler war und etwas tiefer, bei ca. 90 kDa, lag. Humanes SLC7A14 hat ein errechnetes Molekulargewicht von etwa 84 kDa. Zusammen mit dem etwa 27 kDa schweren EGFP kann für das Fusionsprotein von einem Molekulargewicht von 111 kDa ausgegangen werden. Durch die Glykosylierung vergrößert sich das

Molekulargewicht der Proteine, wodurch das Protein auf einer anderen als der errechneten Größe zum Liegen kommt. Dass das deglykosylierte Protein ein Signal unterhalb der errechneten Größe erzeugt, konnte bei hydrophoben Proteinen schon häufig beobachtet werden (Vékony, 2006) und kommt dadurch zustande, da sie durch ihre hydrophoben Eigenschaften mehr SDS einlagern und daher mehr Ladungen aufweisen als gleich große hydrophile Proteine. Erkennungsmerkmal der spezifischen Banden glykosylierter Membranproteine ist also die Veränderung der Laufeigenschaften durch die Glykosidase-Behandlung.

Ein mit dem Peptid EP112156 aufgereinigtes Serum („anti-A14 aff.pur.EP56“), dessen Sequenz etwa mittig im C-Terminus von SLC7A14 liegt, ergab kein spezifisches Signal. Allerdings waren mit diesem aufgereinigten Serum dicke unspezifische Banden zu detektieren, die in der Aufreinigung mit dem anderen Peptid reduziert waren. Es scheint so, als wäre dieses zweite Peptid bei der Immunisierung hauptsächlich für die Generierung dieser unspezifischen Banden verantwortlich gewesen.

Auch bei einem parallel von mir betreuten Programm für Antikörper gegen γ^+ LAT1, wurde ebenfalls mit zwei Peptiden aus dem cytoplasmatischen C-Terminus immunisiert. Die Sequenz des einen Peptids lag innerhalb des Proteins („intern“), die des zweiten Peptids beinhaltete den „echten“ C-Terminus des Proteins. Eine Affinitätsaufreinigung ergab, dass nur das Serum, das mit dem C-terminalen Peptid aufgereinigt wurde, in einem brauchbaren Antikörper resultierte (vgl. Abbildung A. 8). Das mit dem „internen“ Peptid aufgereinigte Serum produzierte kein spezifisches Signal in Lysaten mit endogener Expression. Es scheint also, als sei in beiden Immunisierungsprogrammen nur das Peptid, das den „echten“ C-Terminus des jeweiligen Proteins darstellt für die Generierung der Antikörper, die die im Vergleich zu Überexpressionssystemen geringen endogenen Proteinmengen spezifisch erkennen, verantwortlich. Das zweite Peptid scheint vorwiegend für die unspezifischen Signale verantwortlich zu sein. Bei zukünftigen Antikörper-Programmen könnte demnach oder sollte sogar auf das zweite „interne“ Peptid verzichtet werden.

4.5 Ausblick

An Fraktion C-Proben aus hCAT-1.EGFP- und hCAT-2B.EGFP-Überexpressionssystemen, die Lysosomen enthalten, konnte gezeigt werden, dass beide Proteine Arginin und Lysin über die lysosomale Membran transportieren. Diese Ergebnisse müssen nun auch für endogen exprimierte hCATs bestätigt werden. Die Isolation von Lysosomen benötigt jedoch sehr viel Zellmasse als Ausgangsmaterial. In solch großen Maßstäben ist es nicht praktikabel mit siRNA-Transfektion die hCATs herunterzuregulieren, um die Lysosomen dieser Zellen mit denen nicht-transfizierter Zellen zu vergleichen. Dieser Versuchsaufbau wäre nur mithilfe einer stabilen (Brummelkamp et al., 2002) oder induzierbaren Herunterregulation (Czuderna, 2003) über eine stabile shRNA-Transfektion möglich. Dabei wird mittels einer retroviralen Infektion ein Plasmid stabil in die Zellen eingebracht von dem eine siRNA abgelesen werden kann.

Zusätzlich könnte der Ansatz, die eNOS als Reporter für lysosomalen Arginin-Transport zu nutzen, verfeinert werden. Dazu muss zusätzlich der nun als lysosomaler Arginin- und Lysin-Transporter beschriebene PQLC2 herunterreguliert werden (Liu et al., 2012). Eine alleinige Herunterregulation bzw. in Kombination mit hCAT-1 in EA.hy926-Zellen könnte zeigen, welchen Anteil die jeweiligen Transporter beim lysosomalen Arginin-Transport übernehmen. Dass humanes PQLC2 in EA.hy926-Zellen exprimiert wird, konnte ich auf mRNA-Ebene schon nachweisen (vgl. Abbildung A. 7). Ein Nachweis auf Proteinebene ist nicht möglich, da bisher kein geeigneter Antikörper verfügbar ist.

Um die mit der SSM-basierten Elektrophysiologie generierten Ergebnisse zu verifizieren, bzw. die Möglichkeit eines falsch positiven Ergebnisses durch die Kontamination mit Plasmamembran auszuschließen, könnte eine neuere Methode der Elektrophysiologie genutzt werden. 2010 wurde eine Methode beschrieben, bei der an einzelnen Lysosomen mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik Ströme gemessen werden können (Schieder et al., 2010). Dabei wird die üblicherweise genutzte Glaspipette, bei deren Benutzung es problematisch ist die Integrität der Lysosomen zu wahren, durch einen ebenen Glas-Chip ersetzt. Dieser verfügt über ein sehr kleines Loch, das dazu dient genau ein Lysosom zu immobilisieren und zu stabilisieren (vgl. Abbildung 1C in der oben genannten Veröffentlichung). An diesem können dann Messungen vorgenommen werden. Zur Vereinfachung der Isolation werden Lysosomen in noch intakten Zellen vor der Isolation durch die Inkubation in Vacuolin dazu gebracht, auf das mehrfache ihrer normalen Größe anzuschwellen. Die Firma Nanion (München) bietet zurzeit die Möglichkeit an, Lysosomen, die nach dem von Schieder und Kollegen (2010) beschriebenen Protokoll isoliert wurden, mit dem Gerät „Port-a-Patch“ elektrophysiologisch zu untersuchen. Hier wäre allerdings wichtig, bei jeder Messungen zu überprüfen, dass wirklich ein Lysosom

und kein Plasmamembran-Vesikel auf der Glasplatte sitzt. Dies könnte z.B. anhand Lysosomen-spezifischer Ionen-Kanäle, deren Eigenschaften sich von Kanälen der Plasmamembran unterscheiden, geschehen.

Um zu untersuchen, ob hCATs eine Rolle bei der Cystinose-Therapie spielen, sollten mögliche Kandidaten (in Kombination mit PQLC2) in cystinotischen Zellen herunterreguliert werden. Eine anschließende Messung des intrazellulären Cystin-Gehalts in unbehandelten oder mit Cysteamin behandelten Zellen könnte Aufschluss darüber geben, ob der herunterregulierte Kandidat für den Export des gemischte Disulfids aus dem Lysosom verantwortlich ist. Eine Methode bei der via HPLC spezifisch intralysosomales Cystin gemessen werden kann wurde 1999 beschrieben (de Graaf-Hess et al., 1999). Leider blieb die Transfektion cystinotischer Fibroblasten mit der in EA.hy926-Zellen sehr gut funktionierenden siRNA gegen hCAT-1 mittels zweier, gängiger Transfektionsmedien (SaintRed, PromoFectin-siRNA) bisher erfolglos. Daher könnte in einem weiteren Ansatz EA.hy926-Zellen mit siRNA gegen Cystinosis sowie hCAT-1 (und PQLC2) transfiziert und anschließend mit Cysteamin behandelt werden, so dass getestet werden kann, ob der hCAT-1 für den therapeutischen Effekt des Cysteamin (mit) verantwortlich ist. Alternativ könnte auch hier der Ansatz der retroviralen shRNA-Transfektion in cystinotischen humanen Hautfibroblasten als primäre Zelllinie Anwendung finden (Barton & Medzhitov, 2002). Nach einer Herunterregulation von hCAT-1 und ggf. auch SLC7A14 könnte man testen, ob eine Behandlung dieser Zellen mit Cysteamin noch erfolgreich ist.

Um SLC7A14, für den bisher keine Funktion gezeigt werden konnte, weiter zu untersuchen, könnten mit Retinsäure behandelte NT2-Zellen transient mit SLC7A14.EGFP transfizieren und dann mit LysoTracker angefärbt werden. Damit könnte man überprüfen, ob das überexprimierte Protein in diesem Zelltyp, in dem es ja auch endogen vorkommt, ebenfalls im Lysosom lokalisiert ist, oder in einer anderen Art von Vesikel. Falls sich in diesen Zellen Synaptosomen ausbilden, könnte man diese z.B. über eine Immunfärbung mit einem Antikörper gegen SNAP-25 (synaptosome asociated protein of 25 kDa) anfärben (Hodel, 1998). Andererseits könnte man mit dem im Rahmen dieser Arbeit generierten Antikörper gegen SLC7A14 über Immunfärbungen das endogene Verteilungsmuster von SLC7A14 überprüfen.

Der SLC7A14-Antikörper sollte auch dazu eingesetzt werden, eine U373MG-Linie zu erschaffen, in der SLC7A14 ohne EGFP überexprimiert wird. Eine Präparation der Fraktion C könnte dann Aufschluss darüber geben, ob das EGFP bei den vorherigen Transportversuchen einen Störfaktor dargestellt hat.

5 Zusammenfassung

Lysosomaler Transport kationischer Aminosäuren (KAS) stellt einen Rettungsweg in der Cystinose-Therapie dar. Ein solches Transportsystem wurde in humanen Hautfibroblasten beschrieben und mit System c benannt. Des Weiteren stellt lysosomales Arginin eine Substratquelle für die endotheliale NO-Synthase (eNOS) dar. Das von der eNOS gebildete NO ist ein wichtiges vasoprotektiv wirkendes Signalmolekül. Ziel war es daher, herauszufinden, ob Mitglieder der SLC7-Unterfamilie hCAT möglicherweise System c repräsentieren.

In dieser Arbeit konnte ich die lysosomale Lokalisation verschiedener endogener, sowie als EGFP-Fusionsproteine überexprimierter CAT-Isoformen nachweisen. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde festgestellt, dass die in U373MG-Zellen überexprimierten Fusionsproteine hCAT-1.EGFP sowie SLC7A14.EGFP mit dem lysosomalen Fluoreszenz-Farbstoff LysoTracker co-lokalisieren. Eine Lokalisation in Mitochondrien oder dem endoplasmatischen Retikulum konnte mit entsprechenden Fluoreszenz-Farbstoffen ausgeschlossen werden. Zusätzlich reicherten sich die überexprimierten Proteine hCAT-1.EGFP, hCAT-2B.EGFP und SLC7A14.EGFP in der lysosomalen Fraktion C aus U373MG-Zellen zusammen mit den lysosomalen Markern LAMP-1 und Cathepsin D an. Gleiches galt für den endogenen hCAT-1 in der lysosomalen Fraktion C aus EA.hy926- und U373MG-Zellen sowie für den SLC7A14 in den humanen Hautfibroblasten FCys5. Mit dem im Rahmen dieser Arbeit generierte Antikörper gegen natives SLC7A14 konnte erstmals die endogene Expression und Lokalisation von SLC7A14 in verschiedenen Zelltypen analysiert werden.

Obwohl eine Herunterregulation des hCAT-1 in EA.hy926-Endothelzellen nicht zu einer Reduktion der Versorgung der eNOS mit lysosomalem Arginin führte, ist eine Funktion von hCAT-1 im Lysosom wahrscheinlich. Sowohl die [³H]Arginin- als auch die [³H]Lysin-Aufnahme der Fraktion C aus U373MG-hCAT-1.EGFP war signifikant höher als in die Fraktion C aus EGFP-Kontrollzellen. Dies konnte ebenfalls für den hCAT-2B.EGFP gezeigt werden. Zusätzlich zeigten lysosomale Proben aus U373MG-hCAT-2B.EGFP-Zellen in der SSM-basierten Elektrophysiologie eine elektrogene Transportaktivität für Arginin. Das Protein SLC7A14.EGFP zeigte in keiner der beiden durchgeführten Transportstudien eine Aktivität. Dies war unerwartet, da die aus der Diplomarbeit stammende und im Rahmen dieser Dissertation erweiterte Charakterisierung der hCAT-2/A14_BK-Chimäre, die die „funktionelle Domäne“ des SLC7A14 im Rückgrat des hCAT-2 trug, zuvor den Verdacht erhärtet hatte, dass SLC7A14 ein lysosomal lokalisierter Transporter für KAS sein könnte. Diese Studien zeigten allerdings erstmals, dass die

„funktionelle Domäne“ der hCATs die pH-Abhängigkeit vermittelt und eine Rolle in der Substraterkennung spielt.

Zukünftig soll weiter versucht werden auch endogen eine Transportaktivität der hCATs für KAS im Lysosom nachzuweisen und das Substrat für das intrazellulär lokalisierte Waisen-Protein SLC7A14 zu finden. Eine mögliche Rolle könnte SLC7A14 als Transporter für Neurotransmitter spielen, da eine sehr prominente Expression im ZNS festgestellt wurde.

6 Abstract

Lysosomal transport of cationic amino acids (CAS) constitutes a salvage pathway in the therapy of cystinosis. Such a transport system has been described in human skin fibroblasts and named system c. Furthermore lysosomal arginine plays a role in substrate supply of the endothelial NO synthase (eNOS). NO generated by cytosolic eNOS is an important vasoprotective signaling molecule. Objective of this work was to find out, if members of the SLC7 subfamily of human cationic amino acid transporters (hCATs) might represent system c.

In this study I could demonstrate the lysosomal localization of several endogenous and as EGFP fusion proteins overexpressed hCAT isoforms. Fluorescence microscopy revealed, that the fusion proteins hCAT-1.EGFP and SLC7A14.EGFP co-localized with the lysosomal fluorescent dye LysoTracker when overexpressed in U373MG cells. Localization in mitochondria or the endoplasmic reticulum could be excluded using appropriate fluorescent dyes. In addition the overexpressed proteins hCAT-1.EGFP, hCAT-2B.EGFP und SLC7A14.EGFP enriched in the lysosomal fraction C derived from U373MG cells, together with the lysosomal markers LAMP-1 und Cathepsin D an. The same was true for endogenous hCAT-1 in the lysosomal fraction C derived from EA.hy926 and native U373MG cells and for SLC7A14 in human skin fibroblasts. The antibody against native SLC7A14, which has been generated during this work, has enabled us to study endogenous expression and localization of SLC7A14 in several cell types for the first time.

Although down regulation of hCAT-1 in EA.hy926 endothelial cells did not lead to a reduction of the lysosomal arginine supply of eNOS, a function of hCAT-1 in the lysosome is most likely. Uptake of [³H]arginine as well as [³H]lysine of fraction C derived from U373MG-hCAT-1.EGFP was significantly higher than of fraction C derived from EGFP control cells. Similar results were obtained for hCAT-2B.EGFP. Additionally, lysosomal membranes derived from U373MG-hCAT-2B.EGFP cells exhibited electrogenic transport activity for arginine using SSM-based electrophysiology. SLC7A14.EGFP did not show any transport activity in both experimental setups. This was unexpected, because the chimeric protein hCAT-2/A14_BK, which has been created during my diploma thesis and its characterization has been broadened during my dissertation did transport arginine with similar but not identical properties as hCAT-2A. The chimera carries the “functional domain” of SLC7A14 in the backbone of hCAT-2 and thus substantiated the suspicion that SLC7A14 is a lysosomal localized CAS transporter. However, these studies revealed, that

the „functional domain“ of hCATs mediates pH dependence, additionally to substrate affinity and trans-stimulation properties and is involved in substrate recognition.

Prospective studies should now focus on the detection of endogenous transport activity of hCATs in the lysosome and on the identification of the substrate for SLC7A14. A role of SLC7A14 as transporter for neurotransmitter is possible, because a prominent mRNA expression of this SLC7 member has been detected in the central nervous system.

A Anhang

A.1 Verwandtschaftsbeziehungen der SLC7-Familie

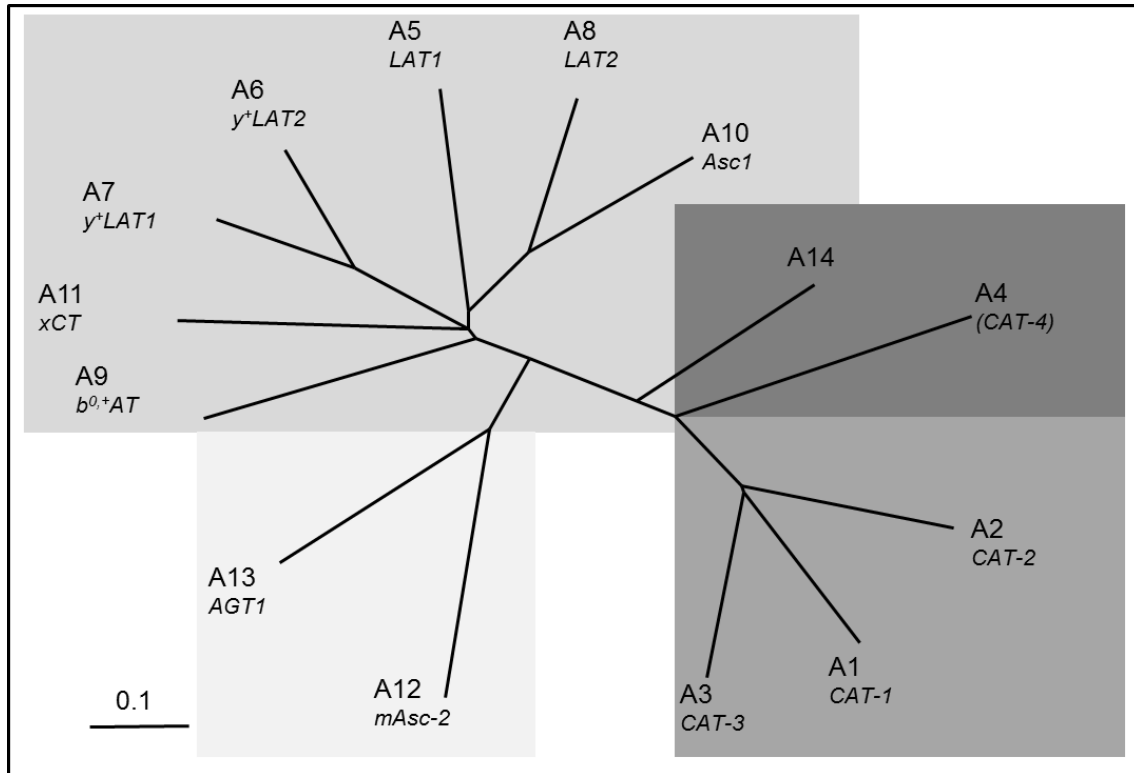


Abbildung A. 1: Phylogenetischer Baum der SLC7-Familie

Die Abbildung wurde aus einer Veröffentlichung unserer Arbeitsgruppe entnommen und modifiziert (Verrey et al., 2003). Die SLC7-Familie besteht aus 2 Untergruppen: Die CATs (hCAT, SLC7A1-4 und 14) und den Glycoprotein-assoziierten Aminosäuretransporter [gpaAT, light chains of heterodimeric amino acid transporters (lcHAT)]. SLC7A4 und A14 sind Waisenproteine mit noch unbekannter Funktion.

A.2 Modelle von hCAT-2A und SLC7A14

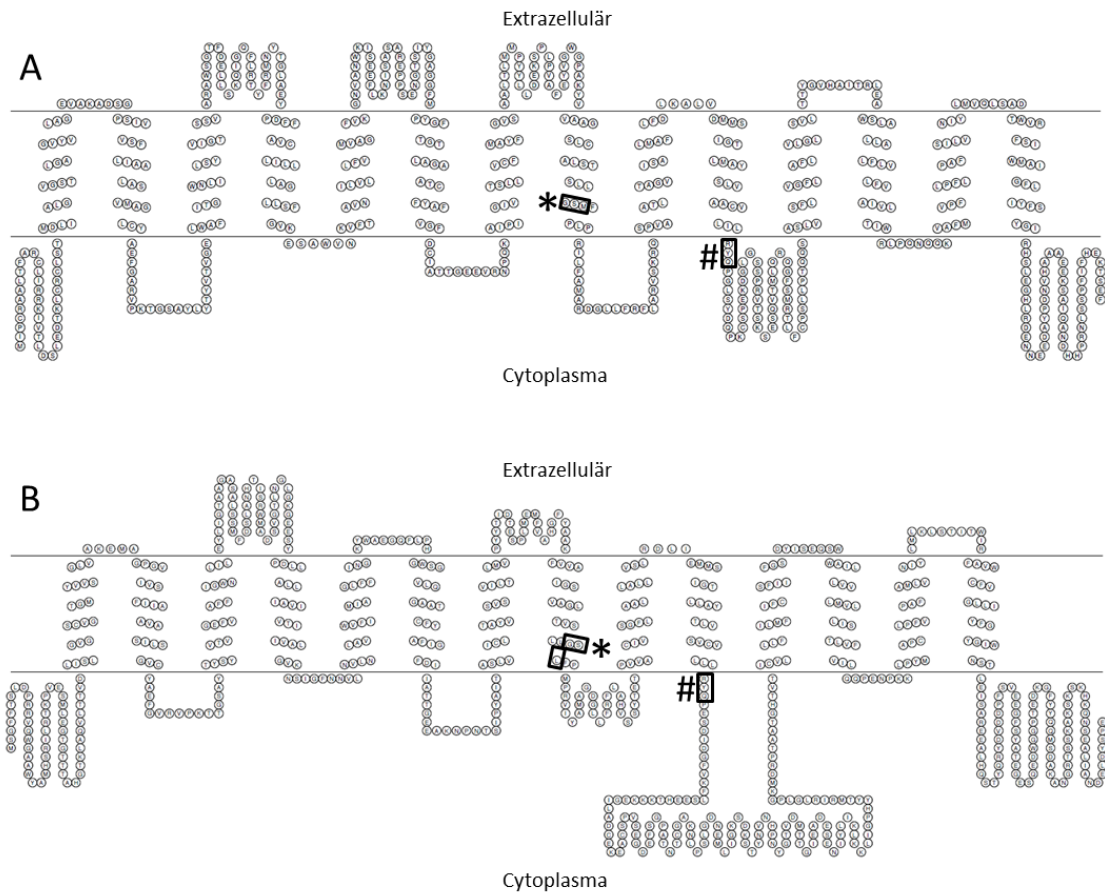


Abbildung A. 2: Schlangenmodell von hCAT-2A und SLC7A14

Modell von hCAT-2A (A) und SLC7A14 (B) mit den 14 mutmaßlichen TMs, wie sie von den meisten Analyse-Programmen vorhergesagt wird. Diese Modelle wurden mit dem Programm Topo2 generiert (Dr. J.-P. Boissel). Die Positionen, die mit den Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BamHI (*) und KpnI (#) korrespondieren sind eingerahmt. Diese Schnittstellen wurden verwendet um die Chimäre hCAT-2/A14_BK herzustellen.

A.3 Die Transkription von SLC7A14 wird in NT2-Zellen durch die Behandlung mit Retinsäure gesteigert

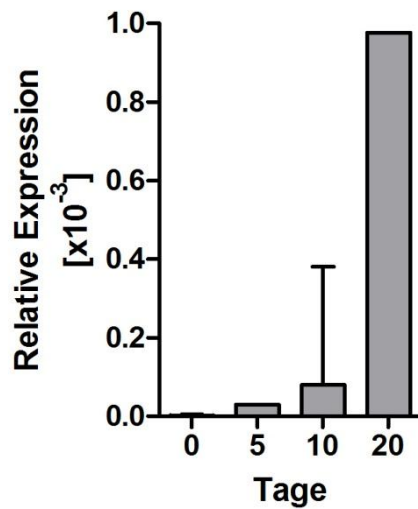


Abbildung A. 3: qRT-PCR Analyse von mRNA aus NT2-Zellen

NT2-Zellen wurden mit 10 μM Retinsäure behandelt. Zum angegebenen Zeitpunkt wurde aus einem Teil der Zellen Gesamt-RNA isoliert und in einer qRT-PCR-Analyse mit SLC7A14- sowie GAPDH-spezifischen Oligonukleotiden und Sonden eingesetzt. Nach den RT-PCR Reaktionen wurde zur Normalisierung der Daten der CT-Wert des Haushaltsgens (GAPDH) von dem des entsprechenden Transporters subtrahiert (ΔCT). Die relative Expression wurde anschließend anhand der Formel $2^{(-1 \times \Delta\text{CT})}$ berechnet, so dass die Expression der GAPDH als 1 definiert war. Die Proben für 1 und 10 Tage wurden in zwei unabhängigen Versuchen ermittelt, die Proben für 5 und 20 Tage in nur einem Versuch. Diese Versuche wurden von Dr. J.-P. Boissel in unserem Labor durchgeführt.

A.4 Transkription von SLC7A14 in verschiedenen Geweben und Zellen

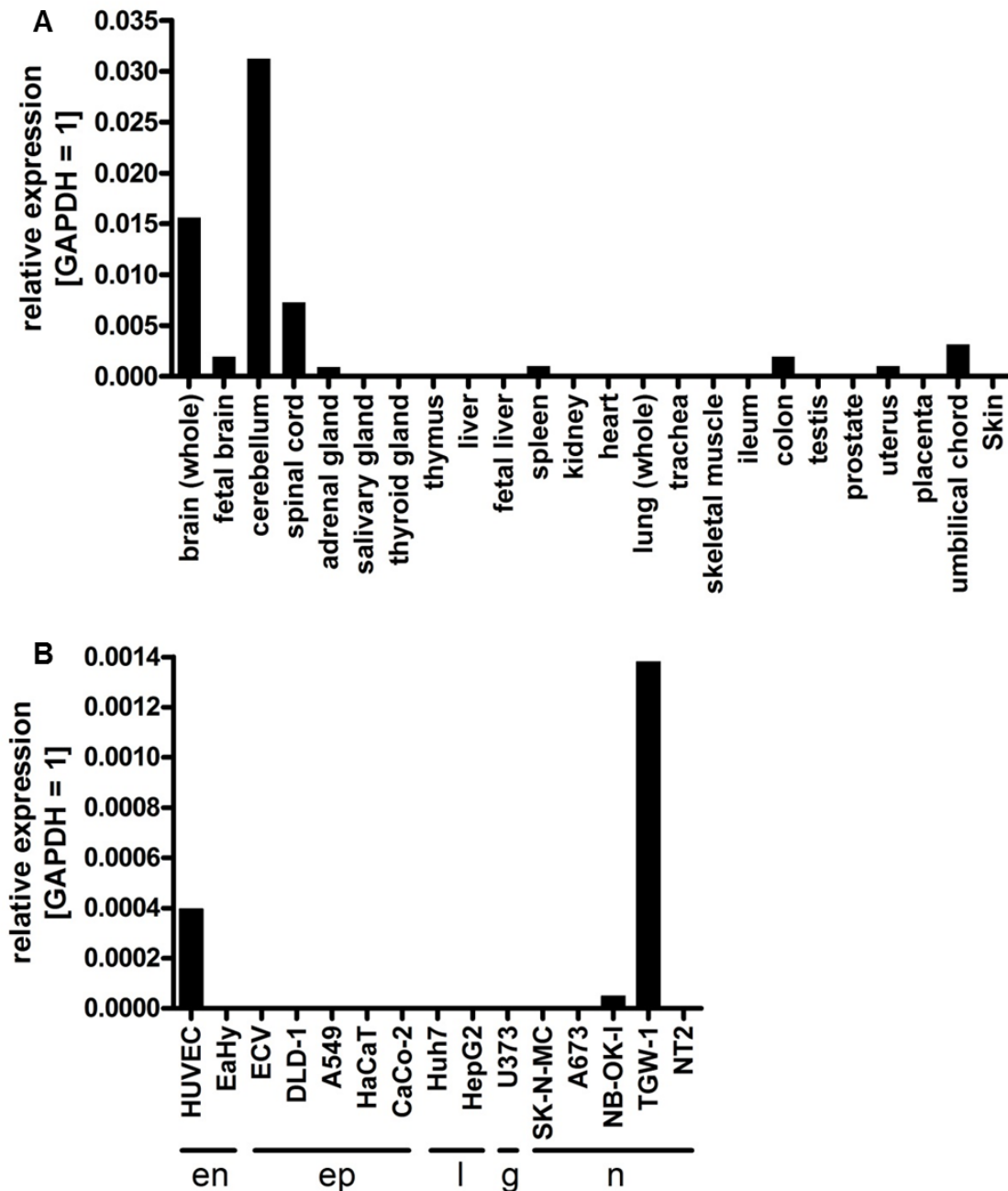


Abbildung A. 4: Expression von SLC7A14 in humanen Geweben und Zelllinien

RNA verschiedener Gewebe von BD Biosciences Clontech (A) sowie aus verschiedenen Zelllinien isolierte Gesamt-RNA (B; en: endotheliale, ep: epitheliale Zellen verschiedener Organe, l: Leber, g: Glia, n: neuronal) wurde mittels qRT-PCR auf SLC7A14 Expression untersucht. Nach den RT-PCR Reaktionen der Transporter sowie des Haushaltsgens GAPDH wurde zur Normalisierung der Daten der CT-Wert des Haushaltsgens von dem des SLC7A14 subtrahiert (ΔCT). Die relative Expression wurde anschließend anhand der Formel $2^{-(1 \times \Delta CT)}$ berechnet, so dass die Expression der GAPDH als 1 definiert war. Diese Versuche wurden von Dr. J.-P. Boissel in unserem Labor durchgeführt.

A.5 Lysosomen-Präparation aus Mäuse-Leber

Die Präparation der Lysosomen aus Mäuse-Leber wurde im Labor von B. Gasnier durchgeführt. Die Western Blot-Analysen der Proben hab ich angefertigt.

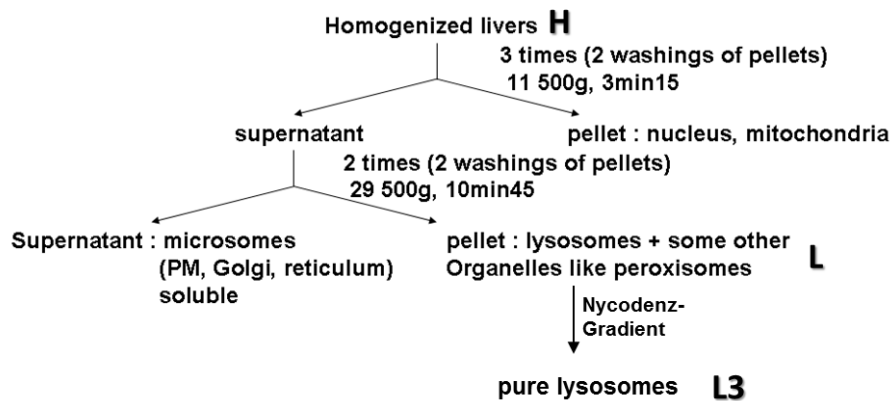


Abbildung A. 5: Schema der Lysosomen-Präparation aus Mäuse-Leber

Lebern von 20 Mäusen wurden homogenisiert (H) und schwere Bestandteile (Zelltrümmer, Kerne, schwere Mitochondrien) abzentrifugiert. Aus dem Überstand wird eine granuläre Fraktion (L) pelletiert (Lysosomen, Peroxisomen) und über einen Nycodenz-Gradient aufgereinigt. Die resultierende Fraktion enthält sehr reine Lysosomen (L3). Diese Präparationen wurden im Labor von B. Gasnier (Paris) durchgeführt.

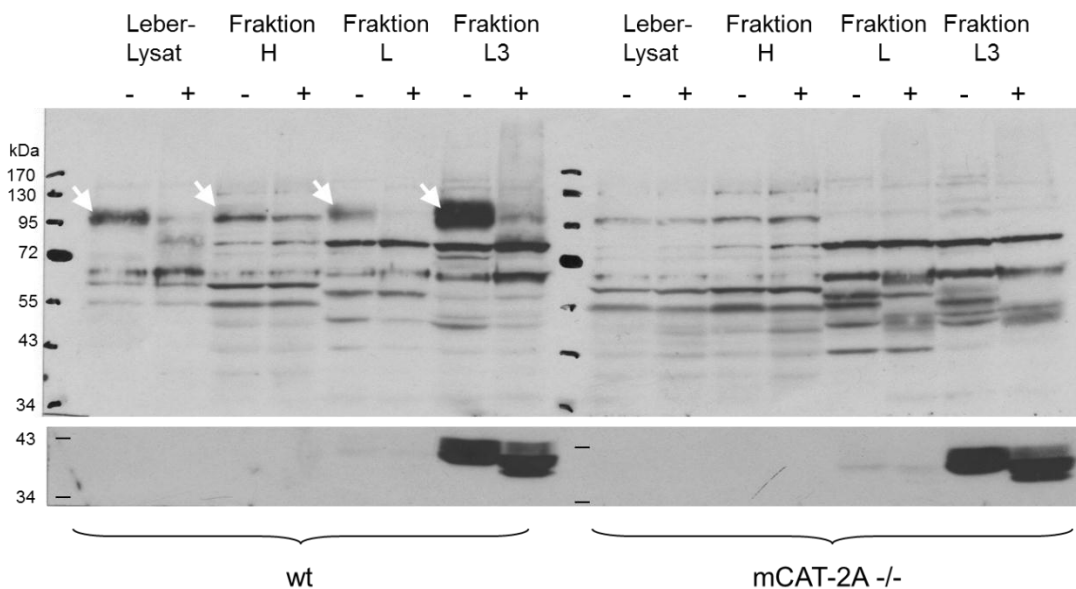


Abbildung A. 6: Western-Blot-Analyse einer Lysosomenpräparation aus Mäuseleber

Aus Leber von Black-6-Wildtyp- und mCAT-2-Knock-out-Mäusen wurden Lysosomen präpariert. Die in einem Western-Blot analysierten Fraktionen waren: Homogenisierte Leber (Fraktion H), die Fraktion vor der Auftrennung über den Nycodenz-Gradienten (Fraktion L) sowie die aufgereinigten Lysosomen (L3). Die jeweils gleichen Proteinmengen der in Sucrose-Puffer vorliegenden Fraktionen wurden je 1:1 mit RIPA gemischt und lysiert (-). Anschließend wurde die Hälfte jeder Probe für 45 Minuten mit N-Glykosidase inkubiert (+) und in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Als Kontrolle wurde ein Lysat aus einem Stück Mäuseleber aufgetragen. Nach dem Transfer auf Nitrozellulose wurde die Membran mit Kaninchen-anti-mCAT-2 (oben) und anschließend mit Ziege-anti-CathepsinD (unten) behandelt.

A.6 Expression von PQLC2 in Endothelzellen und Hautfibroblasten

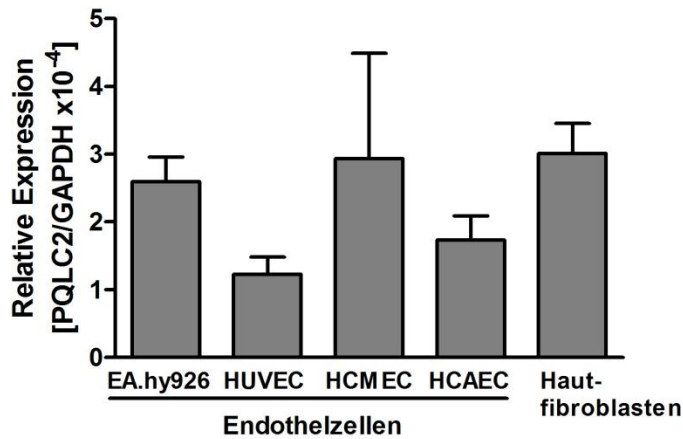


Abbildung A. 7: Analyse der PQLC2-Expression in humanen Zellen

Gesamt-RNA verschiedener Zellen wurden mittels qRT-PCR auf PQLC2-Expression untersucht. Nach den RT-PCR Reaktionen wurde zur Normalisierung der Daten der CT-Wert des Haushaltsgens GAPDH von dem des PQLC2 subtrahiert (ΔCT). Die relative Expression wurde anschließend anhand der Formel $2^{(-1 \times \Delta CT)}$ berechnet, so dass die Expression der GAPDH als 1 definiert war. Bei den Endothelzellen wurden je zwei Gesamt-RNAs aus verschiedenen Zellchargen analysiert, bei den Hautfibroblasten wurde RNA der Linien MW26, MW33, FCys5, FCys16 und FCys17 untersucht (N=5). Abkürzungen: HUVEC= humane Endothelzellen der Nabelschnurvene (human umbilical vein cells); HCMEC= humane mikrovaskuläre Endothelzellen des Herzens (human cardiac microvascular endothelial cells); HCAEC= humane Endothelzellen der Koronararterie (human coronary artery endothelial cells). Die verwendete Primer und Sonden für GAPDH sind in Kapitel 2.2.6 beschrieben, bei PQLC2 handelte es sich um hPQLC2_{ss} (5'-CGG CTG TGT ATT ATG TCT TGG-3'), hPQLC2_{as} (5'-AAC AAC AGC ACG GAG TTG A-3') und hPQLC2_{Taq} (6FAM-TAC AGC GTC AGC ATC ACC AGG TCT-XTp).

A.7 Antikörper gegen humanes γ ⁺LAT1

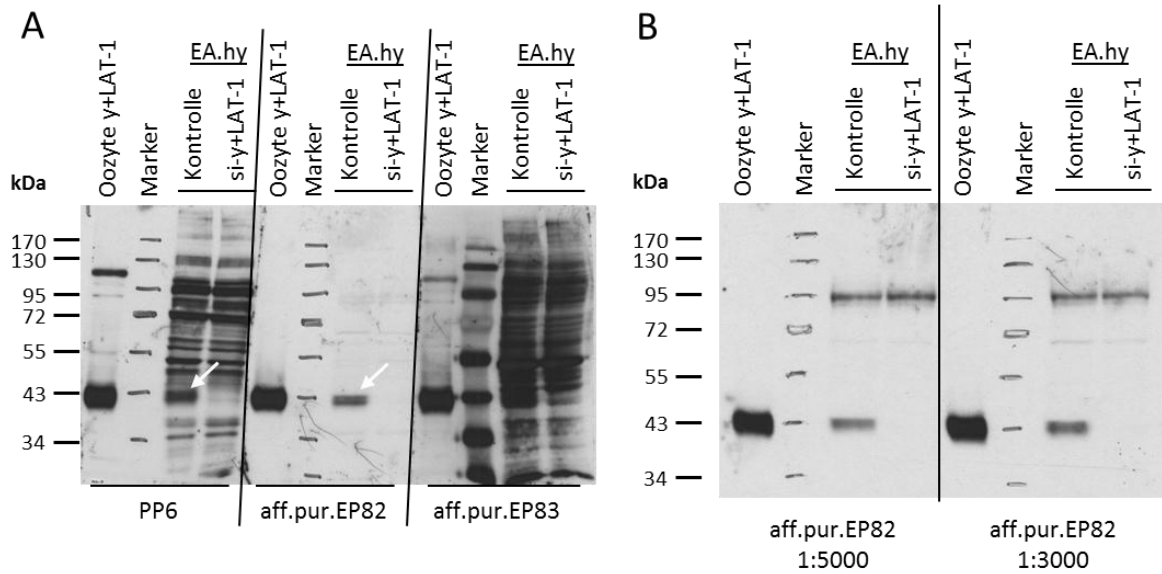


Abbildung A. 8: Testung des Serums PP7 und der aus ihm aufgereinigten Antikörper

Proteine aus Lysaten von γ +LAT1-exprimierenden *X. laevis*-Oozyten (5 μ g/Spur), sowie Lysate aus EA.hy926-Zellen die entweder nicht oder mit siRNA gegen γ +LAT1 behandelt worden waren (je 40 μ g Gesamtprotein/Spur), wurden in einer SDS-PAGE (Trenngel 10% Acrylamid) aufgetrennt und per Western-Blot analysiert. A) Als Primärantikörper diente das Serum der Testblutung PP6 (03.07.12) sowie aus diesem Serum mit den Peptiden der Immunisierung (EP121682 kurz EP82 bzw. EP121683 kurz EP83) aufgereinigte Antikörper. Das Serum wurde in der Verdünnung 1:10.000, die aufgereinigten Antikörper 1:1000 eingesetzt. Der Zweitantikörper (POD konj. anti-Kaninchen-IgG) wurde 1:15.000 eingesetzt. Die Belichtungszeit betrug 1 Minute. B) Anschließend wurden von dem Antikörper aff.pur.EP82 weitere Verdünnungen getestet (1:5000 und 1:3000). Die Belichtungszeit betrug hier 5 Minuten. Doch auch nach 1 Minute war schon ein schwaches Signal zu erkennen (nicht gezeigt).

Abkürzungsverzeichnis

4F2hc.	schwere Kette des 4F2 Oberflächenantigens (4F2 heavy chain)
Arg	Arginin
as	nicht kodogener Strang (antisense)
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BAS	basische Aminosäure
Bp	Basenpaare
CAT	Transporter für kationische Aminosäuren (cationic amino acid transporter) (h für human)
cDNA	Copy DNA
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
cpm	Zählrate pro Minute (counts per minute)
CT	Schwellenwert-Zyklus (Cycle Threshold)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dpm	Zerfallrate pro Minute (decays per minute)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	endotheliale NO-Synthase
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FCS	Rinderserumalbumin
G418	Geneticin 418 Sulfat
GFP	grün fluoreszierendes Protein (green fluorescent protein)
HAT	hetero(di)mere Aminosäure-Transporter
H ₂ Oreinst.	Reinstwasser aus Millipore-Anlage
His	Histidin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
KAS	kationische Aminosäure/n
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
LAT	System L-Aminosäuretransporter
Lys	Lysin
mA	Millie-Ampere
MCS	multiple cloning site
MST	Gepufferte Sucroslösung (MOPS-Tris-Sucrose)

MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
NAS	neutrale Aminosäure/n
NEM	N-Ethylmaleimid
NO	Stickstoffmonoxid
NTPs	Nukleosidtriphosphate
OD	Optische Dichte
OZ	ohne Zielsequenz (betrifft siRNA)
PBS	Phosphat (Phosphate Buffered Saline)
PCR	Polymerase-Chain-Reaktion
POD	(Meerrettich-)Peroxidase
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
RIA	Radio Immun Assay
SEM	Standardfehler (standard error of mean)
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	Small interfering RNA
SLC	Solute carrier
ss	kodogener Strang (sense strand)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (Tris Buffered Saline)
TE	Tris-EDTA
TM	Transmembrandomäne(n)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
ü. N.	über Nacht
UTR	untranslatierte Region
V	Volt

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau und Funktion des endosomal-lysosmalen Systems	2
Abbildung 2: Prinzip des lysosomalen Cystin-Transports sowie der Cystinose-Therapie ...	6
Abbildung 3: Prinzip von TaqMan Sonden in einer quantitativen „real time“ PCR.....	19
Abbildung 4: Die Reifestadien der Oozyten von <i>Xenopus laevis</i>	25
Abbildung 5: Homogenisator mit Kolben	48
Abbildung 6: Prinzip des SURFE ² R.....	52
Abbildung 7: SURFER One Messeinrichtung.....	53
Abbildung 8: Analyse von mRNA humaner Hautfibroblasten auf Expression bestimmter hCAT-Familienmitglieder	58
Abbildung 9: Nachweis des hCAT-1 in humanen Haut-Fibroblasten auf Protein-Ebene...	59
Abbildung 10: Färbungen von U373MG-Glioblastomzellen die ein hCAT-1.EGFP-Fusionsprotein überexprimieren (U373MG-hCAT-1.EGFP) mit Markern für verschiedene Organellen.....	60
Abbildung 11: Färbungen von U373MG-Glioblastomzellen die ein SLC7A14.EGFP-Fusionsprotein überexprimieren (U373MG-A14.EGFP) mit Markern für verschiedene Organellen.....	61
Abbildung 12: Färbungen von U373MG-Glioblastomzellen die ein LAMP-1.EGFP-Fusionsprotein überexprimieren (U373MG-LAMP-1.EGFP) mit einem Marker für Lysosomen	62
Abbildung 13: Analyse der Fraktionen A und C aus U373MG Zellen, die CAT-Familienmitglieder stabil überexprimieren.....	63
Abbildung 14: Analyse der Anreicherung des endogenen hCAT-1-Proteins in den Fraktionen C aus U373MG Glioblastom- und EA.hy926 Endothelzellen	64
Abbildung 15: Oberflächenexpression von Mitgliedern der SLC7-Familie in humanen U373MG Zellen.....	65
Abbildung 16: Oberflächenexpression von Mitgliedern der SLC7-Familie in <i>Xenopus laevis</i> -Oozyten	66
Abbildung 17: Arginin-Aufnahme in U373MG-Zellen	67
Abbildung 18: Arginin-Aufnahme in <i>X. laevis</i> -Oozyten	68
Abbildung 19: Fluoreszenzaufnahmen von <i>X. laevis</i> -Oozyten-Schnitten	69
Abbildung 20: Vergleich der Aufnahme von Arginin und Lysin in <i>X. laevis</i> -Oozyten	70
Abbildung 21: Arginin-Aufnahme in <i>X. laevis</i> - Oozyten bei verschiedenen pH-Werten ..	71
Abbildung 22: Arginin-Efflux aus <i>X. laevis</i> -Oozyten bei verschiedenen pH-Werten.....	72
Abbildung 23: Arginin-Aufnahme in <i>X. laevis</i> -Oozyten in Ab- bzw. Anwesenheit von ϵ -Trimethyl-L-Lysin	73
Abbildung 24: Schema der eNOS- Versorgung in einer endothelialen Zelle	75

Abbildung 25: Analyse von EA.hy926 auf Expression der Vertreter der hCAT-Unterfamilie auf mRNA-Ebene.....	76
Abbildung 26: Analyse der hCAT-1 mRNA-Expression nach Transfektion von EA.hy926-Zellen mit siRNA.....	77
Abbildung 27: Analyse der Proteinexpression nach Transfektion von EA.hy926-Zellen mit siRNA	77
Abbildung 28: Analyse des Arginin-Transports nach Transfektion von EA.hy926-Zellen mit siRNA.....	78
Abbildung 29: Analyse des lysosomale Anteils der Arginin-Versorgung der eNOS in mit hCAT-1-siRNA behandelten Zellen.....	80
Abbildung 30: Analyse der NO-Produktion nach Arginin-Depletion.....	81
Abbildung 31: Erholung der NO-Produktion durch Zugabe von extrazellulärem Arginin.	83
Abbildung 32: Schema von auf der SSM aufgelagerten Vesikeln bzw. Membranen	84
Abbildung 33: Messung von Arginin-Transport der Fraktion C-Proben im SURFE ² R.....	86
Abbildung 34: Messung von Arginin-Transport der Fraktion 31/45-Proben im SURFE ² R87	
Abbildung 35: Analyse der Fraktionen A und C von U373MG-EGFP, -SLC7A14.EGFP und -CAT-2B.EGFP im Western Blot.....	88
Abbildung 36: Analyse der Fraktionen der Membranpräparation von U373MG-EGFP, -SLC7A14.EGFP und -CAT-2B.EGFP-Zellen im Western Blot	89
Abbildung 37: Arginin-Aufnahme der Fraktion C.....	91
Abbildung 38: Lysin-Aufnahme der Fraktion C	93
Abbildung 39: Verwandtschaftsbeziehung des Moskito-AaCAT1 mit hCAT-1, -2A und SLC7A14.....	94
Abbildung 40: Histidin-Aufnahme in U373MG-Zellen.....	95
Abbildung 41: Histidin-Aufnahme in X. laevis-Oozyten.....	96
Abbildung 42: Histidin-Transport in U373MG-A14.EGFP-Zellen in An- bzw. Abwesenheit von Natrium und Leucin.....	97
Abbildung 43: qRT-PCR-Analyse von RNA verschiedener U373MG-Klone auf LAT1 und LAT2-Expression	98
Abbildung 44: Proteinsequenz des C-Terminus von SLC7A14.....	99
Abbildung 45: Testung der Seren des Standardprogramms an Überexpressionssystemen	101
Abbildung 46: Detektion des SLC7A14.EGFP ohne und mit Behandlung mit N-Glykosidase.....	102
Abbildung 47: Testung des Serum PP2 an Lysaten von Zellen mit endogener SLC7A14-Expression.....	103
Abbildung 48: Testung der Seren PP2-PP6 an Lysaten humaner Hautfibroblasten	104
Abbildung 49: Testung des Serums PP7 und der aus ihm aufgereinigten Antikörper	105
Abbildung 50: Testung verschiedener Konzentrationen des anti-A14 aff.pur.EP56	106

Abbildung 51: Nachweis des SLC7A14 in den Fraktionen A und C aus humanen Hautfibroblasten	107
Abbildung 52: Nachweis des SLC7A14 in NT2-Zellen auf Proteinebene.....	108

Abbildungen aus dem Anhang:

Abbildung A. 1: Phylogenetischer Baum der SLC7-Familie.....	137
Abbildung A. 2: Schlangenmodell von hCAT-2A und SLC7A14.....	138
Abbildung A. 3: qRT-PCR Analyse von mRNA aus NT2-Zellen.....	139
Abbildung A. 4: Expression von SLC7A14 in humanen Geweben und Zelllinien.....	140
Abbildung A. 5: Schema der Lysosomen-Präparation aus Mäuse-Leber	141
Abbildung A. 6: Western-Blot-Analyse einer Lysosomenpräparation aus Mäuseleber ...	141
Abbildung A. 7: Analyse der PQLC2-Expression in humanen Zellen	142
Abbildung A. 8: Testung des Serums PP7 und der aus ihm aufgereinigten Antikörper ...	143

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über Plasmamembrantransporter für kationische Aminosäuren der SLC7-Familie	7
Tabelle 2: Plasmidkonstrukte mit den inserierten Genen	16
Tabelle 3: Standard qRT-PCR Ansatz	20
Tabelle 4: Standard qRT-PCR-Cycler-Protokoll	21
Tabelle 5: Standardansatz zur Transfektion mit 15nM siRNA	32
Tabelle 6: Verwendete Erst- und Zweitantikörper	43
Tabelle 7: Schema eines RFL-6 Reporterzell-Assays	45
Tabelle 8: Immunisierungsplan des Kaninchens SA7086	100

Literaturverzeichnis

- Abderhalden, E., 1903. Familiäre Cystindiathese. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, 38(5-6), pp.557–561.
- Alquier, C. et al., 1985. Isolation of pig thyroid lysosomes. Biochemical and morphological characterization. *The Biochemical journal*, 232(2), pp.529–37.
- Andrews, P.W., 1994. Retinoic Acid Induces Neuronal Differentiation of a Cloned Human Embryonal Carcinoma Cell Line in Vitro. *Developmental Biology*, 293(1984), pp.285–293.
- Angeletti, R.H., 1999. Design of Useful Peptide. *Journal of Biomolecular Techniques*, 10, pp.2–10.
- Anikster, Y. et al., 1999. Identification and detection of the common 65-kb deletion breakpoint in the nephropathic cystinosis gene (CTNS). *Molecular genetics and metabolism*, 66(2), pp.111–6.
- Appelmans, F., Wattiaux, R. and de Duve, C., 1955. Tissue Fractionation Studies. The association of acid phosphatase with a special class of cytoplasmic granules in rat liver. *Biochemical Journal*, 59(3), pp.438–445.
- Arai, K., Shimayasu, A., Hiratanill, N. and Ohkumaji, S., 1993. Purification and Characterization of Lysosomal H⁺-ATPase. *Biochemistry*, 268(8), pp.5649–5660.
- Barbin, G. et al., 1980. L-Histidine Decarboxylase in the Human Brain : Properties and Localization. *Journal of Neurochemistry*, 35(2), pp.400–406.
- Barton, G.M. and Medzhitov, R., 2002. Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(23), pp.14943–5.
- Bellidina, E.B. et al., 2003. Steady-state pharmacokinetics and pharmacodynamics of cysteamine bitartrate in paediatric nephropathic cystinosis patients. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 56(5), pp.520–525.
- Bode, B.P., 2001. Recent Molecular Advances in Mammalian Glutamine Transport. *The Journal of Nutrition*, 131(9 Suppl), pp.2475–2485.
- Bradley, H., Schneider, A., Rosenbloom, M. and Seegmiller, J.E., 1967. Increased free-cystine content of fibroblasts cultured from patients with cystinosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 29(4), pp.527–531.
- Brady, R.O. et al., 1973. Replacement Therapy for Inherited Enzyme Deficiency — Use of Purified Ceramidetrihexosidase in Fabry's Disease. *N. Engl. J. Med.*, 289, pp.9–14.
- Brady, R.O. et al., 1974. Replacement Therapy for Inherited Enzyme Deficiency — Use of Purified Glucocerebrosidase in Gaucher's Disease. *N. Engl. J. Med.*, 291, pp.989–993.

- Braulke, T. and Bonifacino, J.S., 2009. Sorting of lysosomal proteins. *Biochimica et biophysica acta*, 1793(4), pp.605–14.
- Bredt, D.S. and Snyder, S.H., 1990. Isolation of nitric oxide synthetase , a calmodulin-requiring enzyme. *Biochemistry*, 87(January), pp.682–685.
- Bremer, J., 1983. Carnitine-Metabolism. *Physiological reviews*, 63(4), pp.1420–1480.
- Brown, R.E., Stevens, D.R. and Haas, H.L., 2001. The physiology of brain histamine. *Progress in neurobiology*, 63, pp.637–72.
- Brummelkamp, T.R., Bernards, R. and Agami, R., 2002. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5567), pp.550–3.
- Böger, R.H. and Bode-Böger, S.M., 2001. The Clinical Pharmacology of L-Arginine. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 41, pp.79–99.
- Calver, a, Collier, J. and Vallance, P., 1993. Nitric oxide and cardiovascular control. *Experimental physiology*, 78(3), pp.303–26.
- Casey, T.M., Meade, J.L. and Hewitt, E.W., 2007. Organelle proteomics: identification of the exocytic machinery associated with the natural killer cell secretory lysosome. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 6(5), pp.767–80.
- Closs, E.I. et al., 1993a. Retroviral Infection and Expression of Cationic Amino Acid Transporters in Rodent Hepatocytes. *Journal of Virology*, 67(4), pp.2097–2102.
- Closs, E.I. et al., 1997. Human cationic amino acid transporters hCAT-1, hCAT-2A, and hCAT-2B: three related carriers with distinct transport properties. *Biochemistry*, 36(21), pp.6462–8.
- Closs, E.I., 2002. Expression, regulation and function of carrier proteins for cationic amino acids. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 11(1), pp.99–107.
- Closs, E.I., Albritton, L.M., Kim, J.W. and Cunningham, J.M., 1993b. Identification of a low affinity, high capacity transporter of cationic amino acids in mouse liver. *The Journal of biological chemistry*, 268(10), pp.7538–44.
- Closs, E.I., Boissel, J.-P., Habermeier, A. and Rotmann, A., 2006. Structure and function of cationic amino acid transporters (CATs). *The Journal of membrane biology*, 213(2), pp.67–77.
- Cox, T.M., 2005. Substrate reduction therapy for lysosomal storage diseases. *Chemistry and Physics of Lipids*, 94(Suppl 447), pp.69–75.
- Cuervo, a M. and Dice, J.F., 1996. A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science (New York, N.Y.)*, 273(5274), pp.501–3.
- Czauderna, F., 2003. Inducible shRNA expression for application in a prostate cancer mouse model. *Nucleic Acids Research*, 31(21), p.127e–127.

- Desnick, R.J., 2004. Enzyme replacement and enhancement therapies for lysosomal diseases. *Journal of inherited metabolic disease*, 27(3), pp.385–410.
- Devés, R. and Boyd, C., 1998. Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function. *Physiological reviews*, 78(2), pp.487–545.
- de Duve, C., 1964. From cytochromes to lysosomes. *Federation Proceedings*, 23, pp.1045–9.
- de Duve, C., Gianetto, R., Wattiaux, R. and Appelmans, F., 1955. Intracellular Distribution Patterns of Enzymes in Rat-Liver Tissue. *Biochemical Journal*, 60(3), pp.324–30.
- Edgell, C.-J.S., 1983. Permanent Cell Line Expressing Human Factor VIII-Related Antigen Established by Hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(12), pp.3734–3737.
- Erickson, J.D. et al., 1996. Distinct pharmacological properties and distribution in neurons and endocrine cells of two isoforms of the human vesicular monoamine transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(10), pp.5166–71.
- Fanconi, G. and Bickel, H., 1949. Die chronische Aminoacidurie (Aminosäureidiabetes oder nephrotisch-glukosurischer Zwergwuchs) bei der Glykogenose und der Cystinose. *Helv Paediat Acta*, 4, p.359.
- Feliubadaló, L. et al., 1999. Non-type I cystinuria caused by mutations in SLC7A9, encoding a subunit (bo,+AT) of rBAT. *Nature genetics*, 23(1), pp.52–7.
- Florin, E. and Gaub, H., 1993. Painted supported lipid membranes. *Biophysical Journal*, 64(2), pp.375–383.
- Frustaci, A. et al., 2001. Improvement in Cardiac Function in the Cardiac Variant of Fabry's Disease with Galactose-Infusion Therapy. *N. Engl. J. Med.*, 345(1), pp.25–32.
- Fukuda, M., 1991. Lysosomal Membrane Glycoproteins - Structure, Biosynthesis and Intracellular Trafficking. *The Journal of biological chemistry*, 266(32), pp.21327–21330.
- Funato, K. et al., 1997. Reconstitution of phagosome-lysosome fusion in streptolysin O-permeabilized cells. *The Journal of biological chemistry*, 272(26), pp.16147–51.
- Förstermann, U. et al., 1994. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning and functions. *Hypertension*, 23, pp.1121–1131.
- Förstermann, U. et al., 1995. Isoforms of nitric oxide synthase : properties, cellular distribution and expressional control. *Biochemical pharmacology*, 50(9), pp.1321–1332.
- Gahl, W., 1989. Lysosomal membrane transport in cellular nutrition. *Annual review of nutrition*, 9, pp.39–61.
- Gahl, W., Thoene, J. and Schneider, J., 2002. Cystinosis. *N. Engl. J. Med.*, 347(2), pp.111–121.

- Gahl, W. a, Tietze, F., Butler, J.D. and Schulman, J.D., 1985. Cysteamine depletes cystinotic leucocyte granular fractions of cystine by the mechanism of disulphide interchange. *The Biochemical journal*, 228(3), pp.545–50.
- Girardin, E.P., DeWolfe, M.S. and Crocker, J.F., 1979. Treatment of cystinosis with cysteamine. *The Journal of pediatrics*, 94(5), pp.838–40.
- de Graaf-Hess, A., Trijbels, F. and Blom, H., 1999. New method for determining cystine in leukocytes and fibroblasts. *Clinical chemistry*, 45(12), pp.2224–8.
- Gräf, P., 1998. *Charakterisierung der Transportproteine für basische Aminosäuren: CAT-1, CAT-2A und CAT-2B*. Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Haas, H. and Selbach, O., 2007. Schlafen und Wachen – neurochemische Regulation. *Neurotransmitter*, 7-8, pp.43–49.
- Habermeier, A. et al., 2003. Two amino acid residues determine the low substrate affinity of human cationic amino acid transporter-2A. *The Journal of biological chemistry*, 278(21), pp.19492–9.
- Hamanaka, Y. et al., 2010. Transcriptional orchestration of the regulated secretory pathway in neurons by the bHLH protein DIMM. *Current biology : CB*, 20(1), pp.9–18.
- Hansen, I.A. et al., 2011. AaCAT1 of the yellow fever mosquito, *Aedes Aegypti*: A novel Histidine-specific amino acid transporter from the SLC7 family. *The Journal of biological chemistry*.
- Harms, E., Kern, H. and Schneider, J., 1980. Human lysosomes can be purified from diploid skin fibroblasts by free-flow electrophoresis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(10), pp.6139–43.
- Hay, R.J., Williams, C., Macy, M.L. and Lavappa, K.S., 1982. Cultured cell lines for research on pulmonary physiology available through the American type culture collection. *Am Rev Respir Dis*, 4125(2), pp.222–32.
- Hegyesi, H. et al., 2004. Retinoic acid enhances histamine content and H1 receptor expression in human neuroblastoma cell line Paju. *Anticancer research*, 24, pp.1657–63.
- Hers, H.G., 1963. α -Glucosidase Deficiency in Generalized Glycogen-Storage Disease (Pompe ' s Disease). *Biochemical Journal*, 86(1), pp.11–16.
- Hodel, A., 1998. SNAP-25. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 30(10), pp.1069–73.
- Holtzmann, E., 1989. *Lysosomes*. New York, London: Plenum Press, p.439pp.
- Hoogerbrugge, P.M. et al., 1995. Allogeneic bone marrow diseases transplantation for lysosomal storage. *The Lancet*, 345(8962), pp.1398–1402.
- Huynh, K.K. et al., 2007. LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. *The EMBO journal*, 26(2), pp.313–24.

- Ingwall, J.S. et al., 1974. Specificity of Creatine in the Control of Muscle Protein Synthesis. *The Journal of Cell Biology*, 63, pp.145–151.
- Inoues, M., Kinne, R., Biempica, L. and Arias, I.M., 1983. Rat Liver Canalicular Membrane Vesicles. *The Journal of biological chemistry*, 258(8), pp.5183–5188.
- Item, C.B. et al., 2001. Arginine:glycine amidinotransferase deficiency: the third inborn error of creatine metabolism in humans. *American journal of human genetics*, 69(5), pp.1127–33.
- Jaenecke, I., 2009. *Charakterisierung eines lysosomal lokalisierten Proteins der SLC7-Familie*. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Jaenecke, I. et al., 2012. A chimera carrying the functional domain of the orphan protein SLC7A14 in the backbone of SLC7A2 mediates trans-stimulated arginine transport. *The Journal of biological chemistry*, (4), pp.1–17.
- Janvier, K. and Bonifacino, J.S., 2005. Role of the Endocytic Machinery in the Sorting of Lysosome-associated Membrane Proteins. *Mol. Biol. Cell*, 16(September), pp.4231–4242.
- Kalatzis, V., Cherqui, S., Antignac, C. and Gasnier, B., 2001. Cystinosin, the protein defective in cystinosis, is a H(+)-driven lysosomal cystine transporter. *The EMBO journal*, 20(21), pp.5940–9.
- Kamath, S.G., Furesz, T.C., Way, B. a. and Smith, C.H., 1999. Identification of Three Cationic Amino Acid Transporters in Placental Trophoblast: Cloning, Expression, and Characterization of hCAT-1. *Journal of Membrane Biology*, 171(1), pp.55–62.
- Kanai, Y. et al., 1998. Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *The Journal of biological chemistry*, 273(37), pp.23629–32.
- Karbach, S., 2008. *Quantifizierung der Substratversorgung der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS)*. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Karbach, S. et al., 2011. Relative contribution of different l-arginine sources to the substrate supply of endothelial nitric oxide synthase. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 51, pp.855–861.
- Kelley, L.K., Smith, C.H. and King, B.F., 1983. Isolation and Partial Characterization of the Basal Cell Membrane of Human Placental Trophoblast. *Biochimica et Biophysica Acta*, 734, pp.91–98.
- Kiehntopf, M. et al., 2002. Analysis of the CTNS gene in patients of German and Swiss origin with nephropathic cystinosis. *Human mutation*, 20(3), p.237.
- Kim, J.W. and Cunningham, J.M., 1993. N-linked glycosylation of the receptor for murine ecotropic retroviruses is altered in virus-infected cells. *The Journal of biological chemistry*, 268(22), pp.16316–20.

- Knowles, R.G. and Moncada, S., 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *The Biochemical journal*, 298(Pt 2), pp.249–58.
- Lawrence, B.P. and Brown, W.J., 1992. Autophagic vacuoles rapidly fuse with pre-existing lysosomes in cultured hepatocytes. *Journal of cell science*, 102 (Pt 3, pp.515–26.
- Levtchenko, E.N., 2005. *Cystinosis: Improved medical care and new insights into pathogenesis. Pediatric Nephrology*.
- Levtchenko, E.N. et al., 2006. Strict cysteamine dose regimen is required to prevent nocturnal cystine accumulation in cystinosis. *Pediatr. Nephrol.*, 21(1), pp.110–3.
- Liu, B. et al., 2012. LAAT-1 Is the Lysosomal Lysine/Arginine Transporter That Maintains Amino Acid Homeostasis. *Science*, 337(6092), pp.351–354.
- Manger, B., 2010. Lysosomale Speicherkrankheiten. *Zeitschrift für Rheumatologie*, 69(6), pp.527–38.
- Martin, C. and Zhang, Y., 2005. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6(11), pp.838–49.
- Mason, S. et al., 2003. Mutational spectrum of the CTNS gene in Italy. *European journal of human genetics : EJHG*, 11(7), pp.503–8.
- Melief, C.J.M. and van der Burg, S.H., 2008. Immunotherapy of established (pre)malignant disease by synthetic long peptide vaccines. *Nature reviews. Cancer*, 8(5), pp.351–60.
- Mertz, E.T., Beeson, W.M. and Jackson, H.D., 1951. Classification of Essential Amino Acids for the Weanling Pig. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 38(1), pp.121–128.
- Minarowska, A., Gacko, M., Karwowska, A. and Minarowski, Ł., 2008. Human cathepsin D. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society*, 46(1), pp.23–38.
- Morgan, D.M.L., 1994. Polyamines, Arginine and Nitric Oxide. *Biochemical Society transactions*, 22(4), pp.879–883.
- Nawrath, H. et al., 2000. Voltage dependence of l-arginine transport by hCAT-2A and hCAT-2B expressed in oocytes from *Xenopus laevis*. *American journal of physiology. Cell physiology*, 279(5), pp.1336–1344.
- Park, D. et al., 2011. Molecular organization of *Drosophila* neuroendocrine cells by Dimmed. *Current biology : CB*, 21(18), pp.1515–24.
- Pineda, M. et al., 1999. Identification of a membrane protein, LAT-2, that Co-expresses with 4F2 heavy chain, an L-type amino acid transport activity with broad specificity for small and large zwitterionic amino acids. *The Journal of biological chemistry*, 274(28), pp.19738–44.

- Pintschovius, J., Fendler, K. and Bamberg, E., 1999. Charge translocation by the Na⁺/K⁺-ATPase investigated on solid supported membranes: cytoplasmic cation binding and release. *Biophysical journal*, 76(2), pp.827–36.
- Pisoni, R.L., Flickinger, K.S., Thoene, J.G. and Christensen, H.N., 1987a. Characterization of carrier-mediated transport systems for small neutral amino acids in human fibroblast lysosomes. *The Journal of biological chemistry*, 262(13), pp.6010–7.
- Pisoni, R.L., Park, G.Y., Velilla, V.Q. and Thoene, J.G., 1995. Detecting and Characterization of a transport system mediating cysteamine entry into human fibroblast lysosomes. *The Journal of biological chemistry*, J Biol Che.
- Pisoni, R.L., Thoene, J.G. and Christensen, H.N., 1985. Detection and characterization of carrier-mediated cationic amino acid transport in lysosomes of normal and cystinotic human fibroblasts. Role in therapeutic cystine removal? *The Journal of biological chemistry*, 260(8), pp.4791–8.
- Pisoni, R.L., Thoene, J.G., Lemons, R.M. and Christensen, H.N., 1987b. Important differences in cationic amino acid transport by lysosomal system c and system y⁺ of the human fibroblast. *The Journal of biological chemistry*, 262(31), pp.15011–8.
- Ponten, J. and Macintyre, E.H., 1968. Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 74, pp.465–486.
- Pösö, H., Karvonen, E., Suomalainen, H. and Andersson, L.C., 1984. A human neuroblastoma cell line with an altered ornithine decarboxylase. *The Journal of biological chemistry*, 259(20), pp.12307–10.
- Reddy, A., Caler, E.V., Andrews, N.W. and Haven, N., 2001. Plasma Membrane Repair Is Mediated by Ca²⁺-Regulated Exocytosis of Lysosomes. *Cell*, 106(2), pp.157–169.
- Riordan, J.R. and Ling, V., 1979. Purification of P-glycoprotein from plasma membrane vesicles of Chinese hamster ovary cell mutants with reduced colchicine permeability. *The Journal of biological chemistry*, 254(24), pp.12701–5.
- Rojas, A.M. and Deve, R., 1999. Membrane Biology Mammalian Amino Acid Transport System y⁺ Revisited : Specificity and Cation Dependence of the Interaction with Neutral Amino Acids. *the Journal of Membrane Biology*, 208, pp.199–208.
- Rose, W.C. and Wixom, R.L., 1955. The Amino Acid Requirements of Man. *The Journal of biological chemistry*, 216, pp.763–774.
- Rotmann, A., 2003. *Elektrophysiologische Charakterisierung und PKC-vermittelte Regulation des humanen Transporters für basische Aminosäuren hCAT-1*. Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Rotmann, A. et al., 2007. Activation of classical protein kinase C decreases transport via systems y⁺ and y⁺L. *American journal of physiology. Cell physiology*, 292(6), pp.C2259–68.

- Rotmann, A., Strand, D., Martiné, U. and Closs, E.I., 2004. Protein kinase C activation promotes the internalization of the human cationic amino acid transporter hCAT-1. A new regulatory mechanism for hCAT-1 activity. *The Journal of biological chemistry*, 279(52), pp.54185–92.
- Schaub, B.E., Nair, P. and Rohrer, J., 2005. *Analysis of protein transport to lysosomes. Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S. Bonifacino ... [et al.]*, .
- Schieder, M. et al., 2010. Planar patch clamp approach to characterize ionic currents from intact lysosomes. *Science signaling*, 3(151), p.p13.
- Schulman, J.D., Bradley, K.H. and Seegmiller, J.E., 1969. Cystine: compartmentalization within lysosomes in cystinotic leukocytes. *Science (New York, N.Y.)*, 166(909), pp.1152–4.
- Schulz, P., 2010. *Elektrophysiologische Charakterisierung des lysosomalen Cl⁻ / H⁺ - Antiporters ClC-7 mit Hilfe der SSM-Technik*. Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main.
- Schulz, P., Garcia-Celma, J.J. and Fendler, K., 2008. SSM-based electrophysiology. *Methods*, 46(2), pp.97–103.
- Seifert, K., Fendler, K. and Bamberg, E., 1993. Charge transport by ion translocating membrane proteins on solid supported membranes. *Biophysical journal*, 64(2), pp.384–91.
- Shotelersuk, V. et al., 1998. CTNS mutations in an American-based population of cystinosis patients. *American journal of human genetics*, 63(5), pp.1352–62.
- Simeone, A. et al., 1990. Sequential activation of HOX2 homeobox genes by retinoic acid in human embryonal carcinoma cells. *Nature*, 346, pp.763–766.
- Simon, A. et al., 2003. Role of neutral amino acid transport and protein breakdown for substrate supply of nitric oxide synthase in human endothelial cells. *Circulation research*, 93(9), pp.813–20.
- Simon, A., 2005. *Substratversorgung von NO-Synthasen : Bedeutung von Membrantransportern und intrazellulären Arginin-Quellen*. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Slenzka, A., 2012. *Asymmetrisches Dimethylarginin als kardiovaskulärer Risikofaktor : Transportmechanismen und Auswirkungen einer Akkumulation*. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Smith, L.D., Xu, W.L. and Varnold, R.L., 1991. Oogenesis and oocyte isolation. *Methods Cell Biol*, 36, pp.45–60.
- Smith, M.L. et al., 1987. Lysosomal cystine transport. Effect of intralysosomal pH and membrane potential. *The Journal of biological chemistry*, 262(3), pp.1244–53.
- Snyder, S.H., Brown, B. and Kuhar, M.J., 1974. The subsynaptosomal localization of histamine, histidine decarboxylase and histamine methyltransferase in rat hypothalamus. *Journal of neurochemistry*, 23(1), pp.37–45.

- Sperandeo, M.P. et al., 1998. The Gene Encoding a Cationic Amino Acid Transporter (SLC7A4) Maps to the Region Deleted in the Velocardiofacial Syndrome. *Genomics*, 49(2), pp.230–236.
- Sreedharan, S., Stephansson, O., Schiöth, H.B. and Fredriksson, R., 2011. Long evolutionary conservation and considerable tissue specificity of several atypical solute carrier transporters. *Gene*, 478(1-2), pp.11–8.
- Stinchcombe, J.C. and Griffiths, G.M., 1999. Regulated secretion from hemopoietic cells. *The Journal of cell biology*, 147(1), pp.1–6.
- Tennezé, L. et al., 1999. A study of the relative bioavailability of cysteamine hydrochloride, cysteamine bitartrate and phosphocysteamine in healthy adult male volunteers. *British journal of clinical pharmacology*, 47(1), pp.49–52.
- Thoene, J.G. and Lemons, R.M., 1982. Cystine accumulation in cystinotic fibroblasts from free and protein-linked cystine but not cysteine. *The Biochemical journal*, 208(3), pp.823–30.
- Tjelle, T.E. et al., 1996. Isolation and characterization of early endosomes, late endosomes and terminal lysosomes: their role in protein degradation. *Journal of cell science*, 109 (Pt 1, pp.2905–14.
- Torrents, D. et al., 1998. Identification and Characterization of a Membrane Protein (y+L Amino Acid Transporter-1) That Associates with 4F2hc to Encode the Amino Acid Transport Activity y+L. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(49), pp.32437–32445.
- Town, M. et al., 1998. A novel gene encoding an integral membrane protein is mutated in nephropathic cystinosis. *nature genetics*, 18, pp.319–324.
- Vellodi, A., 2005. Lysosomal storage disorders. *British journal of haematology*, 128(4), pp.413–31.
- Verrey, F. et al., 2003. CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. *Pflügers Archiv - European journal of physiology*, 447(5), pp.532–42.
- Vékony, N. et al., 2001. Human Cationic Amino Acid Transporter hCAT-3 Is Preferentially Expressed in Peripheral Tissues. *Biochemistry*, 40(41), pp.12387–12394.
- Vékony, N., 2006. *Analyse der Transportfunktion und Proteinexpression des kationischen Aminosäure-Transporters hCAT-3 und des verwandten Proteins SLC7A4*. Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz.
- Wolf, S., 2001. *Funktionsanalyse des als kationischer Aminosäure-Transporter bezeichneten, humanen Membranproteins, hCAT-4*. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Wolf, S. et al., 2002. Expression of solute carrier 7A4 (SLC7A4) in the plasma membrane is not sufficient to mediate amino acid transport activity. *The Biochemical journal*, 775, pp.767–775.

Woodard, M.H. et al., 1994. Plasma membrane clustering of system y⁺ (CAT-1) amino acid transporter as detected by immunohistochemistry. *The American journal of physiology*, 266(5), pp.E817–24.

Zhao, S. et al., 2010. Regulation of Cellular Metabolism by Protein Lysine Acetylation. *Science*, 327, pp.1000–1004.

Teilveröffentlichungen der vorliegenden Arbeit

Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

Isabel Jaenecke, Jean-Paul Boissel, Matthias Lemke, Bruno Gasnier and Ellen I. Closs
A chimera carrying the functional domain of the orphan protein SLC7A14 in the backbone of SLC7A2 mediates trans-stimulated arginine transport. (2012) The Journal of biological chemistry, 287(36); 30853-60

Susanne Karbach, Alexandra Simon, Anita Slenzka, Isabel Jaenecke, Alice Habermeier, Ursula Martiné, Ulrich Förstermann, Ellen I. Closs
Relative contribution of different L-arginine sources to the substrate supply of endothelial nitric oxide synthase. (2011) Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 51; 855-61

Vorträge

Isabel Jaenecke, Jean-Paul Boissel, Alice Habermeier, Bruno Gasnier and Ellen I. Closs
Do SLC7 members constitute the salvage pathway in the therapie of cystinosis?
8th annual World SymposiumTM des Lysosomal Disease Network, 08.-10.02.2012 in San Diego (Californien, USA); inkl. Poster

Matthias Lemke, [Isabel Jaenecke](#), Jean-Paul Boissel, Bruno Gasnier and Ellen I. Closs
Strategies to redirect SLC7A14 to the plasma membrane
Göttinger Transporttage der Universitätsmedizin Göttingen, 22.-23.10.2011

Isabel Jaenecke
Cationic amino acid transporters in mamalian cells and tissues: Function and relevance
auf Einladung bei Bayer CropScience, Frankfurt Höchst, 21.04.11

Isabel Jaenecke, Jean-Paul Boissel, Alice Habermeier, Bruno Gasnier and Ellen I. Closs
Measuring L-arginine transportin lysosomes
Göttinger Transporttage der Universitätsmedizin Göttingen, 16.-18.10.2010

Isabel Jaenecke, Jean-Paul Boissel, Alice Habermeier, Bruno Gasnier and Ellen I. Closs
Search for lysosomal arginine transporters
Göttinger Transporttage der Universitätsmedizin Göttingen, 16.-18.10.2009

Isabel Jaenecke, Jean-Paul Boissel, Alice Habermeier, Bruno Gasnier, and Ellen I. Closs
Entspricht SLC7A14 dem als System c bezeichneten lysosomalen Transporter für kationische Aminosäuren?
50. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie e.V., 10.-12.03.2009

Poster

Isabel Jaenecke, Jean-Paul Boissel, Alice Habermeier, Bruno Gasnier and Ellen I. Closs
Do SLC7 members constitute the lysosomal transport system c?
77. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie e.V., 30.03.-01.04.2011 in Frankfurt am Main