

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

**Interaktion von *NO* und assoziierten Proteinen mit
humanen Transportern für
kationische Aminosäuren (hCAT)**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Anastasia Janina Hobbach
aus Waldbröl

Mainz, 2020

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

08. Dezember 2020

*Meinen Eltern und Geschwistern
als Dank für ihre unabdingbare Liebe.*

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis.....	IX
Abbildungsverzeichnis.....	XI
1 Einleitung	14
1.1 Einleitung und Ziele der vorliegenden Arbeit	14
2 Literaturdiskussion	16
2.1 Aminosäuren als Grundbausteine der Proteine	16
2.2 Charakterisierung der Aminosäuretransportsysteme.....	19
2.2.1 Transportsysteme basischer Aminosäuren	20
2.2.2 Carrierproteine des γ^+ -Systems	24
2.3 Biochemische Grundlagen der Stickstoff-Signalwirkung in Bezug auf die Reaktion mit Cysteinresten in γ^+ -Transportern	30
2.3.1 Grundlagen der Bildung von S-Nitrosothiolen	32
2.4 Interaktionspartner von Proteinen	36
2.4.1 Zellmembrantransportproteine und ihnen assoziierte Interaktionspartner	36
2.5 Ziele der vorliegenden Arbeit.....	41
3 Material und Methoden	42
3.1 Molekularbiologische Methoden	56
3.1.1 verwendete Puffer und Lösungen	56
3.1.2 Auftrennung von Nukleinsäuren durch Gelelektrophorese	59
3.1.3 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration mittels OD-Messung	60
3.1.4 Extraktion von Nukleinsäuren mittels Phenol-Chloroform-Fällung von Proteinen.....	61
3.1.5 Linearisierung von Plasmiden zur <i>in-vitro</i> Transkription in cRNA.....	62
3.1.6 <i>In-vitro</i> Transkription von DNA- in cRNA-Sequenzen.....	63
3.1.7 gezielter Restriktionsverdau von Nukleinsäuresträngen für folgende Klonierungsarbeiten	65
3.1.8 Hybridisierung komplementärer DNA-Einzelstränge zu einem Doppelstrangnukleotid	67
3.1.9 Ligation von Insertionsfragmenten in Vektoren	68
3.1.10 Transformation kompetenter <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	70
3.1.11 Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i> -Zellen	71
3.2 Proteinbiochemische Methoden	73
3.2.1 verwendete Puffer und Lösungen	73
3.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung	76
3.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	76

3.2.4	Western-Blot-Analysen	78
3.2.5	Nachweisreaktion zum spezifischen Proteinnachweis	79
3.3	Methodik der Zellkultur	81
3.3.1	verwendete Puffer	82
3.3.2	Auftauen von Zellen	83
3.3.3	Passagieren von Zellen.....	83
3.3.4	Bestimmung der Zellzahl mittels <i>Neubauer</i> -Zählkammer.....	84
3.3.5	Einfrieren von Zellen	84
3.3.6	Bestimmung der Dosis-Wirkungskurve von Geneticin	85
3.3.7	Transfektion von Säugerzellen.....	86
	3.3.7.1 Zelllinien mit transienter Expression des Zielproteins.....	86
	3.3.7.2 Zelllinien mit stabiler Expression des Zielproteins	88
3.3.8	Herstellung von Zell-Lysaten.....	88
3.4	Expressionsstudien an <i>Xenopus laevis</i> -Oozyten.....	90
3.4.1	verwendete Puffer und Lösungen	90
3.4.2	<i>Xenopus laevis</i> als Versuchstier	91
3.4.3	Gewinnung der <i>Xenopus laevis</i> -Oozyten	92
3.4.4	Präparation der <i>Xenopus laevis</i> -Oozyten.....	93
3.4.5	Mikroinjektion von cRNA in die <i>Xenopus laevis</i> -Oozyten.....	94
3.4.6	L-[³ H]Argininaufnahme in <i>Xenopus laevis</i> -Oozyten.....	95
3.5	High-performance liquid chromatographic- (HPLC) basierte Messmethode	96
	3.5.1 verwendete Puffer und Lösungen	96
	3.5.2 Derivatisierung	97
3.6	Statistische Auswertung	99
4	Ergebnisse	101
4.1	Fehlender Einfluss einer Nitros(yl)ierung auf die Transportleistung der hCAT-Proteine.....	101
	4.1.1 Kein Einfluss einer Nitrosylierung auf den L-[³ H]Arginin-Transport in <i>Xenopus laevis</i> -Oozyten	104
	4.1.2 Kein Einfluss einer (trans-) Nitrosierung auf den L-[³ H]Arginin-Transport in <i>Xenopus laevis</i> -Oozyten	109
4.2	Bindungspartner für die CAT-Proteine.....	116
	4.2.1 Simultantransfektion mit den Vektorkonstrukten „hCAT-1-BAP-N1“ und „pCMV3-BirA“	118
	4.2.1.1 Klonierungsstrategie.....	118
	4.2.1.2 Transfektionsstudien	122
	4.2.2 Einfachtransfektion mit dem Vektorkonstrukt „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“	125
	4.2.2.1 Klonierungsstrategie.....	127
	4.2.2.2 Transfektionsstudien	132
	4.2.2.3 Vergleich der verwendeten Lyse-Puffer	137

4.2.2.4	Stabile Expression des transfizierten „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“-Konstrukts	139
5	Diskussion	142
5.1	Fehlender Einfluss einer Nitros(yl)ierung auf die Transportleistung der hCAT-Proteine.....	142
5.1.1	Divergente Cysteinreste zwischen murinen und humanen CAT-Isoformen?	144
5.1.2	SNO-Bildung über ein assoziiertes Interaktom?.....	150
5.1.3	Interagierende Partnerproteine als Wirkort von <i>NO</i> ?.....	152
5.1.4	Schwächen der angewandten Methodik und potenzielle Fehldeutung der Versuchsdaten	153
5.1.5	Kritische Bewertung und Einordnung der Erkenntnisse von <i>Zhou et al.</i> 155	
5.2	Bindungspartner für die CAT-Proteine.....	160
5.2.1	Bewertung der angewandten Klonierungsstrategien.....	162
5.2.1.1	Etablierung einer Zelllinie mit stabiler Expression mit dem Mischklon „T7 HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“	164
5.2.2	Vergleich verschiedener Zell-Lyse-Puffer zur Solubilisierung des „hCAT-1“-Proteins	168
6	Zusammenfassung	174
7	Literaturverzeichnis.....	176
	Danksagung	192
	Lebenslauf Anastasia Janina Hobbach	194

Abkürzungsverzeichnis

ADMA	asymmetrisches Methylarginin
AK	Antikörper
ARG	Arginase
AS	Aminosäuren
ASL	Argininosuccinatlyase
ASS	Argininosuccinat-Synthetase
ATP	Adenosintriphosphat
BAP	Biotin Akzeptor Peptid
BCA	Bicinchoninsäure
BirA	<i>E. coli</i> Biotin-Ligase
CAT	kationischer Aminosäuretransporter
Suffix „h“	human
Suffix „m“	murin
Suffix „r“	Ratte
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CMC	kritische Mizellenbildungskonzentration
CPS	Carbamoylphosphat-Synthetase
cRNA	codierende Ribonukleinsäure
Cu ²⁺	Kupferion
Da	Dalton (Einheit atomarer Masse)
DDAH	Dimethylaminohydrolase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbeccos gepufferte Salzlösung (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)
Dpm	Zerfälle pro Minute (Desintegrations per minute)
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBP50	ERM-bindendes Phosphorprotein 50
EGFP	verstärkt (<i>enhanced</i>) Grün fluoreszierendes Protein
ERM-Familie	Ezrin-Radixin-Moesin-Familie
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GLUT4	Glukosetransporter Typ 4
GSH	Glutathion
GSNO	S-Nitrosoglutathion
HBS-Puffer	HEPES-gepufferte Kochsalzlösung
Hcp	Hybrid-Cluster Protein
HLB	hydrphile-lipophile Balance
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IMDM	Iscoves modifiziertes Dulbeccos-Medium

LB-Medium	Lysogeny-broth-Medium
ME	Mercaptoethanol
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger RNA)
MRP4	Multidrug Resistance Proteine 4
NEM	N-Ethylmaleinimid
NO	Stickstoffmonoxid
NO ⁺	Nitrosoniumion
NOS	<i>NO</i> -Synthase
NP-40	Nonidet P-40
NTP	Nukleosidtriphosphat
OCT	Ornithin-Carbamoyl-Transferase
OET	ohne exogen exprimierte Transporter
OPA	ortho-Phthaldialdehyd
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PKC	Proteinkinase C
rBAT	related to systeme b ⁰⁺ Aminosäuretransporter
RIPA	Radio-Immuno-Präzipitations-Assay
RNA	Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sin-1	5-Amino-3-(4-morpholinyl)-1,2,3-Oxadiazol-Chlorid
SLC	solute carrier family
SMA	Styrol-Maleinsäureanhydrid-Copolymere
SNAP	S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamin
SNO	S-Nitrosothiol
SOB-Medium	Super Optimal Broth
SOC-Medium	SOB With catabolite repression (SOB mit Glukose)
SPENO	Spermine NONOate; (Z)-1-[N-[3-aminopropyl]-N-[4-(3-aminopropylammonio)butyl]-amino] diazen-1-ium-1,2-diolate
TBS	TRIS-gepufferte Salzlösung
TBST	TRIS-gepufferte Salzlösung mit Tween20
TEA-Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TE-Puffer	Puffer aus TRIS und EDTA
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: tabellarische Übersicht über die derzeit beschriebenen Transportsysteme basischer Aminosäuren.	20
Tabelle 2: K_m und V_{max} für Arginin der verschiedenen hCAT-Isoformen.	28
Tabelle 3: Zusammensetzung Lysogeny Broth (LB)-Medium nach Giuseppe Bertani, 1951 zur Kultivierung von Bakterien.	56
Tabelle 4: Zusammensetzung LB-Selektionsmedium.	56
Tabelle 5: Zusammensetzung LB-Selektionsplatten.	57
Tabelle 6: Zusammensetzung SOB-Medium.	57
Tabelle 7: Zusammensetzung SOC-Medium.	57
Tabelle 8: Zusammensetzung TRIS-Acetat-EDTA-50x Puffer.	58
Tabelle 9: Zusammensetzung TRIS-Acetat-EDTA-1x Puffer.	58
Tabelle 10: Schema eines Linearisierungsansatzes.	62
Tabelle 11: Schema eines Transkriptionsansatzes für die in-vitro Transkription.	64
Tabelle 12: Schema eines Restriktionsansatzes.	66
Tabelle 13: Schema eines Annealing-Ansatzes.	67
Tabelle 14: Zusammensetzung * 10x Annealing-Buffer.	67
Tabelle 15: Schema eines Klenow-Ansatzes.	68
Tabelle 16: Schemata für Ligationsansätze.	69
Tabelle 17: Zusammensetzung *10x Ligationspuffer.	69
Tabelle 18: Zusammensetzung SDS-Elektrophoresegele.	73
Tabelle 19: Zusammensetzung SDS-Elektrophoresepuffer.	73
Tabelle 20: Zusammensetzung 2x SDS-Probenpuffer.	73
Tabelle 21: Zusammensetzung Blotting-Puffer.	74
Tabelle 22: Zusammensetzung Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS).	74
Tabelle 23: Zusammensetzung TRIS-gepufferte Salzlösung (TBS).	74
Tabelle 24: Zusammensetzung TRIS-gepufferte Salzlösung (TBST) mit Tween20.	74
Tabelle 25: Zusammensetzung AK-Verdünnungspuffer.	74
Tabelle 26: Zusammensetzung AK-Entfernungspuffer.	75

Tabelle 27: Zusammensetzung Stammlösung A; BCA-Protein Assay Kit.	75
Tabelle 28: Zusammensetzung Stammlösung B; BCA-Protein Assay Kit.	75
Tabelle 29: Zusammensetzung Radio-Immuno-Präzipitations-Assay- (RIPA) Puffer.....	82
Tabelle 30: Zusammensetzung NP-40-Puffer.	82
Tabelle 31: Schema eines Transfektionsansatzes.	86
Tabelle 32: Schema eines Transfektionsansatzes für die Calcium-Phosphat- Methode.	87
Tabelle 33: Zusammensetzung Ca ²⁺ -freie Pufferlösung.	90
Tabelle 34: Zusammensetzung Ca ²⁺ -haltige Pufferlösung.....	90
Tabelle 35: Zusammensetzung Oozyten-Kulturmedium.....	90
Tabelle 36: Zusammensetzung Borat-Puffer 75 mM.....	96
Tabelle 37: Zusammensetzung OPA-Reagenzien.	96
Tabelle 38: Ergebnisse der quantitativen GSH-Bestimmung in μM pro Oozyte.....	111
Tabelle 39: Werte der hydrophilen-lipophilen Balance (HLB) und der kritischen Mizellenbildungskonzentration (CMC) (in mM) verschiedener Detergenzien (174).	169

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Harnstoff- und <i>NO</i> -Citrullin-Zyklus.	17
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Transportsysteme für kationische Aminosäuren und ihre Substrate.....	21
Abbildung 3: Topografiemodell der kationischen Aminosäuretransporter.	25
Abbildung 4: Modelvorstellung der Interaktion zwischen dem LAT-1 und seinem assoziierten Glykoprotein „4F2hc“.....	37
Abbildung 5: Darstellung der Oozytenstadien I - VI von <i>Xenopus laevis</i> -Oozyten nach Dumont (1972) (123).....	91
Abbildung 6: L-[³ H]Arginintransport durch den hCAT-1 bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C in Abhängigkeit der Inkubationsdauer....	103
Abbildung 7: L-[³ H]Arginintransport durch den hCAT-2A bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C in Abhängigkeit der Inkubationsdauer....	103
Abbildung 8: Absolutwerte der L-[³ H]Argininaufnahme in nmol/h/Oozyte bei hCAT-überexprimierenden Oozyten und solchen ohne exogen-exprimierten Transporter unter und ohne <i>NO</i> -Donator-Exposition bei 20 °C Inkubationstemperatur.	106
Abbildung 9: Absolutwerte der L-[³ H]Argininaufnahme in nmol/h/Oozyte bei hCAT-überexprimierenden Oozyten und solchen ohne exogen-exprimierten Transporter unter und ohne <i>NO</i> -Donator-Exposition bei 37 °C Inkubationstemperatur.	106
Abbildung 10: Prozentualer Anteil der L-[³ H]Argininaufnahme aus den Messungen der Abbildung 8 und der Abbildung 9 bezogen auf die mittlere Aufnahme entsprechender Oozyten ohne exogen-exprimierten Transporter (OET).....	107
Abbildung 11: Absolutwerte der L-[³ H]Argininaufnahme in nmol pro Stunde und pro Oozyte aus jeweils einer repräsentativen Oozytenpräparation aus der Abbildung 8 und der Abbildung 9.....	108
Abbildung 12: Relaxationskurve von durch Norepinephrin konstringierten Maus-Aorten-Ringen im Organbad nach Zugabe des <i>NO</i> -Donators SNAP in steigender Konzentration.....	108
Abbildung 13: Absolutwerte der L-[³ H]Argininaufnahme in nmol/h/Oozyte bei hCAT-überexprimierenden Oozyten und solchen ohne exogen-exprimierten Transporter unter und ohne Sin-1/SPENO-Exposition bei 37 °C Inkubationstemperatur.	113

Abbildung 14: Prozentualer Anteil der L-[³ H]Argininaufnahme aus den Messungen der Abbildung 13 bezogen auf die mittlere Aufnahme entsprechender Oozyten ohne exogen-exprimierten Transporter (OET). ...	113
Abbildung 15: Absolutwerte der L-[³ H]Argininaufnahme in nmol pro Stunde und pro Oozyte aus der Oozytenpräparation der Abbildung 13.	114
Abbildung 16: Repräsentatives HPLC-Chromatogramm mit GSH-Peaks.	115
Abbildung 17: Western-Blot eines Lysates aus nicht transfizierten HEK 293T-Zellen.	117
Abbildung 18: DNA-Sequenz des BAP-Peptides.	118
Abbildung 19: Kloniertes Vektorkonstrukt „hCAT-1-BAP-N1“.	119
Abbildung 20: Vektorgerüst „ArgI-pCMV3-C-OFPSpark“ und Zielvektor „pCMV3-BirA“.	121
Abbildung 21: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Transfektionskontrollen.	122
Abbildung 22: Western-Blot der transienten Expression der Plasmide „hCAT-1-BAP-N1“ und „pCMV3-BirA“.	124
Abbildung 23: Vektorkonstrukt „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“.	126
Abbildung 24: Insertion „hCAT-1“ für den Zielvektor.	127
Abbildung 25: Ausschnitt aus dem Vektorkonstrukt „C-FTA/hBirA-EGFP“.	127
Abbildung 26: Durch Klenow-Ansatz geglätteter Vektor „C-FTA/hBirA-EGFP“. ..	128
Abbildung 27: kloniertes Vektorkonstrukt „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“.	128
Abbildung 28: Vektor „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“ mit Restriktionsstellen „HindIII-HF“ und „BlnI“.	129
Abbildung 29: Beispiel einer gelelektrophoretischen Überprüfung des Klonierungsergebnisses auf die richtige Orientierung der Insertion.	129
Abbildung 30: Vektor „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“ mit Restriktionsstellen „HindIII-HF“ und „XhoI“.	130
Abbildung 31: Beispiel einer gelelektrophoretischen Überprüfung auf eine vollständig-abgelaufene Klenow-Reaktion der Bakterienkolonien mit richtiger Orientierung der Insertion.	131
Abbildung 32: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Transfektionen mit den Konstrukten „HC1-pEGFP-N1“ (Kontrolle) und „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“.	132
Abbildung 33: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Transfektionsansatzes „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“.	133

Abbildung 34: Western-Blot einer transienten Expression des „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“-Konstrukts und einer entsprechenden Kontrolle aus nicht transfizierten HEK 293T.	135
Abbildung 35: Western-Blot einer Transfektion mit dem „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“-Konstrukt von auf verschiedene Arten hergestellten Zell-Lysaten und einer entsprechenden Kontrolle aus nicht transfizierten HEK 293T.	138
Abbildung 36: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Mischklons „T7 Mischklon HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“.	140
Abbildung 37: Western-Blot des Mischklons „T7 HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“ im Zeitverlauf und einer entsprechenden Kontrolle aus nicht transfizierten HEK 293T.	141
Abbildung 38: Aminosäuresequenzen der CAT-Isoformen-1 und -2A des Menschen und der Ratte.....	149
Abbildung 39: Schematische Darstellung des Solubilisierungsvorgangs von Membranproteinen aus der Lipiddoppelschicht durch Detergenzien.	170

1 Einleitung

1.1 Einleitung und Ziele der vorliegenden Arbeit

Zellen sind in ihrer Funktion, ihrem Erhalt und ihrer Vermehrung auf das Vorhandensein von Aminosäuren angewiesen; diese ermöglichen den reibungslosen Ablauf aller metabolischen Funktionswege in der Zelle.

Einige Aminosäuren können vom Körper nicht eigens hergestellt werden und müssen über die Nahrung endogen aufgenommen werden; sie sind für den Organismus essentiell. In Anbetracht dieser Unverzichtbarkeit einiger Aminosäuren für den Körper und der einhergehenden Notwendigkeit des effizienten Haushaltens mit ihnen, ist eine feinabgestimmte und schnell modifizierbare Steuerung ihrer Aufnahme in die Zelle unabdingbar.

Eine bedarfsgerechte Aufnahme von Aminosäuren in die Zelle kann nicht durch Diffusion erfolgen, sondern wird über spezifische Transportproteine in der Plasmamembran vermittelt. Bezogen auf die Gruppe der kationischen Aminosäuren wird dies über insgesamt fünf verschiedene Systeme ermöglicht (1, 2), von denen in der vorliegenden Arbeit besonders auf das System der kationischen Aminosäuretransporter (CAT) Bezug genommen wird, da dieses den Hauptanteil in der Aufnahme jener Aminosäuren leistet. Diese Rolle gesteht ihm darüber hinaus eine pathophysiologische Bedeutung in Stoffwechselfvorgängen erhöhten Nährstoffbedarfs, insbesondere in der Pathophysiologie (hämato-)onkologischer Erkrankungen (3) ein.

Bezüglich der externen Einflussnahme auf das CAT-System und damit potenziell auf die Steuerung der Aminosäureversorgung einer Zelle, zeigten *Deves et al.* experimentell eine mögliche Beeinflussung der CATs durch N-Ethylmaleinimid (NEM) (4). NEM stellt ein Imid dar, mit welchem in biochemischen Versuchen Proteine durch einen Nukleophilen Angriff auf deren Sulfhydryl-Gruppen blockiert werden können. *Beyer et al.* identifizierten bezogen auf die CATs die spezifischen und über alle CAT-Isoformen konservierten Cysteinreste an den Positionen 33 und 273 als Angriffspunkt für NEM (5).

Zhou et al. veröffentlichten 2010 eine Arbeit, die darlegt, dass Stickstoffmonoxid den Transport kationischer Aminosäuren ebenfalls negativ modulieren kann (6). Es ergibt sich die These, dass dies möglicherweise über dieselben Cysteinreste, an denen auch

NEM an die Transporter angreift, vermittelt werden könnte. Eine posttranslationale Modifikation in Form einer Nitros(yl)ierung entsprechender Cysteinreste kommt dabei als zugrundeliegender Mechanismus in Betracht.

Dieses Postulat sollte im Rahmen der vorliegenden Dissertationsschrift experimentell durch Transportstudien an in *Xenopus laevis*-Oozyten exprimierten CATs verifiziert und auf molekularer Ebene weiter untersucht werden.

Die Synthese, die Integration in die und der Bestand der Membrantransporter in der Plasmamembran sind aufwendig und bedingt durch aufeinanderfolgende Prozessschritte nicht unbedingt direkt modulierbar. Für einige transmembranöse Transportsysteme ist, bezogen auf ihre Transportleistung und -fähigkeit, eine Abhängigkeit von ihnen assoziierten Proteinen nachgewiesen. Beispielsweise ist der Aminosäuretransporter LAT1 auf das ihm assoziierte Glykoprotein „42Fhc“ für seine Synthese und Funktion angewiesen (7).

Derartige Interaktionspartner von Transportern stellen ein schnell angreifbares System dar, durch welches die Transporteffektivität zügig und effizient beeinflusst werden kann. Für kationische Aminosäuretransporter der CAT-Familie ist bisher kein interagierendes Protein beschrieben worden.

Idee dieser Arbeit zugrunde liegender Versuche war es, mit Hilfe von transfizierten Säugerzellen eine große Menge an kationischen Aminosäuretransportern und potenziell assoziierten Bindungspartnern zu gewinnen und durch massenspektrometrische Analysen mehr Informationen über letztere erhalten zu können.

Die Transporter kationischer Aminosäuren stellen die Versorgung der Zellen mit Zugehörigen dieser Aminosäuregruppe sicher. Ohne sie wäre das Überleben eines Organismus nicht denkbar. In Folge dessen ist das detaillierte Verständnis der Synthese, Funktion und Funktionsweise der Transporter von enormen wissenschaftlichen Interesse.

Die vorliegende Arbeit versucht diesbezüglich einen Anteil zu leisten und dazu beizutragen, einen der wichtigsten Aufnahmewege von Aminosäuren in die Zelle in seiner Ganzheit weiter zu verstehen.

2 Literaturdiskussion

2.1 Aminosäuren als Grundbausteine der Proteine

Die Expression von Genen und damit die Umsetzung des genetischen Codes in Proteine definiert und ermöglicht das Leben eines Organismus. Aminosäuren stellen dabei die kleinsten Bausteine der Proteine dar. Sie müssen stets in ausreichender Menge in der Zelle vorrätig sein, um die Genexpression zu gewährleisten.

Die proteinogenen, für den Menschen bedeutenden Aminosäuren sind eine heterogene Gruppe aus Carbonsäuren mit einer α -ständigen Aminogruppe. Sie lassen sich nach ihrer Bedeutung für die Proteinbiosynthese, ihrer (Un-)verzichtbarkeit bezogen auf die Selbstsyntheseleistung des Organismus, ihren chemischen Eigenschaften oder ihrer Chiralität in diverse Untergruppen kategorisieren. Im humanen Organismus liegen die proteinogenen Aminosäuren ausnahmslos als L-Enantiomere vor; nur sie können durch die ebenfalls chiralen Aminoacyl-tRNA-Synthetasen erkannt und auf tRNAs beladen werden (8). Ist im Folgenden von humanen proteinogenen Aminosäuren die Rede, wird auf die Kennzeichnung als L-Enantiomer zugunsten des Leseflusses verzichtet; sie ist als vorausgesetzt anzunehmen.

Die spezifischen Seitenketten der verschiedenen Aminosäuren können als Protonenakzeptor oder -donator wirken. Dies erlaubt eine Einteilung der Aminosäuren entsprechend ihres Säure-Basen-Verhaltens in neutrale, basische oder saure Aminosäuren.

Eine Aminosäure gilt als essentiell, wenn ein Organismus diese einerseits für seine Proteinbiosynthese benötigt, sie andererseits nicht endogen herstellen kann, sondern exogen über die Nahrung aufnehmen muss.

Auf den humanen Organismus bezogen, sind Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Threonin, Tryptophan und Valin essentiell.

Ist ein Organismus nicht in der Lage, alle erforderlichen Aminosäuren selbst zu synthetisieren, wird er als heterotroph deklariert.

Basische Aminosäuren, zu denen Arginin, Lysin, die protonierte Form des Histidins und Ornithin gehören, besitzen in ihrer Seitenkette einen Protonenakzeptor und spielen in den Stoffwechselforgängen von Säugetierzellen eine zentrale Rolle. Insbesondere die Produktion von Stickstoffmonoxid und Harnstoff ist auf ein ausreichendes

Substratangebot von Arginin angewiesen. Arginin ist beispielsweise das einzige Substrat für die endogene *NO*-Synthese durch die *NO*-Synthase (9, 10). Die Synthese und das Recycling von Arginin über den *NO*-Citruillin-Zyklus erleichtert das Decken des körpereigenen Argininbedarfs (Abbildung 1) neben der exogenen Zufuhr über die Nahrung. Aus Citruillin und Aspartat kann durch die Argininosuccinat-Synthase Argininosuccinat und daraus unter Abspaltung von Fumarat durch die Argininosuccinatlyase Arginin synthetisiert werden. Arginin kann unter Entstehung von Harnsäure von Argininasen zu Ornithin abgebaut werden, welches im Zuge des Harnstoffzyklus mitochondrial unter Hinzunahme von Carbamoylphosphat durch die Ornithin-Carbamoyl-Transferase zu Citruillin zurück reagieren kann.

Proteingebundenes Arginin im Blutplasma wird durch Protein-Methyl-Transferasen methyliert und proteolytisch freigesetzt. Diese methylierten Argininderivate können wiederum durch Dimethylarginin-dimethylaminohydrolasen zu Arginin demethyliert werden.

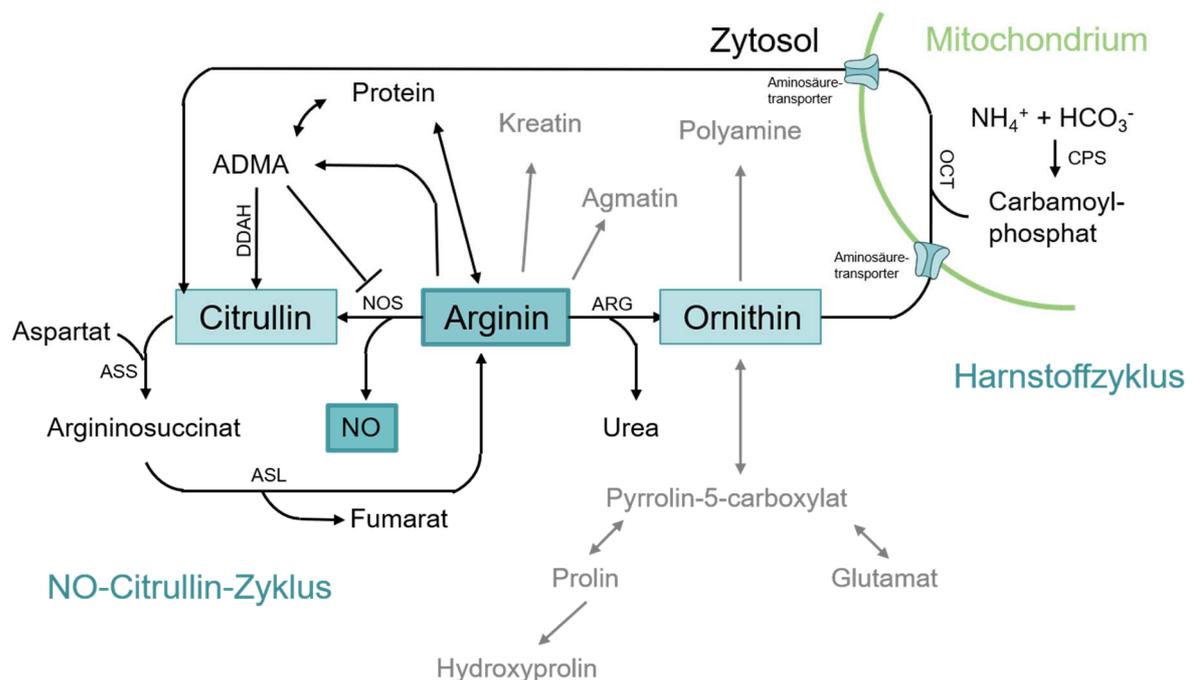


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Harnstoff- und *NO*-Citruillin-Zyklus.

NO wird durch die NOS enzymatisch aus Arginin unter Entstehung von Citruillin produziert. Citruillin kann enzymatisch im *NO*-Citruillin-Zyklus zu Arginin recycelt werden. Citruillin wird dabei mitochondrial im Harnstoffzyklus aus Ornithin und Carbamoylphosphat durch die OCT und CPS gewonnen.

ADMAs finden sich im Blutplasma des Menschen und stellen methylierte Arginin-Derivate dar. Sie können durch die DDAH in Citruillin umgewandelt werden.

ADMA = asymmetrisches Methylarginin, ARG = Arginase, ASL = Argininosuccinatlyase, ASS = Argininosuccinat-Synthetase, CPS = Carbamoylphosphat-Synthetase, DDAH = Dimethylaminohydrolase, NOS = *NO*-Synthase, OCT = Ornithin-Carbamoyl-Transferase.

Modifiziert nach Bratt et al., 2011(11).

Die Aminosäure Lysin kann vom menschlichen Organismus nicht selbst synthetisiert werden, sie ist essentiell und muss exogen über die Nahrung aufgenommen werden. Im Vergleich dazu gelten Arginin und Histidin als semi-essentielle Aminosäuren, da sie in begrenzten Maßen auch endogen vom menschlichen Organismus bereitgestellt werden können (12, 13); nur unter erhöhten Stoffwechselbedingungen reicht diese endogene Produktion nicht aus und ihr Bedarf muss zusätzlich durch die exogene Aufnahme gewährleistet werden (14).

2.2 Charakterisierung der Aminosäuretransportsysteme

Ein Organismus besteht aus heterogenen Zelltypen, die miteinander interagieren und vernetzt sind; die Abgrenzung von Zellen durch Membranen ermöglicht eine Kompartimentierung und darüber hinaus ein dem jeweiligen Zelltyp und der Situation angepasstes Einstellen des Substrataufkommens.

Die Aufnahme von Substanzen über die Zellmembran stellt einen hochkomplexen Vorgang dar. Hydrophile Stoffe wie Aminosäuren können die Zellmembran nicht diffusiv passierend passieren; ihre Aufnahme muss über spezielle Transportsysteme erfolgen und erlaubt darüber eine modulierbare Bereitstellung dieser.

Die Transportsysteme für die verschiedenen Aminosäuren variieren in Abhängigkeit ihrer Substratspezifität; ihnen gemein ist der zugrunde liegende Mechanismus des Carrier-vermittelten-Transportes, der eine direkte Substratbindung erfordert und damit einhergehend der *Michaelis-Menten*-Kinetik (Formel s. unten) unterliegt.

Durch die Transporter-individuelle *Michaelis*-Konstante K_m wird die Substratkonzentration definiert, die eine halbmaximale Transportgeschwindigkeit ermöglicht; in dieser Situation ist der Transporter halbgesättigt. Die maximale Kapazität des Transportsystems V_{max} beschreibt die maximale Transportgeschwindigkeit unter gesättigten Transportbedingungen. Resultierend wird die Geschwindigkeit des Aminosäuretransports sowohl durch das Substratangebot als auch durch die Kapazität des Transporters selbst bestimmt (15).

$$v_0 = \frac{v_{max} \times c}{K_m + c}; \quad K_m = \frac{k_1'}{k_1}$$

v_0 = initiale Transportgeschwindigkeit; v_{max} = maximale Transportgeschwindigkeit; K_m = Michaelis-Konstante; c = Substratkonzentration; k_1/k_1' = Geschwindigkeitskonstanten für die Diss- und Assoziationen des Transporter-Substratkomplexes.

Derzeit sind über zwanzig verschiedene Transportsysteme für Aminosäuren beschrieben (1, 2).

2.2.1 Transportsysteme basischer Aminosäuren

Für basische Aminosäuren hat man derzeit fünf Transportsysteme entsprechend ihrer Transporteigenschaften charakterisiert. Diese werden im Folgenden tabellarisch und graphisch vorgestellt (Tabelle 1 und Abbildung 2).

<i>Transport-system</i>	<i>Vorkommen</i>	<i>Substrat</i>	<i>Na⁺-Abhängigkeit</i>	<i>Quelle</i>
B ^{0,+}	Blastozysten, Bürstensaummembran	neutrale und basische AS	+	<i>Van Winkle et al., 1985 (16)</i>
b ^{0,+}	Blastozysten	neutrale und basische AS, Cystin	–	<i>Van Winkle et al., 1988 (17)</i>
b ⁺	Bürstensaummembran	basische AS	–	<i>Hatanaka et al., 2001 (18)</i>
y ^{+L}	Erythrozyten, Dünndarm, Niere, Plazenta	kationische AS, neutrale AS, L-Glutamin	+	<i>Eleno et al., 1994; Deves et al. 1998 (19, 20)</i>
y ⁺	ubiquitär, außer Leber	kationische AS	–	<i>Closs, 1998; Christensen et al.; 1966, White et al.; 1982 (15, 21, 22)</i>

Tabelle 1: tabellarische Übersicht über die derzeit beschriebenen Transportsysteme basischer Aminosäuren.

AS = Aminosäuren.

Die Terminologie der basischen Aminosäuretransporter ist wie folgt zu erklären: Der Index „+“ zeigt die Substrataffinität für basische Aminosäuren mit positiver Ladung unter physiologischen pH-Bedingungen an. Der Index „0“ steht für Aminosäuren mit neutraler Ladung unter oben genannten Bedingungen und die Verwendung von Kleinbuchstaben für die Na⁺-Unabhängigkeit bezüglich der Transportaktivität. Der Buchstabe „y“ steht repräsentativ für Lysin; der Buchstabe „L“ für Leucin, welches wiederum repräsentativ für große, verzweigte Aminosäuren steht und der Buchstabe „b“ für „broad“, da diese Transporter ein breites Substratspektrum aufweisen.

Transportersysteme mit dem Großbuchstaben „L“ besitzen eine erweiterte Substrataffinität auch für neutrale Aminosäuren.

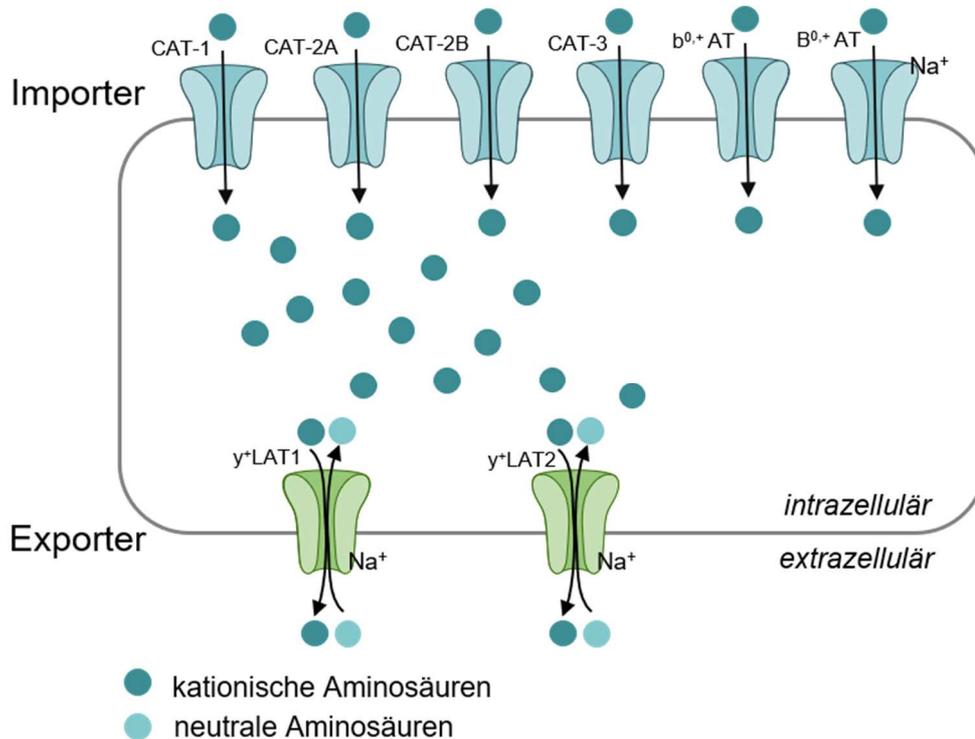


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Transportsysteme für kationische Aminosäuren und ihre Substrate.

Dargestellt sind die Transporter für basische Aminosäuren unter Betonung ihrer Funktion als überwiegende Im- bzw. Exporter. Eine ggf. bestehende Transportabhängigkeit von Natrium ist entsprechend gekennzeichnet.

Abbildung modifiziert nach Werner et al. 2019 (3).

Alle vorgestellten Systeme, mit Ausnahme des B^{0,+}-Systems, sind in ihrer Transportfunktion energieunabhängig, unterscheiden sich aber in ihrer Interaktion mit neutralen Aminosäuren.

Transporter des **Systems b^{0,+}** wurden erstmals in embryonalen Mauszellen beschrieben (17). Sie finden sich überwiegend in Epithelzellen von Nierentubuli und des Gastrointestinaltraktes. Sie haben ein Substratspektrum mit einer gleich starken Affinität für neutrale und kationische Aminosäuren; transportieren aber zusätzlich auch Cystin. Man unterscheidet bei ihnen hoch- und niederaffine Varianten. Transporter des b^{0,+}-Systems liegen ähnlich wie die Vertreter des y⁺L-Systems als Heterodimere vor. Eine Koexpression mit dem Glykoprotein rBAT (related to systeme b^{0,+} Aminosäuretransporter; schwere Kette) bedingt eine hohe Affinität zum Substrat (23, 24). Ein angeborener Defekt des humanen rBAT-Gens kann in einer Hyperexkretion

von kationischen Aminosäuren und Cystin resultieren und ist unter anderem pathophysiologisch für die Cystinurie Typ I (24, 25) verantwortlich.

Das **System B⁰⁺** transportiert kationische und neutrale Aminosäuren Na^+ -abhängig und wurde erstmals in murinen Blastozysten entdeckt (16). Seine Substratspezifität ist ähnlich dem des b⁰⁺-Systems, ist aber um kleine neutrale Aminosäuren, wie Alanin und Serin, erweitert (19).

Transporter des **b⁺-Systems** wurden ebenfalls initial in Maus Blastozysten (1) beschrieben. Sie haben im Vergleich zu den anderen Vertretern der „broad“-Systeme die engste Substratspezifität, sie sind rein auf kationische Aminosäuren beschränkt (1); dabei ist ihre Affinität für Arginin höher als die für die anderen kationischen Aminosäuren (26).

Der Transport kationischer Aminosäuren wird jedoch maßgeblich über zwei weitere große, Na^+ -unabhängige Transportsysteme vermittelt, denen wiederum diverse Carrierproteine mit diszernierenden Eigenschaften zuzuordnen sind.

Bereits 1966 konnte *Christensen* als erster die Existenz eines spezifischen Transportsystems für basische Aminosäuren nachweisen (21); er beschrieb das pH- und Na^+ -unabhängige, *trans*-stimulierbare **Transportsystem „y⁺“** für kationische Aminosäuren, welches sich bis auf in der Leber in allen untersuchten menschlichen Geweben (Fibroblasten der Haut, Mastzellen, Hepatom) vorliegend fand (22). Zugehörige diesen Systems präferieren kationische Aminosäuren als Substrat und binden neutrale Aminosäuren nur mit geringer Affinität und nur unter Anwesenheit von Na^+ -Ionen (27). Ihre Transportleistung wird im Gegensatz zu der, der Angehörigen des y⁺L-Systems, negativ durch N-Ethylmaleinimid (NEM) moduliert (4, 28).

Deves und *Chaves et al.* charakterisierten 1992 das **y⁺L-System** in humanen Erythrozyten als ein weiteres Transportsystem für kationische Aminosäuren neben den y⁺-Transportern (29). *Torrentes et al.* identifizierten 1998 die Untergruppen y⁺LAT1 und den y⁺LAT2 (30).

Die y⁺L-System-Vertreter zeigen bezüglich ihrer Transportaktivität für kationische Aminosäuren einen Antiport mit neutralen Aminosäuren (31); beide Aminosäuregruppen werden mit hoher Affinität gebunden (die K_m für Lysin und Leucin liegt bei etwa 10 M (19)). Der Transport von kationischen Aminosäuren ist hierbei Na^+ -unabhängig, der von neutralen Na^+ -abhängig. Bedingt durch den physiologisch vorherrschenden Natriumgradienten zu Gunsten des Extrazellularraums, kommt es

folglich tendenziell zu einem Import von basischen und einem Export von neutralen Aminosäuren (31, 32). Dies unterstreicht die vorherrschende Rolle des γ^+ -Systems in Organen des Nährstoffaustausches; insbesondere in Epithelien des Dünndarms, der Plazenta und der Nierentubuli. Aber auch in Erythrozyten zeigen sich die γ^+ -Vertreter zahlreich.

Vertreter des γ^+ -Systems liegen ebenfalls wie die Transporter des **Systems b^{0,+}** als Heterodimer vor. Sie sind mit dem Glykoprotein „4F2hc“ (CD98; SLC3A1 oder A2) assoziiert. Dabei stellen die Carrierproteine der γ^+ LAT-Familie die leichten Ketten und das Glykoprotein die schwere Kette des Heterodimers dar. Die Bindung zwischen schwerer und leichter Kette erfolgt über Cysteinbrücken und ist essenziell für die Integration des Transporters in die Zellplasmamembran (30, 33, 34).

γ^+ -Transporter werden auch als Vertreter der *solute carrier family 7* (SLC7) bezeichnet, obwohl sie nur in etwa einem Fünftel ihrer Sequenz (33) mit der der γ^+ -Vertreter übereinstimmen. Sie sind im Gegensatz zu den γ^+ -Vertretern nicht glykosyliert und haben zwei Transmembrandomänen weniger als diese.

Die lysinurische Proteinintoleranz kann pathognomonisch von einem autosomal-rezessiv-vererbten Defekt des γ^+ LAT1 abgeleitet werden (35). Hierbei kommt es einerseits zu einer intrazellulären Anreicherung von kationischen Aminosäuren und andererseits zu einer verminderten Aufnahme von basischen Aminosäuren aus der Nahrung über den Dünndarm und zu einer reduzierten Rückresorption dieser über die Niere. Unbehandelt resultiert eine Mangelernährung mit weitreichenden Folgen wie mentaler Retardierung, chronischer Nierenfunktionseinschränkung, hämatologische Anomalien und pulmonaler Beteiligung (36, 37).

Die verminderte Arginin-Aufnahme bedingt eine Einschränkung des Harnstoffzyklus mit Anreicherung des vor allem zentralnervös toxischen Metabolits Ammoniak, welche bis hin zu einem hyperammonischen Koma führen kann (38, 39).

Experimentelle Studien dieser Arbeit wurden an Vertretern des γ^+ -Systems durchgeführt. In Folge dessen folgt eine detaillierte Darstellung und Charakterisierung der Vertreter diesen Systems.

2.2.2 Carrierproteine des γ^+ -Systems

Die Carrierproteine des γ^+ -Systems werden kationische Aminosäuretransporter (CAT) genannt, da sie, wie bereits eingangs beschrieben, vorzugsweise kationische Aminosäuren mit hoher Affinität binden. Der Transport der kationischen Aminosäuren findet dabei pH- und Na^+ -unabhängig, der von neutralen Aminosäuren mit geringer Affinität und Na^+ -abhängig statt.

Sie gehören der SLC7-Familie an und lassen sich in die Subgruppen CAT-1 (SLC7A1) und im erweiterten Sinne in die Subgruppen CAT-2B (SLCA2B) und CAT-3 (SLC7A3) differenzieren. Darüber hinaus existiert eine weitere CAT-2-Isoform, der CAT-2A, welcher nicht dem γ^+ -System zugeordnet wird und eine Spleiß-Variante des CAT-2B darstellt. Beide CAT-2-Isoformen unterscheiden sich lediglich in einer Sequenz von 42 Aminosäuren im Bereich der vierten intrazellulären Schleife und der neunten Transmembrandomäne (40-45). In dieser Sequenz ist die funktionelle Domäne der Transporter lokalisiert (41), sodass beide Isoformen erheblich in ihren Transporteigenschaften variieren.

Zwischen den Aminosäuresequenzen der CAT-Vertreter verschiedener Säugerspezies, insbesondere auf die CAT-2-Isoformen bezogen, liegt ein hoher Grad an Konservierung vor. Die Aminosäuresequenzen des hCAT-2A und des hCAT-2B zeigen eine über 90%-ige Übereinstimmung mit den entsprechenden Sequenzen der murinen CAT-Isoformen; im Transportfunktions-determinierenden Bereich unterscheiden sie sich lediglich in einem Rest (40). Die korrespondierende Domäne im CAT-1-Protein zeigt zwischen den humanen und murinen Vertretern eine Divergenz von sieben Resten; zwischen den murinen und Ratten-CATs liegt in diesem Bereich hingegen eine 100%-ige Übereinstimmung vor (40). Das Ausmaß der Konservierung zwischen den CAT-Vertretern verschiedener Säugerspezies ist der Beweis für die große Bedeutung der CATs für die Aminosäureversorgung der Säugerzellen. Evolutionsbiologisch betrachtet hat sich die Versorgung mit kationischen Aminosäuren über dieses Transportsystem als vorteilhaft erwiesen und hat speziesübergreifend Bestand gefunden. Die größere Übereinstimmung der Aminosäuresequenz zwischen Ratten und murinen CATs im Vergleich zu den humanen Isoformen könnte im Zuge der phylogenetisch näheren Abstammung erklärt werden.

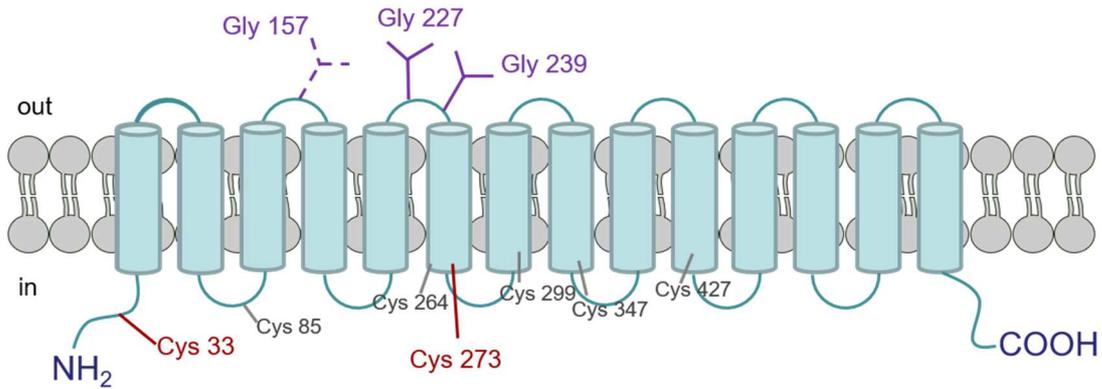


Abbildung 3: Topografiemodell der kationischen Aminosäuretransporter.

Modellvorstellung mit 14 Transmembrandomänen. Eingezeichnet sind die in allen hCAT-Isoformen konservierten Cysteinreste, davon in Rot hervorgehoben die Cysteinreste 33 und 273, die die NEM-vermittelte Funktionshemmung umsetzen, sowie die N-Glykosylierungsstellen 157 (hCAT-2A und -2B), 227 und 239 (hCAT-1, -2A und -2B).

Darstellung angelehnt an *Habermeier et al., 2003 (46)* und *Verrey et al., 2004 (33)*.

Alle CAT-Isoformen zeigen auf molekularer Ebene eine scheinbar ähnliche Topografie bezüglich Anzahl ihrer Transmembrandomänen, Lage des N- und C-Terminus und putativen Glykosylierungsstellen (Abbildung 3). Dies und die Existenz nur weniger funktionstüchtiger SLC7-Polymorphismen (47) impliziert, dass die Transportfunktion dieser Proteine nur wenig Varianz in ihrer Proteinsequenz erlaubt und erklärt die ähnlichen Transporteigenschaften der CAT-Isoformen bezüglich Substratspezifität und Transportabhängigkeit von externen Faktoren.

Das gängigste Strukturmodell, basierend auf Hydrophobizitäts-Analysen, beschreibt die Carrier-Struktur mit 14 Transmembrandomänen (47, 48) und steht damit in Konkurrenz zu dem Modell von *Reizer et al. (49)* welches die Existenz von lediglich 12 Transmembrandomänen vorschlägt. Dieses Postulat bleibt unter Berücksichtigung experimenteller Studien von *Closs und Boissel et al. (47)* als kritisch zu werten.

Die Lage des N- und C-Terminus der Transporter ist intrazellulär zu erwarten (50). Im murinen Organismus weist der CAT-1 zwei (in der dritten extrazellulären Schleife an Position 227 und 239 nach 14-TM-Modell), der CAT-2A und der -2B drei (zusätzlich in der zweiten extrazellulären Schleife an Position 157) putative Glykosylierungsstellen auf (46). Diese können als posttranslationale Modifikation N-glykosyliert und darüber gegebenenfalls die Transportfunktion der CAT-Vertreter moduliert werden; beispielsweise zeigten *Kim et al. 1993 (51)* eine Abnahme der transportierten Arginin-Menge über den mCAT-1 um ca. 50 % bei Störung der N-Glykosylierung von Cysteinresten des Transporters im Überexpressionssystem *Xenopus laevis*-Oozyte.

Neben den bereits aufgeführten CAT-Isoformen konnten zwei weitere Vertreter des y^+ -Systems, der SLC7A4 (52) und der KIAA (SLC7A14)(53), identifiziert werden.

In Überexpressionsstudien mit *Xenopus laevis*-Oozyten konnte für den SLC7A4 bisher keine Transportaktivität weder für kationische noch für neutrale oder anionische Aminosäuren oder für das Polyamin Putrescin bewiesen werden; auch in Zellkulturversuchen mit humanen Glioblastomzellen führte eine Überexpression des SLC7A4 zu keiner gesteigerten Arginin-Aufnahme in diese Zelle (54).

Der KIAA nimmt vermutlich eine Rolle als lysosomaler Aminosäuretransporter ein (53, 55, 56).

Eine ebengleiche Abhängigkeit von einem assoziierten Protein wie für das y^+ L-System und das Glykoprotein „4F2hc“ beschrieben, ließ sich bisweilen für keinen Vertreter des y^+ -Systems nachweisen. Im Anbetracht der ungeklärten Rolle des SLC7A4 und seinem mangelnden Anteil am Aminosäuretransport und dem überwiegend intrazellulärem Nachweis des SLC7A14s liegt die These nahe, dass auch Vertreter des y^+ -Systems auf einen assoziierten Bindungspartner für ihre korrekte Integration in die Plasmamembran und ihre Transportfunktion angewiesen sein könnten.

CAT-1 (SLC7A1)

Der 67kDa große CAT-1 stellt den Hauptvertreter der y^+ -Carrierproteine dar. 1989 wurde er zunächst von *Albritton et al.* als ein Rezeptor für ekotrope murine Leukämieviren beschrieben (48); das Aufschlüsseln seiner Bedeutung als Transportsystem für basische Aminosäuren folgte erst zwei Jahre drauf (57, 58).

Die Transportfunktion des CAT-1-Proteins ist für die Zelle essenziell, da es zum einen mit Ausnahme von hepatischem Gewebe ubiquitär im humanen Organismus vorkommt (33, 47, 59), sich zum anderen ein angeborener Verlust des CAT-1-Proteins in CAT-1^{-/-} Knockout-Mäusen postnatal binnen weniger als 24 Stunden als letal erwiesen hat (60) und darüber hinaus keine mit dem Leben vereinbaren Defekte des CAT-1-Proteins *in vivo* bekannt sind.

Unter den CAT-Subgruppen weist er mit 70–250 μ M die höchste Affinität für Arginin auf (57, 58, 61).

Der CAT-1 zeigt im Kontrast zu den Isoformen CAT-2B und -3 bezüglich seiner Transportleistung eine starke *trans*-Stimulierbarkeit durch sein Substrat (40, 58). Dies bedeutet, dass die Transportrate des CAT-1-Proteins durch Steigerung der Substratmenge auf der *trans*-Seite, also der Seite, zu der hin transportiert wird (in

diesem Falle zur Plasmamembran hin), gesteigert werden kann. Hintergrund dabei ist, dass ein Carrier sich im beladenen Zustand schneller als im unbeladenen Zustand wieder zur *cis*-Seite wenden kann und damit der nächste Transportvorgang des Substrats von *cis* nach *trans* schneller erfolgt. Gesamtbetrachtet finden so mehr Transportvorgänge pro Zeiteinheit statt. Vergleicht man den Arginin-Efflux von hCAT-1 überexprimierenden *Xenopus laevis*-Oozyten bei einer Inkubation in einer 0,1 mM Arginin-Lösung mit dem von überexprimierenden Oozyten bei einer Inkubation in einer Arginin-freien Lösung, ist der Efflux unter ersterem um den Faktor zehn höher, also deutlich *trans*-stimulierbar (40, 58). Bei einer hCAT-2A-Überexpression ergibt sich selbst bei Arginin-Konzentrationen von 0,25 mM keine signifikante Änderung des Arginin-Effluxes (40).

Eine Steigerung der CAT-1-vermittelten Aufnahme von basischen Aminosäuren bei gleichzeitig verminderter Abgabe dieser kann außerdem durch eine Hyperpolarisation der Plasmamembran erreicht werden (62-64). Alle anderen CAT-Isoformen zeigen weniger Beeinflussung durch eine Änderung des Membranpotenzials und eine geringere *trans*-Stimulierbarkeit.

CAT-2A (SLC7A2A)

Der Carrier CAT-2A nimmt im Rahmen der CAT-Proteine eine Sonderrolle ein; er wirkt mehr als ein unidirektionaler Transporter, weniger als ein Austauschere; ist in seiner Transportaktivität pH-abhängig und wenig *trans*-stimulierbar.

Der CAT-2A dominiert in hepatischem Gewebe.

Seine Affinität (K_m) für den Arginin-Transport liegt mit 2-5 mM deutlich unter der, der anderen CAT-Isoformen (Tabelle 2), seine maximale Transportgeschwindigkeit (V_{max}) jedoch deutlich über der, der anderen hCAT-Vertreter (Tabelle 2). Um seine hohe V_{max} bei gleichzeitiger niedriger K_m überhaupt erreichen zu können, benötigt der CAT-2A eine höhere Konzentration an Substrat. Dies ist vor allem für die postprandiale Aufnahme basischer Aminosäuren von Interesse; bei hohen Plasmakonzentrationen an kationischen Aminosäuren können diese auch an den niederaffinen CAT-2A binden, der diese sehr schnell nach intrazellulär aufnehmen kann.

Bedingt durch diese Charaktereigenschaften gehört der CAT-2A nicht dem γ^+ -System an.

<i>hCAT-Vertreter</i>	K_m [μM]	V_{max} [nmol/Oozyte/h]	<i>Quellen</i>
hCAT-1	70–250	1,6- 1,8	<i>Kim et al., 1991; Wang et al., 1991; Hatzoglou et al., 2004 (57, 58, 61)</i>
hCAT-2A	2000–5000	2,2- 8,4	<i>Hosokawa et al., 1997; Ito et al., 1997; Hosokawa et al., 1999; Vekony et al., 2001 (65-68)</i>
hCAT-2B	38–380	1,2- 4,0	
hCAT-3	40–450	1,4	

Tabelle 2: K_m und V_{max} für Arginin der verschiedenen hCAT-Isoformen.

CAT-2B (SLC7A2B)

Die Spleißvariante des CAT-2As, der CAT-2B, zeigt nur nach Stimulation durch Zytokine und Lipopolysaccharide eine signifikante Expression. Dies legt eine Bedeutung des CAT-2Bs für die Immunabwehr nahe; beispielsweise kann so gezielt und bedarfsgerecht die Hochregulierung der *NO*-Synthase in Makrophagen initiiert werden (69).

CAT-3 (SLC7A3)

Der CAT-3 hat seine Hauptfunktion in der Embryonalentwicklung. Zu diesem Zeitpunkt übernimmt er einen entscheidenden Anteil des Aminosäuretransports in die Zelle; dies erklärt vermutlich, wieso CAT-1^{-/-} Knockoutmäuse nur pränatal lebensfähig sind.

In adultem Gewebe ist er weiterhin in Hirn, Thymus, Uterus und Testis nachweisbar (68), seine Funktion in diesen Geweben bleibt aber bisweilen nicht vollständig geklärt (70).

2014 schrieben *Gu et al.* dem CAT-3 in Zebrafischen eine regulierende Rolle in der Oxidation von Leberfettsäuren und damit einen potenziellen Zusammenhang in der Pathogenese der nichtalkoholischen Fettleberkrankheit zu (71). Sie zeigten, dass ein funktioneller Defekt des CAT-3-Proteins und damit der Arginin-abhängigen *NO*-Synthese in Zebrafischen zu einer Steatosis der Leber führt. Ferner belegten sie auch auf den humanen Organismus bezogen einen Zusammenhang zwischen dem Abbau von SLC7A3-Proteinen und einer hepatischen Lipidakkumulation; vermittelt über den Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor-Gamma-Coaktivator-1- α -Signalweg.

2015 fanden *Nava et al.* einen möglichen Zusammenhang zwischen einer Missens-Mutation in dem für den SLC7A3 codierenden Bereich des X-Chromosoms und dem

Auftreten von Störungen des Autismus-Formenkreises bei Männern (72). In Funktionsanalysen der Missens-Mutationen der Probandenproben konnte gezeigt werden, dass zwei der vier gefundenen Varianten zu einer reduzierten Proteinstabilität oder einer abnormalen Transportfunktion des hCAT-3-Proteins führten (72).

2.3 Biochemische Grundlagen der Stickstoff-Signalwirkung in Bezug auf die Reaktion mit Cysteinresten in γ^+ -Transportern

Nachdem *Deves et al.* 1993 experimentell darlegten, dass γ^+ -Transporter in Erythrozyten durch N-Ethylmaleinimid (NEM) inhibierbar sind (4), konnten *Bayer et al.* 2013 dieses Phänomen in Expressionsstudien mit *Xenopus laevis*-Oozyten weiter aufschlüsseln (5). Alle hCAT-Isoformen sind durch NEM gleichermaßen inhibierbar; folglich kommen für die NEM-vermittelte Hemmung nur Cysteinreste in Betracht, die in allen hCAT-Isoformen konserviert sind (Cysteinrest 33, 85, 264, 273, 299, 347, 427; *Bayer et al.*, 2013, (5)). Durch gezielte Expression von hCAT-2A-Einzelmutanten mit Mutation in jeweils einem dieser Cysteinreste, ließen sich zwei der aufgeführten Cysteinreste (Cysteinrest 33 und 273) als Angriffspunkte für NEM herausarbeiten.

Auf molekularer Ebene erfolgt die Transporthemmung durch eine Alkylierung von Sulfhydrylgruppen unter Entstehung von Thioether an diesen Cysteinresten.

Konsequent leitet sich die Frage ab, ob eine Transporthemmung an diesen Cysteinresten auch durch andere posttranslationale Modifikationen, wie beispielsweise einer S-Nitros(yl)ierung oder Palmitoylierung, stattfinden könnte.

2010 lieferten *Zhou et al.* dazu einen möglichen Ansatz (6); sie zeigten, dass eine Stimulierbarkeit der NO-Synthese in Rattenherzmuskelzellen mit einer Hemmung des Arginin-Transports einhergeht. Die Autoren äußerten die Vermutung, dass dies möglicherweise über eine S-Nitrosylierung an Cysteinresten der in diesen Zellen exprimierten CATs vermittelt werden könnte.

Bereits ein Jahr vor dieser Entdeckung publizierten *Casanella et al.* über den Einfluss von NO-Donatoren auf die Transportleistung kationischer Aminosäuretransporter (73). Sie beschrieben für Endothelzellen aus Nabelschnurvenen intrauterin wachstumsretardierter Embryonen konträr zu *Zhou et al.* eine Zunahme der Argininaufnahme in die Zelle unter Zugabe des NO-Donors SNAP (S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamin).

Flores et al. diskutierten 2003, dass Stickstoffmonoxid möglicherweise nicht direkt an kationische Aminosäuretransporter angreift, sondern dass die NO-vermittelte Modulation über indirekte Mechanismen, wie Membranhyperpolarisation, vonstattengehen könnte (74).

Shin et al. bestärkten diese These 2011 durch eine entscheidende Arbeit über das „L-Arginin-Paradoxon“ (75).

Dieses Paradoxon beschreibt das Phänomen einer weiteren Zunahme der endothelialen *NO*-Synthase-Aktivität (eNOS-) durch externe Argininaufnahme in die Zellen bei bereits vorhandener hoher intrazellulärer Arginin-Konzentration (10). Dies tritt *in vivo* nur unter bestimmten pathophysiologischen Bedingungen, wie sie beispielsweise bei Hypercholesterinämie oder Hypertonie vorliegen, auf (76, 77).

Die K_m der eNOS lässt für Arginin eine intrazelluläre Konzentration von $3\mu\text{M}$ (78, 79) erwarten, die intrazellulär physiologisch vorherrschende Konzentration *in vivo* liegt jedoch wahrscheinlich sogar über der extrazellulären Plasmakonzentration von Arginin (80 - $100\mu\text{M}$, *Bode Boger et al., 2007, (80)*) und damit deutlich über der durch die K_m der eNOS berechneten Konzentration. Eine Erhöhung der Arginin-Konzentration würde folglich in der Theorie keinen Einfluss auf die *NO*-Produktion nehmen können. Einige Studiendaten *in vivo* belegen jedoch ebenfalls einen (temporären) Benefit einer Arginin-Supplementierung zumindest für Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz bezüglich ihrer Belastungsfähigkeit (81, 82). Andere Arbeitsgruppen sehen keinen positiven Effekt in der therapeutischen Arginin-Supplementierung bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen (83).

Shin et al. erklären sich das „L-Arginin-Paradoxon“ darüber, dass sich die *NO*-Produktion einer Zelle zwar unabhängig von dem vorhandenem intrazellulären Arginin-Angebot, aber abhängig von dem extrazellulären Angebot und damit abhängig von der über kationische Aminosäuretransporter aufgenommenen Arginin-Menge zeigt (75). Dieses Postulat steht allerdings konträr zu den Ergebnissen von *Simon et al. (84)*, die die intrazelluläre Arginin-Menge in Endothelzellen durch die Arginin-Synthese über den *NO*-Citrullin-Zyklus und durch Proteinolyse als vollkommen unabhängig vom extrazellulären Arginin-Angebot werten.

Abschließend sei festgehalten, dass das „L-Arginin-Paradoxon“ weiterhin nicht *in toto* verstanden ist und dass dessen Aufschlüsselung weiterer Forschungsarbeit bedarf.

2.3.1 Grundlagen der Bildung von S-Nitrosothiolen

Obwohl NO durch sein freies Elektronenpaar als Reaktionspartner bereitsteht, ist es in seiner Reaktionsbereitschaft unerwartet träge (85). Dies gesteht ihm eine Sonderrolle unter den Radikalen ein und ermöglicht ihm eine verzögerte Signalwirkung auch außerhalb der NO -produzierenden Zelle.

Um den potenziellen Einfluss von Stickstoffmonoxid auf die Transportleistung der CATs untersuchen zu können, ist es essenziell, sich vorab mit den chemischen Grundlagen der Interaktion von NO und seinen Zielstrukturen auseinanderzusetzen. Insbesondere die Wechselbeziehungen zwischen NO mit Thiyl-Radikalen bzw. zwischen NO^+ und Thiolen ist in Bezug auf die CATs von besonderer Wichtigkeit und mündet in beiden Fällen in der Entstehung von S-Nitrosothiolen (SNO).

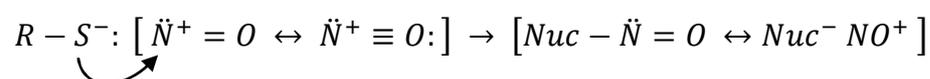
Posttranslationale Modifikationen an Proteinen werden terminologisch oftmals mit dem Suffix „-ylierung“ gekennzeichnet. In Bezug auf die Wirkung von NO bzw. NO^+ definiert das Suffix „-ylierung“ eindeutig den Prozess, der zu dem Produkt, in diesem Fall SNO-Formationen, geführt hat. Die Bezeichnung „Nitros-ylierung“ definiert nicht die Addition von NO an Moleküle im Allgemeinen, sondern bezieht sich rein auf die direkte Bindung von NO an Thiyl-Radikale in Cysteinresten. Eine Bindung zwischen Nitrosoniumionen (NO^+) und Thiolen ist korrekterweise als Nitrosierung zu bezeichnen. Beide Reaktionswege führen jedoch zur Entstehung von SNO-Formationen. Eine einwandfreie Differenzierung zwischen Nitrosylierung und Nitrosierung ist anzustreben, um den Prozess, der zu dem gewünschten Produkt geführt hat, klar zu differenzieren.

Nitrosierung

Ein Nitrosoniumion (NO^+) ist in der Lage, eine **Nitrosierung** durch Addition an eine nukleophile Gruppe seines Reaktionspartners, wie beispielsweise an ein Amin oder ein Thiol, zu bewirken.

Die dabei vorliegende Bindung zwischen dem elektronenbereitstellendem Nukleophil und NO^+ stellt ein Konglomerat aus ionischer und kovalenter Bindung dar und weist damit Charakteristika beider Bindungstypen auf (86).

Der Angriff des Nukleophils auf das elektrophile Atom des Elektronendonators resultiert in einer Elektronenpaardonation zwischen Nucleophil und NO^+ :

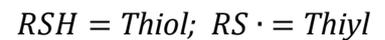


R = Protein mit Cysteinrest

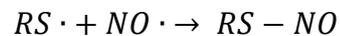
Die Halbwertszeit von NO^+ liegt im wässrigen Milieu im Sekundenbereich (ca. 445 s, (87)), sodass eine Nitrosierung *in vitro* effizienter durch die NO^+ -Bereitstellung durch NO^+ -Donatoren als durch das Generieren von NO^+ durch einen nukleophilen Angriff an NO gelingt.

(Trans-) Nitrosylierung

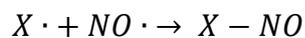
Neben einer Addition von NO^+ an die Nukleophile Gruppe eines Moleküls, kann Stickstoffmonoxid auch direkt als Ligand gebunden werden; man spricht in diesem Zusammenhang von einer **Nitrosylierung**. Voraussetzung für die direkte Bindung ist das Vorliegen des Thiols in oxidierter Form als Thiyl-Radikal. Eine Oxidation von Thiolen zu Thiyl-Radikalen läuft *in vivo* klassischerweise durch eine Reaktion mit Oxidantien wie $HO \cdot$, $HOO \cdot$ oder $NO_2 \cdot$ ab.



Zur Betonung des vorangehenden Oxidationsschrittes vom Thiol zum Thiyl-Radikal spricht man an dieser Stelle auch von einer **oxidativen Nitrosylierung**.



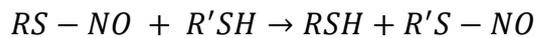
Ursprünglich rührt der Terminus der Nitrosylierung von der Reaktion zwischen Stickstoffmonoxid und den Metallzentren seiner Reaktionspartner und der resultierenden Bildung von Metall-Nitrosyl-Komplexen (88) her.



Das Geschehen einer Nitrosylierung *in vivo* hängt von dem Vorhandensein entsprechender Thiyl-Radikalen, sowie von der Verfügbarkeit konkurrierender Reaktionspartner wie Thiole ab. In vielen Enzymen sind Cystein-Thiyl-Radikale im Bereich ihrer enzymatischen Aktivität lokalisiert; eine Nitrosylierung an dieser Stelle kann die Enzymfunktion beeinflussen.

Thiyl-Radikale können jedoch auch zu stabileren Bindungen, wie Disulfide weiter reagieren. Die Entstehung von SNO-Formationen hängt also ebenfalls entscheidend von der Verfügbarkeit von NO ab.

Eine häufige und bedeutende Modifikation durch Stickstoffmonoxid stellt die Generierung von S-Nitrosothiolen durch Übertragung von NO^+ -Gruppen zwischen S-Nitrosothiolen dar. *Anand und Stammler* haben diesen Mechanismus 2012 ursprünglich als Trans-**Nitrosylierung** beschrieben (89); unter Berücksichtigung der zugrundeliegenden Chemie ist jedoch eher von einer Trans-**Nitrosierung** zu sprechen. In Analogie zum Mechanismus der Nitrosierung läuft hier ein Angriff des einen Reaktionspartners (R' ; z. B. ein Thiol) auf den anderen Reaktionspartner (R ; Stickstoffatom des S-Nitrosothiols) ab und NO bindet nicht direkt als Ligand.



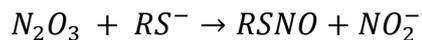
$R = \text{Alkylrest}; S - NO = \text{S-Nitrosothiol}$

Unter Berücksichtigung der kurzen Halbwertszeit von NO^+ kann die Oxidation durch dieses direkt nur unzureichend vermittelt werden und muss über die Entstehung des stabileren Distickstofftrioxids (N_2O_3) geschehen.

Eine Reaktion zwischen Stickstoffmono- und Stickstoffdioxid ergibt das gewünschte Distickstofftrioxid, welches im Fließgleichgewicht wieder in NO^+ und NO_2^- rückreagieren und somit im Sinne eines NO^+ -Donors NO^+ -Ionen bereitstellen kann.



In Gegenwart eines Nukleophils, z. B. eines Thiols, erfolgt die Übertragung des NO^+ -Ions auf dieses unter Entstehung eines S-Nitrosothiols.



Zusammenfassend läuft eine Nitrosierung über die Zwischenstufe des Distickstofftrioxids immer dann ab, wenn NO_2^- unter Anwesenheit von NO gebildet wird.

Dies geschieht beispielsweise bei der Autooxidation von Stickstoffmonoxid.

Eine derartige Autooxidation läuft musterhaft bei der Reaktion von NO -Ionen mit Superoxidanionen (O_2^-) bei einem Vorliegen derer in einem Verhältnis von dreien-zu-einem (90) ab.



Unter physiologischen Bedingungen geschieht dies jedoch träge (86); eine Kompartimentierung der Zelle und eine damit einhergehende Anreicherung von NO - und O_2^- -Molekülen oder eine alternative Gewinnung von Distickstofftrioxid über andere Reak-

tionswege scheinen *in vivo* von Nöten. NO - und O_2^- -Moleküle können sich im hydrophoben Milieu der Zellplasmamembran anreichern und so die N_2O_3 -Bildung beschleunigen (91).

2.4 Interaktionspartner von Proteinen

Bindungspartner von Proteinen werden im Allgemeinen als Liganden bezeichnet. Ein Ligand kann ein komplexes Molekül, beispielsweise ein weiteres Protein oder ein Xenobiotikum, aber auch ein Grundbaustoff wie ein Kohlenhydrat, Lipid, eine Aminosäure oder Nukleinsäure sein.

Die Tertiärstruktur von Proteinen, determiniert durch die Art und Konformation ihrer Aminosäureseitenketten, bedingt ihre hohe Selektivität bezüglich ihrer Ligandenwahl. Die Bindung der entsprechenden Liganden erfolgt meist spezifisch nach dem „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ und wird über nicht-kovalente Bindungen vermittelt. Nicht-kovalente Bindungen sind schwache Bindungen mit einem Energiegehalt von maximal 30 kJ/mol (92) und damit von weniger als einem Zehntel des Energiegehalts kovalenter Bindungen. Ihre Reichweiten liegen damit gewöhnlich unter denen von kovalenten Bindungen. Dies ermöglicht ein schnelles Diss- und Assoziieren von Ligand und Protein und stellt damit ein schnell modulierbares System dar.

Die Bindung zwischen Ligand und Protein löst in der Regel eine Veränderung in der Konformation oder der Reaktionsbereitschaft des bindenden Proteins aus. Dies mündet gewöhnlich in einer Folgereaktion, die ohne Bindung des Liganden nicht möglich gewesen wäre. In Bezug auf ein Transportprotein führt dies zur Translokation des Liganden.

2.4.1 Zellmembrantransportproteine und ihnen assoziierte Interaktionspartner

Viele Zellmembrantransportproteine benötigen für ihre Integration oder ihre volle Funktionstüchtigkeit einen assoziierten Bindungspartner; beispielsweise hat man für das Multidrug Resistance Proteine 4 (MRP4) die Notwendigkeit einer Interaktion mit dem ERM-bindenden Phosphatprotein 50 (EBP50) oder mit Vertretern der ERM-Familie nachgewiesen (93).

In Bezug auf einen Transporter kann die Interaktion mit einem Liganden für die Synthese des Transporters, seine Integration am Zielort (z. B. in die Plasmamembran) und für seine Stabilität am Zielort auch während des Transportvorgangs notwendig sein. Der Glukosetransporter Typ 4 (GLUT4) (SLC2A4) ist ein Membrantransporter für die Insulingesteuerte Aufnahme von Glukose in die Zelle (94). Wenn Insulin an den Insulinrezeptor bindet und dessen Tyrosinkinase aktiviert, wird eine Signalkaskade indu-

ziert, welche durch Proteininteraktionen zur Translokation des in Membranvesikeln gelagerten GLUT4 in die Zellmembran führt (95). Dies ist ein Paradebeispiel für die Translokation eines Transportproteins zu seinem Zielort durch Bindung mit ihm assoziierter Proteine.

Wie bereits vorangehend beschrieben, brauchen auch die Vertreter des γ^+ L-Systems einen Bindungspartner für ihre Stabilität, ihre Integration in die Plasmazellmembran (96) und auf den LAT1 bezogen seine vollständige Transportfähigkeit (7). 1998 konnten *Kanai et al.* diesen Bindungspartner in Form des 85 kDa großen (96) Glykoproteins „4F2hc (SLC3A2)“ identifizieren (97).

Yan et al. schlüsselten 2019 die Proteininteraktion zwischen den LAT1-Transportern und ihrem Bindungspartner „4F2hc“ weiter auf. Sie fanden heraus, dass die starken extra- und intrazellulären Interaktionen (98) zwischen „4F2hc“ und dem LAT1-Transporter den Transport von Aminosäuren über diesen Transporter überhaupt erst ermöglichen (7). „4F2hc“ hält dabei insbesondere die Gerüstdomäne des LAT1 in der Zellmembran und stabilisiert so den Transporter während des Transportvorgangs und während der damit einhergehenden Konformationsänderungen in der Membran (Abbildung 4) (7).

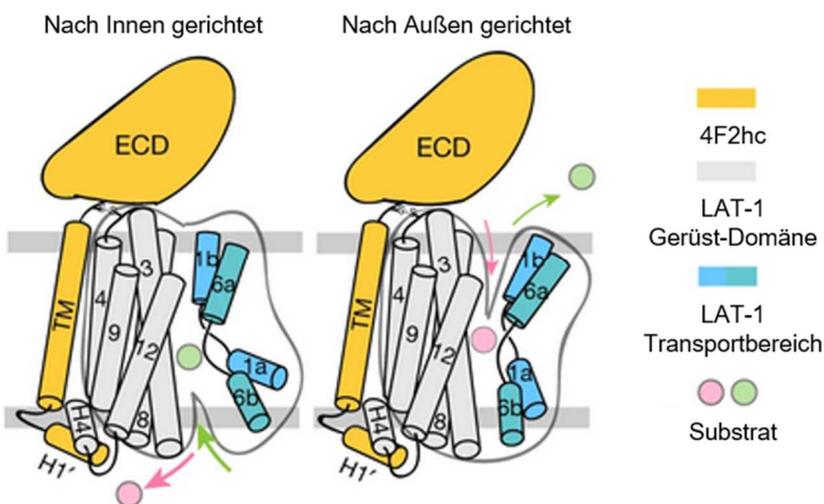


Abbildung 4: Modelvorstellung der Interaktion zwischen dem LAT-1 und seinem assoziierten Glykoprotein „4F2hc“.

Die Abbildung zeigt die Assoziation zwischen dem LAT1 und seinem Interaktionspartner „4F2hc“ an der Gerüstdomäne und die möglicherweise daraus resultierende stabilisierende Bedeutung des „4F2hc“ für den LAT1 in der Plasmamembran während seines Transportvorganges.

Abbildung modifiziert nach *Yan et al.*, 2019 (7).

Ein weiteres Beispiel für eine Glykoprotein-vermittelte Abhängigkeit eines Membrantransporters für seine Translokation in die Plasmamembran stellen das $b^{0,+}$ -System und das Glykoprotein „rBAT“ dar. *Reig et al.* zeigten 2002 in HeLa-Zellen, dass es einer Koexpression von $b^{0,+}$ -Transportern und „rBAT“ bedarf, um den $b^{0,+}$ -Transporter in die Plasmamembran zu integrieren (99).

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt steht der Nachweis eines potenziellen Bindungspartners für die Vertreter des y^+ -Systems in Analogie aus.

Dennoch scheint die Existenz eines solchen interagierenden Proteins denkbar.

Beispielsweise könnte die Existenz eines Bindungspartners für den SLC7A4 erklären, wieso bisher in Überexpressionsstudien für diesen keine Beteiligung am Aminosäuretransport beobachtet wurde (54). Im Falle der Existenz eines interagierenden Proteins könnte dieses im gewählten Expressionssystem nicht oder bei Überexpression nur unzureichend vorhanden gewesen sein und damit die beobachtete fehlende Transportfähigkeit des SLC7A4s erklären.

Eine Abhängigkeit von einem Partnerprotein für die Integration des SLC7A14s in die Plasmamembran würde sein überwiegend zytoplasmatisches Vorkommen in Überexpressionssystemen (54, 100) plausibel machen.

Eine indirekte Hemmung des hCAT-vermittelten Transports über ein assoziiertes Protein wurde für die Proteinkinase C in Bezug auf den hCAT-1 in EA.hy 926 Zellen und in *Xenopus laevis*-Oozyten 2001 von *Gräf et al.* nachgewiesen (101). *Hatzoglou et al.* erweiterten experimentell die indirekte Einflussnahme von PKC auf den CAT-vermittelten Transport auf die Isoformen CAT-2B und -3 (61). 2004 schlüsselten *Rotmann et al.* auf, dass diese Regulation über eine PKC-vermittelte verminderte Oberflächenexpression des Transporters durch Internalisierung des hCAT-1s und nicht in Form einer direkten Hemmung des Transporters geschieht (63). Es ist somit denkbar, dass weitere, den CATs assoziierte und für deren Integration, Stabilität und Funktionstüchtigkeit notwendige Proteine existieren.

Ferner fällt auf, dass die K_m -Werte der CATs in Überexpressionsstudien auch innerhalb einer Isoform große Spannbreiten aufweisen (Tabelle 2). Dies könnte ein Hinweis auf die Abhängigkeit der CATs von einem Protein bezogen auf ihre Transportleistung sein; ggf. resultieren die beobachteten breitstreuenden K_m -Werte durch eine variierende Menge an verfügbarem interagierendem Protein im gewählten Überexpressionssystem.

Zudem steigt die Menge an über die CATs aufgenommenen kationischen Aminosäuren in *Xenopus laevis*-Oozyten nach Injektion CAT-codierender mRNA mit zunehmender Inkubationsdauer an, bis sie nach drei bis vier Tagen ein plateauförmiges Maximum erreicht hat (102). Eine merkliche Argininaufnahme in die Oozyten ist erst zwei Tage nach der Injektion mit CAT-codierender mRNA zu messen (102). Die Translation von injizierter Fremd-DNA würde jedoch kürzere Inkubationszeiten für deutlich messbare Argininströme erwarten lassen. Ggf. ist dies im Zusammenhang mit einer gleichzeitig notwendigen Hochregulierung endogen in der Oozyte vorhandener Bindungspartner für die Integration der überexprimierten CATs in die Plasmamembran zu erklären.

Zusammenfassend ergeben sich ausreichend Hinweise auf die mögliche Existenz eines den Vertretern des γ^+ -Systems assoziierten Proteins. Die vorliegende Arbeit möchte die Basis für die Durchführung einer geeigneten Methodik zur Analyse eines den hCATs assoziierten Proteins geben.

Das Aufschlüsseln von Protein-Interaktionen ermöglicht ein besseres Verständnis physiologischer Stoffwechselprozesse. Dies wiederum stellt die Basis für eine externe Einflussnahme auf jene Signalprozesse dar und öffnet damit ggf. die Tür für einen therapeutischen Nutzen durch Eingriff in die Ligandenbindung. Beispielhaft ist gezeigt worden, dass humane T-Zell-Lymphozyten in ihrer Proliferation (103, 104) und Aktivierung (105) auf Arginin angewiesen sind; die Aufnahme von Arginin erfolgt bei diesen Zellen maßgeblich über den hCAT-1 (106). Bei Patienten mit einer über T-Zellen-vermittelten Autoimmunerkrankung, könnte die pathologisch gesteigerte Aktivität der T-Zellen durch Hemmung ihrer Argininaufnahme über den hCAT-1 angegangen werden. Neben einer direkten Transporthemmung käme eine Transportmodulation über potenziell assoziierte Bindungspartner in Betracht.

2019 veröffentlichten *Werner et al.* einen Beitrag zu der Bedeutung der Arginin-Aufnahme über die CATs in chronische lymphatische Leukämie (CLL)-Zellen (3). Sie zeigten, dass die Proliferation dieser Zellen von der extrazellulären Verfügbarkeit von Arginin abhängt, da CLL-Zellen durch Fehlen der Argininosuccinat-Synthetase (ASS) nicht in der Lage sind, Arginin endogen zu synthetisieren. Der CAT-1 ist dabei der einzige Arginin-aufnehmende Transporter in den CLL-Zellen (3). Experimentelle Daten zeigen, dass ein Herunterregulieren des CAT-1s in HG3-CLL-Zellen die Zellproliferation und das Überleben dieser Zellen reduziert; ebenso führt eine Herunterregulierung des CAT-1-Proteins in murinen CLL-Xenograft-Modellen zu einer

signifikanten Suppression des Tumorwachstums (3). Dies eröffnet eine mögliche Therapieoption für CLL-Patienten durch Modulation der CAT-1 vermittelten Arginin-Aufnahme in die Tumorzelle. Auch hier käme neben einer direkten Transporterhemmung eine Modulation der Transportaktivität über potenziell dem CAT-1 assoziierte Bindungspartner in Betracht und würde eine große therapeutische Chance für an CLL-Erkrankte eröffnen.

2.5 Ziele der vorliegenden Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit lag zusammenfassend darin, Steuerungsmechanismen kationischer Aminosäuretransporter, insbesondere der CATs, weiteraufzuschlüsseln.

Schwerpunkte lagen hierbei auf möglichen Interaktionen mit

1. Stickstoffmonoxid im Sinne einer hemmenden Einflussnahme auf die Transportleistung durch S-Nitros(yl)ierung von Cysteinresten der Transporter

und

2. potenziell mit den Transportern assoziierten Proteinen, zwecks Synthese, Integration in die Plasmamembran und Transportfunktion.

Zum Erreichen der aufgeführten Ziele sollte Erstgenanntes in Überexpressionsstudien in *Xenopus laevis*-Oozyten untersucht und Zweitgenanntes durch Entwicklung eines Protokolls zur zellkulturbasierten Gewinnung von Proben für massenspektrometrische Analysen auf den Transportern assoziierte Bindungspartner erfolgen.

3 Material und Methoden

Geräte

Allgemeine Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Name, Hersteller (Ort)</i>
Analysenwaage	Sartorius (Göttingen)
	Kern-Kompakt-Laborwaage 440-49N, Kern & Sohn GmbH, Balingen
	Präzessionswaage Kern 770, Kern & Sohn GmbH, Balingen
Autoklav	Varioklav Dampfsterilisator H+P Labor- technik GmbH (Oberschleißheim)
Gefrierschrank (-80 °C)	HERAfreeze™, Heraeus, Thermo Scien- tific (Waltham, USA)
Gleichstromquelle	Power Pac 300, BioRad (München)
Handdispenser	Multipipette Plus, Eppendorf (Hamburg)
Heizblock	MBT250, Kleinfeld Labortechnik (Gehr- den)
pH-Meter	pH-Meter GC809, Schott (Mainz)
Pipetten	Pipetman®, Gilson (Middelton, USA)
	Eppendorf Research, Eppendorf (Ham- burg)
	Varipette® 4710, Eppendorf (Hamburg)
Pipettierhilfe, elektronische	Pipetboy acu, Integra IBS (Fernwald)
Wasseraufbereitungsanlage	Milli-Q-Plus, Millipore Waters (Bedford, USA)
Wasserbad	Certomat®WR, B. Braun (Melsungen)

Geräte für Nukleinsäureanalysen

<i>Gerät</i>	<i>Name, Hersteller (Ort)</i>
Elektrophoresekammer	Eigenbau, Werkstatt des Pharmakologischen Instituts (Mainz)
Photometer	Nanodrop, Thermo Scientific (Wilmington, USA) GeneQuant RNA/DNA Calculator, Pharmacia GE Healthcare (Uppsala, Schweden)
UV-Leuchttisch	Minitransilluminator, BioRad (München)

Geräte für die Bakterienkultur

<i>Gerät</i>	<i>Name, Hersteller (Ort)</i>
Brutschrank, mikrobiologischer	WTB, Binder (Tuttlingen)
Inkubationsschüttler	Incubation shaker Series, Innova [®] 40, New Brunswick Scientific (Eddison, USA)

Mikroskope und Lupen

<i>Gerät</i>	<i>Name, Hersteller (Ort)</i>
Binokular	MZ6, Leica (Solms)
Fluoreszenzmikroskop, inverses	Olympus IX-70, Olympus (Shinjuku, Japan)
Mikromanipulator	Manipulator M-152, Narishige (Tokyo, Japan)
Stereolupe	Olympus SZX, Olympus (Shinjuku, Japan)

Geräte für Western-Blot-Analysen

<i>Gerät</i>	<i>Name, Hersteller (Ort)</i>
Aufnahmegerät für Western-Blots	Molecular Imager® ChemiDoc™XRS, BioRad (München)
Blotkammer	Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell, BioRad (München)
Gelelektrophoresekammer (vertikal)	Perfect blue™ Doppelgelsystem Twin ExWS, Peq-Lab (Erlangen)
Mikrotiterplatten-Photometer	Sunrise, Tecan (Männerdorf, Schweiz)
Schüttler	Duomax 1030, Heidolph (Schwabach) Unimax 1010, Heidolph (Schwabach)

Geräte für HPLC-Analysen

<i>Gerät</i>	<i>Name, Hersteller (Ort)</i>
Fluoreszenzdetektor	RF 20A, Shimadzu (Kyoto, Japan)
HPLC-Anlage	Bischoff Analysetechnik und -geräte (Leonberg)

Geräte für Expressions- und Transportstudien an *X. laevis*-Oozyten

<i>Gerät</i>	<i>Name, Hersteller (Ort)</i>
Inkubationsschrank (18 °C)	UKS3602, Liebherr (Biberach)
Kaltlichtlampe	KL 1500 electronic, Schott (Mainz)
Kapillarziehmaschine	Micropipette Puller pB-7, Narishige (Tokyo, Japan)
Kühlschrank	KTel740, Liebherr (Biberach)
Nanoliter Injektor	Transjector 5246, Eppendorf (Hamburg)
Szintillationszähler	TriCarb 2810TR Liquid scintillation analyzer, PerkinElmer (Waltham USA)
Wasserbad	Frigomix®B, B. Braun (Melsungen)

Geräte für die Zellkultur

<i>Gerät</i>	<i>Name, Hersteller (Ort)</i>
Begasungsbrutschrank	Heracell 150 Kupferausführung, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Sterilbank	Mikrobiologische Sicherheitswerkbank UVF 6.18S, BDK (Sonnenbühl-Genkingen)
Tank mit Flüssigstickstoff zu Zellaufbewahrung	Cryo200, Thermo Scientific (Bonn)

Zentrifugen

<i>Gerät</i>	<i>Name, Hersteller (Ort)</i>
Hochgeschwindigkeitszentrifugen	J2-MC mit Rotor JA 13.1, Beckmann-Coulter (Krefeld) Avanti J-301 mit Rotor JLA 16.250, Beckmann-Coulter (Krefeld)
Tischzentrifugen	Centrifuge 5417C, 5415C + 5417R, Eppendorf (Hamburg) Biofuge 13, Heraeus instruments (Hanau) Megafuge X3R + 40R, Heraeus Sepatech (Osterode)

Kit-Systeme

<i>Kit-Systeme</i>	<i>Name, Hersteller (Ort)</i>
DNA-Aufreinigung	NucleoSpin® Gel & PCR Clean-up, Macherey-Nagel (Düren)
Plasmidpräparation, große Mengen	PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep Kit, Invitrogen (Carlsbad, USA)
Plasmidpräparation, kleine Mengen	QIAprep®Spin Miniprep Kit, QIAgen (Hilden)
Proteinbestimmung	Pierce™ BCA Protein Assay, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Transfektion	FuGENE® 6 Transfection Reagent, Promega (Fitchburg, USA)
	GeneJuice® Transfection-Reagent, Novagen®, Merck (Darmstadt)
Transkription, <i>in vitro</i>	mMessage mMachine® SP6, Applied Biosystems (Foster, USA)

Verbrauchsmaterialien

<i>Verbrauchsmaterialien</i>	<i>Name, Hersteller (Ort)</i>
Blottingpapier	MN 218B, Macherey-Nagel
Entwicklerkonzentrat	GBX, Carestream (Stuttgart)
Fixiererkonzentrat	G354, AGFA (Mortsel, Belgien)
Froschnahrung	Tetra Fauna [®] , Repto Min [®] , Tetra Fauna Gammarus [®]
Glaskapillaren	3,5 nl, Glass Capillaries for Nanoliter 2000, World precision Instruments, Inc. (WPI) (Sarasota, USA)
Kryoröhrchen	Nalgene [™] , Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Kunststoffröhrchen mit Schraubdeckel	15 ml, 50 ml, Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Latexhandschuhe	Unigloves Comfort, Unigloves (Troisdorf)
Lochplatten	6-, 12-, 24-, 96-well Costar [®] (Corning, USA)
Nitrozellulosemembran	BA83 Protran [®] , Whatman (Maidstone, USA)
Parafilm [®]	Parafilm [®] M, Roth (Karlsruhe)
Pasteurpipetten, Glas-	Pasteurpipetten, Brand (Wertheim)
Petrischale	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Pipetten, Einmal- (steril)	1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, Cellstar [®] , Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Pipettenspitzen	0,1 - 20 µl, 2 - 200 µl, 50 - 1000 µl für Gilson, Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)

<i>Verbrauchsmaterialien</i>	<i>Name, Hersteller (Ort)</i>
Pipettenspitzen zum Kapillaren-befüllen	Microloader, Eppendorf (Hamburg)
Reaktionsgefäße, safe-lock	0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml, Eppendorf (Hamburg)
Röntgenfilme	Amersham Hyperfilm™ ECL, GE Healthcare Limited (Chalfont St-Giles, GB)
Rundbodenkunststoffröhrchen	Polypropylene round bottom tube with cap, Falcon (New Jersey, USA)
Säulen, analytische für HPLC	C18-Säulen, x-select CSH, 3,5 µm, 4,6 x 150 mm), Waters® (Massachusetts, USA)
Sterilfilter	Puradisc FP 0,2 µm, Whatman (Maidstone, USA)
Szintillationsröhrchen	Minivials, Zinsser, Analytic GmbH (Frankfurt am Main)
Wundnahtmaterial, nicht-resorbierbar	Ethilon® 5-0 Polyamid 6, Johnson & Johnson (St. Stevens-Woluwe, belgien)
Wundnahtmaterial, resorbierbar	Monocryl® 5-0 Polglecapron 25, Johnson & Johnson (St. Stevens-Woluwe, belgien)
Zellkulturflaschen	25 cm ² , 75 cm ² , Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Zellkulturschalen	∅ 6,0 cm, 9,4 cm, 14,5 cm, Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)

Chemikalien

<i>Substanz</i>	<i>Hersteller (Ort)</i>
2-Mercaptoethanol 99%	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
2-Propanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
3-Aminobenzoessäureethylester	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
5-Amino-3-(4-morpholinyl)-1,2,3-oxadiazolium chloride (Sin-1)	Cayman Chemical (Ann Arbor, USA)
Acetonitril (Gradienten grade)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) 30%	AppliChem (Darmstadt)
AgarAgar	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Agarose NEEO Ultra Qualität	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Aminopersulfat (APS)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Antifoam A (Antifoam Y-30)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Antikörper goat-anti-rabbit IgG H&L chain specific peroxidase conjugate	Calbiochem®, Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
BSA (bovines Serum Albumin)	New England BioLabs (Frankfurt a.M.)
Calciumchlorid-Hexahydrat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Chloroquin diphosphate salt	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
D-(+)-Glukose-Monohydrat, ≥99,5%	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
DNA-Größen-Marker (GeneRuler™ 1 kb DNA-ladder)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

<i>Substanz</i>	<i>Hersteller (Ort)</i>
Dulbecco's Phosphate buffered Saline (DPBS)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
di-Natriumtetraborat	Merck KGaA (Darmstadt)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) + GlutaMax™-I	Gibco, Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, USA)
EDTA-Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Eisessig	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Ethanol 70% vergällt	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Ethanol 99,9%	AppliChem (Darmstadt)
Ethidiumbromid 0,07%	AppliChem (Darmstadt)
FBS (fötales bovines Serum)	F-9665, Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Geneticin (G418)	Biochrom GmbH (Berlin)
Gentamycin	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Glutathion	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Harnstoff	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Hefeextrakt (Yeast extract, pulver)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Hepes Pufferan® ≥99,5%	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Gibco, Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, USA)
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Kaliumpermanganat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Kanamycin-sulfat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Kollagenase A	Roche (Grenzach-Wyhlen)
L-[³ H]Arginin (spez. Aktivität 10 µCi/ml)	ICN Biomedicals (Eschwege)

<i>Substanz</i>	<i>Hersteller (Ort)</i>
Ladepuffer, glycerolhaltig (6x DNA-Loading dye)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
L-Arginin	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Leibowitz L-15-medium with L-Glutamin	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Lithiumchlorid	Merck KGaA (Darmstadt)
Lysozyme	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Magermilchpulver blotting grade	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Methanol Rotipuran® ≥99,9% p. a.	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Natriumacetat	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Natrium-Deoxycholat	VWR (West Chester, USA)
Natriumdodecylsulfate ultra pure ≥99%	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
N-Ethylmaleimide, crystalline ≥98%	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
N-Glykosidase F (250 U/500 µl)	Roche Diagnostics (Mannheim)
OPA (ortho-Phthaldialdehyd)	Merck KGaA (Darmstadt)
Pepton aus Casein, trypt. Verdaut	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Ponceau S	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Proteaseninhibitorengemisch complete mini	Roche (Grenzach-Wyhlen)
Proteinmarker (Page ruler™ Prestained protein marker)	Fermentas (St. Leon-Rot)
Roti®-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol pH 7,5 - 8,0	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
S-Nitro-N-acetyl-DL-Penicillamine	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)

<i>Substanz</i>	<i>Hersteller (Ort)</i>
S-Nitrosoglutathion (GSNO)	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas)
Spermine NONOate (SPENO)	Cayman Chemical (Ann Arbor, USA)
Szintillationsflüssigkeit, IrgaSafe Plus	Perkin-Elmer (Waltham, USA)
TE-Puffer	Invitrogen (Carlsbad, USA)
TRIS Base (Trishydroxymethylamino-methan) Pufferan® ≥99% p. a.	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Triton-x-100	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Trypanblau	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Trypsin-EDTA-Solution	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Tween®-20	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Western Lightning Plus ECL	Perkin-Elmer (Waltham, USA)
Zeocin™ Lösung, steril 500 mg/5 ml	InvivoGen (San Diego, USA)
Ziegenserum (Goat Serum steril)	BIOZOL (München)

Enzyme und zugehörige Puffer

Enzyme

<i>Enzym</i>	<i>Inkubations- temperatur</i>	<i>Puffer</i>	<i>Hersteller (Ort)</i>
<i>AfeI</i>	37 °C	10x CutSmart™ -Buffer	New England BioLabs (Frankfurt a.M.)
<i>BamHI</i>	37 °C	NEB 3.1	New England BioLabs (Frankfurt a.M.)
<i>BamHI</i> -HF	37 °C	10x CutSmart™ -Buffer	New England BioLabs (Frankfurt a.M.)
<i>BplI</i>	37 °C	10x CutSmart™ -Buffer	New England BioLabs (Frankfurt a.M.)
EcoRI	37 °C	1x NEBuffer™ EcoRI	New England BioLabs (Frankfurt a.M.)
<i>HindIII</i> -HF	37 °C	10x CutSmart™ -Buffer	New England BioLabs (Frankfurt a.M.)
hitzestabile alkali- sche Phosphatase (antarctic Phospha- tase)	37 °C	Phosphatase- Buffer	New England BioLabs (Frankfurt a.M.)
Klenow-Fragment (3' → 5' - Exonukle- ase)	RT	Klenow Puffer	New England BioLabs (Frankfurt a.M.)
<i>KpnI</i> -HF	37 °C	10x CutSmart™ -Buffer	New England BioLabs (Frankfurt a.M.)
<i>NotI</i> -HF	37 °C	10x CutSmart™ -Buffer	New England BioLabs (Frankfurt a.M.)
<i>SmaI</i>	37 °C	10x CutSmart™ -Buffer	New England BioLabs (Frankfurt a.M.)

<i>Enzym</i>	<i>Inkubations- temperatur</i>	<i>Puffer</i>	<i>Hersteller (Ort)</i>
T4-Ligase	16 °C	T4 Ligase Reaktionspuffer (Fermentas)	New England BioLabs (Frankfurt a.M.)
XbaI	37 °C	10x CutSmart™-Buffer	New England BioLabs (Frankfurt a.M.)
XhoI	37 °C	10x CutSmart™-Buffer	New England BioLabs (Frankfurt a.M.)

Enzympuffer

<i>Enzympuffer</i>	<i>Hersteller (Ort)</i>
Antarctic-Phosphatase-Puffer	New England BioLabs (Frankfurt a.M.)
CutSmart™-Buffer	New England BioLabs (Frankfurt a.M.)
Klenow-Puffer	Fermentas (St. Leon-Rot)
NEB 3.1	New England BioLabs (Frankfurt a.M.)
NEBuffer™ EcoRI	New England BioLabs (Frankfurt a.M.)
T4 Ligase Reaktionspuffer	Fermentas (St. Leon-Rot)

3.1 Molekularbiologische Methoden

Vorabgehend sei vermerkt, dass sich die Beschreibung der Methoden hauptsächlich auf das Vektorkonstrukt „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“ konzentriert. Ausgenommen dabei ist das Kapitel 3.1.8, da die dort beschriebene Methodik nur bei Klonierungsarbeiten für das Konstrukt „hCAT-1-BAP-N1“ Verwendung fand.

3.1.1 verwendete Puffer und Lösungen

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>	
Hefeextrakt 0.5 %	5 g	Die Lösung wird mit 5 M <i>NaOH</i> auf einen pH von 7,0 eingestellt, mit 1 L Aqua bidest. aufgefüllt und autoklaviert.
Natriumchlorid 1 %	10 g	
Pepton aus Casein 1 %	10 g	

Tabelle 3: Zusammensetzung *Lysogeny Broth* (LB)-Medium nach *Giuseppe Bertani*, 1951 zur Kultivierung von Bakterien.

Zur Selektion mit Zeocin (InvivoGen, San Diego, USA) ist die Verwendung eines LB-Mediums mit geringerem Salzgehalt notwendig, da höhere Salzkonzentrationen die Wirksamkeit von Zeocin negativ beeinflussen können (*Produktinformationsblatt „Zeocin™ Selection Reagent“*, *Thermo Scientific*). Hierzu wird die halbe Menge an Natriumchlorid eingesetzt und die Lösung mit *NaOH* auf einen pH von 7,5 eingestellt.

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>	
LB-Medium	400 ml	Zugabe des Selektionsantibiotikums zu dem LB-Medium aus Tabelle 3 erst kurz vor Gebrauch.
Selektionsantibiotikum (C _{end.} = 25 - 50 µg/ml)		

Tabelle 4: Zusammensetzung LB-Selektionsmedium.

Die Menge des eingesetzten Selektionsantibiotikums ist abhängig von dessen gewünschten Endkonzentration. Die gewünschte Endkonzentration lag in den vorliegenden Versuchen zwischen 25 - 50 µg/ml.

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>	
LB-Medium	400 ml	LB-Medium mit Agar-Agar vorsichtig erhitzen, nach Abkühlen auf unter 60 °C mit Selektionsantibiotikum versetzen, in 10 cm ² -Petrischalen ausgießen und erstarren lassen.
Agar-Agar	6 g	
Selektionsantibiotikum (C _{end.} = 25 - 50 µg/ml)		

Tabelle 5: Zusammensetzung LB-Selektionsplatten.

Die Menge des eingesetzten Selektionsantibiotikums ist abhängig von dessen gewünschten Endkonzentration. Die gewünschte Endkonzentration lag in den vorliegenden Versuchen zwischen 25 - 50 µg/ml.

Das Selektionsantibiotikum Zeocin ist lichtempfindlich, sodass mit Zeocin versetztes LB-Medium stets vor Licht geschützt gehandhabt werden muss.

Zeocin ist in Lösung bei 4 °C maximal zwei Wochen stabil (*Produktinformationsblatt „Zeocin™ Selection Reagent“, Thermo Scientific*). Es empfiehlt sich seine Zugabe erst kurz vor Gebrauch.

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>	
Hefeextrakt 0,5%	5 g	Die Lösung wird mit 5 M NaOH auf einen pH von 7,0 eingestellt, mit 1 L Aqua bidest. aufgefüllt und autoklaviert.
Natriumchlorid 10 mM	0,5 g	
Pepton aus Casein 2%	20 g	
Kaliumchlorid 2,5 M	2,5 ml	
Magnesiumchlorid (steril) 1 mM	10 ml	Nach dem Autoklavieren MgCl ₂ dazugeben und in Aliquots à 2 ml abfüllen.

Tabelle 6: Zusammensetzung SOB-Medium.

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>	
SOB-Medium	1 L	40 µl 1 M Glukose-Lösung zu je 2 ml-Aliquots dazugeben.
Glukose-Lösung 1 M (steril)	40 µl	

Tabelle 7: Zusammensetzung SOC-Medium.

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>	
TRIS	242 g	Ad 1 L Aqua bidest. und autoklavieren.
Eisessig	57,1 ml	
EDTA (0,25 M; pH 8)	200 ml	

Tabelle 8: Zusammensetzung TRIS-Acetat-EDTA-50x Puffer.

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>	
TAE-50x-Puffer	20 ml	Ad 1 L Aqua bidest.

Tabelle 9: Zusammensetzung TRIS-Acetat-EDTA-1x Puffer.

3.1.2 Auftrennung von Nukleinsäuren durch Gelelektrophorese

Die Methodik der Gelelektrophorese eignet sich zur Auftrennung von geladenen Biomolekülen an Hand ihrer Ladung und Größe.

Nukleinsäuren zeigen durch ihre geladenen Phosphatreste unter pH-neutralen Bedingungen eine negative Eigenladung. Bringt man Nukleinsäuren in ein elektrisches Feld wandern sie entsprechend ihrer negativen Ladung zur positiv geladenen Anode hin. Wird dieses elektrische Feld trägegebunden, also an ein Gel angelegt, fungiert das Gel als Sieb und trennt die Moleküle zusätzlich nach ihrer Masse bzw. Molekülgröße auf.

Die aufgetrennten Nukleinsäurefragmente können optional präparativ aus dem Gel isoliert und für weitere Arbeitsschritte aufgereinigt werden.

Agarosegele eignen sich hervorragend als Trennmittel, man kann auf ihnen aufgetragene Nukleinsäurestücke entsprechend ihrer Doppelstranglänge separieren.

Größere Anionen bewegen sich langsamer durch das elektrische Feld als Kleinere. Die Längen der Nukleinsäurestücke lassen sich durch Mitführen von Größenstandards ablesen, indem ihre Laufstrecke zu dem Logarithmus ihrer Fragmentlänge in Relation gesetzt wird.

Für die vorliegenden Versuche wurden 0,7-1 %-ige Agarosegele aus TAE-einfach-Puffer, Agarose (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) unter Zugabe von Ethidiumbromid (AppliChem, Darmstadt) verwendet.

Agarose geht unter Aufkochen mit der Pufferlösung in Lösung und geliert beim Abkühlen wieder.

Das Ethidiumbromid dient der Anfärbung und damit optischen Darstellung der Nukleinsäuren; es interkaliert zwischen den Basenpaaren der Nukleinsäuren, sodass diese durch Anregung mit UV-Licht in Form von rötlich-orange-fluoreszierenden Banden sichtbar gemacht werden können. Die Fähigkeit des Interkalierens zwischen Basenpaaren macht Ethidiumbromid zu einem Mutagen; es ist ein sorgsamer Umgang zum Eigen- und Fremdschutz unerlässlich.

Agarosegele können DNA-Mengen in der Größenordnung ab 2-5 ng darstellen (107). Den Nukleinsäuren wird vor Auftragen auf das Agarosegel ein glycerolhaltiger Lade-puffer (6x DNA-loading dye, Thermo Scientific, Waltham, USA) zugefügt, welcher die Nukleinsäuren beschweren und im Gel bodenwärts halten soll.

Die optische Darstellung der Nukleinsäurebanden erfolgt durch Fluoreszenzemissionen des zugesetzten Ethidiumbromids auf einem UV-Licht-emittierenden Transilluminator (Minitransluminator, BioRad, München).

Ein mitgeführter kommerzieller Größenstandard (GeneRuler™ 1 kb DNA-ladder, Thermo Scientific, Waltham, USA) ermöglicht es, Rückschlüsse auf die Längen der Nukleinsäurefragmente zu ziehen.

Sollten DNA-Fragmente nach erfolgter Gelelektrophorese weiterverarbeitet werden, wurden die entsprechenden Gelabschnitte aus dem Gel präpariert und die Nukleinsäuren unter Verwendung des NucleoSpin® Gel & PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers eluiert. Dabei wurde die Isolation der Nukleinsäuren durch reversible Bindung an Silicamembranen ermöglicht.

3.1.3 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration mittels OD-Messung

Die Konzentrationen an gewonnener DNA und RNA in einer Nukleinsäurelösung lassen sich über die Technik der Spektralphotometrie bestimmen. Dazu wird in einer Quarzküvette die Absorption (= Optische Dichte = OD) von Licht in der zu untersuchenden Lösung bestimmt. Die Absorption von Nukleinsäuren ist bei Licht mit einer Wellenlänge von 260 nm maximal, sodass die Konzentrationsbestimmung bei dieser Wellenlänge erfolgt.

Vor Beginn der Konzentrationsbestimmung muss das Photometer auf das jeweilige Lösungsmittel (in diesem Falle Wasser) geeicht werden.

Die Messungen der zugrundeliegenden Arbeit erfolgten am Photometer GeneQuant RNA/DNA Calculator, Pharmacia GE Healthcare (Uppsala, Schweden) und am Nanodrop (Thermo Scientific, Wilmington, USA).

Bei der Verwendung von Ersterem musste die zu untersuchende Probe zuvor im Verhältnis 1 : 100 mit dem Lösungsmittel (hier: Wasser) verdünnt werden. Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde unter Berücksichtigung eines Multiplikationsfaktors (für RNA 40 µg/ml, für doppelsträngige DNA 50 µg/ml, jeweils pro einer OD-Einheit bei Verwendung einer Küvette von 1 cm²) und eines Verdünnungsfaktors wie folgt berechnet:

$$c \text{ (}\mu\text{g}/\mu\text{l)} = \frac{OD_{260\text{nm}} \times \text{Multiplikationsfaktor} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{1000}$$

Neben der Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren, lassen sich spektralphotometrisch zusätzlich Aussagen über die Qualität der vorliegenden Nukleinsäurelösung treffen. Hierfür wird der OD-Wert bei 280 nm betrachtet, welcher ein Maß für die Absorption möglicherweise enthaltener Proteine darstellt. Er ist in Relation zu der maximalen OD der Nukleinsäuren bei 260 nm zu setzen; es ist ein Quotient $OD_{260 \text{ nm}} / OD_{280 \text{ nm}}$ von über 1,8 im Falle von DNA und von über 2,0 für RNA anzustreben. Niedrigere Quotienten sprechen für eine Verunreinigung der Nukleinsäurelösung.

3.1.4 Extraktion von Nukleinsäuren mittels Phenol-Chloroform-Fällung von Proteinen

Die Phenol-Chloroform-Fällung von Proteinen dient der Aufreinigung von Nukleinsäure-Präparationen durch Ausfällung enthaltener Proteine.

Das Chloroform denaturiert die eventuell vorhandenen Proteine in Aminosäureketten; das Phenol reichert die dissoziierten Proteine durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken und hydrophoben Wechselwirkungen zwischen polarer und unpolare Phase an und erleichtert darüber die Separation dieser. Die Nukleinsäuren¹ sind im Gegensatz zu den Proteinen polar und finden sich in der wässrigen Phase wieder; Fette gehen in die unpolare Phase über.

Der Zusatz von Isoamylalkohol soll ein Schäumen und die Ausbildung einer großen Interphase während der Extraktion verhindern und damit ein leichteres Pipettieren ermöglichen.

Zur Aufreinigung von Nukleinsäuren werden üblicherweise Gemische aus 25 Teilen Phenol, 24 Teilen Chloroform und einem Teil Isoamylalkohol verwendet; diese sind industriell mit einem TRIS-Puffer auf einen pH-Wert von 7,5-8,0 äquilibriert.

Die Nukleinsäure-Lösung wurde in einem Verhältnis von 1 : 1 mit TRIS-gesättigtem Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) gemischt und für ca. zehn Minuten bei Raumtemperatur mit einer Tischzentrifuge mit maximaler Geschwindigkeit (14.000 rpm) zentrifugiert. Es erfolgte die Abnahme der wässrigen Oberphase mit den enthaltenen Nukleinsäuren in ein weiteres Reaktionsgefäß und ein erneutes Zugeben der gleichen Menge an TRIS-gesättigtem Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol mit anschließender Zentrifugation unter gleichen Bedingungen. Die wässrige Phase wurde abermals vorsichtig abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

¹ Für DNA gilt dies nur in Anwesenheit von anionischen Salzen und bei einem pH zwischen 7,8 bis 8,0.

Es schloss sich eine Fällung der Nukleinsäuren durch Alkohol unter Hochsalzbedingungen mit 4 M *NaCl*-Lösung an. Dazu wurde die DNA-Lösung mit dem 4 M Natriumchlorid auf eine Endkonzentration von 0,2 M *NaCl* verdünnt und mit zwei Volumeneinheiten Ethanol absolut (unvergällt) zusammengegeben.

Es fand eine Fällungsreaktion über Nacht im Eisfach bei -20 °C statt.

Am nächsten Tag erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 14.000 rpm über 30 Minuten, mit folgendem Dekantieren und erneutem Waschen des Präzipitats mit 70%-igem Ethanol eiskalt.

Das entstandene Nukleinsäure-Pellet wurde luftgetrocknet und in TRIS-EDTA-Puffer aufgenommen.

3.1.5 Linearisierung von Plasmiden zur *in-vitro* Transkription in cRNA

Die vorliegenden Plasmiden mussten vor der *in-vitro* Transkription in cRNA linearisiert werden, da es sonst zu einem replikativ-zirkulärem Ablesen der ringförmigen DNA und folglich zu einer repetitiven, ringförmigen Transkription der Vektorsequenzen gekommen wäre.

Für alle Linearisierungen wurde ein Linearisierungsansatz nach folgendem Schema angefertigt und anschließend für zwei bis drei Stunden bei 37 °C im Wasserbad inkubiert;

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>
Plasmid-DNA	15 µg Plasmid in x µl Aqua bidest.
Enzym (20.000 Units/ml)	2 µl
Puffer	10 µl
Aqua bidest.	ad 100 µl

Tabelle 10: Schema eines Linearisierungsansatzes.

Zur Expression des hCAT-2A-118 wurde das Restriktionsenzym „*Bam*HI“ (New England BioLabs, Frankfurt a.M.) und der Puffer „NEB 3.1“ (New England BioLabs, Frankfurt a.M.); für den hCAT-1-AB_c das Restriktionsenzym „*Eco*RI“ (New England BioLabs,

Frankfurt a.M.) und der Puffer „NEBuffer™ EcoRI“ (New England BioLabs, Frankfurt a.M.) verwendet.

Die linearisierte DNA wurde anschließend durch eine Phenol-Chloroform-Fällung kontaminierender Proteine aufgereinigt, gefällt und anschließend in TRIS-EDTA-Puffer aufgenommen.

Zur Überprüfung der Restriktionsvorgänge diente eine Agarosegelelektrophorese.

Die DNA-Konzentrationsbestimmung des linearisierten Fragments erfolgte abschließend durch eine OD-Messung.

3.1.6 *In-vitro* Transkription von DNA- in cRNA-Sequenzen

RNA ist sehr anfällig für spontane oder enzymatische Hydrolyse; das Einhalten einer möglichst RNase-freien Umgebung ist beim Arbeiten mit RNA daher unerlässlich. RNasen kommen ubiquitär vor und werden zum Beispiel mit dem Schweiß sezerniert. Das Tragen von Handschuhen während der Arbeit mit RNA ist daher essenziell.

Die *in-vitro* Synthese von cRNA aus linearisierter DNA wurde durch ein Ambion mMessege mMachine® SP6-Promotor-Kit (Forster, USA) vermittelt. Dieses Kit enthält ein CAP-Analogon ($m^7G(5')ppp(5')G$), welches die CAP-Sequenz der eukaryotischen mRNA nachstellt und die Translation der cRNA in den Oozyten gewährleisten soll. Das Reaktionskit enthält neben dem CAP-Analogon alle benötigten Ribonukleotide, Puffer, Reagenzien und eine (SP6-)Polymerase .

Die enthaltene SP6-Polymerase stellt eine Bakteriophagen-Polymerase dar und ist besonders anfällig gegenüber der inhibierenden Wirkung der in der Phenol-Chloroform-Fällung eingesetzten Fällungssalze. Ein sorgsames Einhalten der verschiedenen Waschschrte nach der Fällungsreaktion ist hier besonders wichtig.

Im ersten Schritt wurden 20 µl eines Transkriptionsansatzes nach folgendem Schema pipettiert;

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>
linearisierte DNA	x μ l (\cong 1 μ g)
2x NTP/CAP	10 μ l
10x Reaktionspuffer	2 μ l
Enzym-Mix (enthält RNA-Polymerase und RNase-Inhibitor)	2 μ l
nukleasefreies Wasser	ad 20 μ l

Tabelle 11: Schema eines Transkriptionsansatzes für die in-vitro Transkription.

2x NTP/CAP stellt eine neutralisierte, gepufferte Lösung mit enthaltenem CAP-Analogon [8 mM] und Nukleosidtriphosphaten (NTP) (ATP [10 mM], CTP [10 mM], UTP [10 mM] und GTP [2 mM]) dar.

Es folgte eine Inkubation des Ansatzes für zwei Stunden bei 37 °C. Im Anschluss daran wurden die DNA-Reste durch das Zugabe von 1 μ l (2 U/ μ l) TURBO DNase während einer 15-minütigen Inkubation bei 37 °C abgebaut.

Die übrig gebliebene cRNA wurde durch das Zugabe von je 30 μ l RNase-freiem Wasser und 30 μ l einer Lithiumchlorid-Lösung (7,5M) über Nacht bei -20 °C zur Fällung gebracht.

Am nächsten Tag wurde die cRNA mit 14.000 rpm bei 4 °C über 20 Minuten zentrifugiert. Es folgte der Zusatz von 500 μ l 70%-igem Ethanol. Eine weitere Zentrifugation unter oben beschriebenen Bedingungen schloss sich an. Der Überstand wurde dekantiert. Die Zentrifugationsschritte des Tages wurden unter Zugabe von 1 ml Ethanol wiederholt und das gewonnene cRNA-Pellet vorsichtig getrocknet.

Anschließend wurde das Pellet in 10 μ l RNase-freiem Wasser aufgenommen.

Es schloss sich eine OD-Messung, sowie eine Gelelektrophorese im Agarosegel zur Qualitätsbestimmung an.

Die RNA-Sequenz wurde bis zu ihrer Verwendung bei -70 °C im Tiefkühlschrank gelagert.

3.1.7 gezielter Restriktionsverdau von Nukleinsäuresträngen für folgende Klonierungsarbeiten

DNA lässt sich mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen spezifisch an Erkennungssequenzen weniger Länge schneiden. Abhängig von der Art der verwendeten Restriktionsenzyme entstehen DNA-Stücke mit glatten Enden, bei denen beide DNA-Stränge auf selber Länge enden oder DNA-Stränge mit Überhang, bei denen die komplementären Stränge an unterschiedlichen Stellen geschnitten und somit Überhänge von meistens zwei bis fünf Basen generiert werden. Die Art dieser Überhänge lässt sich entsprechend des einzelsträngigen DNA-Stückes nach 5'- und 3'-Überhängen einteilen.

Soll ein definierter DNA-Abschnitt zu Expressionszwecken in ein Plasmid kloniert werden, ist es wichtig, diesen im Leserahmen und in der korrekten Leserichtung in einen Vektor zu ligieren, um später die Expression des Zielproteins zu erreichen.

Dies gelingt am sichersten durch Schneiden der DNA mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen, welche Restriktionsstellen mit zwei verschiedenen Überhängen generieren, die mit den Enden des Zieloligonukleotids (die ebenfalls durch Restriktionschnitte mit denselben Restriktionsenzymen generiert wurden) kompatibel sind.

Das in der vorliegenden Arbeit hergestellte „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“-Konstrukt konnte nicht über DNA-Fragmente mit Überhang kloniert werden, da sich keine passenden Restriktionsstellen zwischen Insertion und Vektor finden ließen. In Folge dessen erfolgte die Klonierung des hCAT-1 in den Vektor „C-FTA/hBirA-EGFP“ über glatte Enden. Die codierende Sequenz für den hCAT-1 wurde ohne Stopp-Kodon aus dem Plasmid „hCAT-1-EGFP-N1 (22.09.09)“ unter Verwendung der Restriktionsendonukleasen „*AfeI*“ (New England BioLabs, Frankfurt a.M.) und „*SmaI*“ (New England BioLabs, Frankfurt a.M.) und unter Zugabe des 10xPuffers „NEB CutSmart™“ (New England BioLabs, Frankfurt a.M.) mit glatten Enden gewonnen.

Das Plasmid „C-FTA/hBirA-EGFP“ wurde zunächst durch die Restriktionsenzyme „*NotI*-HF“ (New England BioLabs, Frankfurt a.M.) und „*XhoI*“ (New England BioLabs, Frankfurt a.M.) unter Zugabe des Puffers „10xNEB CutSmart™“ (New England BioLabs, Frankfurt a.M.) geschnitten, sodass ein Fragment von 31 bp entfiel.

Zwischen den entstandenen Schnittstellen wurde später das für den hCAT1-codierende Oligonukleotid ligiert.

Beide Restriktionsenzyme ergaben für den Vektor Enden mit Überhang, welche vor der Ligation durch einen Klenow-Ansatz geglättet werden mussten.

Sofern beide Restriktionsenzyme gleiche Anforderungen an Inkubationstemperatur, Puffer und pH-Milieu stellen, können beide Endonukleasen in einem Restriktionsansatz simultan zugegeben werden. Im entgegengesetzten Fall ist ein sukzessives Schneiden der DNA von Nöten. Bei einer Temperaturinkompatibilität der eingesetzten Restriktionsendonukleasen wird das zuerst zugegebene Enzym vor Zugabe des zweiten hitzeinaktiviert, sofern dies möglich ist. Stellen beide Enzyme verschiedene Ansprüche an den benötigten Puffer, muss die DNA nach Zugabe des ersten Enzyms mittels NukleoSpin Extraction Kits® (Machery Nagel, Düren) vor Zugabe des zweiten Enzyms und dessen Puffers aufgereinigt und abermals inkubiert werden.

Für alle Restriktionen wurde ein Restriktionsansatz nach folgendem Schema angesetzt und anschließend für zwei bis drei Stunden bei 37 °C im Wasserbad inkubiert;

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>
Plasmid-DNA	1 µg
10x Reaktionspuffer	5 µl
Restriktionsenzym I (20.000 Units/ml)	1 µl
Restriktionsenzym II (20.000 Units/ml)	1 µl
nukleasefreies Wasser	ad 50 µl

Tabelle 12: Schema eines Restriktionsansatzes.

Nach der Inkubation des Restriktionsansatzes konnte die Restriktion durch eine Agarosegelelektrophorese und dem Nachweis entsprechend langer DNA-Fragmente überprüft werden.

Mittels Skalpell wurde die gewünschte DNA-Bande unter UV-Licht präparativ aus dem Gel entnommen und aus diesem unter Verwendung des NucleoSpin® Gel & PCR Clean-up (Machery-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers gelöst.

Eine Konzentrationsbestimmung des DNA-Gehaltes der so gewonnenen Nukleinsäurelösung erfolgte über eine OD-Messung.

3.1.8 Hybridisierung komplementärer DNA-Einzelstränge zu einem Doppelstrangnukleotid

Damit ein Insertionsfragment (hier: codierend für das BAP-Protein) zwischen die Restriktionsstellen eines Vektors kloniert werden kann, müssen sich die komplementären Einzelstränge (hier: „HC1-BAP-1 fwd.“, Eurofins Genomics, Mainz) in und entgegen (hier: „HC1-BAP-2“; Eurofins Genomics, Mainz) der Leserichtung zu einem komplementären Doppelstrang-Nukleotid (hier: „HC1-BAP“) anlagern.

Die hier verwendeten Einzelstränge für die BAP-codierende Sequenz (Quelle: *Tirat et al., 2006, (138)*) mit passenden Restriktionsstellen für „*Bam*HI“ und „*Not*I“ wurde mittels ApE-Programms zusammengestellt und die entsprechenden Oligonukleotide durch die Firma StarSEQ (Mainz) generiert.

Es wurde ein Hybridisierungsansatz, angelehnt an *Wiederschain, et al. (108)*, nach folgendem Schema angesetzt;

Reagenz	Menge
Oligonukleotid in sense-Richtung (c=0.1 nmol/μl)	11,25 μl
Oligonukleotid in antisense-Richtung (c=0.1 nmol/μl)	11,25 μl
10x Annealing-buffer *	2,5 μl

Tabelle 13: Schema eines Annealing-Ansatzes.

Reagenz	Menge
Natriumchlorid	1 M
TRIS-HCl, pH 7,4	100 mM

Tabelle 14: Zusammensetzung * 10x Annealing-Buffer.

Das Reaktionsgefäß mit Hybridisierungsansatz wurde in einem mit kochendem Wasser ($\geq 95^\circ\text{C}$) gefüllten Becherglas langsam bei Raumtemperatur auf 30°C runtergekühlt.

Je 1 μl dieser Lösung wurde 1 : 400 mit einem 0,5x Annealing-Buffer verdünnt und anschließend bis zur Weiterverwendung bei -20°C aufbewahrt.

3.1.9 Ligation von Insertionsfragmenten in Vektoren

Das zu exprimierende Insertionsfragment (hier: codierend für den hCAT-1) wird über kovalente Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphat- und der 3'-Hydroxylgruppe im Bereich der Restriktionsstellen in den Vektor (hier „C-FTA/hBirA-EGFP“) kloniert.

Bei der Restriktion des Vektors „C-FTA/hBirA-EGFP“ waren Enden mit Überhang entstanden, welche vor Ligation mit der Insertion „hCAT-1“ durch das Klenow-Fragment einer DNA-Polymerase I geglättet werden mussten.

Das Klenow-Fragment stellt die große Untereinheit der DNA-Polymerase I nach Spaltung mit Subtilisin dar. Es besitzt neben einer 5' → 3'-Polymeraseaktivität auch eine 3' → 5'-Exonuklease-, aber keine 5' → 3'-Exonukleaseaktivität mehr, sodass die entstandenen überhängenden 5'-Enden durch dieses aufgefüllt, aber nicht entfernt werden können (109).

Die Klenow-Reaktion erfolgte nach folgendem Ansatz und wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert;

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>
DNA	30 µl (≙ 2 µg)
10x Klenow-Puffer	10 µl
Klenow-Fragment (c = 10 U/µl)	2,0 µl
dNTPS (10 mM)	2,0 µl
nukleasefreies Wasser	ad 100 µl

Tabelle 15: Schema eines Klenow-Ansatzes.

Nach erfolgreicher Klenow-Reaktion empfiehlt es sich, eine alkalische-Phosphatase-Behandlung des geschnittenen Vektors anzuschließen, um eine möglichen Selbstligation des Vektors zu verhindern.

An den 5'-Enden der DNA bleiben für eine Ligation notwendige Phosphatreste zurück; entfernt man diese, minimiert sich das Risiko einer Selbstligation.

Die Phosphatreste für die anschließende Klonierung der Insertion werden von diesem selbst zur Verfügung gestellt.

Es wurden ca. 1 µl Antarctic Phosphatase (New England BioLabs, Frankfurt a.M.) und ca. $\frac{1}{10}$ an Reaktionsvolumen mit Phosphatase-Puffer (New England BioLabs, Frankfurt a.M.) zu dem Vektor zu pipettiert, alles für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und die Reaktion anschließend durch eine zweiminütige Inkubation bei 80 °C abgestoppt.

Die Ligation zwischen Insertion und Vektor wird enzymatisch unter ATP-Verbrauch durch eine T4-DNA-Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot) vermittelt.

T4-Ligasen sind aus *E. coli* -Bakterien gewonnene Enzyme, welche zuvor mit einem T4-Bakteriophagen infiziert wurden.

Für eine hohe Rate erfolgreicher Insertionen bei kurzen Insertionsfragmenten in größere Vektoren sollte das Molekül-Verhältnis zwischen Vektor und Insertionsfragment bei 1 : 3 liegen (110).

Für eine Ligation wurden folgende Ligationsansätze verwendet;

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>	
	<i>n. Wiederschain</i>	<i>n. J.-P. Boissel</i>
Vektor (Plasmid; 10 - 20 ng)	1 µl	2 µl
Insertionsfragment (Oligonukleotidverdünnung; 1:400 in 0,5x Annealing Buffer – s. Kapitel 3.1.8) bzw. 0,5x Annealing Buffer als Negativkontrolle	1 µl	6 µl
10x Ligationspuffer*	1 µl	1 µl
T4-DNA Ligase	1 µ	1 µl
Aqua bidest.	6 µl	-

Tabelle 16: Schemata für Ligationsansätze.

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>
TRIS-HCL; pH 7,6	0,5 M
Magnesiumchlorid	100 mM
ATP	1 mM
Dithiothreitol	100 mM
BSA	500 µg/ml

Tabelle 17: Zusammensetzung *10x Ligationspuffer.

Sowohl der Ligationansatz nach *Wiederschein* als auch der nach *J.-P. Boissel* ergaben erfolgreiche Ligationen und können als gleichwertig betrachtet werden.

Es wurde stets ein Kontrollansatz mit 0,5x Annealing-Buffer ohne Zugabe des Insertionsfragmentes mitgeführt, um eine Kontrolle für folgende Restriktionsanalysen zu haben.

Alle Ansätze wurden entweder über Nacht bei 18 °C im Inkubationsschrank oder bei Raumtemperatur für zwei bis drei Stunden inkubiert.

Bis zur Transformation in kompetente *E. coli*-Stämme können die klonierten Plasmide auch bei -20 °C im Gefrierfach aufbewahrt werden.

3.1.10 Transformation kompetenter *Escherichia coli* (*E. coli*)

Zur Vervielfältigung des für das Zielprotein codierenden DNA-Abschnitts in Vektoren kann dieser in Bakterien transformiert und in ihnen repliziert werden.

Bei einer Generationszeit von 20 Minuten eignen sich *Escherichia coli*-Bakterien hervorragend als Vektorreplikationssystem.

E. coli werden in (*low*) LB-Medien unter Zugabe entsprechender Selektionsantibiotika (hier: Kanamycin und Zeocin) kultiviert.

Eine Aufnahme des gewünschten Plasmides in die Bakterienzelle kann durch verschiedene Methoden erreicht werden.

Wir verwendeten die Methode der Hitzeschocktransformation, bei der durch einen kurzanhaltenden Temperatursprung die Zellmembran der Bakterien transient für Plasmide durchgängig gemacht wurde.

Dazu wurden zunächst je 50 µl der zuvor bei -70 °C aufbewahrten, nun aufgetauten, kompetenten Bakterien-Stämme (hier: *E. coli*-Stamm „Top10“) und das gewünschte Plasmid (hier: „HC1-pEGFP-N1“ und „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“) in einem Rundbodenkunststoffröhrchen (Falkon, New Jersey, USA) zusammengebracht und anschließend für 30 Minuten auf Eis gestellt, sodass sich die Plasmide an die Bakterienmembran anheften konnten.

Es wurde stets ein Ansatz mit Plasmid ohne Insertionsfragment, sowie ein Ansatz mit Wasser ohne Plasmid und damit ohne Resistenzgen im Sinne von Negativkontrollen mitgeführt. Ersterer diente in folgenden Restriktionsanalysen als Negativkontrolle.

Letzterer sollte kein Koloniewachstum auf den LB-Platten zeigen, da ohne Resistenzgen ein Bakterienwachstum ausgeschlossen sein sollte. Sollten sich auf der Negativkontrolle ohne Plasmid Kolonien zeigen, ist von einer Kontamination bzw. von einer Resistenz der Bakterien auch ohne transformiertes Plasmid auszugehen; eine Selektion ist folglich nicht möglich.

Anschließend erfolgte für jeden Ansatz durch Überführung der Röhrchen für 45 Sekunden in ein 42 °C warmes Wasserbad die eigentliche Hitzeschocktransformation. Nach dem Hitzeschock wurden die Bakterien für weitere drei Minuten auf Eis gestellt, um die Bakterienmembran wieder zu verschließen. Es folgte die Zugabe von 250 µl gekühltem SOC-Medium und eine einstündige Inkubation im Schüttler (Innova® 40, New Brunswick Scientific, Edison, USA) bei 37 °C mit 250 rpm. In dieser Zeit sollten die Bakterien das aufgenommene Plasmid mit enthaltenem Resistenzgen (hier: gegen Kanamycin beim „HC1-pEGFP-N1“-Plasmid und gegen Zeocin beim „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“-Plasmid) zur Selektion in Protein umsetzen. Das SOC-Medium sollte gekühlt sein, um einen wiederholten Temperatursprung mit erneuter Öffnung der Bakterienmembran und ggf. Verlust der transformierten Plasmide zu verhindern.

Im Anschluss wurden die Bakterien auf Platten mit LB-Selektionsmedium ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank (WTB, Binder Tuttlingen) inkubiert.

3.1.11 Plasmidpräparation aus *E. coli* -Zellen

Aus einzeln gewachsenen Bakterienkolonien wurden Bakterien-Vorkulturen zur weiteren Verwendung angelegt.

Dazu wurden Glasröhrchen mit je 5 ml Resistenzantibiotikum-versetztem LB-Medium mit jeweils einer gepickten Bakterienkolonie angeimpft. Es empfiehlt sich das Mitführen einer Negativkontrolle ohne Zugabe einer Bakterienkolonie um eine Trübung des Mediums durch Kontamination ausschließen zu können.

Die Röhrchen wurden über Nacht bei 37 °C im Schüttler (Innova® 40, New Brunswick Scientific, Edison, USA) mit 250 rpm inkubiert.

Bei erfolgreichem Angehen der Vorkultur (erkennbar durch Trübung des Mediums) konnte aus dieser eine kleine Menge an Plasmid gewonnen, eine größere Kultur angelegt oder diese bis zur weiteren Verwendung im Kühlraum gelagert werden.

Es empfiehlt sich zunächst die Gewinnung einer kleinen Menge an Plasmiden, um die klonierten Plasmide durch Restriktionsanalysen und anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung auf die korrekte Aufnahme der Insertion überprüfen oder ggf. die codierende Sequenz des Zielproteins durch eine Sequenzanalyse verifizieren zu können.

Dazu wurden die Plasmide unter Verwendung des QIAprep Miniprep Kit® (QIAGEN, Venlo, Niederlande) nach Angaben des Herstellers aus der Bakterienkultur isoliert und aufgereinigt.

Die Sequenzierung der aufgereinigten Plasmide wurde in der vorliegenden Arbeit von der Firma StarSEQ GmbH (Mainz) übernommen. Die Beurteilung der analysierten Sequenz erfolgte mit dem Computerprogramm „ApE“ (*M. Wayne Davis*).

Beinhalten die gepickten Bakterienkolonien die gewünschte DNA-Sequenz, kann aus der Vorkultur zur Gewinnung größerer Vektormengen eine Hauptkultur angelegt werden. Dazu wurden zu ca. 200 ml LB-Selektionsmedium 25 µl der Vorkultur gegeben und diese unter den gleichen Bedingungen wie bei der Inkubation der Vorkultur über Nacht inkubiert.

Es schloss sich die Plasmidpräparation mit dem Invitrogen PureLink™ HiPure Midiprep Kit® (Invitrogen, Carlsbad, USA) nach Angaben des Herstellers an.

Das Prinzip der Plasmidpräparation unter Zuhilfenahme von Kits basiert auf dem System der säulenchromatographischen Trennverfahren, mit dem selbst kleinste DNA-Mengen von niedermolekularen Verunreinigungen getrennt werden können.

Es werden zunächst die Plasmide durch Lyse der Bakterienzellen freigesetzt, diese dann durch Zugabe von RNasen von anhaftender RNA aufgereinigt und das Lysat durch Anionenaustauschsäulen aufgetrennt.

Die Anionenaustauschsäulen besitzen ein Trägermaterial mit positiv geladenen Oberflächenmolekülen die negativ geladene Substanzen, wie Nukleinsäuren, zurückhalten. Eine Trennung der negativ geladenen Nukleinsäuren von anderen Stoffen mit negativer Ladung kann durch Elution mit Puffern unterschiedlicher Ionenstärken erreicht werden. Proteine eluieren im Vergleich zu Nukleinsäuren erst bei höheren Ionenstärken (111).

Abschließend erfolgte eine Fällung mit Alkohol, um die Nukleinsäuren zu entsalzen und aufzukonzentrieren.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 verwendete Puffer und Lösungen

<i>Reagenz</i>	<i>Sammelgel</i> (2 Gele á 6 %)	<i>Trenngel</i> (2 Gele á 10 %)
TRIS-HCl (1,5 M, pH 8,8)	-	11,25 ml
TRIS-HCl (0,5 M, pH 6,8)	5 ml	-
SDS 10 %	200 µl	450 µl
Acrylamid 30 % + Bisacrylamid 0,8 %	4,6 ml	15 ml
Ammoniumpersulfat 10 %	132 µl	300 µl
TEMED	28 µl	30 µl
Aqua bidest.	12,2 ml	18 ml

Tabelle 18: Zusammensetzung SDS-Elektrophoresegele.

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>	
TRIS-Base	240 mM	In Aqua bidest. aufnehmen.
Glycin	190 mM	
SDS	1 %	

Tabelle 19: Zusammensetzung SDS-Elektrophoresepuffer.

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>	
Harnstoff	8 M	In Aqua bidest. lösen.
TRIS-HCl (pH 6,8)	125 mM	
Glycerol	20 %	Kurz vor Gebrauch Zugabe von 10 µl 2-Mercaptoethanol zu 500 µl Probenpuffer.
SDS	5 %	
Bromphenolblau	wenig	

Tabelle 20: Zusammensetzung 2x SDS-Probenpuffer.

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>	
TRIS-Base	24 mM	In Aqua bidest. aufnehmen.
Glycin	190 mM	
Methanol	20 %	

Tabelle 21: Zusammensetzung Blotting-Puffer.

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>	
KH_2PO_4	1,76 mM	Mit $NaOH$ auf einen pH von 7,3-7,5 einstellen.
Kaliumchlorid	2,68 mM	
$Na_2HPO_4 \times 2H_2O$	10,1 mM	
Natriumchlorid	140 mM	

Tabelle 22: Zusammensetzung Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS).

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>	
TRIS (pH 8,0)	10 mM	In Aqua bidest. aufnehmen.
Natriumchlorid	150 mM	

Tabelle 23: Zusammensetzung TRIS-gepufferte Salzlösung (TBS).

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>
Tween20	100 μ l
*TBS	200 ml

Tabelle 24: Zusammensetzung TRIS-gepufferte Salzlösung (TBST) mit Tween20.

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>	
BSA	1 %	In PBS aufnehmen und auf einen pH von 7,4 einstellen. Bei 4 °C kurz lagerungsfähig.
Tween20	0,1 %	

Tabelle 25: Zusammensetzung AK-Verdünnungspuffer.

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>	
SDS	2%	In Aqua bidest. aufnehmen.
TRIS-HCl (pH 6,8)	62,5 mM	
Mercaptoethanol	100 mM	

Tabelle 26: Zusammensetzung AK-Entfernungspuffer.

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>	
Natriumbicinchoninat	10 g/L	Auf einen pH-Wert von 11,25 titrieren.
Natriumcarbonat	20 g/L	
Natriumtartrat	1,6 g/L	
Natriumhydroxid	4 g/L	
Natriumhydrogencarbonat	9,5 g/L	

Tabelle 27: Zusammensetzung Stammlösung A; BCA-Protein Assay Kit.

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>
Kupfersulfat-Pentahydrat	40 g/L

Tabelle 28: Zusammensetzung Stammlösung B; BCA-Protein Assay Kit.

3.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung der angefertigten Lysate wurde unter zu Hilfe-
nahme des Pierce™ BCA Protein Assay Kits (Thermo Scientific, USA, Waltham)
durchgeführt. Es handelt sich hierbei um eine quantitative Messmethode, bei der die
farbgebende Komplexbildung zwischen den an die Peptide angelagerten Kupferionen
und der Bicinchoninsäure (BCA) zur photometrischen Messung ausgenutzt wird.

Die zu messenden Proteingemische wurden in einem Verhältnis von 1 : 9 mit einer
Reagenzlösung, bestehend aus den Stammlösungen A und B (Tabelle 27, Tabelle 28),
vorliegend in dem Verhältnis von 50 : 1, verdünnt und 30 Minuten bei 37 °C in einer 96-
Lochplatte inkubiert.

Die in der Stammlösung B enthaltenen Cu^{2+} -Ionen lagern sich an die Peptidbindungen
der Proteine an und werden im alkalischen pH-Milieu zu einwertige Kupferionen redu-
ziert. BCA bildet mit den reduzierten Ionen blau-violette Farbstoffkomplexe. Abhängig
von der Menge an vorhandenen Peptidbindungen und damit abhängig von der Menge
an Cu^+ -Ionen fällt die Farbreaktion verschieden stark aus.

Durch photometrische Messungen (Tecan, Männedorf, Schweiz) bei einer Wellen-
länge von 562 nm lassen sich Rückschlüsse auf die Menge an eingesetztem Protein
ziehen.

3.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Mittels SDS-Page lassen sich heterogene Proteingemische entsprechend ihrer Mole-
külmasse in homogene Proteinbanden auf einem Polyacrylamidgel auftrennen.

Dazu wurden die Proben vorab mit dem anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat
(SDS) versetzt, welches sich an die hydrophoben Teile der Proteine anlagert, sie ent-
faltet und stark negativ lädt, sodass die Eigenladung der Proteine überdeckt wird.

Die negative Beladung erfolgt über Bindung an vor allem hydrophoben Aminosäure-
ketten und steht folglich in einem proportionalen Verhältnis zur Molekülmasse der je-
weiligen Proteine (pro Gramm Protein werden durchschnittlich 1,4 g SDS gebunden
(112)). Die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld wird folglich von der Mo-
lekülmasse der Proteine und nicht mehr von ihrer Eigenladung bestimmt. Je niedriger
die Molekülmasse ist, desto schneller wandert das Protein durch das Gel und desto
größer ist die zurückgelegte Laufstrecke im Gel nach einer definierten Zeit x .

Das Mitführen standardisierter Größenmarker erlaubt das Ziehen von Rückschlüssen auf die Molekülmasse der zu untersuchenden Proteine.

In der vorliegenden Arbeit wurden Gele mit einer 6 %-igen Sammel- und einer 12,5 %-igen Trennphase verwendet.

Das Sammelgel weist eine größere Porenweite auf und enthält Chloridionen, welche im elektrischen Feld schneller durch das Gel wandern als Proteine.

Der beigefügte Elektrophoresepuffer enthält Glycinionen, welche langsamer als die Proteine durch das Gel wandern. Die Proteine sammeln sich im Sammelgel zwischen Glycin- und Chloridionen. Dies bezeichnet man als „*stacking*-Effekt“ und dient der Vortrennung und Aufkonzentrierung der Proteinprobe (107).

Das Trenngel hat im Verhältnis zum Sammelgel eine kleinere Porengröße; es hält zunächst porengößenbedingt die Proteine zurück und lässt die kleineren Glycinionen durchlaufen; über die Zeit erfolgt auch das Auftrennen der Proteine entsprechend ihrer Molekülmasse.

Die Gele wurden zwischen zwei Glasplatten entsprechend ihrer Zusammensetzungen (Tabelle 18) gegossen.

Es wurde zunächst das Trenngel eingefüllt, mit Wasser übergossen und auspolymerisiert. Danach wurde das Wasser abgegossen und das Sammelgel mit einer Kunststoffschablone für die Probenaschen eingeführt und ebenfalls polymerisieren gelassen. Das ausgehärtete Gel wurde in eine mit SDS-Laufpuffer gefüllter Gelektrophoresekammer (Perfect blue™ Doppelgelsystem Twin ExWS, Peq-Lab) eingesetzt.

Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit Mercaptoethanol-versetztem 2x Probenpuffer (Tabelle 19 Tabelle 20: Zusammensetzung 2x SDS-Probenpuffer) für zehn Minuten bei 37 °C inkubiert.

Dies denaturiert die Proteine durch Spaltung ihrer Disulfidbrücken zusätzlich zu dem Aufspalten durch Interkalieren des SDSs zwischen die Proteine.

Der hCAT-1 weist zwei Glykosylierungsstellen in seiner dritten extrazellulären Schleife auf (33); diese können Einfluss auf das Laufverhalten des Proteins und damit auf sein Wanderungsverhalten im Gel nehmen. Durch Vorliegen verschiedener Glykosylierungszustände des Proteins erscheint dieses im Gel als unscharfe, verwaschene Bande. Eine Deglykosylierung erlaubt eine schärfere Abgrenzung der entsprechenden

Proteinbande im Gel. Für den Nachweis des hCAT-1-Proteins empfiehlt sich eine vorangehende Deglykosylierung der Proteinprobe durch Inkubation mit N-Glykosidase F (Roche Diagnostics, Mannheim) bei 37 °C über 30 Minuten.

Die Proteinproben durchliefen die Sammelgelphase bei einer angelegten Spannung von 120 V (über etwa zehn Minuten); die Auftrennung der Proteinfragmente durch das Trenngel erfolgte bei 100 V über ca. drei bis vier Stunden.

3.2.4 Western-Blot-Analysen

Proteine lassen sich nach gelelektrophoretischer Auftrennung durch das SDS-Page-Verfahren elektrophoretisch aus dem Polyacrylamidgel auf eine geeignete Membran übertragen. Auf dieser können sie fixiert und über verschiedene spezifische Nachweisreaktionen detektiert werden.

Die Übertragung erfolgte hier auf eine Nitrocellulosemembran (Protran[®]83, Schleicher und Schüll, Dassel) mittels Tankblotverfahrens (Tankblotkammer, Trans-Blot[®] Cell, BioRad) über Nacht bei 4 °C und einer angelegten Stromstärke von 200 mA.

Die angelegte Spannung zieht die negativ geladenen Proteine entsprechend ihrer Ladung aus dem Gel in Richtung des Pluspols. Auf dem Weg dorthin bleiben diese durch hydrophobe Wechselwirkungen auf der Membranoberfläche der Nitrocellulosemembran haften. Das dem Transferpuffer zugesetzte Methanol lockert die Bindung zwischen SDS und Proteinen weiter auf, sodass die Proteine einfacher auf die Membran transferieren können.

Membran und Gel wurden beim Tankblotverfahren in Sandwichtechnik mit je drei Lagen Whatman[®] 3MM Filter (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) vor dem Gel und hinter der Membran in die Blottingkammer mit Transferpuffer unter Einsatz von Schwammtüchern und Kunststoffgittern geschichtet. Es ist wichtig, dass bei dem Zusammenbau des Blots eine Luftblasenbildung vermieden wird, damit die Proteine vollständig auf die Membran übertragen werden können.

Eine Färbung mit dem wasserlöslichen Farbstoff Ponceau S (Sigma-Aldrich, Deisenhofen), welcher unspezifisch Proteine anfärbt, kann den Erfolg des Transfers optisch sichtbar machen. Anschließend wird die Färbung mit Aqua dest. wieder ausgewaschen.

3.2.5 Nachweisreaktion zum spezifischen Proteinnachweis

Durch spezifische Nachweisreaktionen zwischen Nachweisreagenzien und den gesuchten Proteinen lassen sich diese auf der Nitrocellulosemembran detektieren und optisch darstellen.

In der Mehrzahl der Fälle geschieht dieser Nachweis unter Zuhilfenahme spezifischer Antikörper (hier: polyklonaler Antikörper gegen den hCAT-1 „HC1 aff. pur“ aus Kaninchen, Eigenproduktion Pharmakologisches Institut, Universitätsmedizin Mainz, J. Rupp 2010) und über Peroxidase-gekoppelte Zweitantikörper (hier: gegen Kaninchen gerichteter Antikörper „Goat-anti-rabbit IgG“ aus der Ziege, Calbiochem®, Merck, Darmstadt), welche an den jeweiligen Erstantikörper binden. Die Peroxidase ist ein Enzym, welches für eine später benötigte Chemilumineszenzreaktion verantwortlich ist und der optischen Darstellung der Proteine dient. Erst- und Zweitantikörper entstammen zwangsläufig divergenten Spezies, damit sie gegeneinander gerichtet sind.

Unspezifische Bindungsstellen müssen vor Zugabe von Antikörpern durch z. B. das im Antikörperverdünnungspuffer (AKV-Puffer) enthaltene bovine Serumalbumin (BSA), abgesättigt werden, um eine unspezifische Bindung des Nachweisreagenz auf der Blotmembran zu verhindern.

Erst danach erfolgt die eigentliche Nachweisreaktion durch Bindung des Erstantikörpers.

Dazu wurde der Blot zunächst dreimal mit AKV-Puffer á zehn Minuten unter Schwenken (Duomax 1030, Heidolph, Schwabach) bei Raumtemperatur gewaschen und anschließend in diesem unter Zugabe des jeweiligen Primärantikörpers (hier: „HC1 aff. Pur“, Verdünnung 1 : 10.000) unter Schwenken (Unimax 1010, Heidolph, Schwabach) über Nacht bei 4° C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Membran durch dreimaliges Waschen á zehn Minuten in Blotto-Puffer (oder in AKV-Puffer) auf dem Schwenker (Duomax 1030, Heidolph, Schwabach) bei Raumtemperatur von überschüssigem Antikörper befreit und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem jeweiligen Zweitantikörper (hier: „Antikörper Goat-anti-rabbit IgG“, Verdünnung 1 : 10.000) in Blotto-Puffer oder in AKV-Puffer inkubiert. Es ist unabdingbar den Zweitantikörper vor Lichteinfall zu schützen.

Es schlossen sich abermals drei Waschschríte á zehn Minuten in TRIS-gepufferter Salzlösung mit Tween (TBST) und ein Waschschrít in TRIS-gepufferter Salzlösung

(TBS) bei Raumtemperatur auf dem Schwenker (Duomax 1030, Heidolph, Schwabach) an, um die Membran von ungebundenem Zweitantikörper zu reinigen.

Als nächstes folgte das optische Sichtbarmachen der Antikörperbindung. Dies geschah mithilfe der an die Nachweisreagenzien gekoppelten Peroxidase und beruht auf dem Prinzip der Chemilumineszenz, welche durch die Enzym-Substratreaktion der Peroxidase mit Luminol frei wird und auf dem Röntgenfilm sichtbar gemacht wird.

Für die Peroxidase-reaktion wirkte eine Minute lang das Chemilumineszenzreagenz Western Lightning Plus ECL (PerkinElmer, Waltham, USA) auf die Membran ein, so dass das an den Zweitantikörper gekoppelte Enzym mit dem in der Lösung enthaltenen Luminol reagieren und Licht emittieren kann.

Die Membran wurde nach einer Minute aus dieser entnommen und mit einer Folie bedeckt.

Das Ganze wurde auf einen Film gelegt und dieser in der Dunkelkammer entwickelt. Die Belichtungszeiten lagen in der vorliegenden Arbeit zwischen einer und zehn Minuten.

In der dargelegten Arbeit sollte zudem der Nachweis von biotinyliertem hCAT-1-Proteins über HRP-Streptavidin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) erfolgen.

Die Bindung des HRP-Streptavidin und der entsprechende Lumineszenz-Nachweis erfolgten analog zu der oben dargestellten Methode; der Einsatz des HRP-Streptavidin entsprach dabei der des Zweitantikörpers (Verdünnung 1 : 5.000), die Inkubation mit einem Erstantikörper entfiel, da die Chemilumineszenzreaktion durch HRP-Streptavidin direkt vermittelt wird.

Soll der Western-Blot zum Nachweis von biotinylierten Proteinen durch HRP-Streptavidin erfolgen, darf zum Absättigen der unspezifischen Bindungsstellen kein Puffer mit Milchpulver verwendet werden, da Milch bereits Biotin enthält und eine unspezifische Gesamtbindung des HRP-Streptavidins auf der Blotmembran verursachen würde; stattdessen empfiehlt sich in den entsprechenden Schritten die Verwendung von AKV-Puffer.

3.3 Methodik der Zellkultur

Es war das Ziel gegeben, einen ersten Schritt in Richtung des Auffindens potenzieller Bindungspartner für kationische Aminosäuretransporter durch massenspektrometrische Analysen zu ebneten. Dazu wurden humane Zellen mit Plasmiden, codierend für den hCAT-1-Transporter, gekoppelt mit einem Biotinylierungsenzym, in humane Zellen transfiziert und Lysate aus diesen Zellen für weitere Versuche aufbereitet.

In den zugrundeliegenden Versuchen wurden humane Zellen der Zelllinie HEK293T verwendet. Es handelt sich hierbei um menschliche, embryonale Nierenzellen, transformiert mit Erbinformation des menschlichen Adenovirus 5. Sie exprimieren zudem das „SV40 large T-Antigen“, welches eine DNA-Replikation von viralen Genen mit SV40-Replikationsursprung ermöglicht. Sie sind adhärent wachsende Zellen (113). Ihre Kultivierung fand bei 37 °C und unter 5% CO_2 in DMEM + GlutaMax™-I (Gibco, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA) mit 10% FBS (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) statt.

Die Simultantransfektionen mit den Vektorkonstrukten „hCAT-1-BAP-N1“ und „pCMV3-BirA“ erfolgten in humanen Zellen der Zelllinie U373-MG. Es handelt sich hierbei um neuroektodermale Zellen aus einem Glioblastom-Astrozytom eines 61-jährigen kaukasischen Mannes (114).

Ihre Kultivierung fand bei 37 °C und unter 5% CO_2 in IMDM (Gibco, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA) mit 10% FBS (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) statt.

3.3.1 verwendete Puffer

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>	
Natrium-Desoxycholat	0,5 %	In Aqua bidest. aufnehmen. Bei der Anwendung auf Geweben Zugabe von Proteaseinhibitoren.
Triton-X-100	1 %	
SDS	0,1 %	
Natriumchlorid	150 mM	
TRIS (pH 8,0)	50 mM	

Tabelle 29: Zusammensetzung Radio-Immuno-Präzipitations-Assay- (RIPA) Puffer.

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>	
Natriumchlorid	150 mM	In Aqua bidest. aufnehmen.
TRIS (pH 8,0)	50 mM	Bei der Anwendung auf Geweben Zugabe von Proteaseinhibitoren.
NP-40	1 %	

Tabelle 30: Zusammensetzung NP-40-Puffer.

3.3.2 Auftauen von Zellen

Das Auftauen von in Flüssigstickstoff gelagerten Zelllinien sollte zu deren Protektion zügig erfolgen. Zellen werden in 10% FCS mit Dimethylsulfoxid (DMSO) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe), einem Gefrierschutzmittel, eingefroren.

Es hat bei Raumtemperatur eine direkt zytotoxische Wirkung (115), sodass die Zellen nach dem Auftauen schnell in ein für sie geeignetes Kulturmedium überführt werden sollten.

Die aufgetauten Zellen wurden in ein 15 ml Reaktionsgefäß mit angewärmtem Nährmedium gegeben, gemischt und mit 900 rpm fünf Minuten bei 4 °C abzentrifugiert (Megafuge X3R, Heraeus Sepatech, Osterode). Der Überstand wurde verworfen, das Zellsediment in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Es folgte das Einsäen der Zellen in eine 75 cm²-Kulturflasche (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) und deren Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und unter 5% CO₂ für 24 Stunden. Nach einer optischen Kontrolle der Zellen unter dem Lichtmikroskop schloss sich ein erneuter Mediumwechsel an.

3.3.3 Passagieren von Zellen

Sollen Zellen über einen längeren Zeitraum für mehrere Versuche in Kultur gehalten werden, müssen Sie regelmäßig umgesetzt und verdünnt werden, da sie sich sonst in ihrer Kulturflasche stark vermehren und durch Nährstoffmangel zu Grunde gehen. Den Vorgang des Umsetzens und Verdünnens nennt man „Passagieren der Zellen“. Die Anzahl an Passagen einer Zellkultur gibt die Anzahl an durchgeführten Verdünnungen wieder.

Für die HEK293T hatte sich ein einmal-wöchentliches Passagieren in einer Verdünnung von wenigen Tropfen Zellsuspension (hier in der Regel 3-5 Tropfen pro Kulturflasche) ad 20 ml neuem Medium als ausreichend gezeigt. Für die U373-MG war ein zweimal-wöchentliches Passagieren in Verdünnungen der Größenordnung von 1 : 3-1 : 6 notwendig.

Es wurde zunächst unter der Sterilbank (Mikrobiologische Sicherheitswerkbank UVF 6.18S, BDK, Sonnenbühl-Genkingen) das alte Kulturmedium aus der Kulturflasche abgesaugt, die Zellen mit ca. 10 ml DPBS (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) von restlichem Medium sauber gewaschen und mit ca. 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung (Sigma-Aldrich,

Deisenhofen) von dem Flaschenboden losgelöst. Es folgte eine ca. drei-minütige Inkubation der Zellen im Brutschrank bei 37 °C und unter 5% CO_2 . Leichtes Klopfen gegen den Flaschenboden diente als mechanische Unterstützung des Ablösevorgangs. Nach einer kurzen optischen Kontrolle des Ablösevorgangs wurden die Zellen in 10 ml vorgewärmtem Medium wiederaufgenommen und entsprechend der geplanten Verdünnung auf neue 75 cm²-Kulturflaschen aufgeteilt und neues Medium auf jeweils 20 ml Gesamtvolumen pro Kulturflasche wieder aufgefüllt.

Die Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung im Brutschrank bei 37 °C und unter 5% CO_2 inkubiert.

3.3.4 Bestimmung der Zellzahl mittels *Neubauer*-Zählkammer

Die *Neubauer*-Zählkammer wird mit 100 µl Zellsuspension beladen und durch Trypanblau (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) angefärbt.

Unter dem Mikroskop zeigt sich jede Zählkammer geteilt in vier Quadranten mit jeweils weiteren 16 quadratischen Unterteilungen. Die Anzahl der Zellen pro großem Quadrat wird ausgezählt, gemittelt und mit dem Faktor 10^4 und unter Berücksichtigung eventueller Verdünnungsfaktoren auf einen Milliliter Zellsuspension hochgerechnet. Dies ermöglichte ein exaktes Aussäen definierter Zellzahlen für Transfektionen.

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{Zahl der großen Quadrate}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 \times \text{ml}^{-1} = \text{Zellen} \times \text{ml}^{-1}$$

Verdünnungsfaktor entsprechend der Anzahl von Zellen in einem Milliliter Zellsuspension.

3.3.5 Einfrieren von Zellen

Zellen werden zur Langzeitlagerung in Einfriermedium im Flüssigstickstofftank bei -210 °C aufbewahrt.

Dazu wurden sie ähnlich zu dem Vorgang beim Passagieren zunächst mit DPBS (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) gewaschen, mit Trypsin-EDTA-Lösung (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) abgelöst und in 10 ml frischem Medium aufgenommen, in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und mit 900 rpm fünf Minuten bei 4 °C abzentrifugiert (Megafuge X3R, Heraeus Sepatech, Osterode). Der Überstand wurde verworfen, das Zellsediment in gekühltem Einfriermedium (enthält 10% DMSO) resuspendiert und je

1 ml davon in Kryoröhrchen (Nalgene™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) pipettiert. Die Zellen wurden über 24 h bei -70 °C in einer eisgefüllten Styroporbox langsam gefroren, bis sie in den Stickstofftank umgesetzt werden konnten. Dieses sukzessive Abkühlen dient der Protektion vor Kristallbildung im Zellinneren und ist zellschonender als ein schnelleres Abkühlen.

3.3.6 Bestimmung der Dosis-Wirkungskurve von Geneticin

Zur Züchtung einer stabilen Expression müssen die transfizierten Zellen unter Selektionsdruck hochgezogen und von nicht erfolgreich transfizierten Zellen selektiert werden.

Dies gelingt unter Ausnutzung von Antibiotikaresistenzgenen auf den transfizierten Plasmiden. Das Plasmid „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“ besitzt eine Sequenz für eine Aminoglykosid-Phosphattransferase, welche eine Resistenz gegen Neomycin/Geneticin vermittelt. Nur erfolgreich transfizierte Zellen können unter entsprechendem Selektionsdruck überleben.

Geneticin vermittelt seine Wirkung durch Translationshemmung über eine Bindung an die 80S-Ribosomen (116).

Die Dosis an Geneticin, die notwendig ist, um alle nicht transfizierten Zellen ohne Resistenz sicher abzutöten, ist von Zelllinien zu Zelllinie variabel und differiert zwischen verschiedenen Geneticin-Chargen. Vor Transfektionsbeginn sollte die für eine Selektion notwendige Geneticindosis bestimmt werden.

Dazu wurden Zellen definierter Dichte (hier: 25 Tsd. pro ml) in eine sechs-Lochplatte ausgesät und je Vertiefung mit unterschiedlichen Konzentrationen an Geneticin (Biochrom, Berlin) unter Selektionsdruck gegeben. Eine Vertiefung verbleibt als Kontrollgruppe ohne Selektionsdruck.

In den der Arbeit zu Grunde liegenden Experimenten hat sich eine Geneticinkonzentration von 400 µg/ml als ausreichend zur Selektion erwiesen.

3.3.7 Transfektion von Säugerzellen

Den Vorgang des Einschleusens von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen nennt man Transfektion. Dies kann transient ohne das Ziel einer dauerhaften Integration der transfizierten DNA in die Zelle oder dauerhaft im Sinne einer Zelllinie mit stabiler Expression des Zielproteins erfolgen.

3.3.7.1 Zelllinien mit transienter Expression des Zielproteins

Die Zellen wurden in sechs-Lochplatten mit einer Dichte von $0,4 - 4 \times 10^4$ Zellen je Vertiefung ausgesät und über mindestens 24 Stunden bei 37°C und unter 5% CO_2 im Brutschrank inkubiert.

Am Folgetag fand ein Mediumwechsel der ausgesäten Zellen statt. Zum Zeitpunkt der Transfektion sollten die Zellen mindestens zu 70% konfluent sein.

Es wurde die Methode der biologischen Transfektion unter Einsatz eines Transfektionsreagenz angewendet. Dieses enthält diverse transfektionserleichternde Stoffe, wie z. B. Histone, Polyamine und synthetische Lipide. Letztere lagern sich ionisch an die Plasmidmoleküle an, sodass eine positive Nettoladung des Komplexes resultiert. Dieser kann an die Zellmembranoberfläche binden und wird von den Zellen vermutlich endozytotisch aufgenommen (107). Neuere Transfektionsreagenzien wie Fugene[®]6 und GeneJuice[®] enthalten keine synthetischen Lipide.

Es wurden Transfektionsansätze nach folgendem Schema pipettiert und tropfenweise zu den ausgesäten Zellen dazugegeben;

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>	
Medium ohne FBS	150 μl	Mischen, 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur.
Transfektionsreagenz Fugene [®] 6; GeneJuice [®]	3 - 8 μl	
Plasmid	1 - 2 μg	Dann Zugabe des Plasmids und 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur.

Tabelle 31: Schema eines Transfektionsansatzes.

Die biologische Transfektion der Säugerzellen mit den „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“-Konstrukten verlief trotz diverser Modulationen bezüglich Mengenverhältnissen und Transfektionsreagenzien frustan bzw. mit einer zu geringen Effizienz.

Eine chemische Transfektion nach der Calcium-Phosphat-Präzipitations-Methode ist eine Alternative zu oben dargestelltem Vorgang.

Diese wurde 1973 durch *Graham, Frank L.* und *Van der Eb, Alex J.* etabliert (117).

Die zu transfizierenden Plasmide werden dabei rührend in eine $CaCl_2$ -Lösung mit Phosphatpuffer gemischt. Das enthaltene Calciumchlorid und das zugegebene Natriumphosphat fallen zusammen als Calciumphosphat aus, welches an der DNA binden und zusammen mit dieser von den Zellen endozytotisch aufgenommen werden kann. Die Transfektionseffizienz kann durch Zugabe einer Chloroquin-Lösung gesteigert werden. Chloroquin verschiebt den pH-Wert in den Lysosomen und wirkt somit dem lysosomalem Abbau der transfizierten DNA durch DNasen entgegen (107).

Es wurden Transfektionsansätze nach folgendem Schema pipettiert und tropfenweise zu den in 10-cm-Platten ausgesäten Zellen nach vorangegangenem Mediumwechsel dazugegeben;

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>	
Plasmid	5 - 10 µg	Mischen, 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur.
Calciumchlorid 2,5M	50 µl	
H_2O : 0,1x TE-Puffer (1 : 3)	ad 500 µl	Dann Zugabe von 1 ml einer 1 : 100 mit Medium verdünnten Chloroquinlösung [C _{end.} = 1 mM]
HBS-Puffer (2x)	500 µl	

Tabelle 32: Schema eines Transfektionsansatzes für die Calcium-Phosphat-Methode.

Es folgte bei beiden Transfektionsmethoden eine Inkubation der transfizierten Zellen über 48 - 76 Stunden bei 37 °C und unter 5% CO_2 im Brutschrank.

Transfektionen mit EGFP-Konstrukten können fluoreszenzmikroskopisch auf ihre Effizienz beurteilt und ausgezählt werden.

Durchflusszytometrisch lassen sich Zellen separieren.

3.3.7.2 Zelllinien mit stabiler Expression des Zielproteins

Bei einer stabilen Expression wird die eingeschleuste Fremd-DNA stabil in das Wirtsgenom integriert und dauerhaft exprimiert (118).

Nach erfolgreicher transients Expression der Zellen des Plasmids „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“ wurden die Zellen mit Geneticin (Biochrom GmbH, Berlin) unter Selektionsdruck gesetzt. Es erfolgte nach wenigen Tagen der Kultivierung durchflusszytometrisch ein Sortieren der Zellen in Einzel- und Mischklone. Dies wurde am Paul Klein Zentrum für Immunabwehr, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz für uns durchgeführt.

Aus der Zellsuspension wurden EGFP-positive Zellen in einer 96-Lochplatte vereinzelt und weiter unter Selektionsdruck kultiviert bzw. in einer 12-Lochplatte als Mischklon weiter unter Selektionsdruck kultiviert. Es erfolgten regelmäßige Medienwechsel unter Selektionsdruck und fluoreszenzmikroskopische Kontrollen auf Beibehalten des EGFP-Signals.

Nach Erreichen entsprechender Konfluenz wurden die Zellen auf größere Kultivierungsgefäße umgesetzt und in den üblichen Passagierungs-Rhythmus überführt.

Eine Expression gilt als stabil, wenn sie das transfizierte Plasmid stabil in ihre DNA integriert hat und es auch ohne Selektionsdruck dauerhaft exprimiert.

Das Hochziehen der Einzelklone verlief in der vorliegenden Arbeit frustan. Es wurde das Erreichen einer Zelllinie mit stabiler Expression („T7 Mischklon HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“) durch Kultivierung des Mischklons erreicht.

3.3.8 Herstellung von Zell-Lysaten

Die transfizierten Zellen wurden nach entsprechender Kultivierung abgeerntet und für weitere Proteinanalysen lysiert.

Dabei wurde das vorhandene Kulturmedium abgesaugt, die Zellen mit DPBS (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) gespült und mit einem entsprechenden Lyse-Puffer 30 Minuten unter Schütteln bei 4 °C inkubiert. Das Zell-Lyse-Gemisch wurde in einem Reagenzgefäß 20 Minuten mit 14.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand mit enthaltenen Proteinen in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das gewonnene Lysat kann bei -20 °C für mehrere Wochen gelagert und für weitere Analysen genutzt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Lyse-Puffer verwendet. Die Herausforderung bestand darin, einen Lysepuffer zu finden, der einerseits die Zellen ausreichend lysiert, die hCATs hinreichend aus der Zellmembran solubilisiert, aber dennoch potenzielle Bindungspartner nicht von den hCATs ablöst und gleichzeitig die Durchführung folgender massenspektrometrischer Analysen nicht behindert.

In der Tabelle 29 und der Tabelle 30 sind die verwendeten Lysepuffer in ihrer Zusammensetzung dargestellt. Insbesondere der NP-40-Puffer stellt einen sehr milden, nicht denaturierenden Puffer dar, welcher die Wahrscheinlichkeit für eine erhaltene Assoziation potenzieller Bindungspartner nach der Zellyse erhöht (119).

Alle Lysepuffer wurden mit einem Proteaseinhibitor-Gemisch (Proteaseninhibitorengemisch complete mini, Roche, Grenzach-Wyhlen) versetzt, um einem Abbau der Proteinproben entgegenzuwirken und damit eine möglichst scharf abgrenzbare Darstellung der einzelnen Proteinbanden im Western-Blot zu erhalten.

3.4 Expressionsstudien an *Xenopus laevis*-Oozyten

Seit *John Gurdon* 1971 erste molekularbiologische Experimente mit Oozyten des Kralenfrosches *Xenopus laevis* durchführte, haben sich diese in der Forschung vor allem als zelluläres Expressionssystem zur Proteinexpression exogener, injizierter RNA stetig weiter etabliert (120).

3.4.1 verwendete Puffer und Lösungen

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>
Natriumchlorid	96 mM
Kaliumchlorid	2 mM
Magnesiumchlorid	1 mM
HEPES (pH 7,3)	10 mM

Tabelle 33: Zusammensetzung Ca²⁺-freie Pufferlösung.

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>
Natriumchlorid	96 mM
Kaliumchlorid	2 mM
Magnesiumchlorid	1 mM
Calciumchlorid	1,8 mM
HEPES (pH 7,3)	10 mM

Tabelle 34: Zusammensetzung Ca²⁺-haltige Pufferlösung.

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>
Leibowitz L15-medium	25 ml
Aqua bidest. Steril	25 ml
HEPES (15 mM, pH)	750 µl
Gentamycin 100 µg/ml	50 µl

Tabelle 35: Zusammensetzung Oozyten-Kulturmedium.

3.4.2 *Xenopus laevis* als Versuchstier

Das natürliche Verbreitungsgebiet von *Xenopus laevis* liegt in Afrika. *X. laevis* ist bezüglich seiner Ansprüche an Umgebungsbedingungen äußerst genügsam und damit ein ideales Versuchstier im Labor.

Er verhält sich sowohl euryök als auch eutherm. Geschlechtsreife Tiere erreichen eine Größe von ca. 13 cm und können unter Laborbedingungen oft 15 Jahre alt werden. Das Nahrungsspektrum der Tiere ist sehr breit und in erster Linie proteinreich (120). Im Labor werden sie mit Fertig-Pellets ernährt.

Die Oozyten des Krallenfrosches eignen sich aus mehreren Gründen als zelluläres Expressionssystem. Sie sind ohne großen Aufwand und in großen Mengen chirurgisch einfach zu gewinnen; sie erlauben durch ihre Größe von 1,2 - 1,5 mm eine gute Handhabung, haben eine hohe Proteinbiosyntheserate (121, 122) durch einen großen Enzymapparat und ausreichendem Vorhandensein zytoplasmatischer Zellorganellen und setzen auch injizierte Fremd-RNA in Protein um.

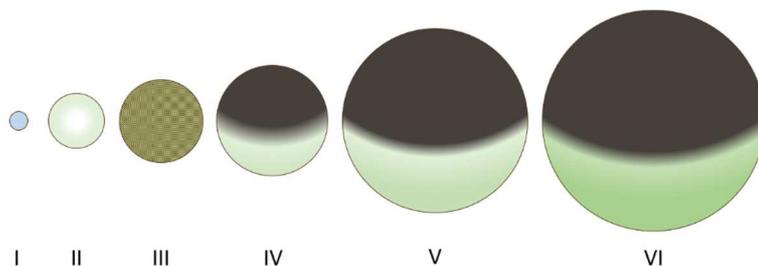


Abbildung 5: Darstellung der Oozytenstadien I-VI von *Xenopus laevis*-Oozyten nach Dumont (1972) (123).

Die Oozyten nehmen vom Stadium I bis VI an Volumen und Pigmentierung zu. Oozyten des Stadiums I sind transparent; ab Stadium III sind bereits dunkle Pigmentgranula zu sehen, die sich ab Stadium VI am animalen Pol konzentrieren und eine optische Differenzierung zwischen animalen und vegetativen Pol erlauben. Im Stadium VI zeichnet sich ein heller äquatorialer Ring zwischen beiden Polen ab. Für die Injektionsversuche wurden Oozyten der Stadien V und VI ausgewählt.

Die diploiden Oozyten durchlaufen verschiedene Wachstumsphasen und wurden bereits 1972 durch Dumont in sechs verschiedene Stadien klassifiziert (Abbildung 5).

Für Expressionsstudien eignen sich Oozyten der Stadien V und VI nach Dumont, welche bereits makroskopisch eine Differenzierung zwischen einem animalen (zytoplasmareich, bräunlich) und vegetativen (dotterhaltig, beige) Pol zulassen (123).

Die Qualität der Oozyten hängt entscheidend von der Außentemperatur ab und sinkt bei steigenden Temperaturen. Für die Arbeit an den Oozyten ist eine Umgebungstemperatur von unter 25 °C anzustreben.

3.4.3 Gewinnung der *Xenopus laevis*-Oozyten

Die Ovarien eines *Xenopus laevis* Weibchen enthalten bis zu 30.000 Oozyten der *Dumont*-Stadien I-VI, verteilt in bis zu 16 epithelüberzogenen Mesovarien. Die Oozyten zeigen eine Umhüllung aus Follikelepithel, Theka und innerem Ovarialepithel (120).

Zur Oozytengewinnung mussten die Krallenfrösche vorab narkotisiert werden. Die gebräuchlichste Form dabei ist das Narkosebad. Das am häufigsten eingesetzte Anästhetikum stellt 0,1 %-iger 3-Aminobenzoessäure-Ethylester (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) dar (124, 125).

Die Qualität der Narkose ist abhängig von der Umgebungstemperatur; je höher die Temperatur des Narkosebades ist, desto schneller wird das Anästhetikum über die Haut des Frosches resorbiert und auch wieder abgegeben (120).

Zur Überprüfung der Narkosetiefe und damit dem Erreichen des chirurgischen Stadiums, wurde der Ausfall des Umkehr- (Wendung des Frosches aus der Rückenlage) und Schmerzreflexes (mit Pinzette die Schwimmhäute kneifen) überprüft. Erst wenn diese erloschen sind, darf mit der chirurgischen Isolation der Oozyten begonnen werden. Dies ist meistens nach einem ca. 30- bis 40-minütigem Narkosebad erreicht und hält für ca. 30 Minuten an (126). Die Narkosedauer kann durch Überführen des Frosches in klares Wasser verkürzt werden.

Die Lagerung des Frosches während der Präparation erfolgte auf Eis in Rückenlage mit leicht erhöhtem Kopf; die Schnittführung verlief im kaudalen Abdominalbereich ca. 1 cm lang von kranial nach kaudal; eine Verletzung der Abdominalarterie oder größerer Mesovargefäße ist in der Regel letal und damit unbedingt zu vermeiden (120).

Es wurde zunächst die Lederhaut, dann das Peritoneum und die Muskelschichten eröffnet. Das Ovar tritt meist nach Eröffnung des Bauchraums nach außen vor und kann mithilfe einer Pinzette weiter luxiert und der gewünschte Teil des Mesovars durch eine Schere abgetrennt werden. Das entnommene Gewebe wurde in einer Ca^{2+} -haltigen Pufferlösung bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Das restliche Ovar wurde in die Peritonealhöhle rückverlagert und die durchtrennten Gewebeschnitte mit Nahtmaterial wieder verschlossen; für die Nähte von Muskulatur und Peritoneum wurden resorbierbare Monocryl-Fäden der Stärke 5-0 (Johnson & Johnson), für die Oberhaut nicht-resorbierbare Polyethylen-Fäden der Stärke 5-0 (Ethilon, Johnson & Johnson) verwendet.

Zur Narkoseausleitung wurde der Krallenfrosch unter Leitungswasser abgespült und in eine Schale mit niedrigem Wasserstand bis zum Erwachen gesetzt; es empfiehlt sich die Zugabe von Kaliumpermanganat zur Infektionsprophylaxe (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) ins Wasser.

Erst nach vollständigem Erwachen aus der Narkose wurde das Tier zurück in ein Einzelbecken gebracht und am folgenden Tag zurück in ein Gemeinschaftsaquarium gesetzt.

3.4.4 Präparation der *Xenopus laevis*-Oozyten

Nach Entnahme der Oozytenläppchen wurden diese in einer Petrischale aufgeschnitten, sodass sie einschichtig vorlagen und ein besserer Austausch mit dem Umgebungsmedium und damit eine optimierte Nährstoffversorgung stattfinden konnte.

Zur weiteren Verwendung der Oozyten sollte das Bindegewebe um die Oozyten mechanisch oder enzymatisch gelöst werden, dies erleichtert eine Klassifikation in die verschiedenen *Dumont*-Stadien.

Für ein enzymbasiertes Vorgehen diesbezüglich eignet sich das Zugeben von 100 µl einer Kollagenase A-Lösung (Roche, Grenzach-Wyhlen), gewonnen aus *Clostridium histolyticum*, zu den Oozytenläppchen, welche zuvor in ca. 3-4 mm große Stücke geschnitten wurden.

Vor Zugabe des Enzyms wurden die Oozyten ca. achtmal in einer Ca^{2+} -freien Pufferlösung gewaschen, um einer überschießenden Aktivierung der Kollagenase durch das Kalzium entgegenzuwirken.

Unter leichten Schüttelbewegungen vereinzeln sich die Oozyten nach Zugabe der Kollagenase nach ca. 30-40 Minuten.

Die Kollagenase wurde im Anschluss durch ein mindestens 15-maliges Waschen mit Ca^{2+} -freiem Puffer entfernt.

Die Oozyten ließen sich vereinzelt mikroskopisch nach *Dumont*-Stadien einteilen; es folgte die Auswahl mehrerer Oozyten der Stadien V-VI nach *Dumont*.

Die gewonnenen Oozyten wurden bis zur Mikroinjektion in modifiziertem Leibowitz-Medium (mit L-Glutamin; Sigma-Aldrich, Deisenhofen), zuzüglich HEPES (15 Mm) und Gentamycin (100 µg/ml; Invitrogen, Carlsbad, USA) im Inkubationsschrank bei 18 °C gelagert.

3.4.5 Mikroinjektion von cRNA in die *Xenopus laevis*-Oozyten

Die Mikroinjektion von Fremd-RNA in die Oozyte ermöglicht die Translation dieser durch den Proteinbiosyntheseapparat der Oozyte. Dazu reichen bereits mRNA-Mengen von weniger als 1 pg pro Oozyte aus; eine Sättigung der Expression ist bei ca. 20 ng injizierter RNA erreicht (120).

Die Mikroinjektion erfolgte durch Druckinjektion unter Zuhilfenahme eines Mikroinjektors (Transjektor 5246, Eppendorf, Hamburg) und bedingt vorab die Herstellung passender Mikrokapillaren. Diese wurden mit einem Kapillarziehgerät (Micropipette Puller pB-7, Narishige) angefertigt und auf die richtige Tropfengröße unter Lupensicht (Binokular MZ6, Leica, Solms) mittels Pinzette gekürzt. Eine weitere Anpassung der Tropfmenge erfolgte durch Justierung der Einstellgrößen des Mikroinjektors bezüglich der Stellgrößen für Ausstoßdruck und -intervall.

Das Tropfenvolumen berechnet sich anhand der Volumenformel einer Kugel; der Tropfendurchmesser lässt sich mikroskopisch an der Mikroskopskala ablesen.

Es erfolgte die Verdünnung der zuvor hergestellten cRNA mit RNase-freiem Wasser auf eine Konzentration von 0,5 µg/µl. Davon wurden 2-2,5 µl unter Zuhilfenahme einer Eppendorf® Varipette (Eppendorf, Hamburg) in die Mikrokapillare eingebracht und je ca. 20 nl pro Oozyte, vorzugsweise in ihren vegetativen Pol, durch Druckluft injiziert.

Während der Injektion waren die Oozyten in einer Petrischale mit Ca^{2+} -haltigem Puffer auf einem Kunststoffnetz mit einer Maschenweite von 1 mm x 1 mm gelagert. Der animale Pol der Oozyte enthält den Kern und sollte durch die Injektion nicht beschädigt werden.

Eine Lagerung der Oozyten mit nach oben gerichtetem vegetativem Pol kann die Handhabung vereinfachen. Die Injektionskanüle wurde senkrecht zur Oozytenmembran angesetzt und vorsichtig in die Oozyte eingeführt. Es erfolgte die Applikation der zu injizierenden cRNA mittels Druckluft. Parallel wurde eine Gruppe Oozyten mit Aqua bidest. gleichen Volumens injiziert und als Kontrolle mitgeführt.

Nach erfolgreicher Injektion wurden die Oozyten wieder im Oozyten-Kulturmedium im Inkubationsschrank bei 18 °C für zwei bis vier Tage kultiviert. Es erfolgten regelmäßige Wechsel der Kulturmedien in einem Zweitagesintervall oder bei makroskopischen Auffälligkeiten bereits eher.

Die Expressionsdauer betrug in der vorliegenden Arbeit in der Regel zwei Tage.

3.4.6 L-[³H]Argininaufnahme in *Xenopus laevis*-Oozyten

Nach einem zweitägigen Expressionsintervall wurde die Proteinexpression des Transportproteins durch Messung der Aufnahme von Tritium-markiertem Arginin in die Oozyte beurteilt.

Pro Versuchsansatz wurden vier bis sechs Oozyten zusammen in ein Reaktionsgefäß gegeben, dreimal mit jeweils 200 µl eiskalter ND96-Lösung gewaschen, um Reste des Oozytenkulturmediums und darin enthaltene Aminosäuren zu entfernen, und der Überstand anschließend abgezogen.

Im Anschluss wurden die Oozyten mit 200 µl einer Lösung aus ND96 mit und ohne Zugabe der Testsubstanz (hier: 100 µM SNAP, Sigma-Aldrich, Deisenhofen oder die Kombination aus je 1 mM Sin-1 und SPENO, beide Cayman Chemical, Ann Arbor, USA) für zehn Minuten bei Raumtemperatur bzw. bei 37 °C inkubiert und anschließend der Überstand wieder vorsichtig abgezogen.

Es folgte die Inkubation mit 200 µl einer 1 mM L-[³H]Arginin-Lösung (Aktivität: 10 µCi/ml) für den Transporter hCAT-2A und einer 100 µM L-[³H]Arginin-Lösung (Aktivität: 10 µCi/ml) für den Transporter hCAT-1 bei 20 °C über 15 Minuten, sowie bei 37 °C über drei Minuten (hCAT-2A) bzw. über eine Minute (hCAT-1) mit und ohne Zugabe der Testsubstanz (hier: 100 µM SNAP oder die Kombination aus je 1 mM Sin-1 und SPENO).

Die Reaktionsgefäße wurden anschließend direkt auf Eis gesetzt, um die Transportaktivität und damit die Argininaufnahme stillzulegen.

Es schloss sich ein fünf-maliges Waschen mit je 2 ml eiskalter ND96-Lösung an, bevor die Oozyten einzeln in Szintillationsgefäße gegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur mit jeweils 100 µl einer 2%-igen SDS-Lösung (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) lysiert wurden.

Um die ionisierende Strahlung, die beim Zerfall der Oozyten frei wird, messen zu können, wurde dem Ganzen eine Szintillationslösung (Irgasafe[®], Perkin-Elmer, Waltham, USA) zugegeben. Diese sendet durch die freiwerdende Energie angeregt, Lichtemissionen aus, die der Flüssigkeitsszintillationszähler (Tricarb 2810TR Liquid scintillation analyzer, PerkinElmer, Waltham, USA) messen kann.

Berücksichtigt man die Ausgangsaktivität des L-[³H]Arginins und die Inkubationsdauer, kann der Arginintransport pro Oozyte und Stunde errechnet werden.

3.5 High-performance liquid chromatographic- (HPLC) basierte Messmethode

Für den Nachweis einer stattgehabten Nitrosierung und Transnitrosierung in den *Xenopus laevis*-Oozyten nutzten wir eine 1989 durch *Neuschwander-Tetri et al.* beschriebene (127) und 1999 von *Tsikas et al.* (128) modifizierte HPLC-basierte Messmethode zur quantitativen Bestimmung von Glutathion (GSH) bzw. S-Nitrosoglutathion (GSNO).

Hintergrund stellt dabei die Umwandlung von GSNO in GSH durch eine Reaktion mit 2-Mercaptoethanol dar.

Auf diese Art generiertes GSH derivatisiert unter Zugabe von ortho-Phthaldialdehyd (OPA) zu einem UV-absorbierenden trizyklischem Isoindolderivat, dessen Menge chromatographisch mit einer HPLC-Anlage bestimmt werden kann.

3.5.1 verwendete Puffer und Lösungen

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>	
di-Natriumtetraborat	1,5 g	Auf pH8 äquilibrieren.
Aqua bidest.	100 ml	

Tabelle 36: Zusammensetzung Borat-Puffer 75 mM.

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>	
OPA	36,4 mM	Die OPA-Reagenzien werden in lichtgeschützten Reaktionsgefäßen bei 4 °C gelagert.
Borat-Puffer (pH 8,7)	75 mM	
Ethanol	10 Vol%	
OPA-B	+ 2-Mercaptoethanol 12,2 mM	

Tabelle 37: Zusammensetzung OPA-Reagenzien.

3.5.2 Derivatisierung

Alle dieser Arbeit zu Grunde liegenden HPLC-basierten Messungen wurden mit dem Hochleistungsflüssigkeitschromatographen der Firma Bischoff (Bischoff Analysetechnik und -geräte, Leonberg) und dem Fluoreszenzdetektor RF 20A (Shimadzu, Kyoto, Japan) (Wellenlängen E_x 338 nm und E_m 458 nm) durch die Technische Assistentin Alice Habermeier durchgeführt.

Zu anfangs erfolgte die Zugabe von NEM (1 mM über fünf Minuten) zu den Messproben um endogen-vorhandenes GSH abzufangen und von der Messung auszuschließen.

Zur Derivatisierung von GSH wurden jeweils drei Oozyten in 500 μ l Borat-Puffer (75 mM) lysiert; 50 μ l diesen Lysats wurden mit 50 μ l des entsprechenden OPA-Reagenz versetzt.

Die Derivatisierung von GSH ohne GSNO zwecks Leerwertbestimmung erfolgte mit dem OPA-Reagenz über zwei Minuten unter Entstehung von GSH-OPA.

Die Umwandlung von GSNO in GSH nach Bereinigung von endogenem GSH erfolgte durch Zugabe von 50 μ l des OPA-Reagenz-Bs über einen Inkubationszeitraum von 40 Minuten.

Das in OPA-B enthaltene 2-Mercaptoethanol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) reagierte mit dem zuvor zugefügten NEM (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) unter Entstehung von 2-Mercaptoethanol-NEM-Derivaten, welche nicht in der Lage sind, mit dem aus dem GSNO durch 2-Mercaptoethanol entstandenem GSH zu reagieren und dieses abzufangen. Das GSH steht der Reaktion mit OPA und damit seiner quantitativen Bestimmung zur Verfügung.

Die Messproben wurden auf C18-Säulen (Waters[®], Massachusetts (USA), x-select CSH, 3,5 μ m, 4,6 x 150 mm) und einem Gradienten aus 50 mM Natriumacetat (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) und 100 % Acetonitril (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) bei einem Fluss von 0,8 ml und einer Injektionsmenge von 15 μ l in die HPLC-Anlage zur Messung gegeben.

Zur Quantifizierung mittels linearer Regression wurde eine externe Standardreihe einer GSH-Lösung (2 - 0,25 mM) in gleicher Weise mit einer OPA-B-Lösung versetzt und gemessen.

Messungen wurden an Oozyten mit Überexpression des hCAT-1- und hCAT-2A-Proteins zur Kontrolle ohne und nach Zugabe der Substanzkombination aus jeweils 1 mM Sin-1 und SPENO durchgeführt. Die Messwerte der Sin-1 und SPENO exponierten Oozyten wurden von den Kontroll-Werten ohne Exposition unter Sin-1 und SPENO bereinigt.

3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der durchgeführten Versuche erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA).

Bezüglich der Transportstudien an den *Xenopus laevis*-Oozyten wurde jedes Messergebnis einer Oozyte als Einzelversuch betrachtet.

Pro Versuchsansatz stammten alle erhobenen Messwerte von drei verschiedenen Oozytenpräparationen ab und wurden an jeweils drei unterschiedlichen Versuchstagen erhoben.

Mitgeführte Kontrollgruppen ohne exogen-exprimierte Transporter (OET) dienten der Messwertbereinigung.

Die Messwerte der jeweiligen OET-Kontrollgruppen wurden gemittelt und diese von den Einzelwerten der überexprimierenden Oozyten der entsprechenden Bedingung subtrahiert.

Die Mittelwerte der so bereinigten Oozytengruppen wurden berechnet und die Datenverteilung unter Angabe der Standardabweichungen (SD) dargestellt.

Sollte die Darstellung der Messwerte nicht in Zerfällen pro Minute (dpm), sondern in aufgenommener Mol-Menge erfolgen, wird dies nach folgender Formel berechnet:

$$L - \text{Arginin} [\text{mol}] = \text{Zerfälle} [\text{dpm}] \times \frac{C_{L-\text{Arg}} [\text{mol/L}]}{2,22 \times 10^{12} [\text{dpm/Ci}] \times \alpha_{L-[^3\text{H}]-\text{Arg}} [\text{Ci/L}]}$$

C = Konzentration eines Stoffes

α = spezifische Aktivität (= Aktivität, auf die Masse des Stoffes bezogen)

Anm.: 1 Ci ≙ 3,7 × 10¹⁰ Bq ; 1 Bq ≙ 60 dmp ↔ 1 Ci ≙ 2,22 × 10¹² dpm

Diese Werte lassen sich unter Berücksichtigung der jeweiligen Aufnahmedauer auf andere Zeitspannen, beispielsweise auf die Argininaufnahme innerhalb einer Stunde hochrechnen.

Eine Signifikanztestung zwischen den verschiedenen Versuchsbedingungen erfolgte unter der Annahme einer Werteverteilung gemäß Gaußscher Normalverteilung über einen t-Test. Das Konfidenzintervall wurde auf 95% der Werte festgelegt.

Die Auswertung des Organbad-Versuches erfolgte mit dem Programm LabChart® Reader (Softwareversion 8.1.13, ADInstruments, Sydney, Australien).

Für die graphische Darstellung der HPLC-basierten Messergebnisse fand die Software Mcc Daq der Firma Bischoff (Bischoff Analystechnik und -geräte, Leonberg) Verwendung.

4 Ergebnisse

4.1 Fehlender Einfluss einer Nitros(yl)ierung auf die Transportleistung der hCAT-Proteine

Bereits *Bayer et al.* und *Deves et al.* konnten experimentell zeigen, dass CATs in ihrer Transportfunktion durch Bindung von N-Ethylmaleinimid an ihren Cysteinresten gehemmt werden können (4, 5).

2010 fand die Arbeitsgruppe von *Zhou et al.* Hinweise darauf, dass in Rattenkardio-myozyten die Transportaktivität jener Transporter über eine Stimulation mit Stickstoffmonoxid negativ moduliert wird und postulierten die These, dass dies möglicherweise über eine S-Nitrosylierung an den Cystein-Resten der Transporter, an denen auch NEM bindet, vermittelt werden könnte (6).

Das Bestreben der vorliegenden Arbeit war es, diesen Hemmmechanismus durch *NO* auf die Transportfunktion der CATs nachzubilden und molekular weiter aufzuschlüsseln.

Die Isoformen hCAT-1 und hCAT-2A sollten in *Xenopus laevis*-Oozyten exprimiert werden, da diese eine hohe Expression der hydrophoben Membranproteine gut tolerieren und gleichzeitig eine geringe, endogene Transportaktivität dieser Transporter zeigen (120). Eine *NO*-vermittelte Hemmung der Transporter sollte durch Messung der Transportaktivität durch Aufnahme von Tritium-markiertem Arginin (L-[³H]Arginin) in *NO*-Donatoren-exponierten und unbehandelten Oozyten nachgewiesen werden. Im zweiten Schritt war es angedacht, herauszufinden, ob die *NO*-vermittelte Hemmung über eine Nitrosylierung von Cysteinresten der Transporter erfolgt. Dies sollte an einer bereits vorhandenen cysteinfreien Transporter-Mutante (*Bayer et al.*, (5)) entsprechend experimentell untersucht werden; im Fall einer ausbleibenden hemmenden Wirkung von *NO* an dieser, sollte mit Hilfe weiterer Mutanten (*Bayer et al.*, (5)) nach den spezifischen Cysteinresten, an die *NO* angreift, gesucht werden.

Die Oozyten wurden chirurgisch aus den *Xenopus laevis* isoliert und RNA, codierend für den hCAT-1- und -2A-Transporter in die Oozyten injiziert.

Die Wahl für die hCAT-Isoformen hCAT-1 und -2A lag darin begründet, dass *Zhou et al.* ihre Ergebnisse an Sarkolemm-Vesikeln aus Rattenkardiomyozyten erhoben (6). In diesen sind die beiden Isoformen hCAT-1 und -2A als dominierend beschrieben (129).

Nach einer Inkubationsdauer von zwei Tagen bei 18 °C erfolgten die in Kapitel 3.4.6 skizzierten Transportversuche. Ziel war es zunächst, den hemmenden Effekt von Stickstoffmonoxid, freigesetzt durch den *NO*-Donator S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamin (SNAP), über einen Rückgang der L-[³H]Argininaufnahme über die beiden hCAT-Isoformen in die Oozyten abzubilden.

Die Versuche erfolgten sowohl bei hCAT-1- als auch bei hCAT-2A-exprimierenden Oozyten jeweils bei einer Inkubationstemperatur von 20 °C als auch bei einer von 37 °C. Letztere Temperaturbedingung war in Anlehnung an die von *Zhou et al.* beschriebenen Versuche und zum Nachbilden der in Säugetieren physiologisch vorherrschenden Körpertemperatur begründet (6).

Die Aufnahmedauer von zehn Minuten für L-[³H]Arginin in *Xenopus laevis*-Oozyten bei 20 °C Inkubationstemperatur für die beiden Transporter-Isoformen war bereits in unserer Arbeitsgruppe etabliert und konnte übernommen werden (130).

Die Aufnahmedauer für einen Aufnahmeversuch mit einer Inkubationstemperatur von 37 °C war in unserer AG nicht etabliert, sodass die Aufnahmedauer unter dieser Versuchsbedingung für beide Transporter experimentell durch Zeitverlaufsanalysen ermittelt werden musste. Nur Messungen im linearen Bereich der initialen L-[³H]Argininaufnahme spiegeln die Aktivität der Transporter wider.

Dazu wurde die Aufnahme wie beschrieben, durchgeführt und ihre Dauer in einem Intervall von einer bis 15 Minuten variiert. Es war hierbei wichtig, Inkubationszeiten für Folgeversuche zu finden, bei denen man zum einen noch gut handhabbare Inkubationszeiten hatte und man zum anderen noch im steilen Anstieg der Argininaufnahme, vor Einstellen eines Gleichgewichtszustandes zwischen L-[³H]Argininein- und -ausstrom, lag.

Graphisch und rechnerisch ließen sich so Aufnahmeintervalle von einer Minute für den hCAT-1 und von drei Minuten für den hCAT-2A als ideal ermitteln (Abbildung 6 und Abbildung 7). Auf den hCAT-1 bezogen lag das Aufnahmeintervall von einer Minute gerade noch so im steilen Anstieg der Datenkurve; ein kürzeres Aufnahmeintervall war auf die praktische Durchführbarkeit bezogen nicht umzusetzen.

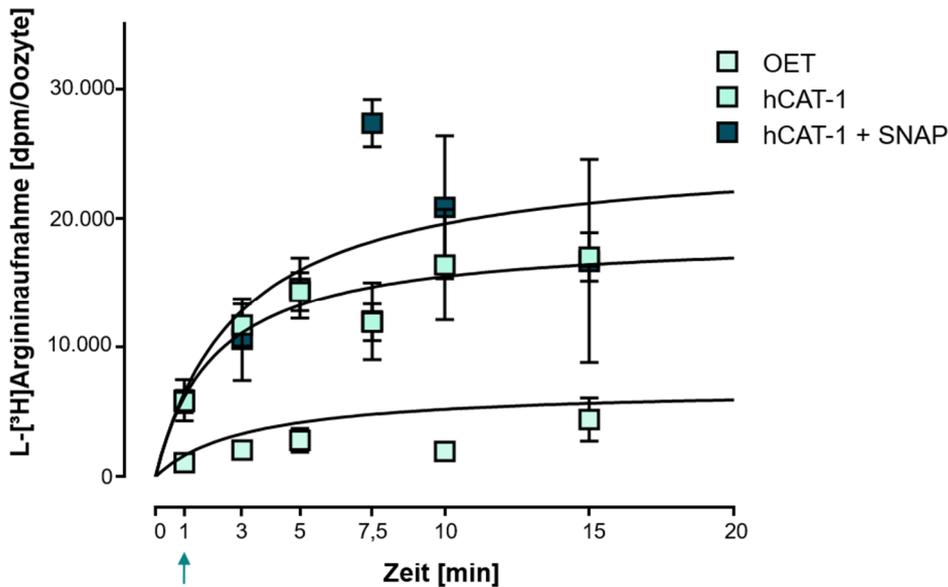


Abbildung 6: L-[³H]Arginintransport durch den hCAT-1 bei einer Inkubationstemperatur von 37°C in Abhängigkeit der Inkubationsdauer.

L-[³H]Argininaufnahme bei einer Inkubationstemperatur von 37°C in *Xenopus laevis*-Oozyten mit und ohne (ohne exogen exprimierten Transporter (OET)) Überexpression des hCAT-1s. hCAT-überexprimierende Oozyten waren unter (SNAP [100 µM]) und ohne NO-Donator-Exposition. Gezeigt wird der L-[³H]Arginintransport entsprechender Oozytengruppen bei unterschiedlichen Aufnahmeintervallen [Intervall 1-15 Minuten]. Die Inkubationsdauer von 1 Minute im steilen Anstieg der Argininaufnahme wurde als geeignet für weitere Versuche ermittelt.

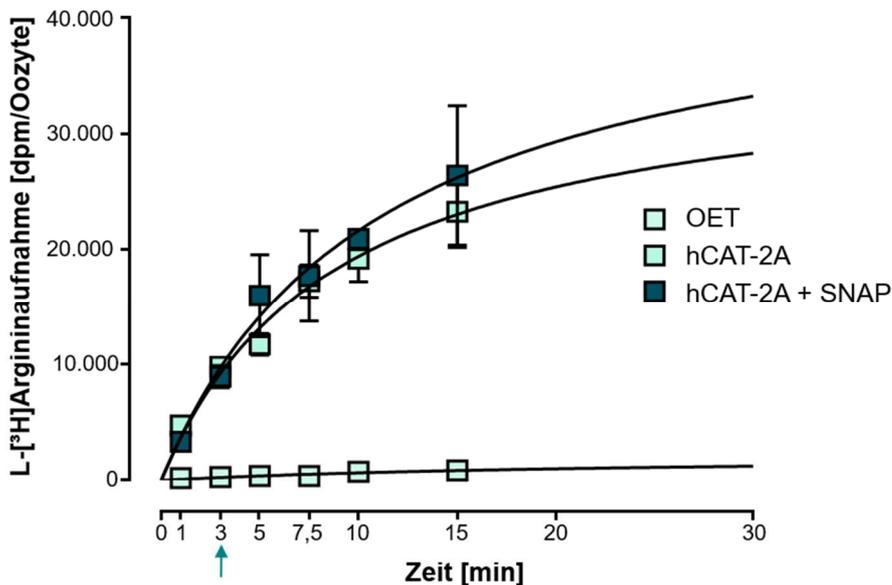


Abbildung 7: L-[³H]Arginintransport durch den hCAT-2A bei einer Inkubationstemperatur von 37°C in Abhängigkeit der Inkubationsdauer.

Versuchsdurchführung analog zu dem Versuch aus Abbildung 6 in *Xenopus laevis*-Oozyten mit und ohne (ohne exogen exprimierten Transporter (OET)) Überexpression des hCAT-2As. hCAT-überexprimierende Oozyten waren unter (SNAP [100 µM]) und ohne NO-Donator-Exposition. Gezeigt wird der L-[³H]Arginintransport entsprechender Oozytengruppen bei unterschiedlichen Aufnahmeintervallen [Intervall 1-15 Minuten]. Die Inkubationsdauer von 3 Minuten im steilen Anstieg der Argininaufnahme wurde als geeignet für weitere Versuche ermittelt.

4.1.1 Kein Einfluss einer Nitrosylierung auf den L-[³H]Arginin-Transport in *Xenopus laevis*-Oozyten

Anschließend erfolgten die Aufnahmeversuche in den bestimmten Aufnahmeintervallen unter und ohne Exposition der Oozyten gegenüber einer SNAP-Lösung, um den Einfluss von *NO* auf die Transporter untersuchen zu können.

Die Messwerte ergaben für den hCAT-1 weder bei einer Inkubationstemperatur von 20 °C ($p=0,684$), noch bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C ($p=0,853$) einen signifikanten Unterschied in der L-[³H]Argininaufnahme zwischen mit SNAP exponierten und nicht-exponierten Oozyten (Abbildung 8, Abbildung 9, Abbildung 10).

Ebengleiches Ergebnis ließ sich bei den hCAT-2A-exprimierenden Oozyten für beide Inkubationstemperaturen auf Signifikanzniveaus von $p=0,0827$ (20 °C) bzw. $p=0,079$ (37 °C) festhalten (Abbildung 8, Abbildung 9, Abbildung 10).

Die zugrundeliegenden Daten der gezeigten Abbildungen wiesen z. T. eine erhebliche Streuung auf. Dies ist in der Variation der Oozyten innerhalb einer Präparation, aber auch durch die Streuung zwischen den verschiedenen Oozytenchargen zu erklären. Durch die prozentuale Darstellung der L-[³H]Argininaufnahme bezogen auf die mittlere Argininaufnahme entsprechender Oozyten ohne exogen-exprimierte Transporter, wie sie in Abbildung 10 angewendet wurde, wird die Variation zwischen den einzelnen Oozytenchargen herausgerechnet; die Streuung innerhalb einer Präparation bleibt weiterhin sichtbar bestehen.

Die Abbildung 11 zeigt exemplarisch die Argininaufnahme in die Oozyten in nmol/h je eines Versuchstages sowohl bei 37 °C als auch bei 20 °C Inkubationstemperatur ohne Leerwertbereinigung durch Oozyten ohne exogen-exprimierte Transporter. Dies ermöglicht eine deutliche Visualisierung des Unterschieds in der Argininaufnahme zwischen Oozyten ohne exogen-exprimierte Transporter und hCAT-überexprimierender Oozyten, sowie eine Darstellung der Werte mit geringerer Streubreite, da die interspezifische Streuung zwischen verschiedenen Oozytenpräparationen entfällt.

Um sicherzustellen, dass der *NO*-Donator SNAP tatsächlich Stickstoffmonoxid freisetzt, wurde eine Funktionsprüfung des Donators im Organbadversuch durchgeführt. Werden konstringierte Gefäßpräparate einem suffizienten *NO*-Donator exponiert, ist mit einem Tonusverlust des Gefäßes zu rechnen: zuvor durch Norepinephrin konstringierte Maus-Aorten-Ringe lassen sich durch Zugabe von *NO* relaxieren.

Es wurde SNAP in Dimethylsulfoxid in steigender Konzentration gelöst und auf durch Norepinephrin konstringierte Maus-Aorten-Ringe gegeben; die halbmaximale Relaxation der Aorten konnte bei einer Konzentration von 83 nM SNAP erreicht werden (Abbildung 12). Dies ist mit Angaben aus der Literatur (131) vereinbar. Die *NO*-Freisetzung durch den *NO*-Donator SNAP mit der in den Aufnahmeversuchen eingesetzten Konzentration von 100 μ M SNAP ist damit verifiziert und eine Einflussnahme von *NO* auf den hCAT-Transport durch eine Exposition unter SNAP in dieser Konzentration möglich.

Eine direkte Bindung durch *NO* als Ligand in Form einer Nitrosylierung von Thiolen ist *de facto* nicht möglich (86).

NO ist lediglich in der Lage eine Nitrosierung an Thiyl-Radikale, also an der oxidierten Form eines Thiols, zu vollziehen.

Zusammenfassend ergibt sich aus den erhobenen Daten und dem fehlenden Hinweis eines Einflusses von *NO* auf die Transportleistung der beiden in *Xenopus laevis*-Oozyten überexprimierten hCAT-Isoformen die Schlussfolgerung, dass hCATs entweder keine Thiyl-Radikale besitzen, welche im Sinne einer Nitrosylierung durch *NO* direkt zu S-Nitrosothiolen umgewandelt werden können oder dass eine Nitrosylierung der Thiyl-Radikale ihrer Cysteinreste im gewählten Expressionssystem keine Rolle für ihre Transportfunktion spielt.

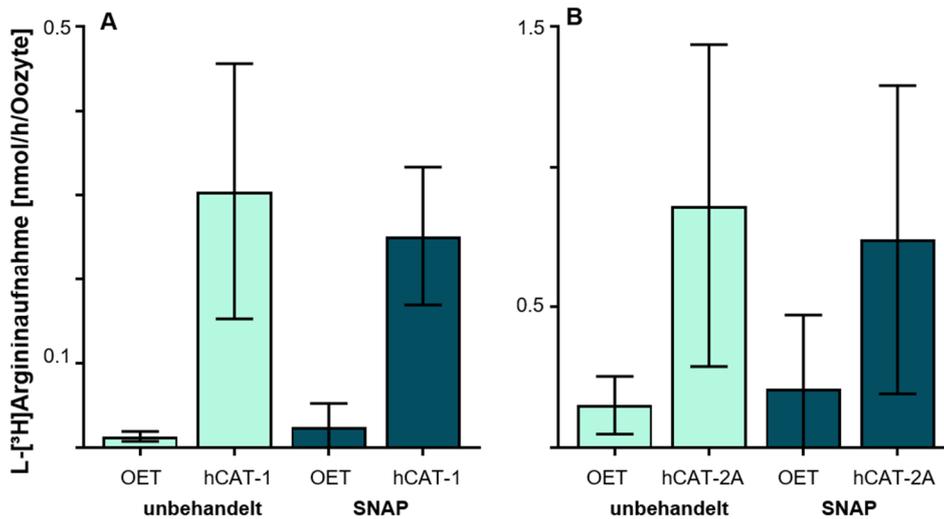


Abbildung 8: Absolutwerte der L-[³H]Argininaufnahme in nmol/h/Oozyte bei hCAT-überexprimierenden Oozyten und solchen ohne exogen-exprimierten Transporter unter und ohne *NO*-Donator-Exposition bei 20 °C Inkubationstemperatur.

hCAT-1- (A) oder hCAT-2A- (B) überexprimierende *X. laevis*-Oozyten und Oozyten ohne exogen exprimierten Transporter (OET) wurden mit und ohne 100 μ M SNAP und L-[³H]Arginin (100 μ M für hCAT-1 und 1 mM für hCAT-2A) für 15 Minuten inkubiert. Vorangehend erfolgte eine Vorinkubation über 10 Minuten unter beschriebenen Bedingungen für alle Gruppen.

Die Radioaktivität pro Oozyte wurde gemessen und die Zerfälle in aufgenommene Arginin-Menge in nmol pro Stunde und pro Oozyte umgerechnet. Die Säulen zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichung (n = 12 - 17 aus 3 verschiedenen Oozytenpräparationen).

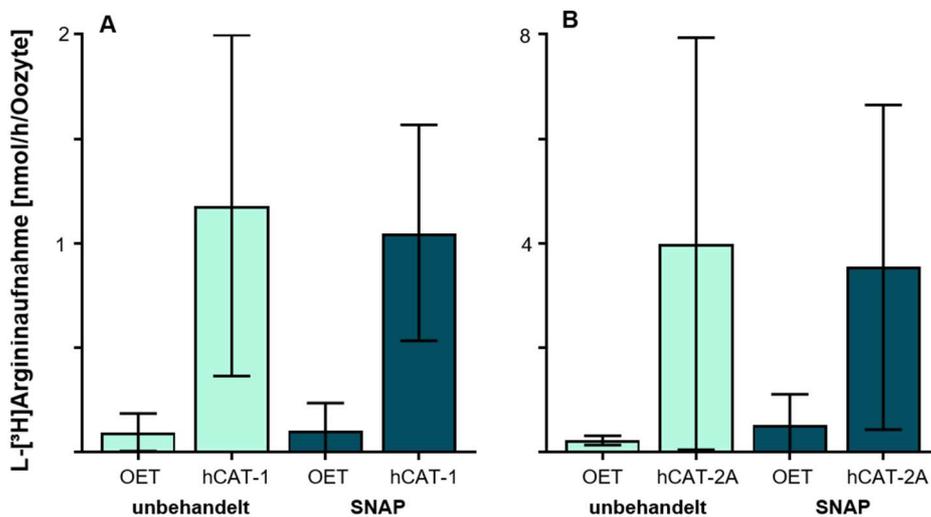


Abbildung 9: Absolutwerte der L-[³H]Argininaufnahme in nmol/h/Oozyte bei hCAT-überexprimierenden Oozyten und solchen ohne exogen-exprimierten Transporter unter und ohne *NO*-Donator-Exposition bei 37 °C Inkubationstemperatur.

hCAT-1- (A) oder hCAT-2A- (B) überexprimierende *X. laevis*-Oozyten und Oozyten ohne exogen-exprimierten Transporter (OET) wurden mit 100 μ M SNAP und L-[³H]Arginin (100 μ M für hCAT-1 und 1 mM für hCAT-2A) für 1 bzw. 3 Minuten inkubiert.

Die Radioaktivität pro Oozyte wurde gemessen und die Zerfälle in aufgenommene Arginin-Menge in nmol pro Stunde und pro Oozyte umgerechnet. Die Säulen zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichung (n = 13 - 16 aus 3 verschiedenen Oozytenpräparationen).

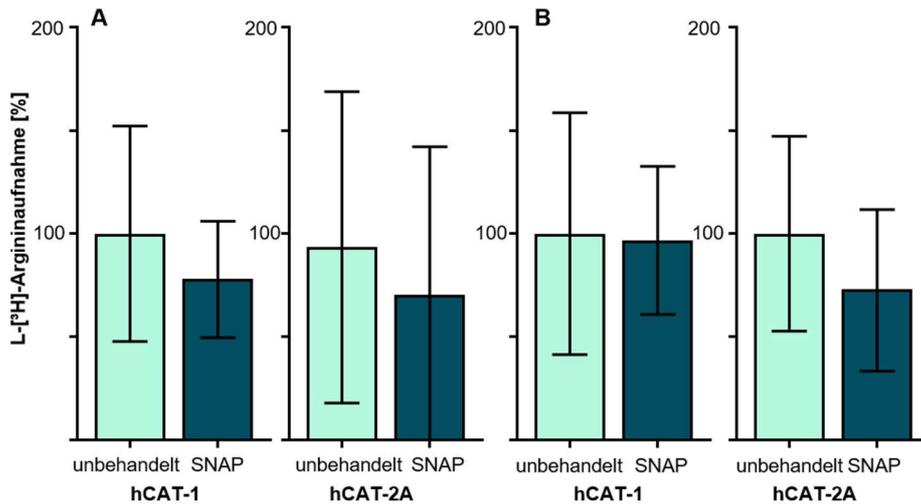


Abbildung 10: Prozentualer Anteil der L-[³H]Argininaufnahme aus den Messungen der Abbildung 8 und der Abbildung 9 bezogen auf die mittlere Aufnahme entsprechender Oozyten ohne exogen-exprimierten Transporter (OET).

Die L-[³H]Argininaufnahme der einzelnen Oozyten aus den in der Abbildung 8 (A) und der Abbildung 9 (B) gezeigten Versuchen wird durch die mittlere Aufnahme entsprechender Oozyten ohne exogen-exprimierte Transporter (OET) bereinigt und als prozentualer Anteil des Mittelwerts der entsprechenden OET-Oozyten dargestellt. Die Säulen zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n=13-16$ aus 3 verschiedenen Oozytenpräparationen). T-Tests ergaben keine signifikanten Unterschiede in der L-[³H]-Argininaufnahme zwischen unbehandelten und SNAP-behandelten Oozyten (in A: $p=0,684$ für hCAT-1; $p=0,0827$ für hCAT-2A; in B: $p=0,8533$ für hCAT-1; $p=0,0792$ für hCAT-2A).

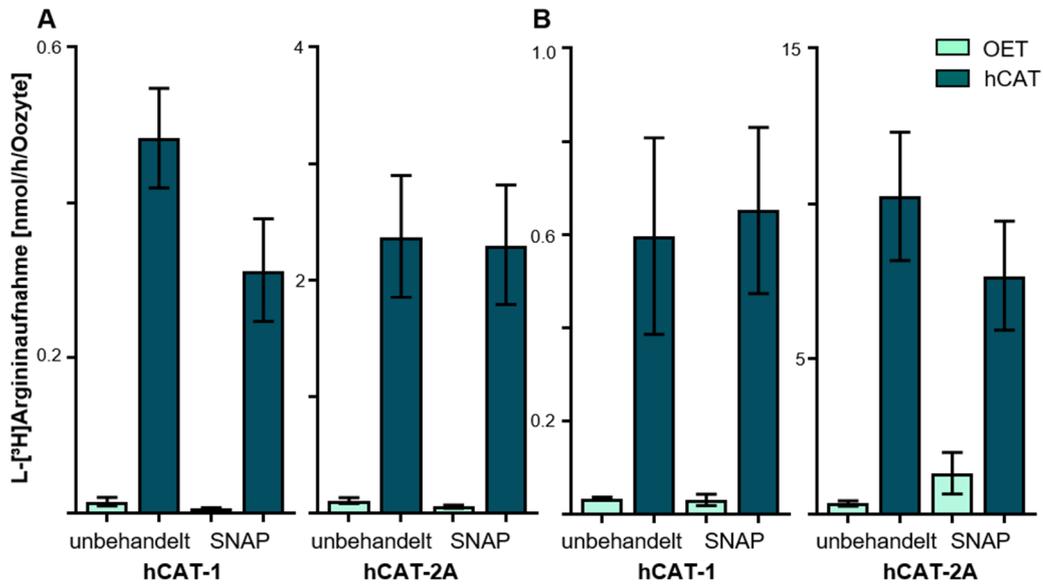


Abbildung 11: Absolutwerte der L-[³H]Argininaufnahme in nmol pro Stunde und pro Oocyte aus jeweils einer repräsentativen Oozytenpräparation aus der Abbildung 8 und der Abbildung 9.

Gezeigt ist die L-[³H]Argininaufnahme [nmol/h/Oocyte] von Oozyten ohne exogen-exprimierte Transporter (OET) und von hCAT-1- oder hCAT-2A- überexprimierenden *X. laevis*-Oozyten unter und ohne NO-Donator-Exposition.

Bei den Daten handelt es sich um Messwerte jeweils einer repräsentativen Oozytenpräparation aus den der Abbildung 8 (A) und der Abbildung 9 (B) zugrundeliegenden Versuchen.

Die Radioaktivität pro Oocyte und Stunde wurde gemessen; die Zerfälle in aufgenommener Arginin-Menge in nmol pro Stunde und Oocyte umgerechnet. Die Säulen zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichung. Es wird pro Ansatz jeweils ein repräsentativer Versuchstag aus jeweils einer Oozytenpräparation (n = 4 - 6) dargestellt.

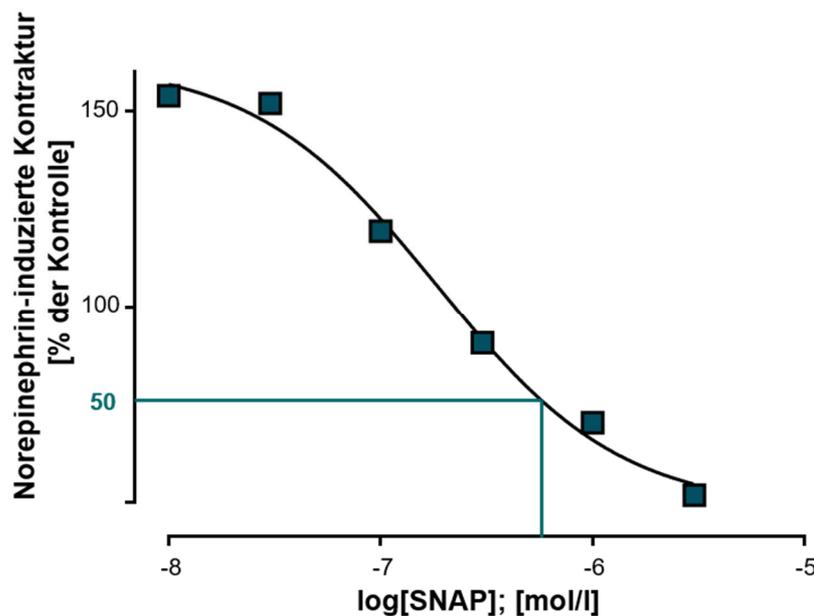


Abbildung 12: Relaxationskurve von durch Norepinephrin konstringierten Maus-Aorten-Ringen im Organbad nach Zugabe des NO-Donators SNAP in steigender Konzentration.

Die halbmaximale Relaxation kann für eine Konzentration von 83 nM SNAP angegeben werden.

4.1.2 Kein Einfluss einer (trans-) Nitrosierung auf den L-[³H]Arginin-Transport in *Xenopus laevis*-Oozyten

Wie bereits in Kapitel 2.3.1 dargelegt, kann die Bildung von S-Nitrosothiolen alternativ durch Nitrosierung, im Sinne einer direkten Reaktion eines Thiols in nicht oxidierte Form mit einem Nitrosoniumion (NO^+) bzw. mit einem NO^+ -Donor erreicht werden (86).

Unter Berücksichtigung der differenten Ergebnisse zwischen meinen Studiendaten und denen von *Zhou et al.* stellte sich die Frage, ob diese Nitrosierung möglicherweise in den Rattenkardiomyozyten, nicht aber in den *X. laevis*-Oozyten abgelaufen sein könnte. Es war experimentell zu prüfen, ob dieses Ergebnis nicht in dem Expressionssystem „Oozyte“ begründet lag, da möglicherweise in dem Expressionssystem „Rattenkardiomyozyte“ durch ein höheres Niveau an oxidativem Stress in Kardiomyozyten (132) im Gegensatz zu dem Niveau in Oozyten, das durch SNAP freigesetzte NO zu NO^+ oxidiert war.

Zum Erhalt von reaktionsausreichenden Nitrosoniumionen eignet sich deren Bereitstellung über das Zwischenprodukt des Distickstofftrioxids; *Daiber et al.* beschrieben, dass das Vorliegen von Stickstoffmonoxid und Superoxidanionen in einem Verhältnis von dreien-zu-einem Gewünschtes bereitstellt (90).

Um den Effekt einer derartig katalysierten S-Nitrosierung auf die Transportaktivität der hCATs - frei von der Fähigkeit des exprimierenden zellulären Systems, Distickstofftrioxid bereitzustellen - untersuchen zu können, wurde der bereits beschriebenen Versuchsablauf wie im Folgenden dargelegt, modifiziert.

Die Oozyten wurden einem Gemisch aus den Substanzen Sin-1, welches neben NO^+ auch eine äquimolare Menge an O_2^- zur Verfügung stellt, und SPENO, welches 2 mol NO freigibt, exponiert; es resultierte das geforderte Mengenverhältnis von dreien-zu-einem für Stickstoffmonoxid und Superoxidanionen zur Bildung von NO^+ .

Die so durchgeführten Aufnahme-Versuche zeigten keine signifikanten Unterschiede (hCAT1: $p=0,627$; hCAT-2A: $p=0,695$) zwischen den in der Kombination aus Sin-1 und SPENO exponierten Oozyten und der Kontrollgruppe ohne NO -Donatorzugabe (Abbildung 13, Abbildung 14, Abbildung 15).

Abbildung 15 zeigt in Analogie zu der Abbildung 11 die Argininaufnahme in die Oozyten in nmol/h einer Oozytenpräparation ohne Leerwertbereinigung durch Oozyten

ohne exogen-exprimierte Transporter. Dies dient auch hier einer deutlichen Visualisierung des Unterschieds in der Argininaufnahme zwischen Oozyten ohne exogen-exprimierte Transporter und hCAT-überexprimierenden Oozyten.

Den Beweis einer tatsächlich abgelaufenen Nitrosierung in den Oozyten durch die Zugabe der Substanzkombination aus Sin-1 und SPENO wurde durch eine HPLC-basierte Messmethode verifiziert.

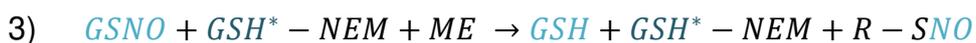
Der Messablauf wurde dabei an das Protokoll von *Tsikas et al. (128)* angelehnt, bei der die durch Nitros(yl)ierung in Glutathion (GSH) umgewandelte S-Nitrosoglutathion- (GSNO) Menge quantitativ bestimmt wurde.

Zugrunde liegend ist hier die Erkenntnis, dass NO^+ (bereitgestellt durch die Substanzkombination Sin-1 und SPENO) mit GSH zu GSNO reagiert.

Das entstandene GSNO lässt sich unter Zugabe von Mercaptoethanol (ME) in GSH zurückverwandeln, welches durch eine HPLC-basierte Messung quantifiziert werden kann.

Messungen an unbehandelten Kontrolloozyten ergaben eine endogene GSH-Menge von etwa 600 μM (608 - 638 μM) pro Oozyte, welches sich mit Angaben aus der Literatur deckt (133).

Das NO^+ (bereitgestellt durch die Substanzkombination Sin-1 und SPENO) reagierte mit einem Teil des endogen in den Oozyten vorhandenen GSHs zu GSNO (Reaktionsschritt 1); der Anteil an endogenem GSH, der nicht mit NO^+ reagierte, wurde durch das zu den Oozyten-Lysaten zugegebene NEM abgefangen (Reaktionsschritt 2) und von der Messung ausgeschlossen. Das aus der Reaktion zwischen NO^+ und endogenem GSH entstandene GSNO ließ sich unter Zugabe von Mercaptoethanol in GSH zurückverwandeln, welches durch eine HPLC-basierte Messung quantifiziert werden konnte (Reaktionsschritt 3).



GSH^* = Anteil an GSH, der nicht mit NO^+ reagiert hat

<i>Bedingung</i>	<i>GSH-Menge nach Zugabe von NEM und ME (Reaktionsschritt 3)</i>	
Oozyten _{nativ}	106,2 µM	129,27 µM
Oozyten _{+Sin-1/SPENO}	174,7 µM	189,83 µM
Oozyten _{+Sin-1/SPENO} - Oozyten _{nativ}	68,53 µM	60,67 µM

Tabelle 38: Ergebnisse der quantitativen GSH-Bestimmung in µM pro Oozyte.

Gemessen wurde die basale GSH-Menge in unbehandelten Oozyten (Oozyten nativ) und die GSH-Menge in Oozyten nach Exposition unter 1 mM Sin-1 und 1 mM SPENO jeweils nach NEM- und ME-Zugabe. Das durch Sin-1 und SPENO freigesetzte NO^+ wandelt endogenes GSH in der Oozyte in GSNO um; das hinzugegebene NEM bindet die Restmenge an GSH, die nicht in GSNO umgewandelt wurde und schließt sie von der quantitativen Messung aus. Das zugegebene ME wandelt das entstandene GSNO wieder in GSH zurück, welches chromatographisch quantitativ bestimmt werden kann. Die Differenz der gemessenen GSH-Menge in Oozyten ohne und unter Sin-1/SPENO-Exposition entspricht der GSH-Menge, welche durch Sin-1/SPENO in GSNO umgewandelt wurde (61 - 69 µM). In den vorliegenden Daten liegt dies in der Größenordnung von ca. 10% des endogenen GSHs.

Bei der Exposition der Oozyten unter 1 mM Sin-1/1 mM SPENO wurden ca. 10% des GSHs in GSNO (61 - 69 µM pro Oozyte; Tabelle 38) umgewandelt, welches als Beweis einer ausreichend abgelaufenen Nitrosierung zu werten ist (Abbildung 16).

GSNO ist in der Lage, NO^+ im Sinne einer Transnitrosierung auf andere Proteine zu übertragen; dazu sind GSNO-Mengen von mindestens 40 µM nötig (134). Die von uns gemessenen GSNO-Mengen >60 µM sind folglich für eine Transnitrosierung ausreichend.

Experimentell ist durch die erhobenen Daten gezeigt, dass eine Modulation der hCAT-Funktion in *X. laevis*-Oozyten weder durch Transnitrosierung noch durch Nitrosierung stattgefunden hat. Der Erklärungsansatz, dass in *X. laevis*-Oozyten möglicherweise eine Oxidation von NO zu NO^+ nicht abgelaufen sein könnte, eine Nitrosierung von Thiolen demzufolge unmöglich gewesen wäre, ist widerlegt. Die gemessenen Werte liefern den Beweis einer abgelaufenen Nitrosierung von GSH und belegen die Möglichkeit einer potenziellen Transnitrosierung.

Es ergibt sich, dass CATs weder direkt noch indirekt nitrosiert werden oder dass eine Bildung von S-Nitrosothiolen keine Auswirkung auf ihre Transportfunktion hat.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass weder NO noch NO^+ im Expressionssystem *X. laevis*-Oozyte einen Einfluss auf die Transportfunktion der hCAT-Isoformen -1 und -2A hat; weder durch eine **Nitrosylierung** noch durch eine **(trans-) Nitrosierung**.

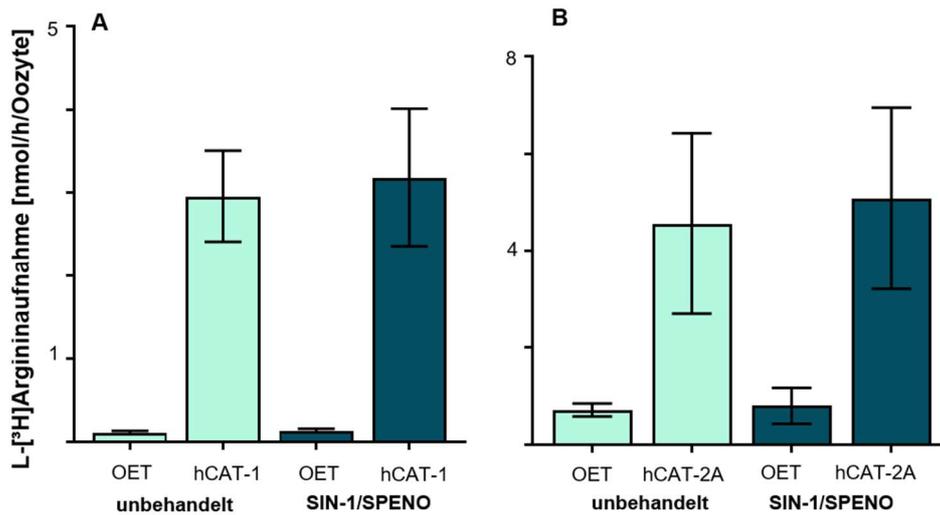


Abbildung 13: Absolutwerte der L-[³H]Argininaufnahme in nmol/h/Oozyte bei hCAT-überexprimierenden Oozyten und solchen ohne exogen-exprimierten Transporter unter und ohne Sin-1/SPENO-Exposition bei 37 °C Inkubationstemperatur.

hCAT-1- (A) oder hCAT-2A- (B) überexprimierende *X. laevis*-Oozyten und Oozyten ohne exogen exprimierten Transporter (OET) wurden mit je 1 mM Sin-1 und SPENO und L-[³H]Arginin (100 µM für hCAT-1 und 1 mM für hCAT-2A) 1 bzw. 3 Minuten inkubiert. Vorangehend erfolgte eine Vorinkubation über 10 Minuten unter beschriebenen Bedingungen für alle Gruppen.

Die Radioaktivität pro Oozyte und Stunde wurde gemessen und die Zerfälle in aufgenommene Arginin-Menge in nmol pro Stunde und pro Oozyte umgerechnet. Die Säulen zeigen Mittelwerte ± Standardabweichung (n = 6 aus einer Oozytenpräparation).

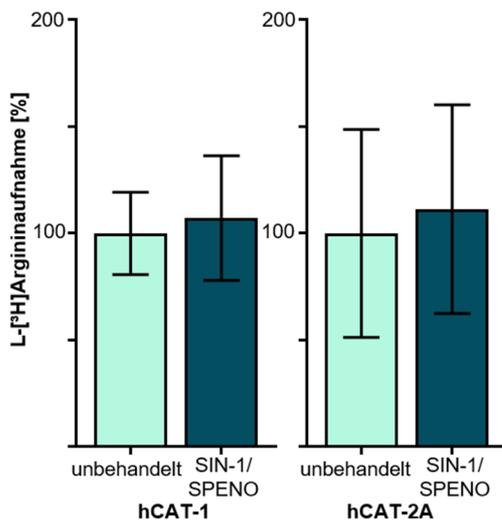


Abbildung 14: Prozentualer Anteil der L-[³H]Argininaufnahme aus den Messungen der Abbildung 13 bezogen auf die mittlere Aufnahme entsprechender Oozyten ohne exogen-exprimierten Transporter (OET).

Die L-[³H]Argininaufnahme der einzelnen Oozyten aus dem in der Abbildung 13 gezeigten Versuch wird von der mittleren Aufnahme entsprechender Oozyten ohne exogen-exprimierte Transporter (OET) bereinigt und als prozentualer Anteil des Mittelwerts der entsprechenden OET-Oozyten dargestellt.

Die Säulen zeigen Mittelwerte ± Standardabweichung (n = 6 aus einer Oozytenpräparation).

T-Tests ergaben keine signifikanten Unterschiede in der L-[³H]Argininaufnahme zwischen unbehandelten und Sin-1/SPENO-behandelten Oozyten (p = 0,6951 für hCAT-1; p = 0,6271 für hCAT-2A).

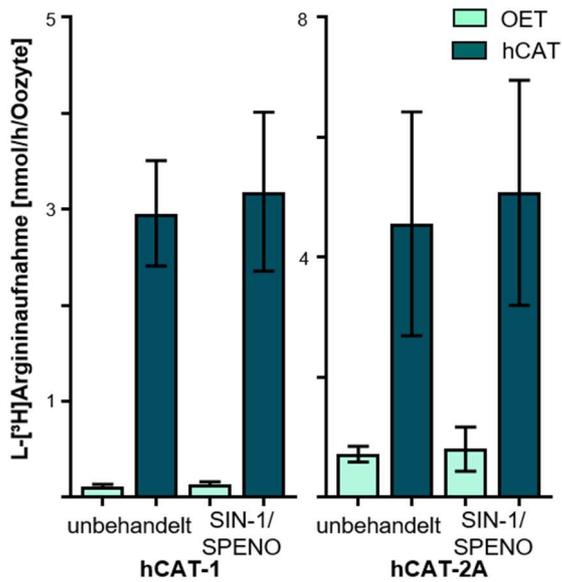


Abbildung 15: Absolutwerte der L-[³H]Argininaufnahme in nmol pro Stunde und pro Oozyte aus der Oozytenpräparation der Abbildung 13.

Gezeigt ist die L-[³H]Argininaufnahme [nmol/h/Oozyte] von Oozyten ohne exogen-exprimierte Transporter (OET) und von hCAT-1- oder hCAT-2A- überexprimierenden *X. laevis*-Oozyten unter und ohne Exposition unter Sin-1 und SPENO.

Die Radioaktivität pro Oozyte und Stunde wurde gemessen; die Zerfälle in aufgenommener Arginin-Menge in nmol pro Stunde und Oozyte umgerechnet. Die Säulen zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichung (n = 6 aus einer Oozytenpräparation).

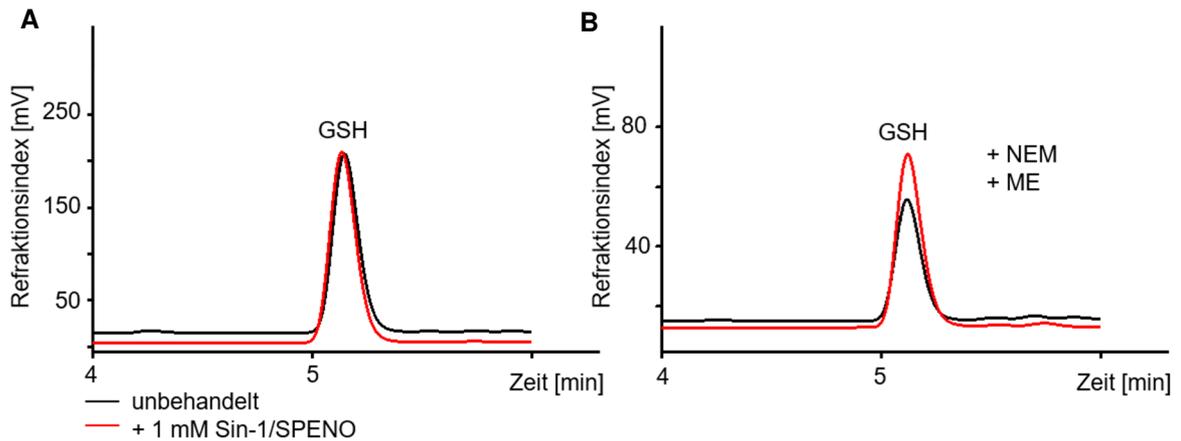


Abbildung 16: Repräsentatives HPLC-Chromatogramm mit GSH-Peaks.

A: Die Abbildung zeigt den HPLC-chromatographisch gemessenen Gesamt-GSH-Gehalt in den Lysaten hCAT-2A-überexprimierender *X. laevis*-Oozyten unter und ohne einer zehnmütigen Exposition unter je 1 mM Sin-1 und 1 mM SPENO vor der Lysatherstellung.

Eine Messung des GSH-Gehalts (Daten nicht gezeigt) in entsprechenden Oozyten-Lysaten unter Zugabe von 1 mM NEM, welches das endogen in den Oozyten vorhandene GSH bindet, diente der Leerwertbereinigung.

B: Die Abbildung zeigt den HPLC-chromatographisch gemessenen GSH-Gehalt in den Oozyten-Lysaten nach Zugabe von 1 mM NEM und 1 mM ME. ME wandelt das entstandene GSNO zurück in GSH, welches chromatographisch bestimmt werden kann.

Das GSNO, welches durch die Exposition unter Sin-1/SPENO entstanden ist, wurde durch Subtraktion des GSH-Peaks von Sin-1/SPENO-exponierten Oozyten nach NEM- und ME-Zugabe von dem entsprechenden GSH-Peak von unbehandelten Oozyten bestimmt. Auf diese Weise konnte der Hintergrund durch das endogen in der Oozyte vorhandene GSH und GSNO aus den Messergebnissen ausgeschlossen werden.

4.2 Bindungspartner für die CAT-Proteine

Viele Zellmembrantransportproteine sind für ihre Synthese, Translokation und Funktion auf einen ihnen assoziierten Bindungspartner angewiesen. Beispielsweise ist der LAT-1 in Bezug auf seine Translokation in die Zellmembran und teilweise für seine Funktionsfähigkeit von dem Glykoprotein „4F2hc“ abhängig (7). Ein ebengleicher Nachweis für Transporter der CAT-Familie steht bisher noch aus, wenngleich es auch Hinweise auf die Existenz eines solchen Bindungspartners für die CAT-Proteine gibt. Beispiele für diese Hinweise sind die experimentell bisher nicht geklärte Transportfunktion des SLC7A4s (135) oder die in Expressionsstudien beobachtete große Spannbreite der K_m -Werte der CATs (Tabelle 2) und weitere, in Kapitel 2.4.1 aufgeführte Aspekte.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Protokollschritte für die Suche nach einem solchen Bindungspartner für die CAT-Proteine zu entwickeln und durchzuführen.

Es war die Überlegung, einen den CATs assoziierten Bindungspartner durch massenspektrometrische Analysen zu finden. Für dieses Vorhaben musste ausreichend CAT-Protein und im besten Fall ausreichend interagierendes Protein gewonnen werden.

Dies sollte durch eine zellkulturbasierte Vervielfältigung des hCAT-1-Proteins und anschließender Aufreinigung dieses geschehen. Dazu wurde die genetische Sequenz des hCAT-1-Proteins mit einer Erkennungssequenz für ein Biotinylierungsenzym gekoppelt, sodass das *in vivo* exprimierte hCAT-1-Protein biotinyliert vorlag. Biotin bzw. biotinylierte Proteine lassen sich durch Streptavidin binden und in Western-Blot-Analysen sichtbar machen; sie können durch magnetische Avidinkügelchen gebunden und aufkonzentriert werden. Derartig aufkonzentrierte Proteinproben eignen sich für folgende massenspektrometrische Analysen.

Das Markieren von Zellproteinen durch Biotinylierung bietet den Vorteil, dass bisher nur fünf endogen biotinylierte Proteine [mitochondrial: Pyruvat-Carboxylase (130 kDa), 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase (75 kDa), Propionyl-CoA-Carboxylase (72 kDa) und zytoplasmatisch: Acetyl-CoA-Carboxylasen 1 (265 kDa) und 2 (280 kDa)] (136), bekannt sind, welche einen unspezifischen Hintergrund bei Streptavidin-Bindungen verursachen können (Abbildung 17).

Zum Erreichen des Zwischenziels eines geeigneten Vektorkonstrukts für das Endprodukt eines biotinylierten hCAT-1-Proteins wurden zwei Ansätze verfolgt;

- I. Simultantransfektion mit zwei Vektoren:
 - Vektor I codiert für das Zielprotein hCAT-1 mit im Leseraster angehängter Erkennungssequenz für ein Biotinylierungsenzym;
 - Vektor II codiert für ein Biotinylierungsenzym, das an die Erkennungssequenz bindet.
- II. Einfachtransfektion mit einem Vektor, codierend für den hCAT-1 mit im Leseraster angehängter Erkennungssequenz für ein Biotinylierungsenzym und codierend für ein Biotinylierungsenzym.

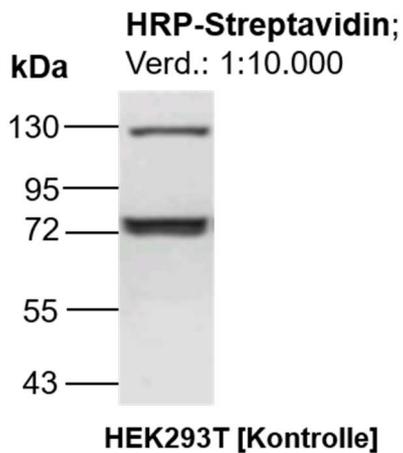


Abbildung 17: Western-Blot eines Lysates aus nicht transfizierten HEK 293T-Zellen.

Gezeigt wird der Ausschnitt eines repräsentativen Western-Blots aus nicht transfizierten HEK 293T-Zellen.

Auf das SDS-Gel wurden 30 µg Protein-Lysat aufgetragen.

Der Proteinnachweis erfolgte mit HRP-Streptavidin (Thermo Fisher Scientific) und zeigt zwei Signale als Korrelat von drei der fünf bekannten endogen biotinylierten Proteinen. Ein Signal findet sich auf der Höhe von 130 kDa (Pyruvat-Carboxylase) und ein Signal in Form einer Doppelsignalbande auf den Höhen 75 kDa (3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase) und 72 kDa (Propionyl-CoA-Carboxylase). Die Signale der Acetyl-CoA-Carboxylasen 1 (265 kDa) und 2 (280 kDa) waren nicht detektierbar.

4.2.1 Simultantransfektion mit den Vektorkonstrukten „hCAT-1-BAP-N1“ und „pCMV3-BirA“

Angelehnt an die Publikation von *Tenzer et al.* (137), die über einen *in-vivo*-Biotinylierungs-Pulldown-Quant-(iBioPQ) Ansatz das Auffinden eines Bindungspartners für deren Zielprotein RALY (RNA-bindendes Protein) beschrieben haben, orientierte ich mich an der dort skizzierten Klonierungsstrategie.

Die Basis dazu stellt eine Transfektion mit zwei unterschiedlichen Vektorkonstrukten dar, von denen ein Vektor den genetischen Code für eine prokaryotische Biotinligase „BirA“ und der andere in ein und demselben Leseraster die genetische Sequenz für ein Biotin-Akzeptor-Peptid (BAP) und eine Sequenz für das zu untersuchende Zielprotein (hier: hCAT-1) trägt. Das BAP-Molekül ist dabei im Sinne einer Erkennungsstelle für die Ligase „BirA“ zu verstehen.

Bei einer Simultantransfektion einer eukaryotischen Zelle mit beiden Plasmiden und deren erfolgreiche Translation in Protein sollte *in vivo* die Biotinylierung des mit der BAP-Sequenz-markierten Proteins durch die Biotin-Ligase „BirA“ erfolgen. In Bezug auf unsere Suche nach einem Bindungspartner für CAT-Proteine sollte der hCAT-1 mit der Erkennungssequenz „BAP“ markiert exprimiert und durch das Biotinylierungsenzym „BirA“ biotinyliert werden.



Abbildung 18: DNA-Sequenz des BAP-Peptides.

Die vorliegende Aminosäuresequenz codiert für das BAP-Peptid. Es ist eine Erkennungssequenz für die „BirA“-Ligase. Proteine, die mit BAP markiert sind, werden durch die Biotinligase „BirA“ biotinyliert.

4.2.1.1 Klonierungsstrategie

Für diesen Ansatz wurde mir der Expressionsvektor „pcDNA3-cyt-BirA“ (AG Tenzer, c = 0,97 ng/μl) von der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. rer. nat. S. Tenzer (Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Mainz) zur Verfügung gestellt. Er codiert für die Biotinligase „BirA“.

Zum Erstellen eines Vektors mit der codierenden Sequenz für den hCAT-1 mit am 3'-Ende angehängter BAP-Sequenz fiel die Wahl auf den Vektor „HC1-pEGFP-N1“ (Sabine Wolf, 22.09.09; c = 3,2 μg/μl) als Grundgerüst. Dieser Vektor codiert für ein hCAT-1-EGFP-Fusionsprotein. EGFP (verstärkt („*enhanced*“) grün fluoreszierendes Protein)

ist ein fluoreszenzemittierendes Protein, dessen Expression fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht werden kann. Durch die Fusion mit einem Zielprotein im Leseraster spricht ein positives Fluoreszenzsignal auch für die erfolgreiche Expression des angehängten Zielproteins. Derartige Fusionsproteine ermöglichen eine mikroskopische Kontrolle und Einschätzung der Erfolgsraten durchgeführter Transfektionen.

Die beiden Vektoren „pcDNA3-cyt-BirA“ und „hCAT-1-BAP-N1“ codieren beide für eine Geneticinresistenz zur Selektion in Säugerzellen. Bedingt durch die Nützlichkeit einer Selektion mit zwei differenten Selektionsantibiotika bei Simultantransfektion wurde die „BirA“-Sequenz aus dem Expressionsvektor „pcDNA3-cyt-BirA“ in den Vektor „Argl-pCMV3-C-OFPSpark“ (Sino Biological, 20.07.17, c = 2,39 µg/µl) kloniert.

Daraus resultierten folgende Resistenzen: gegen Geneticin für den „hCAT-1-BAP-N1“- und gegen Genemycin für den „pCMV3-BirA“-Vektor. Dies bedeutet, dass nur Zellen mit erfolgreicher Simultantransfektion unter doppeltem Selektionsdruck mit Geneticin und Genemycin wachsen konnten; fand eine frustrane oder eine Einfachtransfektion mit nur einem Vektor statt, fehlte der eukaryotischen Zelle eine bzw. beide Resistenzgene und sie ging zugrunde.

„hCAT-1-BAP-N1“

Aus dem Vektorkonstrukt „HC1-pEGFP-N1“ (Sabine Wolf, 22.09.09; c = 3,2 µg/µl) entfiel durch Restriktion mit den Endonukleasen „BamHI“ und „NotI“ die EGFP-codierende Sequenz und wurde durch eine für das BAP-Molekül-codierende Sequenz ersetzt (Abbildung 19).

Es resultierte der Vektor „hCAT-1-BAP-N1“ (Anastasia Hobbach, 29.11.18, c = 1,45 µg/µl).



Abbildung 19: Kloniertes Vektorkonstrukt „hCAT-1-BAP-N1“.

In Hellblau ist die codierende Sequenz für den hCAT-1 hervorgehoben. Durch Restriktion des Vektors „HC1-pEGFP-N1“ mit den Restriktionsenzymen „BamHI“ und „NotI“ entfiel das EGFP-Protein und ein Insertions-Fragment (in Türkis hervorgehoben), codierend für das „BAP“-Molekül (dunkelblau umrandet), wurde über die entsprechenden Restriktionsschnittstellen in den Vektor eingefügt. hCAT-1 und BAP liegen in einem Leseraster.

Die Pfeilspitzen markieren den Beginn und das Ende der Erkennungsstellen für die Restriktionsenzyme. Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet.

Die BAP-codierende Sequenz (Quelle: *Tirat et al., 2006, (138)*) mit passenden Restriktionsstellen für „*Bam*HI“ und „*Not*I“ wurde mittels ApE-Programms zusammengestellt und die entsprechenden Oligonukleotide durch die Firma StarSEQ (Mainz) generiert.

Es folgte eine Hybridisierung des für das BAP-codierende Oligonukleotids in Leserichtung mit dem komplementären Oligonukleotid nach beschriebener Methodik.

„pCMV3-BirA“

Der Vektor „pcDNA3-cyt-BirA“ enthält genau wie das Konstrukt „hCAT-1-BAP-N1“ die codierende Sequenz für eine Geneticinresistenz zur Selektion in eukaryotischen Zellen.

Dies erschwert die Selektion der Zellen bei Simultantransfektion, da eine Differenzierung zwischen frustraner Einfach- und erfolgreicher Doppeltransfektion bei den unter Selektionsdruck wachsenden Zellen nicht möglich ist. Aus diesem Grund erschien eine Umklonierung der für die Biotin-Ligase „BirA“-codierenden Sequenz in einen anderen Vektor mit differentem Resistenzgen zur Selektion in eukaryotischen Zellen notwendig.

Die Wahl fiel auf den Expressionsvektor „ArgI-pCMV3-C-OFPSpark“ (Sino Biological, 20.07.17, c=2,39 µg/µl) mit entsprechendem Resistenzgen gegen Genemycin. Dieser Vektor codierte ursprünglich für ein Fusionsprotein aus einer Arginase und dem OFP-Protein (Orange fluoreszierendes Protein). Letzteres hat als fluoreszenzemittierendes Protein dieselbe Funktion wie das zuvor charakterisierte EGFP-Molekül. Die Arginase ist das Enzym, welches im Harnstoffzyklus aus Arginin unter Entstehung von Harnstoff Ornithin herstellt (Abbildung 1).

Entscheidend für die Wahl für jenes Vektorgerüst war die Tatsache, dass dieser Vektor bereits passende Sequenzen für die Restriktionsenzyme „*Xba*I“ und „*Kpn*I“ besaß und dem gleichen Promotor (CMV) wie das „hCAT-1-BAP-N1“-Konstrukt unterlag.

Es wurde einerseits die codierende Sequenz für die „Arginase-OFP“ aus jenem Vektor und andererseits die codierende Sequenz für die Biotin-Ligase aus dem Vektor „pcDNA3-cyt-BirA“ mit oben genannten Restriktionsendonukleasen entfernt und die Biotin-Ligase in den Vektor „ArgI-pCMV3-C-OFPSpark“ unter Erhalt eines neuen Vektorkonstrukts mit der Bezeichnung „pCMV3-BirA“ (Anastasia Hobbach, 13.12.18, c=1,18 µg/µl) ligiert (Abbildung 20).

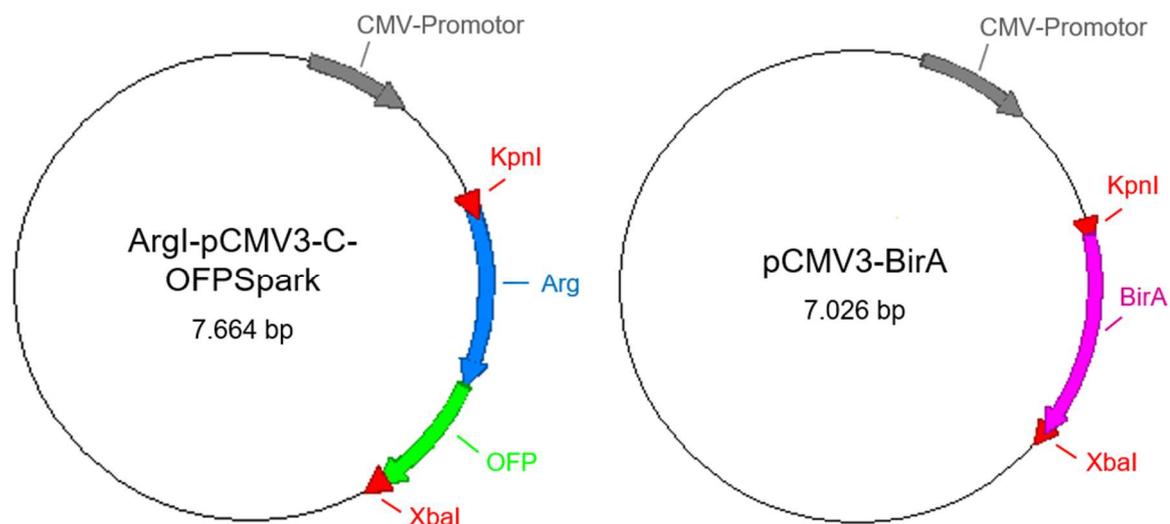


Abbildung 20: Vektorgerüst „ArgI-pCMV3-C-OFPSpark“ und Zielvektor „pCMV3-BirA“.

Die „Arginase-OFP“ wurde durch die Restriktionsendonukleasen „KpnI“ und „XbaI“ aus dem Vektor „ArgI-pCMV3-C-OFPSpark“ geschnitten und durch eine für die Biotinligase „BirA“ codierende Sequenz unter Erhalt des Zielvektors „pCMV3-BirA“ ersetzt.

4.2.1.2 Transfektionsstudien

Es erfolgten Transfektionsversuche mit dem Ziel einer Simultantransfektion eukaryotischer Zellen mit den Plasmiden „hCAT-1-BAP-N1“ und „pCMV3-BirA“.

Dies geschah mit Zellen der Zelllinie U373-MG als transiente Expression unter Zuhilfenahme der Transfektionsreagenzien Fugene® 6 und GeneJuice®.

Um indirekt Rückschlüsse auf die Transfektionseffizienz der Simultantransfektion ziehen zu können, wurden Kontrolltransfektionen mit Fusionsvektoren, die positive Fluoreszenzsignale emittierten, mitgeführt. Dies ermöglichte eine optische Kontrolle der Transfektion der Fusionsvektoren und zeigte, dass zumindest eine Transfektion mit diesen Vektoren nach angewandtem Transfektionsprotokoll stattgefunden hatte. Die Wahl fiel auf die verwendeten Klonierungsvektoren „HC1-pEGFP-N1“ (Sabine Wolf, 22.09.09; $c=3,2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) und „Arg1-pCMV3-C-OFPSpark“ (Sino Biological, 20.07.17, $c=2,39 \mu\text{g}/\mu\text{l}$), welche beide codierende Sequenzen für fluoreszenzemittierende Proteine (OFP und EGFP) enthalten.

Die Zellen der Kontrolltransfektionen zeigten 48 Stunden nach der Transfektion fluoreszenzmikroskopisch ein positives Signal (Abbildung 21), jeweils entsprechend einer Transfektionseffizienz von $>60\%$. Dies galt sowohl für die Ansätze mit dem Transfektionsreagenz Fugene® 6 als auch für solche mit GeneJuice®; es zeigte sich bezüglich der Auswahl der Transfektionsreagenzien optisch kein Unterschied in der Transfektionseffizienz.

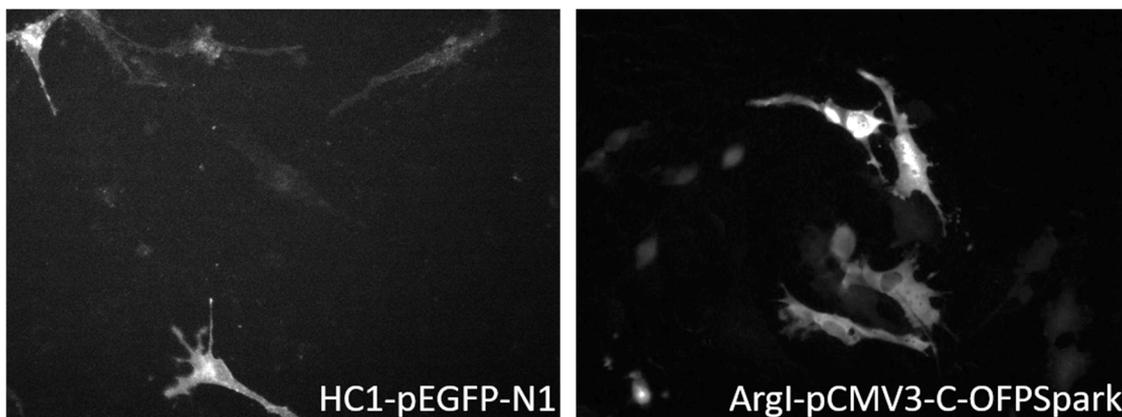


Abbildung 21: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Transfektionskontrollen.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen transfizierte Zellen der Zelllinie U373-MG. Sie wurden unter Zuhilfenahme des Transfektionsreagenz Fugene® 6 mit den Kontrollplasmiden „HC1-pEGFP-N1“ und „Arg1-pCMV3-C-OFPSpark“ transfiziert. Die vorliegenden Aufnahmen wurden 48 Stunden nach der Transfektion gemacht.

Nach einer Kultivierungsdauer von 48 Stunden erfolgte die Lysatherstellung aus den Transfektionsansätzen zur weiteren Western-Blot-Analyse durch sequenziellen Einsatz eines gegen den hCAT-1 gerichteten Antikörpers („HC1 aff. pur“ aus Kaninchen) und dem gegen Kaninchen gerichteten Antikörper „Goat-anti-rabbit IgG“ aus der Ziege zum Nachweis des hCAT-1-Proteins, sowie mit HRP-Streptavidin zum Nachweis einer stattgehabten Biotinylierung.

Die Western-Blot-Analysen der Lysate ergaben für die Einfachtransfektion mit dem Vektor „hCAT-1-BAP-N1“ und für die Simultantransfektion zusätzlich mit dem Vektor „pCMV3-BirA“ unter Verwendung der beschriebenen Antikörper zum Nachweis des hCAT-1-Proteins in beiden Fällen den positiven Nachweis eines Signals entsprechender Größe (türkisfarbener Pfeil in Abbildung 22). Rechnerisch wäre das „hCAT-1-BAP“ zwar auf einer Höhe von ~70 kDa zu erwarten gewesen, da jedoch keine Deglykosylierung des hCAT-1s stattgefunden hatte, erschien das „hCAT-1-BAP“-Protein bei einem höheren Molekulargewicht als errechnet und als unscharfes Signal (türkisfarbener Pfeil Abbildung 22). In beiden Lysaten fand sich etwa die gleiche Menge an „hCAT-1-BAP“-Protein.

In der Nachweisreaktion mit HRP-Streptavidin zeigte sich nur bei der Simultantransfektion mit beiden Plasmiden ein Signal entsprechend der Höhe des Signals durch den gegen den hCAT-1 gerichteten Antikörper (türkisfarbener Pfeil Abbildung 22). Dies beweist, dass der hCAT-1 in Zellen der Zelllinie U373-MG endogen nicht biotinyliert vorliegt, also nicht durch endogene Biotinligasen biotinyliert werden kann. Es ist die Schlussfolgerung zu ziehen, dass das zusätzliche Signal in der Spur der Simultantransfektion dem biotinylierten „hCAT-1-BAP“-Protein entspricht.

Der Nachweis mit HRP-Streptavidin erbrachte in allen Proben Signale entsprechend der Molekulargewichte von 130 kDa und 75 kDa. Diese entsprechen den endogen biotinylierten Proteinen Pyruvat-Carboxylase, 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase und Propionyl-CoA-Carboxylase.

Resultierend sind die Transfektionsversuche als erfolgreich zu werten; der hCAT-1 wird durch die Biotinligase „BirA“ biotinyliert.

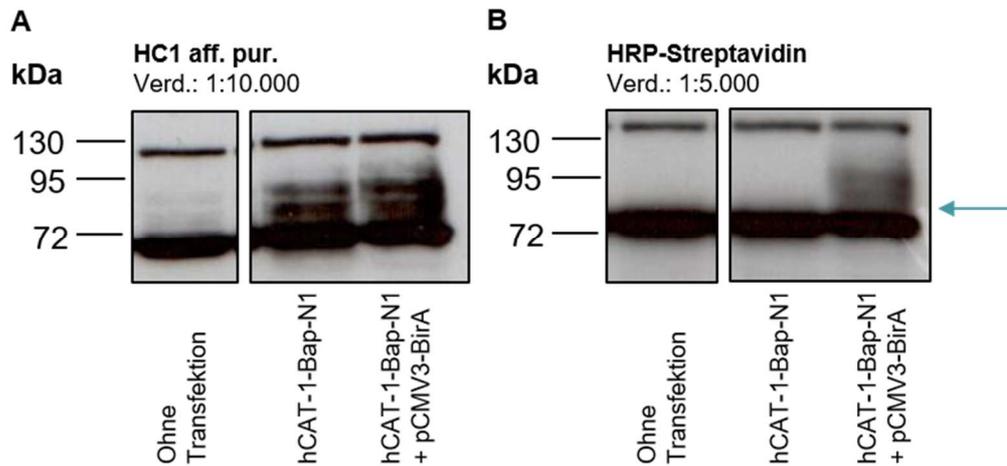


Abbildung 22: Western-Blot der transienten Expression der Plasmide „hCAT-1-BAP-N1“ und „pCMV3-BirA“.

Gezeigt wird der Ausschnitt eines repräsentativen Western-Blots aus transfizierten U373-MG-Zellen nach 48 Stunden der Kultivierung.

Auf das SDS-Gel wurden je Spur 30 µg Protein-Lysat aufgetragen. Keine der Proteinproben wurde deglykosyliert.

A: Die Proteine wurden entsprechend der Beschriftung mit „HC1 aff. pur“ (aus Kaninchen, J. Rupp), und „Goat-anti-rabbit IgG“ (gegen Kaninchen gerichtet, aus der Ziege, Calbiochem®, Merck) nachgewiesen. Die Höhe des hCAT-1-Proteins mit angehängter „BAP“-Sequenz ist durch einen türkisfarbenen Pfeil gekennzeichnet.

Der gegen den hCAT-1-gerichtete Antikörper erbrachte für die Einfachtransfektion mit dem Vektor „hCAT-1-BAP-N1“ und für die Simultantransfektion zusätzlich mit dem Vektor „pCMV3-BirA“ in beiden Fällen ein unscharfes Signal entsprechend des „hCAT-1-BAP“-Proteins (türkisfarbener Pfeil). In der Spur der Probe ohne Transfektion fehlt dieses Signal.

B: Die Proteine wurden entsprechend der Beschriftung mit „HRP-Streptavidin“ (Thermo Fisher Scientific) nachgewiesen. Es ließ sich in der Spur ohne Transfektion und in der Spur der Einfachtransfektion (nur „hCAT-1-BAP-N1“) kein Signal auf Höhe des „hCAT-1-BAP“-Proteins finden, da ohne Biotin-Ligase keine Biotinylierung des „hCAT-1-BAP“ stattgefunden hatte, auch nicht durch endogen vorhandene Biotinligasen. Die Simultantransfektion zeigte ein Signal auf der gleichen Höhe wie das Signal durch den gegen den hCAT-1-gerichteten Antikörper entsprechend der Höhe des „hCAT-1-BAP“-Proteins. Die Simultantransfektion mit beiden Plasmiden verlief erfolgreich; der mit BAP markierte hCAT-1 wurde durch die Biotinligase biotinyliert und über HRP-Streptavidin nachgewiesen.

Der Nachweis mit HRP-Streptavidin erbrachte in allen Proben Signale entsprechend der Molekulargewichte von 130 kDa und 75 kDa. Diese entsprachen den endogen biotinylierten Proteinen Pyruvat-Carboxylase, 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase und Propionyl-CoA-Carboxylase.

4.2.2 Einfachtransfektion mit dem Vektorkonstrukt „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“

Angelehnt an eine Publikation von *Ioannou et al. (136)* verfolgte ich zum Erhalt von biotinyliertem hCAT-1-Protein den Ansatz einer Einfachtransfektion mit einem Vektor, gleichzeitig codierend für den hCAT-1 mit im Leseraster angehängter Erkennungssequenz für ein Biotinylierungsenzym und für ein Biotinylierungsenzym.

Ioannou et al. (136) charakterisierten in ihrer Veröffentlichung zum Erreichen dieses Ziels den Expressionsvektor „C-FTA/hBirA-EGFP“.

Er stellt einen Fusionsvektor, basierend auf einem pBudCE4.1-Vektor (Life Technologies) dar, der bereits die codierende Sequenz für die humanisierte Biotin-Ligase „hBirA“, gekoppelt an ein EGFP-Protein, sowie einen Avi-Tag im Leseraster des Zielproteins (hier: „hCAT-1“) enthält (Abbildung 23).

Die Biotinligase „BirA“ ist ein bakterielles Enzym. Die Häufigkeit diverser Kodons variiert zwischen Eukaryoten und Prokaryoten; in der Folge zeigt die Translation von prokaryotischen Genen in Eukaryoten durch ein erhöhtes Vorkommen prokaryotischer Kodons häufig Schwierigkeiten (139). Der Zusatz „humanisiert“ in Bezug auf die Biotinligase „hBirA“ zeigt eine für Eukaryoten adaptierte Kodonwahl ihrer Sequenz an und soll den Translationserfolg in eukaryotischen Zellen und damit die Biotinylierungsrate positiv begünstigen (139).

Die exprimierte Biotinligase „hBirA“ kann *in vivo* über die Erkennungsstelle des Avi-Tags an das angehängte Zielprotein binden. Der Avi-Tag ist eine kommerziell hergestellte Aminosäure-Peptid-Erkennungssequenz aus 15 Aminosäuren (140). Sie wird von der Biotinligase „BirA“ erkannt und die von ihr markierten Proteine können in der Folge biotinyliert werden. Dies ermöglicht wiederum den Nachweis und die Aufreinigung der biotinylierten Proteine durch Avidin oder Streptavidin.

Die Expression von Enzym und Avi-Tag-markiertem Zielprotein ist durch ein- und denselben Vektor ohne Umweg über eine Simultantransfektion möglich.

Den codierenden Sequenzen für das Enzym und für das markierte Zielprotein sind zwei verschiedene Promotoren (ein CMV-Promotor für die Biotin-Ligase und ein EF1 α -Promotor für das gekoppelte Zielprotein) vorgelagert.

Eine Selektion des „C-FTA/hBirA-EGFP“-Vektors in Prokaryoten kann über eine Zeocin-, die Kultivierung in Säugerzellen über eine Geneticin-Resistenz erfolgen.

Der Expressionsvektor „C-FTA/hBirA-EGFP“ wurde uns von der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. John Strouboulis PhD (*Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation of Research & Technology Hellas, Heraklion, Griechenland*) zur Verfügung gestellt.

Für unsere Zwecke wurde in diesen Expressionsvektor die codierende Sequenz für den hCAT-1 aus dem bereits vorhandenen Konstrukt „HC1-pEGFP-N1“ (Sabine Wolf, 22.09.09; c = 3,2 µg/µl) kloniert.

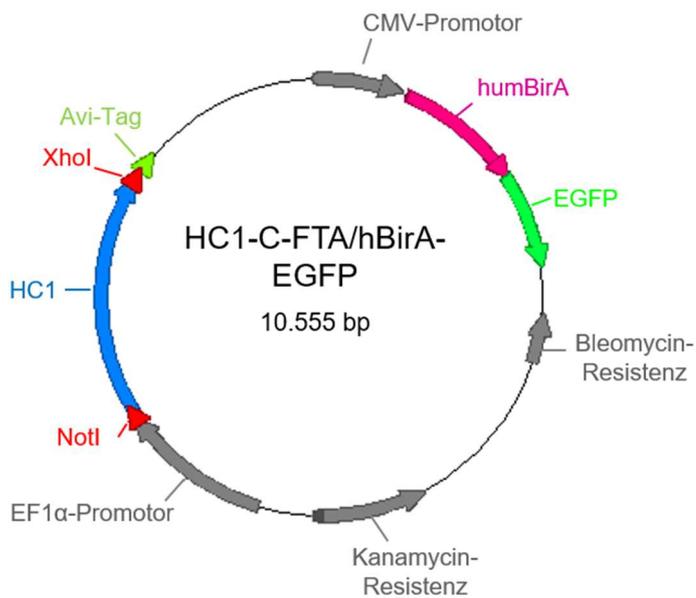


Abbildung 23: Vektorkonstrukt „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“.

Die Abbildung zeigt das Zielkonstrukt „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“ zum Erhalt des biotinylierten hCAT-1-Proteins. Farblich hervorgerufen ist die codierende Sequenz für die Biotinligase „hBirA“, für das daran gekoppelte EGFP-Protein, für den Avi-Tag und für die zur Klonierung des Zielproteins verwendeten Restriktionsstellen (*XhoI* und *NotI*). In Graustufen dargestellt sind die codierenden Sequenzen der Promotoren CMV und EF1α, sowie die der Selektionsresistenzen gegen Kana- und Bleomycin.

Die Biotinligase „hBirA“ kann über die Erkennungsstelle im Avi-Tag an das fusionierte Zielprotein binden und es biotinylieren.

Die Gesamtgröße des klonierten Vektors beläuft sich auf 10.555 Basenpaare.

Die Darstellung erfolgte mittels ApE-Programms.

4.2.2.1 Klonierungsstrategie



Abbildung 24: Insertion „hCAT-1“ für den Zielvektor.

Gezeigt ist die hCAT-1-codierende Sequenz (hier in Blau hervorgehoben) im Konstrukt „hCAT-1-EGFP-N1“ mit den Restriktionsstellen „AfeI“ und „SmaI“ (141).

Die Pfeilspitzen markieren den Beginn und das Ende der Erkennungsstellen für die Restriktionsenzyme. Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet.

Die Insertion „hCAT-1“ wurde mittels Restriktion durch die Restriktionsendonukleasen „AfeI“ und „SmaI“ isoliert (Abbildung 24). Beide Enzyme schneiden die DNA unter Entstehung von glatten Enden ohne Überhang. Dies bedingt, dass auch die Vektorstelle, an der hinein kloniert wird, geglättet vorliegen muss.

Liegen glatte Enden sowohl am 5- als auch am 3-Ende vor, findet statistisch betrachtet in der Hälfte der Fälle eine inverse Insertion des Insertion-Fragments bei Ligation beider DNA-Fragmente statt; hinzukommend besteht außerdem das Risiko einer Religation des Vektors ohne Integration der Insertion.

Der Vektor „C-FTA/hBirA-EGFP“ wurde an den für Klonierungen vorgesehenen Restriktionsstellen mit den Restriktionsendonukleasen „NotI-HF“ und „XhoI“ unter Entstehung von Enden mit Überhang geschnitten; es entfiel ein 31 bp langes Fragment, an dessen Stelle später der hCAT-1 kloniert wurde (Abbildung 25).

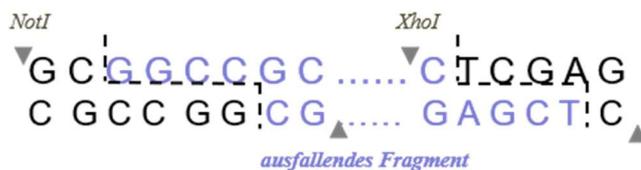


Abbildung 25: Ausschnitt aus dem Vektorkonstrukt „C-FTA/hBirA-EGFP“.

Die zur Klonierung verwendeten Restriktionsstellen „NotI“ und „XhoI“ sind markiert. In Blau hervorgehoben ist das ausfallende Fragment.

Die Pfeilspitzen markieren den Beginn und das Ende der Erkennungsstellen für die Restriktionsenzyme. Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet.

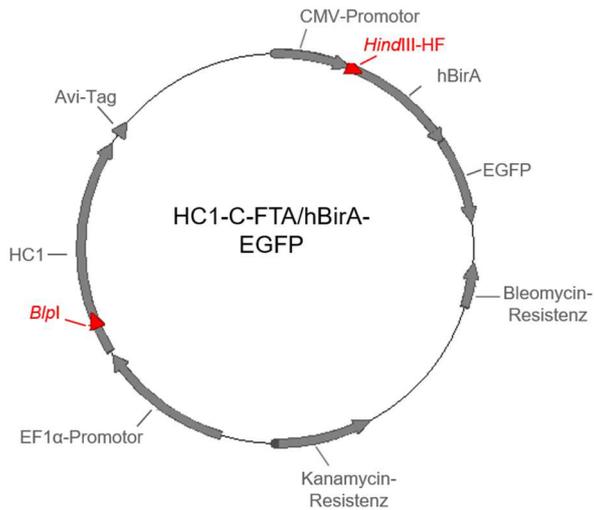


Abbildung 28: Vektor „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“ mit Restriktionsstellen „HindIII-HF“ und „BlnI“. Die Restriktion mit den Restriktionsendonukleasen „HindIII-HF“ und „BlnI“ teilt den Vektor „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“ in zwei Fragmente (6.607 bp und 3.948 bp).

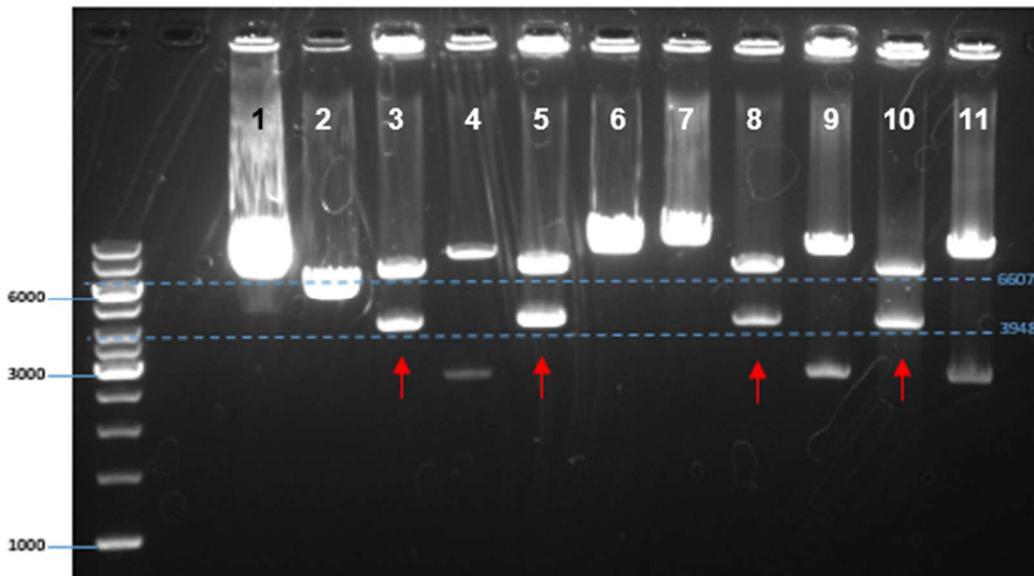


Abbildung 29: Beispiel einer gelelektrophoretischen Überprüfung des Klonierungsergebnisses auf die richtige Orientierung der Insertion.

(1): C-FTA/hBirA-EGFP ohne Insertion als Kontrolle; (2) - (11) DNA von unterschiedlichen Bakterienklonen nach Restriktion mit den Restriktionsendonuklease „HindIII-HF“ und „BlnI“.

Ergebnis: Kontrolle (1) linearisiert durch „HindIII-HF“; Proben (2), (6) und (7) ebenfalls linearisiert durch fehlende Insertion. Proben (4), (9) und (11): zwei Fragmente auf den Höhen von 7.895bp und 2.659bp durch inverse Integration der Insertion. Proben (3), (5), (8) und (10) zwei Fragmente auf den Höhen von 6.607bp und 3948bp bei korrekter Integration der Insertion (markiert durch rote Pfeile).

Sofern das Klenow-Fragment die Nukleotidstränge korrekt aufgefüllt hat, sollte wieder eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym „*Xho*I“ entstehen. Bei unzureichender Klenow-Reaktion würde diese fehlen. Um dies zu überprüfen, wurden alle DNA-Proben der Bakterienklone mit korrekter Insertion nach gelelektrophoretischer Auswertung in einer zweiten Restriktionsanalyse mit den Endonukleasen „*Hind*III-HF“ und „*Xho*I“ geschnitten (Abbildung 31).

Im Falle einer korrekten Klenow-Reaktion und Wiederherstellung der Schnittstelle für „*Xho*I“ ergaben sich dabei zwei DNA-Fragmente der Längen 8.214 bp und 2.341 bp (Abbildung 30) und im Falle einer unzureichenden Klenow-Reaktion durch das Fehlen der „*Xho*I“-Schnittstelle eine Linearisierung des Plasmids (10.555 bp).

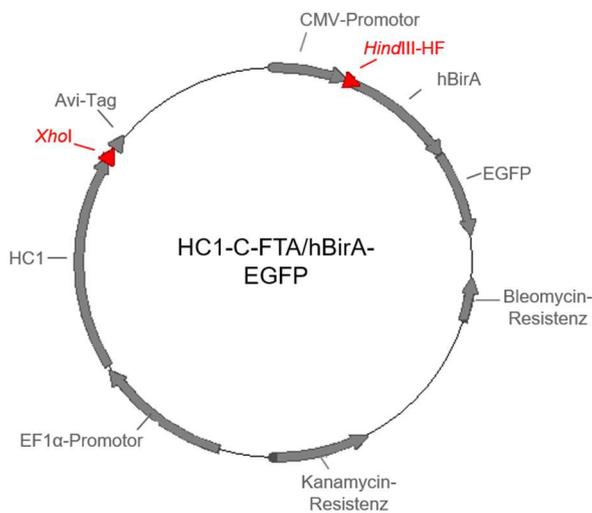


Abbildung 30: Vektor „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“ mit Restriktionsstellen „*Hind*III-HF“ und „*Xho*I“. Die Restriktion mit den Restriktionsendonukleasen „*Hind*III-HF“ und „*Xho*I“ teilt den Vektor „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“ in zwei Fragmente (8.214 bp und 2.341 bp).

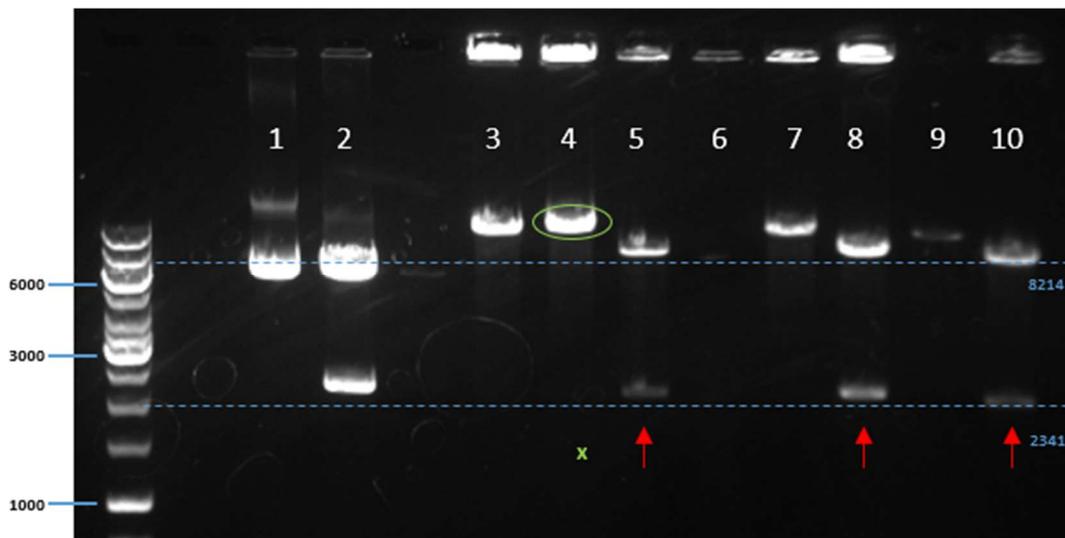


Abbildung 31: Beispiel einer gelelektrophoretischen Überprüfung auf eine vollständig-abgelaufene Klenow-Reaktion der Bakterienkolonien mit richtiger Orientierung der Insertion.

(1): „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“ ungeschnitten als Kontrolle; (2): „C-FTA/hBirA-EGFP“ ohne Insertion als Kontrolle; (3) - (10): DNA von unterschiedlichen Bakterienklonen nach Restriktion mit den Restriktionsendonuklease „HindIII-HF“ und „XhoI“.

Ergebnis: ungeschnittene Kontrolle (1): eine Bande; Kontrolle ohne Insertion (2): zwei DNA-Fragmente auf den Höhen 6.320 bp und 2.341 bp; Proben (3), (4), (7), und (9): linearisiert (10.555 bp) durch Fehlen der Schnittstelle „XhoI“ bei fehlerhafter Klenow-Reaktion; Proben (5), (8), (10): zwei Fragmente auf den Höhen 8.214 bp und 2.341 bp durch Vorhandensein der Schnittstelle „XhoI“ bei korrekt abgelaufener Klenow-Reaktion (durch rote Pfeile markiert).

In der Probe (4) (hier Grün markiert) wurde durch Sequenzanalyse das Fehlen der Base Thymin in der Restriktionsstelle für „XhoI“ nachgewiesen; damit ist die Restriktionsstelle für „XhoI“ unvollständig und das Restriktionsenzym kann dort nicht binden und die DNA nicht schneiden.

Anmerkung: Die Nummerierung der einzelnen Proben ist unabhängig von der Nummerierung des vorherigen Bildes.

Zum Ausschluss bestehender Mutationen im Übergangsbereich der Insertion in den Klonierungsvektor wurden die nach Restriktionsanalysen positiven Klone durch die Firma StarSEQ mit Hilfe des Oligonukleotids „HC1-AS1344-65“ sequenziert.

Für alle positiven Klone konnte ein positives Sequenzierungsergebnis verzeichnet werden.

Ich entschied mich dazu, den Klon „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP WIII-13“ in einer größeren Bakterienkultur anzusetzen und isolierte daraus größere Mengen DNA (HC1-C-FTA/hBirA-EGFP WIII-13, c = 1,05 µg/µl, 04.02.19) für folgende Transfektionsversuche.

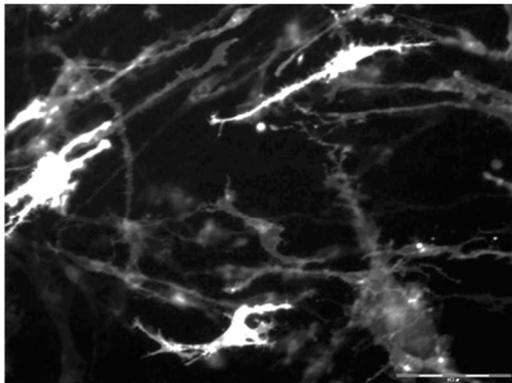
4.2.2.2 Transfektionsstudien

Es erfolgte der Transfektionsversuch mit dem Vektorkonstrukt „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“ (Anastasia Hobbach, 04.02.19, c = 1,05 µg/µl).

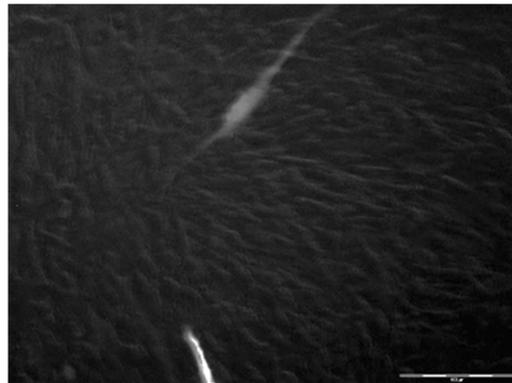
Zunächst wurden Transfektionsansätze mit den Transfektionsreagenzien Fugene® 6 und GeneJuice® angesetzt und U373-MG-Zellen transfiziert.

Die Transfektion der Säugerzellen mit den „C-FTA/hBirA-EGFP“-Konstrukt verlief trotz diverser Modulationen bezüglich Mengenverhältnissen und Transfektionsreagenzien frustan mit Transfektionseffizienzen unter 2% und damit deutlich unter dem Transfektionserfolg der Simultantransfektion mit den Vektoren „hCAT-1-BAP-N1“ und „pCMV3-BirA“ (Effizienz >60%).

Mitgeführte Kontrollen anderer Konstrukte zeigten Transfektionseffizienzen >85% (Abbildung 32), sodass die unzureichende Transfektion des „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“-Konstrukts in dem Konstrukt selbst und nicht in der angewandten Methodik zu suchen ist.



HC1-pEGFP-N1



HC1-C-FTA/hBirA-EGFP

Abbildung 32: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Transfektionen mit den Konstrukten „HC1-pEGFP-N1“ (Kontrolle) und „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“.

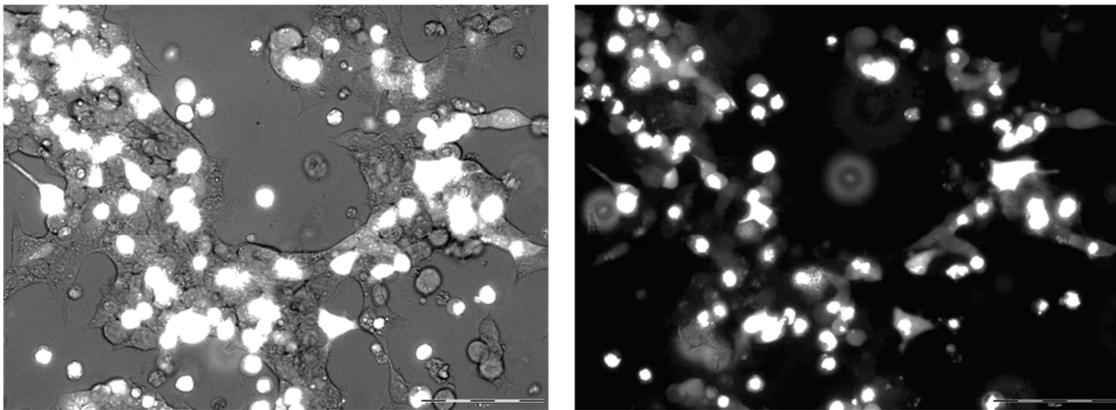
Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen transfizierte Zellen der Zelllinie U373-MG. Sie wurden unter Zuhilfenahme des Transfektionsreagenz Fugene® 6 mit dem Kontrollplasmid „HC1-pEGFP-N1“ und dem Konstrukt „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“ transfiziert. Die vorliegenden Aufnahmen wurden 48 Stunden nach der Transfektion gemacht.

Die Transfektionseffizienz mit dem HC1-pEGFP-Konstrukt liegt bei >85%; bei dem „HC1-C-FTA/hBirA“-Konstrukt <2%.

Als Lösungsstrategie wurde das Expressionssystem von den U373-MG-Zellen auf Zellen der Zelllinie HEK293T gewechselt. In diese lassen sich auch große Vektoren in der Regel gut transfizieren.

Die Methodik der Transfektion unter Zuhilfenahme von Transfektionsreagenzien führte auch bei diesem Expressionssystem nicht zum gewünschten Erfolg und die Transfektionseffizienz blieb unter $< 5\%$.

Alternativ wechselte ich auf ein Transfektionsprotokoll einer chemischen Transfektion nach der 1973 durch *Graham, Frank L.* und *Van der Eb, Alex J.* bekundeten Calcium-Phosphat-Präzipitations-Methode wie bereits in Kapitel 3.3.7 beschrieben; diese brachte für das „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“-Plasmid Transfektionseffizienzen von $> 80\%$ (Abbildung 33).



HC1-C-FTA/hBirA-EGFP

Abbildung 33: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Transfektionsansatzes „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen transfizierte Zellen der Zelllinie HEK293T. Sie erfolgten nach der Calcium-Phosphat-Präzipitations-Methode mit dem „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“-Konstrukt. Die vorliegenden Aufnahmen wurden 48 Stunden nach der Transfektion mit und ohne Hellfeld gemacht.

Die Transfektionseffizienz liegt bei $> 80\%$.

Western-Blot-Analysen (Abbildung 34) der Lysate entsprechend transfizierter Zellen zeigten im Vergleich zu Kontroll-Lysaten nicht transfizierter HEK293T Zellen sowohl durch den gegen den hCAT-1 gerichteten Antikörper als auch durch „HRP-Streptavidin“ (Thermo Fisher Scientific) ein zusätzliches Signal auf derselben Höhe von knapp unter 72 kDa (hellblaue Pfeile in der Abbildung 34).

Die Western-Blot-Analysen mit dem gegen den hCAT-1 gerichteten Antikörper detektierten in allen Lysaten den endogenen hCAT-1: in den glykosylierten Proben als un-

scharfes Signal mit einem Molekulargewicht von über 72 kDa (lilafarbener Pfeil in Abbildung 34 A) und deglykosyliert als scharfe Bande mit einem Tiefensprung auf etwa 55 kDa (pinkfarbener Pfeil in Abbildung 34 A). Ausschließlich in den Spuren mit dem transfizierten „HC1-C-FTA-hBirA/EGFP“-Konstrukt ließ sich nach der Deglykosylierung eine Doppelbande unterhalb der Höhe von 72 kDa durch den gegen den hCAT-1-gerichteten Antikörper finden (hellblauer Pfeil in der Abbildung 34 A). Der leichtere Teil der Doppelbande entspricht vermutlich dem erfolgreich transfizierten und Avi-Tag-markierten hCAT-1-Protein. Das Signal für die Transfektion VII ist hierbei deutlich schwächer als das Signal der Transfektion IX. Dies könnte an der längeren Kultivierungsdauer der Transfektion VII (70 Tage) und einem Rückgang der Expression des transfizierten Konstrukts liegen.

In der Nachweisreaktion mit HRP-Streptavidin zeigte sich nur in den Transfektionen mit „hCAT-1“-Insertion nach Deglykosylierung ein Signal entsprechend des Signals durch den gegen den hCAT-1-gerichteten Antikörpers auf der Höhe des hellblauen Pfeils in Abbildung 34 A (hellblauer Pfeil Abbildung 34 B). Dies entspricht vermutlich dem erfolgreich transfizierten und Avi-Tag-markierten hCAT-1-Protein. Dies beweist, dass der hCAT-1 in Zellen der Zelllinie HEK293T endogen nicht biotinyliert vorliegt, also nicht durch endogene Biotinligasen biotinyliert werden kann. Der positive Nachweis durch „HRP-Streptavidin“ zeigt eine erfolgreiche Biotinylierung des hCAT-1 durch die „hBirA“-Ligase.

Die Signale, die dem transfizierten hCAT-1-Protein entsprechen, sind sowohl durch den Nachweis mit dem gegen den hCAT-1 gerichteten Antikörper als auch durch HRP-Streptavidin schwächer als die entsprechenden Signale des endogenen hCAT-1 Proteins. Dies spricht entweder für eine tatsächlich geringere Menge an transfiziertem hCAT-1-Protein im Vergleich zu der Menge an endogenem hCAT-1 oder für eine erschwerte Bindung des getaggt und biotinylierten hCAT-1-Proteins an den eingesetzten Antikörper und an HRP-Streptavidin. Ob die Mengen des transfizierten hCAT-1-Proteins und einem ihm potenziell assoziierten Partnerprotein ausreichend für massenspektrometrische Folgeanalysen sind, kann, wie eingangs skizziert, durch Western-Blot-Analysen des z. B. über magnetische Avidinkügelchen aufgereinigten und aufkonzentrierten biotinylierten hCAT-1-Proteins eingeschätzt und über die Durchführung geplanter massenspektrometrischer Analysen verifiziert werden.

Der Nachweis mit HRP-Streptavidin erbrachte in allen Proben zusätzliche Signale entsprechend der Molekulargewichte von 130 kDa und 75 kDa. Diese entsprechen den

endogenen biotinylierten Proteinen Pyruvat-Carboxylase, 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase und Propionyl-CoA-Carboxylase.

Entsprechende Transfektionen sind als erfolgreich einzuordnen; der hCAT-1 wird durch die Biotinligase „hBirA“ biotinyliert.

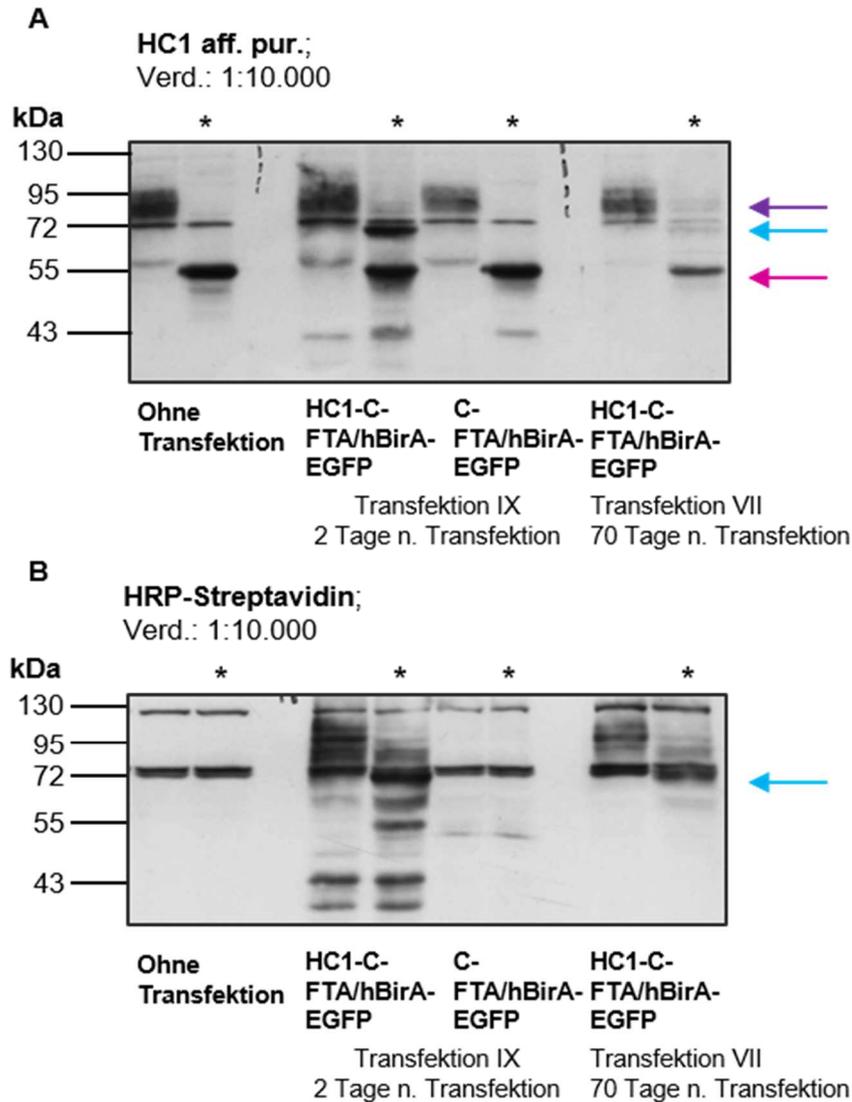


Abbildung 34: Western-Blot einer transienten Expression des „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“-Konstrukts und einer entsprechenden Kontrolle aus nicht transfizierten HEK 293T.

Gezeigt wird der Ausschnitt eines repräsentativen Western-Blots aus transfizierten HEK 293T-Zellen nach 48 Stunden (Transfektion IX) und nach 70 Tagen (Transfektion VII) der Kultivierung. Auf das SDS-Gel wurden je Spur 30 µg Protein-Lysat aufgetragen. Die Proteinproben mit „*“ wurden deglykosyliert.

A: Die Proteine wurden entsprechend der Beschriftung mit „HC1 aff. pur.“ (aus Kaninchen, J. Rupp) und „Goat-anti-rabbit IgG“ (gegen Kaninchen gerichtet, aus der Ziege, Calbiochem®, Merck) nachgewiesen. Der pinkfarbene Pfeil markiert die Höhe des endogenen hCAT-1-Proteins nach Deglykosylierung. Zu erkennen ist der deutliche Tiefensprung des hCAT-1-Proteins nach der Deglykosylierung im Vergleich zu den Spuren mit glykosyliertem hCAT-1-Protein (lilafarbener Pfeil).

Der hellblaue Pfeil liegt auf der Höhe des zweiten Teils einer Doppelbande, welche nur in den Spuren der deglykosylierten Transfektionen mit „hCAT-1“-Insertion im Vektor zu finden ist; in den Spuren ohne

Transfektionen oder in denen ohne hCAT-1-Insertion im Konstrukt fehlt dieses Signal. Es repräsentiert das hCAT-1-Protein mit angehängtem Avi-Tag. Das Signal für die Transfektion VII ist hierbei deutlich schwächer als das Signal der Transfektion IX. Die Spuren der Transfektion IX mit dem „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“-Konstrukt weisen auch unterhalb der 55kDa Signale auf; diese sind vermutlich auf Proteinabbau bei der Lysatherstellung zurückzuführen.

B: Die Proteine wurden entsprechend der Beschriftung mit „HRP-Streptavidin“ (Thermo Fisher Scientific) nachgewiesen.

Der hellblaue Pfeile markiert die Höhe des zweiten Teils der Doppelbande, welche nur in den Spuren der deglykosylierten Transfektionen mit dem „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“-Konstrukt und auf derselben Höhe wie das Signal durch den gegen den hCAT-1 gerichteten Antikörper zu finden ist; in den Spuren ohne Transfektionen oder in denen ohne hCAT-1-Insertion im Konstrukt fehlt dieses Signal. Es repräsentiert das biotinylierte hCAT-1-Protein mit angehängtem Avi-Tag.

Der Nachweis mit HRP-Streptavidin erbrachte in allen Proben Signale entsprechend der Molekulargewichte von 130kDa und 75kDa. Diese entsprechen den endogen biotinylierten Proteinen Pyruvat-Carboxylase, 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase und Propionyl-CoA-Carboxylase.

Die Signale, die dem transfizierten hCAT-1-Protein entsprechen, sind sowohl durch den Nachweis mit dem gegen den hCAT-1 gerichteten Antikörper als auch durch HRP-Streptavidin schwächer als die entsprechenden Signale des endogenen hCAT-1-Proteins. Dies spricht entweder für eine tatsächlich geringere Menge an transfiziertem hCAT-1-Protein im Vergleich zu dem endogenen hCAT-1 oder für eine erschwerte Bindung des getaggten und biotinylierten hCAT-1-Proteins an den eingesetzten Antikörper und an HRP-Streptavidin.

4.2.2.3 Vergleich der verwendeten Lyse-Puffer

Bei der Zelllyse der transfizierten Zellen kamen verschiedene Lysepuffer zur Anwendung, um ein für meine Versuchsziele ideales Lyse-Protokoll zu entwickeln. Der Anspruch an den gesuchten Lysepuffer bestand darin, die Zellen einerseits ausreichend lysieren und die hCATs hinreichend aus der Zellmembran solubilisieren zu können und andererseits darin, potenzielle Bindungspartner nicht von den hCATs abzulösen und gleichzeitig die Durchführung geplanter massenspektrometrischer Analysen nicht zu behindern.

Ein Vergleich der Western-Blot-Analysen der auf verschiedene Arten lysierten Zellen erbrachte keinen Unterschied bezüglich des Vorhandenseins und der Intensität der Protein-Signale zwischen den verschiedenen Lyse-Puffern (Abbildung 35). Bei allen Lyse-Methoden konnte markiertes hCAT-1-Protein durch einen gegen den hCAT-1 gerichteten Antikörper nachgewiesen werden; HRP-Streptavidin erbrachte auf der gleichen Höhe wie der hCAT-1-Antikörper ein positives Signal in den entsprechenden Proben unabhängig von der Art des eingesetzten Lysepuffers. Unabhängig von der Wahl des Lysepuffers fand sich biotinyliertes hCAT-1-Protein im Lysat.

Unterschiede zwischen den verschiedenen Lyse-Puffern bezüglich des Beibehaltens putativer Bindungspartner können nur durch geplante massenspektrometrische Messungen aufgezeigt werden.

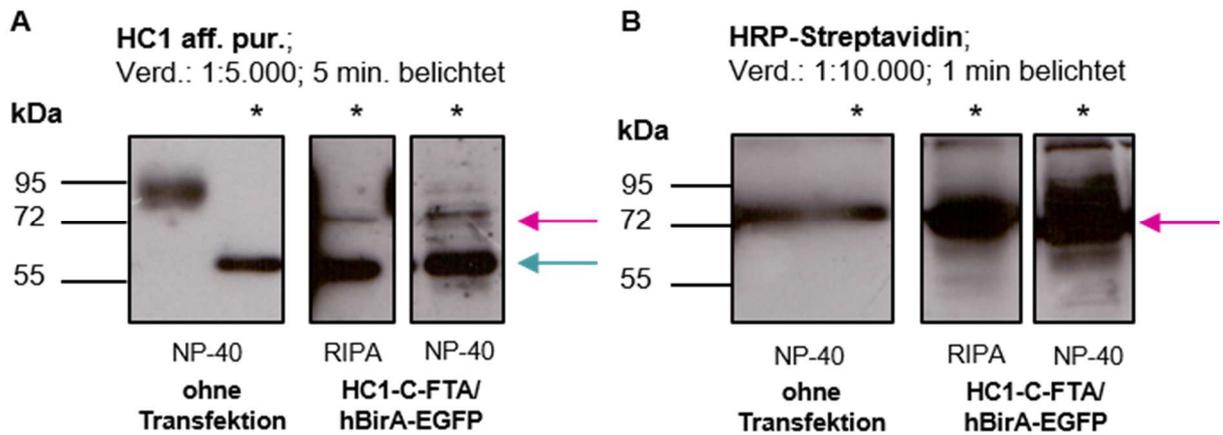


Abbildung 35: Western-Blot einer Transfektion mit dem „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“-Konstrukt von auf verschiedene Arten hergestellten Zell-Lysaten und einer entsprechenden Kontrolle aus nicht transfizierten HEK 293T.

Gezeigt wird der Ausschnitt eines repräsentativen Western-Blots aus transfizierten HEK293T-Zellen. Auf das SDS-Gel wurden je Spur 30 µg Protein-Lysat aufgetragen. Die Proteinproben mit „*“ wurden deglykosyliert. Die Zell-Lysate wurden entsprechend der Beschriftung in der Abbildung mit „RIPA“- oder „NP-40“-Puffer hergestellt.

A: Die Proteine wurden entsprechend der Beschriftung mit „HC1 aff. pur“ (aus Kaninchen, J. Rupp) und „Goat-anti-rabbit IgG“ (gegen Kaninchen gerichtet, aus der Ziege, Calbiochem®, Merck) nachgewiesen. Die Proben der HEK293T ohne Transfektion zeigen ein Signal auf der Höhe des endogenen hCAT-1-Proteins vor und nach Deglykosylierung. Zu erkennen ist der deutliche Tiefensprung des hCAT-1-Proteins nach der Deglykosylierung (türkisfarbener Pfeil) im Vergleich zu der Spur mit dem glykosylierten hCAT-1-Protein.

Der pinkfarbene Pfeil liegt auf der Höhe einer Bande, welche nur in den Spuren der deglykosylierten Transfektionen mit „hCAT-1“-Insertion im Vektor zu finden ist; in der Spur ohne Transfektion fehlt dieses Signal. Es repräsentiert das hCAT-1-Protein mit angehängtem Avi-Tag. Dieses Signal zeigt in der Intensität keinen Unterschied zwischen den auf verschiedene Weisen lysierten Zellen.

B: Die Proteine wurden entsprechend der Beschriftung mit „HRP-Streptavidin“ (Thermo Fisher Scientific) nachgewiesen.

Der pinkfarbene Pfeile liegt auf der Höhe einer Bande, welche nur in den Spuren der deglykosylierten Transfektionen mit dem „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“-Konstrukt und auf derselben Höhe wie das Signal durch den gegen den hCAT-1 gerichteten Antikörper zu finden ist; in der Spur ohne Transfektion fehlt dieses Signal. Es repräsentiert das biotinylierte hCAT-1-Protein mit angehängtem Avi-Tag.

Dieses Signal zeigt auch im Nachweis durch HRP-Streptavidin keinen Unterschied in der Intensität zwischen den auf verschiedene Weisen lysierten Zellen.

„RIPA“- und „NP-40“-Puffer sind beide in der Lage biotinyliertes hCAT-1-Protein aus der Zellmembran zu lösen.

4.2.2.4 Stabile Expression des transfizierten „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“-Konstrukts

Neben transienten Expressionen zur Gewinnung ausreichender Mengen an Zell-Lysat für weitere Versuche war das Bestreben gegeben, eine Zelllinie mit stabiler Expression mit dem Vektor „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“ zu etablieren.

Erfolgreich mit dem Plasmid „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“ transfizierte Zellen wurden mit Geneticin (Biochrom GmbH, Berlin) unter Selektionsdruck gesetzt. Es erfolgte nach wenigen Tagen der Kultivierung durchflusszytometrisch ein Sortieren der Zellen in Einzel- und Mischklone. Bei letzterem handelt es sich um eine Ansammlung mehrerer fluoreszenzpositiver Zellen, die den transfizierten Vektor an unterschiedlichen Stellen in ihr Genom integriert haben, aber in einem Kultivierungsgefäß aufgezogen werden. Es wurden insgesamt 192 Einzelklone in zwei 96-Lochplatten sortiert und ein Mischklon aus 6.200 Zellen auf eine 24-Lochplatte aufgeteilt.

Dies wurde am Paul-Klein-Zentrum für Immunintervention, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz für uns durchgeführt

Die Kultivierung der Einzelklone diente dazu, voneinander unabhängige Zellklone isoliert voneinander zu vervielfältigen. Die Einzelklone haben das transfizierte Plasmid an verschiedenen Stellen in ihre DNA integriert. Durch folgende Western-Blot-Analysen könnte man die Klone mit dem stärksten Signal für den biotinylierten hCAT-1 für geplante Folgeversuche auswählen.

Die Kultivierung der Einzelklone verlief frustran. Es wurde das Erreichen einer Zelllinie mit stabiler Expression („T7 Mischklon HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“) durch Kultivierung des Mischklons erreicht.

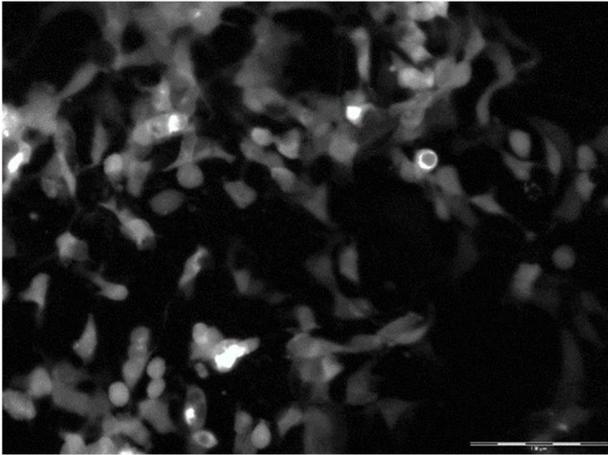


Abbildung 36: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Mischklons „T7 Mischklon HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“.

Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme zeigt den Mischklon „T7 Mischklon HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“ nach ca. 13 Wochen der Kultivierung unter Selektionsdruck mit 400 µg/ml Geneticin.

Zwischen 14 und 20 Wochen der Kultivierung und damit sieben Wochen der Kultivierung ohne Selektionsdruck erfolgte das Herstellen von Zell-Lysaten mit NP-40-Puffer und anschließender Western-Blot-Analyse nach beschriebener Methodik. Es zeigte sich ein Beibehalten der Signale des biotinylierten hCAT-1-Proteins in allen Proben. Selbst nach Beendigung des Selektionsdruckes bleibt das Signal bestehen (Abbildung 37). Die Intensität des Signals schien in allen Proben über den Zeitverlauf der Kultivierung konstant ausgeprägt. Durch Ladekontrollen mit Antikörpern gegen konstitutiv exprimierte endogene Proteine, könnte der Anteil jener Proteine in den verschiedenen Proben bestimmt und darüber der Anteil der überexprimierten hCAT-1-Proteine beurteilt werden. Dies würde einen Vergleich des Anteils an biotinyliertem hCAT-1-Protein in den verschiedenen Proben über den dargestellten Zeitverlauf ermöglichen.

Der Mischklon „T7 HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“ scheint das transfizierte Plasmid „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“ bis dato (05.08.2019) stabil in sein Genom integriert zu haben. Dies ermöglicht die Kultivierung von Zellen mit „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“-Konstrukt, ohne dieses vorher transfizieren zu müssen und erlaubt das Zellkultur-basierte Gewinnen von größeren Mengen an biotinyliertem hCAT-1-Protein für geplante massenspektrometrische Analysen.

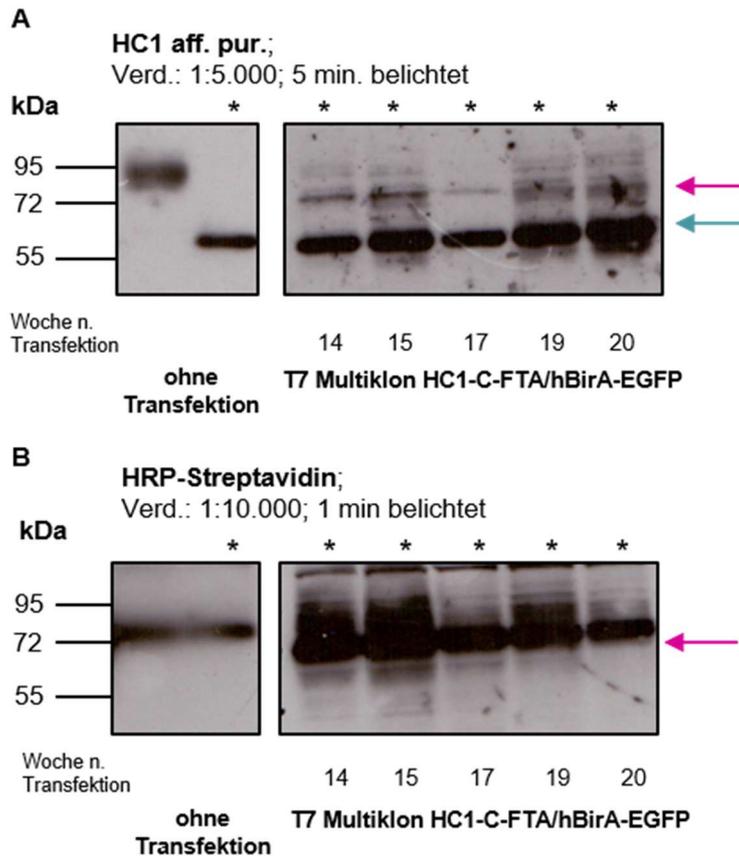


Abbildung 37: Western-Blot des Mischklons „T7 HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“ im Zeitverlauf und einer entsprechenden Kontrolle aus nicht transfizierten HEK 293T.

Gezeigt wird der Ausschnitt eines repräsentativen Western-Blots aus transfizierten HEK293T-Zellen. Auf das SDS-Gel wurden je Spur 30 µg Protein-Lysat aufgetragen. Die Proteinproben mit „*“ wurden deglykosyliert. Die Zell-Lysate wurden mit „NP-40“-Puffer hergestellt.

A: Die Proteine wurden entsprechend der Beschriftung mit „HC1 aff. pur“ (aus Kaninchen, J. Rupp) und „Goat-anti-rabbit IgG“ (gegen Kaninchen gerichtet, aus der Ziege, Calbiochem®, Merck) nachgewiesen. Die Proben der HEK293T ohne Transfektion zeigen ein Signal auf der Höhe des endogenen hCAT-1-Proteins vor und nach Deglykosylierung. Zu erkennen ist der deutliche Tiefensprung des hCAT-1-Proteins nach der Deglykosylierung (türkisfarbener Pfeil) im Vergleich zu der Spur mit dem glykosylierten hCAT-1-Protein.

Der pinkfarbene Pfeil liegt auf der Höhe einer Bande, welche nur in den Spuren der deglykosylierten Transfektionen mit „hCAT-1“-Insertion im Vektor zu finden ist; in der Spur ohne Transfektionen fehlt dieses Signal. Es repräsentiert das hCAT-1-Protein mit angehängtem Avi-Tag. Dieses Signal ist in allen Lysaten des Mischklons zu finden.

B: Die Proteine wurden entsprechend der Beschriftung mit „HRP-Streptavidin“ (Thermo Fisher Scientific) nachgewiesen.

Der pinkfarbene Pfeile liegt auf der Höhe einer Bande, welche nur in den Spuren der deglykosylierten Transfektionen mit dem „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“-Konstrukt und auf derselben Höhe wie das Signal durch den gegen den hCAT-1 gerichteten Antikörper zu finden ist; in der Spur ohne Transfektion fehlt dieses Signal. Es repräsentiert das biotinylierte hCAT-1-Protein mit angehängtem Avi-Tag.

Dieses Signal ist auch durch HRP-Streptavidin in allen Lysaten des Mischklons zu finden.

5 Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sich die Transportfunktion der hCATs durch eine Nitrosylierung oder (trans-) Nitrosierung unbeeinflusst zeigt.

Dies steht konträr zu den Erkenntnissen von *Zhou et al.* und soll im Folgenden kritisch diskutiert werden.

Die vorliegende Arbeit legt zudem Grundsteine für eine praktische Umsetzung für die Suche nach potenziell mit den kationischen Aminosäuretransportern assoziierten Interaktionsproteinen. Die Ergebnisse der hierbei verfolgten Strategien werden im Folgenden vorgestellt und beurteilt.

5.1 Fehlender Einfluss einer Nitros(yl)ierung auf die Transportleistung der hCAT-Proteine

Posttranslationale Proteinmodifikationsmechanismen stellen Umgestaltungsvorgänge an Proteinen nach ihrer Translation dar. Diese strukturellen Veränderungen sind nicht genetisch in der DNA codiert, aber für die Steuerung und Funktionsfähigkeit von Zellprozessen unabdingbar. Sie sind i. d. R. reversibel und erlauben darüber eine zielgerichtete und temporäre Wirkung.

Derzeit sind mehrere Hundert verschiedene Proteinmodifikationsmechanismen bekannt (142), zu denen auch die Addition von anorganischen Gruppen gehört. Als ein Beispiel ist der Mechanismus der S-Nitrosylierung zu nennen (143).

Eine S-Nitrosylierung meint die direkte Bindung von *NO* als Ligand an einen Thiol-Rest unter Ausbildung von S-Nitrosothiolen.

Zhou et al. zeigten 2010 mit ihrer Arbeit, dass eine Exposition von Sarkolemm-Vesikeln aus Kardiomyozyten der Ratte gegenüber *NO* zu einem Rückgang der Argininaufnahme in diese führt (6).

Es resultierte die These, dass dies über eine *NO*-vermittelte Hemmung durch S-Nitros(yl)ierung von Cysteinresten zuständiger Aminosäuretransporter (rCAT-1 und -2A) geschehen könnte.

Mit der Bestrebung diesen Mechanismus weiter aufzuschlüsseln, fand ich durch Aufnahmeversuche in hCAT-überexprimierenden *X. laevis*-Oozyten heraus, dass die von *Zhou et al.* beobachtete Hemmung in diesem Expressionssystem nicht zu reproduzieren war.

Im Umkehrschluss folgerte ich, dass die hCAT-1- und -2A-Transporter keine Thiyl-Radikale besitzen, welche zu S-Nitrosothiolen umgewandelt werden können oder dass diese keinen Einfluss auf die Transportleistung jener Transporter-Isoformen nehmen. Dargelegte Versuchsdaten zeigen ebengleiches für den Mechanismus einer potenziellen (trans-) Nitrosierung durch NO^+ an den Cysteinresten der Transporter.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass weder NO noch NO^+ im Expressionssystem *X. laevis*-Oozyte einen Einfluss auf die Transportfunktion der hCAT-Isoformen -1 und -2A hat; weder durch eine **Nitrosylierung** noch durch eine **(trans-) Nitrosierung**.

Im Anbetracht der Diskrepanz zwischen meinen experimentell gewonnen Erkenntnissen und denen von *Zhou et al.* stellt sich die Frage nach der Ursache für diese Abweichung. Mögliche Erklärungsansätze könnten in einem strukturellen Unterschied zwischen den CAT-Isoformen der verschiedenen Spezies (Mensch vs. Ratte), in der Wahl des Expressionssystems (*X. laevis*-Oozyte vs. Sarkolemmvesikel der Ratte) und dem damit einhergehendem Vorhandensein oder Fehlen notwendiger interagierender Proteine oder in den Schwächen der angewandten Methodik und in der Fehldeutung der gewonnenen Daten gefunden werden.

All diese Ansätze werden im Folgenden skizziert und bewertet.

5.1.1 Divergente Cysteinreste zwischen murinen und humanen CAT-Isoformen?

Ein möglicher Erklärungsansatz für die Kontrarität zwischen meinen Ergebnissen und denen von *Zhou et al.*, könnte die Tatsache sein, dass sich die murinen und humanen CAT-1- und -2A-Transporter in ihrer Sensibilität auf *NO/NO*⁺ unterscheiden. Dies würde bedingen, dass es einen strukturellen Unterschied, z. B. in der Anzahl ihrer für *NO* zugänglichen Cysteinreste, geben würde.

Im Anbetracht der bewiesenen hohen Konservierung zwischen den CAT-Isoformen verschiedener Säugetierspezies (5) scheint dies vorerst fraglich.

In der Tat zeigte ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der Isoformen hCAT-1 und -2, sowie rCAT-1 und -2 bezüglich der die NEM-Hemmung-vermittelnden Cysteinreste an den Positionen 33 und 273² eine eindeutige Konservierung im hCAT-1, hCAT-2A, rCAT-1 und rCAT-2A (violette unterlegt in der Abbildung 38). Damit können diese beiden Cysteinreste nicht für die in meinen Versuchen beobachtete ausbleibende Wirkung von *NO/NO*⁺ verantwortlich sein.

Insgesamt besitzt der hCAT-1 dreizehn, der hCAT-2 zwölf und die beiden rCAT-Isoformen-1 und -2 je vierzehn Cysteinreste (türkisfarben unterlegt in der Abbildung 38).

Davon sind neben den Cysteinresten an den Positionen¹ 33 und 273 sechs weitere Reste (an den Positionen¹ 4, 85, 264, 299, 347 und 428; violette-gestrichelte Umrandung in der Abbildung 38) in den humanen und murinen Isoformen CAT-1 und -2 konserviert. Sie scheiden als Wirkort für eine *NO*-vermittelte Hemmung aus, da sie in beiden Spezies vorhanden sind.

Die Ratten- und humanen CAT-1-Isoformen besitzen im Vergleich zu den beiden CAT-2-Isoformen sechs (an den Positionen³ 21, 196, 232 [228], 316 [311], 511 [506] und 628 [623]; blau-gestrichelte Umrandung in der Abbildung 38), die Ratten- und humanen CAT-2-Isoformen im Vergleich zu den beiden CAT-1-Isoformen drei exklusive Cysteinreste (an den Positionen¹ 13, 31 und 171; orange-gestrichelte Umrandung in der Abbildung 38). Sie können ebenfalls nicht an der selektiv in den rCAT-Isoformen beobachteten Hemmung durch *NO* beteiligt sein; sie zeigen jedoch

² Die Positionsangaben beziehen sich auf die Nummerierung der Aminosäuren im hCAT-2.

³ Die Positionsangaben beziehen sich auf die Nummerierung der Aminosäuren im hCAT-1; in eckigen Klammern stehen die Positionsangaben im rCAT-1, sofern sich diese vom hCAT-1 unterscheiden.

beispielhaft die hohe Konservierungsrate der CAT-Isoformen zwischen den humanen und murinen Spezies.

An der Position 539 des hCAT-1-Proteins findet sich ein Cysteinrest, der in den rCAT-Vertretern (im rCAT-1 an der Position 534, im rCAT-2 an der Position 236; grau-gestrichelte Umrandung in der Abbildung 38) konserviert ist, jedoch im hCAT-2 fehlt. Dieser Cysteinrest kann auch keine ausschließlich in rCAT-Isoformen beobachtete Hemmung durch *NO* erklären, da er auch in der humanen Isoform hCAT-1 vorhanden ist.

Der rCAT-1 besitzt einen spezifischen Cysteinrest an der Position 202 und der rCAT-2 vier exklusive Cysteinreste an den Positionen 438, 454, 620 und 657, welche nicht bei den entsprechenden humanen Isoformen vorhanden sind (in Rot umrandet in der Abbildung 38). Theoretisch wäre eine Nitros(yl)ierung jener Reste mit der Konsequenz einer Transporthemmung möglich.

Der Cysteinrest an der Position 202 im rCAT-1 ist intramembranös in der V. Transmembrandomäne lokalisiert. Da *NO/NO⁺* sich insbesondere intramembranös anreichern können, könnte dieser Cysteinrest einer Nitros(yl)ierung zugänglich sein und eine hohe Sensitivität des rCAT-1-Proteins auf *NO/NO⁺* bedingen.

Die spezifischen Cysteinreste des rCAT-2-Proteins liegen intrazellulär in der zehnten Schleife (Position 438 und 454) und C-terminal (Position 620 und 657). Sie wären topographisch ebenfalls einer Nitros(yl)ierung zugänglich.

Des Weiteren muss betont werden, dass die Bedeutung des rCAT-2A-Transporters in adulten Rattenkardiomyozyten unter physiologischen Bedingungen in der Literatur kontrovers betrachtet wird.

Simmons et al. postulierten 1996, dass die funktionell bedeutende Expression jenes Transporters nur in neonatalen Rattenkardiomyozyten und nur nach ausgeprägter Behandlung mit Zytokinen zu beobachten sei (144).

Konträr dazu zeigten *Lu et al.* 2009, dass in Herzmuskelzellen jener Spezies zwar CAT-2A-mRNA-Transkripte in einer Größenordnung von lediglich einem Drittel der Menge der nachweisbaren CAT-1-mRNA-Transkripte zu finden sind, der rCAT-2A jedoch eine 34x höhere Kapazität als der rCAT-1 aufweist, sodass dieser seine niedrige Menge an Transkript durch seine im Vergleich zum rCAT-2A höhere V_{max} überwinden kann (129).

Des Weiteren bedeutet eine geringe Menge an mRNA-Transkript nicht zwangsläufig auch eine geringe Menge an translatiertem Protein. Die Nettomenge eines Proteins in der Zelle zu einem definierten Zeitpunkt hängt zudem von der Translationsgeschwindigkeit seines Transkripts und seiner Stabilität ab. Zudem muss in Bezug auf die Menge an funktionstüchtigem Protein dessen Translokation am Zielort und im Fall einer Abhängigkeit von diesem Protein assoziierten Molekülen, deren Verfügbarkeit berücksichtigt werden.

Lu et al. berechneten 2009 auf Grundlage ihrer Untersuchungen der Transportaktivität von rCAT-1 und -2A für Lysin in Sarkolemmvesikeln (Kardiomyozyten der Ratte), dass unter physiologischen Plasmaspiegeln kationischer Aminosäuren (für Arginin, Ornithin und Lysin im humanen und murinen Organismus in einer Spannweite von 100 - 250 μM ; (145, 146)) 40 - 50 % der gesamten Transportaktivität dieser Aminosäuren über den rCAT-2A laufen (129). Unter der Annahme, dass alle Vertreter des γ^+ -Systems die kationischen Aminosäuren mit gleicher Effizienz transportieren (19), ergibt sich daraus eine kombinierte effektive Plasmakonzentration aller kationischen Aminosäuren von 0,6 mM (147). Unter einer derartig hohen Plasmakonzentration berechneten *Lu et al.* einen noch höheren Anteil des CAT-2As an der Gesamttransportleistung in einer Größenordnung von 62 % (129).

In den gezeigten Daten von *Zhou et al.* wird der Transport von Arginin unter physiologischen Argininkonzentrationen durch eine NO-Konzentration von 275 nM nur zu 33 % gehemmt (6). Nach den Berechnungen von *Lu et al.* teilt sich der Anteil am kationischen Aminosäuretransport zwischen den CAT-Isoformen-1 und -2A unter physiologischen Argininplasmakonzentrationen einem-zu-zwei Drittel auf (129). In Bezug auf den von *Zhou et al.* beobachteten Rückgang der Argininaufnahme um ein Drittel des Ausgangswertes bei einer Exposition der Zellen unter 275 nM NO, spricht dies den Autoren zufolge für eine selektive Hemmung des CAT-1-Proteins (6). Unter einer NO-Konzentration von 857 nM maßen *Zhou et al.* einen Rückgang des Arginintransports zu fast 60 %, welches den Autoren nach eine überwiegende Hemmung des CAT-2As impliziert (6). *Zhou et al.* erklärten sich diese selektiv von der NO-Konzentration abhängige Wirkung darüber, dass der CAT-2A gegenüber einer Hemmung mit NO resistenter als der CAT-1 sein muss (6).

Diese konzentrationsbedingte, selektive Hemmung der verschiedenen Transporterisoformen spricht gegen eine NO-vermittelte Hemmung über einen, den rCAT-1 und -2A gemeinsamen, aber in den rCAT-Isoformen spezifisch-vorkommenden Cysteinrest

und deckt sich mit der zu Anfang des Kapitels skizzierten Verteilung der Ratten- und humanen Cysteinreste in den CAT-Proteinen. Eine Hemmung müsste folglich über mindestens zwei verschiedene, nur in rCAT-Proteinen vorkommende Cysteinreste vermittelt werden. Die entsprechenden Cysteinreste müssten jeweils in nur einer rCAT-Isoform vorliegen; im rCAT-1 müsste es sich dabei um andere Cysteinreste als im rCAT-2A handeln.

Unter Berücksichtigung der bereits beschriebenen Aminosäurestruktur der beiden rCAT- und hCAT-Isoformen kommen dafür der Cysteinrest an der Position 202 im rCAT-1 und die Cysteinreste an den Positionen 438, 454, 620 und 657 im rCAT-2A in Betracht. Insbesondere die intramembranöse Lage des exklusiven Cysteinrests des rCAT-1-Proteins und der daraus vermuteten höheren Sensitivität gegenüber *NO/NO⁺* im Vergleich zu den Cysteinresten des rCAT-2-Proteins kommen mit der Beobachtung von *Zhou et al.*, dass der CAT-2A gegenüber einer Hemmung mit *NO* resistenter als der CAT-1 ist (6), überein.

Resümierend können divergente Cysteinreste zwischen Ratten- und menschlichen CAT-Isoformen als ursächlich für die konträren Ergebnisse bezüglich der *NO*-vermittelten Hemmung nicht ausgeschlossen werden. Durch Experimente nach dem Protokoll von *Zhou et al.* (6) mit rCAT-Proteinen mit Mutationen der exklusiven Cysteinreste an den entsprechenden Positionen (rCAT-1: Position 202; rCAT-2: Positionen 438, 454, 620 und 657), könnte die Bedeutung jener Cysteinreste für die von *Zhou et al.* beobachtete *NO/NO⁺*-vermittelte Hemmung der CAT-Transporter (6) untersucht werden. Würde durch eine Mutation entsprechender Cysteinreste die *NO/NO⁺*-vermittelte Hemmung der rCAT-Transporter ausbleiben, wären diese als verantwortlich für die *NO/NO⁺*-vermittelte Hemmung anzusehen.

Allerdings ist zu berücksichtigen, dass selbst unter der Prämisse der Existenz eines derartigen, rCAT-spezifischen Hemmmechanismus, die Relevanz in Bezug auf den Menschen und damit einem potenziellen therapeutischen Nutzen durch Hemmung der intrazellulären Argininaufnahme in z. B. CLL-Zellen und damit einem therapeutischen Nutzen in der humanen Tumorthherapie, nicht gegeben ist.

hCAT-1 -MGCKVLLNIGQQMLRRKVDC-SREETRLSR-LNTFDLVALGVGSTLGAGVYVLGAVA 58
rCAT-1 -MGCKNLLSLGQOTLRRKVDC-SREESRLSR-LNTYDLVALGVGSTLGAGVYVLGAVA 58
hCAT-2 MIFCRAALTFAKCLIRRKIVTLDLSLEDTKLCR-LSTMDLIALGVGSTLGAGVYVLAGEVA 60
rCAT-2 MIFCRAVLTFTRCCLIRRKIVTLDLSLEDSKLCR-LTTMDLIALGVGSTLGAGVYVLAGEVA 60

Position 33

hCAT-1 RENAGPAIVISFLIAALASVLAGLICYGEFGARVPKTSAYLYSYVTVGELWAFITGWNLII 118
rCAT-1 RENAGPAIVISFLIAALASVLAGLICYGEFGARVPKTSAYLYSYVTVGELWAFITGWNLII 118
hCAT-2 KADSGPSIVVSFLIAALASVMAGLCYAEFGARVPKTSAYLYTYVTVGELWAFITGWNLII 120
rCAT-2 KADSGPSIVVSFLIAALASVMAGLCYAEFGARVPKTSAYLYTYVTVGELWAFITGWNLII 120

II III

hCAT-1 LSYIIGTSSVARAWSATFDELIGRPIGEFSRTHMTLNAPGVLAENPDIFAVIIILITGL 178
rCAT-1 LSYIIGTSSVARAWSATFDELIGKPIGEFSRQHMLNAPGVLAQTPDIFAVIIIIITGL 178
hCAT-2 LSYVIGTSSVARAWSGTFDELLSKQIGQFLRITYFRMNYTG-LAEYPDFFAVCLILLLAGL 179
rCAT-2 LSYVIGTSSVARAWSGTFDELLNKQIGQFFKTYFKMNYTG-LAEYPDFFAVCLVLLLAGL 179

IV

hCAT-1 LTLGVKESAMVNKIFTICINVLVLGFIMVSGFVKGSVKNWQLTEDFGNTSGRIICL-NNDT 237
rCAT-1 LTLGVKESAMVNKIFTICINVLVLCFIMVSGFVKGSIEHWQLTENK----SSPLCG-NNDT 233
hCAT-2 LSFQVKESAWVNKVFVAVNIVLVLVFMVAGFVKGNVANWKISEEFLKNISASAREPPSEN 239
rCAT-2 LSFQVKESAWVNKFFTAIVNIVLVLVFMVAGFVKGNVANWKISEEFLKNISASAREPPSEN 239

V Position 202

hCAT-1 KEGKPGVGGFMPFGFSGVLSGAATCFYAFVGFDCIATTGEEVKNPQKAI PVGIVASLLIC 297
rCAT-1 -NVKYEGGGFMPFGFSGVLSGAATCFYAFVGFDCIATTGEEVKNPQKAI PVGIVASLLIC 292
hCAT-2 GTSIYGAGGFMPYGFGTGLAGAATCFYAFVGFDCIATTGEEVRNPQKAIPIGIVTSLLVIC 299
rCAT-2 GTSIYGAGGFMPYGFGTGLAGAATCFYAFVGFDCIATTGEEVRNPQKAIPIGIVTSLLVIC 299

VI Position 273 VII

hCAT-1 FIAYFGVSAALTLMMPYFCLDNNSPLPDAFKHVGWEGAKYAVAVGSLICALSALLGSMFP 357
rCAT-1 FIAYFGVSAALTLMMPYFCLDTSPLPGAFAKYRGWEEAKYAVAVGSLICALSTSLGSMFP 352
hCAT-2 FMAYFGVSAALTLMMPYLLDEKSPLPVAFEYVWGPAKYVVAAGSLICALSTSLGSIIFP 359
rCAT-2 FMAYFGVSAALTLMMPYLLDEKSPLPVAFEYVWGPAKYVVAAGSLICALSTSLGSMFP 359

VIII

hCAT-1 MPRVIYAMAEDGLLFKFLANVNDRTKTPIIATLASGAVAAMAFDLKDLVDLMSIGTL 417
rCAT-1 MPRVIYAMAEDGLLFKFLAKINDRTKTPIIATVTSGAIAAMAFDLKDLVDLMSIGTL 412
hCAT-2 MPRVIYAMAEDGLLFKCLAQINSKTKTPIIATLSSGAVAALMAFLDLKALVDMMSIGTL 419
rCAT-2 LPRILFAMARDGLLFRFLARVS-KRQSPVAATMTAGVISAVMAFLDLKALVDMMSIGTL 418

IX X

hCAT-1 LAYSLVAACV LVLRYQPEQPNLVYQMASTSDDELDPADQNE-LASTNDSQLGFLPEAEMFS 476
rCAT-1 LAYSLVAACV LVLRYQPEQPNLVYQMA RTTDELQVDQNE-MVSASESQTGFLPAAEKFS 471
hCAT-2 MAYSLVAACV LILRYQPGL---SYDQPKCSPEKDGLGSSPRVTSKSESQVTM-LQRQGF 475
rCAT-2 MAYSLVAACV LILRYQPGL---CYEQPKYTPEKDILESCTNATSKSESQVTM-LQGQGF 474

Position 438 Position 454

hCAT-1	LKTILSPKNMEPSKISGLIVNISTSLI AVLIIITFCIVTVLGREALTKGALWAVFLLAGSA	536
rCAT-1	LKTILSPKNMEPSKFSGLIVNISAGLLAVLIITVCIIVAVLGREALAEGLWAVFVMTGSV	531
hCAT-2	MRTLFCPSLL-PTQQSASLVSFLVGFLAFLVLGLSVLTTYGVHAI TRLEAWSLALLALFL	534
rCAT-2	LRTLFNPSAL-PTRQSASLVSFLVGFLAFLIAGLSILTTYGVQAIARLEAWSLALLALFL	533
	XI	XII
hCAT-1	LLCAVVTGVIWRQPESKTKLSFKVPFPLVLPILSIFVNVYLMMLDQGTWVRFVWMLIG	596
rCAT-1	LLCMLVTGIIWRQPESKTKLSFKVPFVPLVLSIFVNIYLMMLDQGTWVRFVWMLIG	591
hCAT-2	VLFFVAIVLTIWRQPQNQQKVAFMVPFPLPFAFSILVNIYLMVQLSADTWVRFSIWMAIG	594
rCAT-2	VLCAAVILTIIWRQPQNQQKVAFMVPFPLPFAFSILVNIYLMVQLSADTWVRFSIWMVLG	593
	XIII	XIV
hCAT-1	FIIYFGYGLWHSEEASLDADQART---PDGNLDQCK-----	629
rCAT-1	FAIYFGYGAWHSEEASLAAGQAKT---PDSNLDQCK-----	624
hCAT-2	FLIYFSYGIRHSLEGHLRDNNEEDAYPDNVHAAAEKSAIQANDHHPRNLSSPFIFHEK	654
rCAT-2	FLIYFAYGIRHSLEGNPRDEEDEDVCPDNVNAAAEKSAIQANDHHQRNLSLSPFILHEK	653
	Position 620	
hCAT-1	----	
rCAT-1	----	
hCAT-2	TSEF 658	
rCAT-2	TSEC 657	
	Position 657	

Abbildung 38: Aminosäuresequenzen der CAT-Isoformen-1 und -2A des Menschen und der Ratte.

In Hellblau sind die 14 putativen Transmembrandomänen der Transporter unterlegt; in Türkis hervorgehoben sind die Cysteinreste, davon sind in Rot umrandet die rattenspezifischen Cysteinreste (rCAT-1: Position 202; rCAT-2: Positionen 438, 454, 620 und 657), mit violette-gestrichelter Umrandung sind die konservierten Cysteinreste in allen gezeigten rCAT- und hCAT-Isoformen (an den Positionen 4, 85, 264, 299, 347 und 428 des hCAT-2A-Proteins) hervorgehoben. In Violette sind die konservierten NEM-sensitiven Cysteinreste an den Positionen 33 und 273 des hCAT-2A-Proteins gekennzeichnet.

Die murinen und humanen CAT-1-Isoformen besitzen im Vergleich zu den beiden CAT-2-Isoformen sechs (an den Positionen⁴ 21, 196, 232 [228], 316 [311], 511 [506] und 628 [623]; blau-gestrichelte Umrandung), die murinen und humanen CAT-2-Isoformen im Vergleich zu den beiden CAT-1-Isoformen drei exklusive Cysteinreste (an den Positionen 13, 31 und 171 des hCAT-2A-Proteins; orange-gestrichelte Umrandung). An der Position 539 des hCAT-1-Proteins findet sich ein Cysteinrest, der in den murinen CAT-Vertretern (im rCAT-1 an der Position 534, im rCAT-2 an der Position 236; grau-gestrichelte Umrandung) konserviert ist, jedoch im hCAT-2 fehlt.

Die Aminosäuresequenzen wurden aus der Datenbank von <https://www.uniprot.org/> entnommen.

⁴ Die Positionsangaben beziehen sich auf die Nummerierung der Aminosäuren im hCAT-1; in eckigen Klammern stehen die Positionsangaben des rCAT-1-Proteins, sofern sich diese vom hCAT-1 unterscheiden.

5.1.2 SNO-Bildung über ein assoziiertes Interaktom?

Alternativ könnte das Expressionssystem „Sarkolemmvesikel der Ratte“ von dem System „*X. laevis*-Oozyte“ nicht auf die Struktur der CATs selbst bezogen, sondern in den reaktionsbeteiligten Molekülen, differieren.

Für das Entstehen von SNO-Formationen wurde 2018 in *E. coli* durch *Seth et al.* das Hybrid-Cluster Protein „Hcp“ als unabdingbar notwendig nachgewiesen (148). Dies ist als eine komplexe Enzymmaschinerie anzusehen, welche die Bildung und Wirkung von SNO-Formationen vermittelt.

NO, bereitgestellt durch eine intrazelluläre Nitratreduktase aktiviert das Hcp-Interaktom, bestehend aus Enzymen für eine zusätzliche, für die trans-Nitrosylierung notwendige, *NO*-(*NO*-Synthase) und SNO-Synthase (SNO-Synthase), sowie für eine SNO-vermittelte Signalverbreitung in Form einer trans-Nitros(yl)ierung (trans-Nitrosylase) von Zellproteinen zur Steuerung von zelleigenen Stoffwechselfvorgängen und der Zellmotilität (148). *Seth et al.* zeigten, dass die größte Minderung an intrazellulären nitros(yl)ierten Proteinen nicht durch eine verminderte Menge an intrazellulär vorhandenem *NO*, sondern durch ein Ausschalten der „Hcp“-codierenden Gene erreicht werden konnte (148). Dies impliziert, dass die Nitros(yl)ierung von Proteinen in *E. coli* überwiegend durch das „Hcp“ vermittelt wird.

Obwohl die S-Nitros(yl)ierung selbst eine nicht-enzymatische Reaktion darstellt, also ohne Katalyse ablaufen kann, benötigen *E. coli* für diese die enzymatische Unterstützung des „Hcp“s.

In Analogie dazu zeigen auch höhere Organismen verwandte Mechanismen; beispielsweise enthält Säugerhämoglobin neben einer SNO-Synthase- auch eine S-Nitrosylase-Aktivität (149, 150), welche den Transfer von *NO*-Gruppen auf interagierende Proteine, wie beispielsweise einem GAPDH-haltigen Superkomplex, und damit eine S-Nitros(yl)ierung enzymatisch vermittelt. Der GAPDH-haltige Superkomplex interagiert mit dem Säugerhämoglobin und kann darüber den Glukosemetabolismus in den Erythrozyten von Glykolyse auf den Pentose-Phosphat-Weg umstellen (151-153).

Es ist folglich nicht auszuschließen, dass die SNO-Bildung und -Wirkung in Bezug auf die CATs ebenfalls von einem Enzymkomplex abhängig ist, welcher in dem Oozyten-Expressionssystem fehlte und damit die in meinen Versuchen ausbleibende Wirkung von *NO* auf die Transporter erklärt.

Zu berücksichtigen ist jedoch, dass durch die Wahl von Membranvesikeln als Versuchssystem in den Studien von *Zhou et al.* die Notwendigkeit weiterer Zellorganelle und komplexer Nebenreaktionen überwiegend ausgeschlossen wurde, da diese bis auf Zellmembran, darin enthaltene Membranproteine und ggf. denen assoziierte Proteine wenig zelluläres Material enthalten (154). Untersuchungen von Substratflüssen sind in derartigen Modellen weitestgehend unbeeinflusst von intrazellulären Metabolismen.

„Hcp“ ist nicht membrangebunden, sondern liegt im Zytoplasma frei vor (155). Ein solches zytoplasmatisch-vorliegendes Protein würde im Expressionssystem „Membranvesikel“ fehlen; damit ist ein zytoplasmatisches Interaktom für die NO/NO^+ -vermittelte Hemmung auf den CAT-Transport nahezu ausgeschlossen.

In Bezug auf „Hcp“ wurde dieses bzw. entsprechende orthologe Gene bisher nur in weiteren Prokaryoten und in Eukaryoten nur in ein paar anaeroben Parasiten und Mikroalgen (156, 157) nachgewiesen. Eine Notwendigkeit des „Hcp“'s scheidet damit in Bezug auf die von *Zhou et al.* beobachtete NO/NO^+ -vermittelte Hemmung auf die CATs aus.

Dies schließt jedoch nicht die Notwendigkeit eines anderen Interaktoms als potenziellen Erklärungsansatz aus.

Ein putativ an der CAT-Funktion beteiligter Enzymkomplex würde zudem vermutlich eng mit den Transportern assoziiert und nicht frei im Zytoplasma vorliegen.

Ein Enzymkomplex derartiger Komplexität wäre außerdem speziesübergreifend zu erwarten, insbesondere vor dem Hintergrund der hohen Konservierung seines assoziierten Zielmoleküls zwischen den CAT-Isoformen innerhalb der jeweiligen Spezies. Ein exklusives Fehlen eines derartigen Komplexes für die humanen CAT-Isoformen in den *X. laevis*-Oozyten ist folglich eher abwegig, im Anbetracht der näheren Verwandtschaft zwischen Mensch und Ratte im Verhältnis zu der entfernteren Verwandtschaft zwischen Mensch und Frosch aber nicht unmöglich.

Es könnte jedoch auch hinsichtlich des Vorhandenseins eines Nitros(yl)ierungs-vermittelnden Enzymkomplexes einen Unterschied nicht zwischen den Spezies, sondern zwischen dem Differenzierungsgrad der Zellen geben; möglicherweise ist ein derartiger Enzymkomplex nicht in unbefruchteten Oozyten exprimiert, wohl aber in höher entwickelten Zellen der *X. laevis*.

5.1.3 Interagierende Partnerproteine als Wirkort von *NO*?

Ein weiterer Erklärungsansatz wäre, dass *NO* nicht an die CATs direkt bindet, sondern an einem, ihnen assoziierten Interaktionspartner im Sinne eines indirekt inhibierenden Effekts.

Ähnliches ist bereits 2004 von *Rotmann et al.* für die Proteinkinase C (PKC) postuliert worden (63). *Rotmann et al.* wiesen einen indirekten Effekt der PKC auf den hCAT-vermittelten Transport nach (63). Sie fanden heraus, dass die durch die PKC vermittelte Transporterhemmung nicht in einer Phosphorylierung des Transporters im Sinne einer posttranslationalen Modifikation begründet ist, sondern dass PKC ein Adapterprotein phosphoryliert, welches wiederum die Oberflächenexpression des hCAT-1-Proteins durch Internalisierung des Carriers runter reguliert.

2007 bewies die Arbeitsgruppe um *Closs* mit hCAT-1-EGFP-Fusionsproteinen, dass diese Form der Expressionsregulation sowohl in *X. laevis*-Oozyten als auch in humanen Zellen stattfindet (158). Dies legt ein ubiquitäres Vorkommen jenes Mechanismus nahe.

Es bleibt kritisch zu sehen, ob in Analogie die Existenz eines derartigen Partnerproteins für die *NO*-vermittelte Hemmung, welches in Rattenmyokardiozyten, aber nicht *X. laevis* existent ist, wahrscheinlich ist.

Zur Aufschlüsselung dieses Postulats bedarf es weiterer Forschungsarbeit.

5.1.4 Schwächen der angewandten Methodik und potenzielle Fehldeutung der Versuchsdaten

Neben der Ursachensuche in Unterschieden zwischen den verwendeten Modellsystemen bleibt auch immer die Fehlerquelle in der angewandten Methodik und Interpretation der Versuchsdaten in Erwägung zu ziehen.

X. laevis-Oozyten stellen ein etabliertes Expressionssystem zur Erforschung von membranvermittelten Transportvorgängen dar, da diese eine hohe Expression der hydrophoben Membranproteine gut tolerieren und gleichzeitig eine geringe endogene Transportaktivität dieser Transporter zeigen (120).

Dennoch ist einzuwerfen, dass exprimierte Fremdproteine mit den endogen vorhandenen Proteinen interferieren und konkurrieren können (159). Insbesondere könnte bei einer Abhängigkeit von assoziierten Partnerproteinen das endogene Angebot dieser im Fall einer Überexpression unzureichend sein und exprimierte Fremdproteine mit den endogen vorhandenen Proteinen diesbezüglich in Konkurrenz treten.

Die Qualität der verschiedenen Oozyten variiert zwischen verschiedenen, aber auch innerhalb einer Oozytencharge erheblich (160, 161). Ein sorgfältiges Auswählen geeigneter Oozyten entsprechend der in Kapitel 3.4.5 beschriebenen Merkmale versucht diese Fehlerquelle zu minimieren, kann sie aber nicht gänzlich eliminieren. Die den durchgeführten Experimenten zugrundeliegenden Daten wiesen z. T. eine erhebliche Streuung auf. Dies ist in der Variation der Oozyten innerhalb einer Präparation, aber auch durch die Streuung zwischen den verschiedenen Oozytenchargen zu erklären. Durch eine prozentuale Darstellung der Argininaufnahme bezogen auf die mittlere Argininaufnahme entsprechender Oozyten ohne exogen-exprimierte Transporter wird die Variation zwischen den einzelnen Oozytenchargen herausgerechnet; die Streuung innerhalb einer Präparation bleibt weiterhin bestehen und ist in den entsprechenden Abbildungen ersichtlich.

Ferner ist der Injektionsvorgang von cRNA in die Oozyte als potenzielle Fehlerquelle zu identifizieren. Die optische Kontrolle des Injektionsvorgangs (Volumenzunahme der Oozyte nach Injektion), regelmäßiges Überprüfen der eingestellten Tropfengröße und sorgfältiges Pipettieren für die Verdünnung der cRNA aus der Stammlösung beabsichtigen Ungenauigkeiten gering zu halten, können diese jedoch nicht *in toto* ausschließen. Alle dieser Arbeit zu Grunde liegenden Experimente zeigten einen signifikanten Anstieg der Transportaktivität bei hCAT-überexprimierenden Oozyten im Vergleich zu

den Oozyten ohne exogen exprimierte Transporter. Dies beweist eine signifikante Expression der injizierten Fremd-cRNA und schließt eine Ursachensuche in der Expressionsmenge der jeweiligen hCAT-Isoformen aus.

Eine weitere potenzielle Fehlerquelle könnte in der Anwendung der eingesetzten *NO/NO⁺*-Donatoren liegen. Die eingesetzten Mengen könnten beispielsweise nicht ausreichend *NO/NO⁺* generiert haben, sodass ein Effekt auf die Transportfunktion der CATs gar nicht hätte stattfinden können.

Die Ergebnisse des Organbad-Versuchs durch Zugabe des *NO*-Donators SNAP auf durch Norepinephrin konstringierte Maus-Aorten-Ringe ergaben für die in den Aufnahmeversuchen eingesetzte Konzentration an SNAP eine ausreichende *NO*-Freisetzung durch den *NO*-Donator und damit eine mögliche Einflussnahme von *NO* auf den hCAT-Transport durch eine Exposition der Oozyten unter der eingesetzten SNAP-Konzentration.

Die HPLC-basierten Messungen bewiesen für die Exposition der Oozyten unter 1 mM Sin-1/1 mM SPENO eine abgelaufenen Nitrosierung durch Umwandlung von ca. 10% des in den Oozyten vorhandenen GSHs in GSNO. Sie quantifizierten eine entstandene GSNO-Menge in der Größenordnung von $>60 \mu\text{M}$, welche für eine Übertragung von *NO⁺* im Sinne einer Transnitrosierung auf andere Proteine ausreichend ist.

Resümierend lässt sich festhalten, dass durch den gezeigten signifikanten Anstieg der Transportaktivität bei hCAT-überexprimierenden Oozyten im Vergleich zu den Oozyten ohne exogen exprimierte Transporter von einer methodischen Fehlerquelle abzusehen ist; insbesondere durch den signifikanten Unterschied dieser beiden Gruppen trotz Streuung innerhalb einer Oozytenpräparation und durch die Existenz eines signifikanten Unterschieds zwischen hCAT-überexprimierenden Oozyten und Oozyten ohne exogen exprimierte Transporter für die beiden Transporterisoformen hCAT-1 und -2A.

Experimentell konnte zudem ein Fehler hinsichtlich der Menge der eingesetzten *NO/NO⁺*-Donatoren ausgeschlossen werden.

5.1.5 Kritische Bewertung und Einordnung der Erkenntnisse von *Zhou et al.*

Es ist festzuhalten, dass der von *Zhou et al.* beobachtete Effekt unter *NO*-Konzentrationen jenseits des physiologischen Vorkommens beobachtet wurde (6). Die *NO*-Menge, freigesetzt durch 100 μM SNAP, liegt in der Größenordnung von 4 μM (6); die endogene *NO*-Produktion der Zellen liegt *in vivo* jedoch in einem Bereich von unter 1 μM (162).

Es resultiert zum einen der Einwand, ob der von *Zhou et al.* gezeigte Einfluss auf die CATs nicht eher durch unspezifische Begleiteffekte der hohen *NO*-Konzentrationen erklärbar ist und zum anderen, ob ein Effekt, selbst wenn er reproduzierbar wäre, unter derartig unphysiologischen *NO*-Konzentrationen *in vivo* eine Rolle spielen würde.

Zhou et al. führten zudem einen Teil ihre Studien mit Argininkonzentrationen deutlich oberhalb (10 mM) des physiologischen Bereichs von 100 - 250 μM durch, da die angewandte Messmethodik sonst an ihre Messgrenzen gestoßen wäre. Nur im physiologischen Bereich zeigen beide CAT-Isoformen den gleichen Anteil an der Transportleistung kationischer Aminosäuren. Es ist also kritisch, ob der beschriebene *NO*-modulierte Rückkopplungsmechanismus auch unter physiologischen Konzentrationen aufgetreten wäre.

Zhou et al. werfen an dieser Stelle ein, dass ihre Ergebnisse zumindest eine pathophysiologische Bedeutung in Situationen eines erhöhten Proteinabbaus und damit eines erhöhten Vorliegens an plasmatischen Aminosäurekonzentrationen, beispielsweise bei einer Sepsis, malignen Erkrankungen oder anderen katabolen Zuständen, impliziert (6).

Zudem wurden entsprechende Versuche von *Zhou et al.* auch mit L-Lysin in physiologischen Konzentrationen (eingesetzte Konzentrationen: 0,05 - 50 mM) durchgeführt und zeigten ebenfalls eine hemmende Wirkung des Lysintransports nach Exposition der Transporter unter SNAP. *Zhou et al.* postulierten, dass ebengleiches Ergebnis auch für Arginin in physiologischen Konzentrationen zu erwarten wäre.

Neben *Zhou et al.* beschäftigten sich weitere Forschungsgruppen mit dem Einfluss von *NO/NO⁺* auf die Transportfunktion der CAT-Proteine.

2009 veröffentlichten *Casanello et al.* eine Arbeit über den Einfluss von *NO*-Donatoren auf die Transportleistung kationischer Aminosäuretransporter in Endothelzellen aus

Nabelschnurvenen intrauterin wachstumsretardierter Embryonen (73). Sie beschrieben konträr zu *Zhou et al.* eine Zunahme der Argininaufnahme in die Zelle unter Zugabe des *NO*-Donors SNAP.

Flores et al. diskutierten 2003, dass Stickstoffmonoxid möglicherweise nicht direkt an kationische Aminosäuretransporter angreift, sondern dass die *NO*-vermittelte Modulation über indirekte Mechanismen, wie Membranhyperpolarisation, vonstattengehen könnte (74).

Shin et al. bestärkten diese These 2011 durch eine Arbeit zum „L-Arginin-Paradoxon“ (75), also zu der Zunahme der endothelialen NOS-Aktivität durch externe Argininaufnahme in die Zellen bei bereits vorhandener hoher intrazellulärer Arginin-Konzentration (10). Sie erklären sich das „L-Arginin-Paradoxon“ darüber, dass sich die *NO*-Produktion einer Zelle zwar unabhängig von dem vorhandenem intrazellulären Arginin-Angebot, aber abhängig von dem extrazellulären Angebot und damit abhängig von der über kationische Aminosäuretransporter aufgenommenen Arginin-Menge zeigt (75).

Ramachandran et al. untersuchten 2013 die *NO*-Signalübertragung in Kardiomyozyten von zwei Monate alten Mäusen mit X-chromosomaler Dystrophie (in Analogie zum Fehlen des Dystrophins bei Menschen mit Muskeldystrophie Typ Duchenne) mit und ohne Fehlen des Utrophin-Gens (163). Dystrophin ist ein Strukturprotein in der Zellmembran von Skelettmuskelzellen und verankert das Zytoskelett dieser Zellen mit der umgebenden extrazellulären Matrix. Utrophin ist ein autosomales Homolog zu Dystrophin (164) und verankert ebenfalls das Zytoskelett an der Plasmamembran. *Ramachandran et al.* fanden heraus, dass, obwohl die NOS nicht mit Dystrophin oder Utrophin an der Kardiozytenmembran assoziiert ist, sie in ihrer Aktivität in diesen Zellen deutlich verringert ist, die Expression und der Transport der L-Arginintransporter jedoch signifikant erhöht sind (163). Sie werteten dies als Kompensationsmechanismus der verminderten NOS-Aktivität für die intrazelluläre Bereitstellung von *NO*. Ferner wurde gezeigt, dass eine Steigerung der Argininaufnahme über die Zellmembrantransporter auch bei Kardiomyozyten ohne Dystrophin und/oder Utrophin die intrazelluläre *NO*-Produktion signifikant abnehmen ließ. Dies bestätigt eine Abhängigkeit der *NO*-Produktion von dem extrazellulären Arginin-Angebot und damit eine Abhängigkeit von der über kationische Aminosäuretransporter aufgenommenen Arginin-Menge.

Zusammenfassend sei festgehalten, dass die derzeitige Studienlage in Bezug auf die Auswirkung von NO/NO^+ auf die Transportfunktion der CAT-Proteine uneindeutig ist. Dies spricht für einen komplexen Mechanismus in der Vermittlung der NO/NO^+ -Wirkung auf die Transportfunktion der CAT-Proteine und kann als Hinweis auf das Vorliegen weiterer, reaktionsbeteiligter Moleküle z. B. in Form eines interagierenden Partnerproteins gewertet werden.

Zusammenfassend kann bezüglich der Aussagekraft meiner Versuchsergebnisse Folgendes gesagt werden:

1. Der signifikante Unterschied der Transportaktivität bei hCAT-überexprimierenden Oozyten im Vergleich zu den Oozyten ohne exogen exprimierte Transporter spricht für eine ausreichende Überexpression der hCAT-Proteine im gewählten Expressionssystem.
2. Die Ergebnisse des Organbad-Versuchs durch Zugabe des *NO*-Donators SNAP auf durch Norepinephrin konstringierte Maus-Aorten-Ringe ergaben für die in den Aufnahmeversuchen eingesetzte Konzentration an SNAP eine ausreichende *NO*-Freisetzung durch den *NO*-Donator und damit eine mögliche Einflussnahme von *NO* auf den hCAT-Transport durch eine Exposition der Oozyten unter der eingesetzten SNAP-Konzentration.
3. Die HPLC-basierten Messungen bewiesen für die Exposition der Oozyten unter 1 mM Sin-1/1 mM SPENO eine abgelaufenen Nitrosierung durch Umwandlung von ca. 10% des in den Oozyten vorhandenen GSHs in GSNO. Sie quantifizierten eine entstandene GSNO-Menge in der Größenordnung von $> 60 \mu\text{M}$, welche für eine Übertragung von NO^+ im Sinne einer Transnitrosierung auf andere Proteine ausreichend ist.

Dies belegt die korrekte Durchführung der angewandten Methodik und schließt sie als ursächlich für die beobachtete Diskrepanz zwischen meinen Ergebnissen und denen von *Zhou et al.* aus.

Bezüglich weiterer dargelegter Erklärungsansätze in Bezug auf die Kontrarietät meiner Ergebnisse, zu denen von *Zhou et al.* kann Folgendes geschlussfolgert werden:

1. Strukturelle Unterschiede zwischen den CAT-Isoformen der verschiedenen Spezies (Mensch vs. Ratte) könnten über die einer (trans-) Nitros(yl)ierung zugänglichen exklusiven Cysteinreste an der Position 202 im rCAT-1 und an den Positionen 438, 454, 620 und 657 im rCAT-2A die beobachtete Kontrarietät der Ergebnisse zwischen beiden Forschungsgruppen erklären.
2. Die Existenz eines, in den *X. laevis*-Oozyten fehlenden, aber für die (trans-) Nitros(yl)ierung der CAT-Proteine benötigten Interaktoms in Analogie zu der Bedeutung von „Hcp“ für die Nitros(yl)ierung in *E. coli*, ist nicht auszuschließen.

3. Die Existenz eines, mit den CAT-Proteinen interagierenden Proteins, welches in meinen Experimenten in hCAT-überexprimierenden *X. laevis*-Oozyten nicht (ausreichend) vorhanden war und dass die hemmende Wirkung von *NO/NO*⁺ auf die Transportfunktion der CAT-Proteine vermittelt, ist möglich.

Bei ausstehender experimenteller Klärung der Diskrepanz zwischen meinen Ergebnissen und denen von *Zhou et al.* bleiben beide Ergebnisse zunächst jeweils auf die gewählten Spezies (Mensch vs. Ratte) entsprechender CAT-Isoformen und den angewandten Expressionssystemen (*X. laevis*-Oozyte vs. Sarkolemmvesikel der Ratte) begrenzt.

Allgemeingültig ist jedoch die Erkenntnis, dass hCAT-1- und 2A-Transporter nicht durch eine (trans-) Nitros(yl)ierung in ihrer Transportleistung beeinflusst werden.

5.2 Bindungspartner für die CAT-Proteine

Einige Zellmembranproteine benötigen für ihre Integration und volle Funktionstüchtigkeit einen assoziierten Bindungspartner; beispielsweise sind die Vertreter des γ^+ -Systems auf das Glykoprotein „4F2hc“ angewiesen (97). Bisher konnte in Analogie für die Vertreter des γ^+ -Systems kein solcher Bindungspartner gefunden werden.

Unter Berücksichtigung der in Kapitel 5.1.2 und in Kapitel 5.1.3 dargelegten Hypothesen bezüglich einer putativen Existenz eines für die *NO*-Wirkung benötigten, assoziierten Bindungspartners oder Enzymkomplexes, rechtfertigt die Suche nach einer geeigneten Methodik zur Analyse eines hCAT-1-assoziierten Proteins. Auch die experimentell bisher nicht geklärte Transportfunktion des SLC7A4s (135) oder die in Expressionsstudien beobachtete große Spannbreite der K_m -Werte der CATs (Tabelle 2) und weitere, in Kapitel 2.4.1 aufgeführte Aspekte, könnten Hinweise darauf sein, dass die CAT-Proteine auf einen endogenen Bindungspartner angewiesen sind.

Die Entscheidung die praktische Umsetzung betreffend, fiel auf die in der Literatur bereits mehrfach beschriebenen Methodik der massenspektrometrischen Analyse nach zielproteinassoziierten Bindungspartnern (165). Vorteilhaft bei dieser Methodik ist, dass gleichzeitig mehrere, dem Zielprotein potenziell assoziierte Proteine identifiziert werden können. Nachteilig bleibt jedoch, dass Assoziationen, welche nur temporär unter definierten Bedingungen auftreten ggf. nicht miterfasst und dass über schwache Wechselwirkungen assoziierte Proteine im Zuge der Aufreinigung von dem Zielprotein abgelöst werden können.

Alternativ könnte vor der massenspektrometrischen Analyse eine Immunpräzipitation des Zielproteins (hier „hCAT-1“) erfolgen, dies würde jedoch die Schwierigkeit erhöhen, eine echte Bindung eines Proteins mit dem Zielprotein von der reinen räumlichen Nähe eines Proteins ohne Interaktion mit dem Zielprotein zu unterscheiden.

Die Basis der gewählten Methodik ist es, das Zielprotein mit einer Erkennungsstelle für ein Biotinylierungsenzym zu markieren, es darüber in einem Expressionssystem zu biotinylieren und es zusammen mit seinem Bindungspartner aufzukonzentrieren und für weitere massenspektrometrische Analysen zusammen mit seinem assoziierten Bindungspartner aus der Zellmembran zu solubilisieren (136).

Es wurden in der vorliegenden Arbeit für die Gewinnung von biotinyliertem Zielprotein (hier „hCAT-1“) zwei Ansätze auf Basis aktueller Literaturrecherche verfolgt. Ihnen gemeinsam ist, dass der hCAT-1 an eine Erkennungsstelle (hier „BAP“ bzw. „Avi-Tag“) für ein Biotinylierungsenzym (hier Biotinligase „(h)BirA“) gekoppelt wird. Das Zielprotein mit angehängter Erkennungssequenz wird im zellulären Expressionssystem zusammen mit der Biotinligase exprimiert, von dieser erkannt und biotinyliert.

Zu diesem Ziel bestand zum einen, angelehnt an eine Publikation von *Tenzer et al. (137)*, das Konzept einer Simultantransfektion humaner Zellen mit zwei Plasmiden („hCAT-1-BAP-N1“: codierend für das markierte Zielprotein, „pCMV3-BirA“: codierend für die Biotin-Ligase) und zum anderen, angelehnt an die Arbeit von *Ioannou et al. (136)*, das Konzept einer Einfachtransfektion mit nur einem Plasmid („HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“: codierend für beides, das markierte Zielprotein und die Biotinligase).

5.2.1 Bewertung der angewandten Klonierungsstrategien

Sowohl die Western-Blot-Analysen der Simultantransfektion mit den Plasmiden „hCAT-1-BAP-N1“ und „pCMV3-BirA“, als auch die der Einfachtransfektion mit dem Plasmid „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“, erbrachten durch den gegen den hCAT-1 gerichteten Antikörper und mit HRP-Streptavidin ein Signal gleicher Höhe. Dies lässt den Schluss zu, dass dieses Signal dem biotinylierten hCAT1-Protein entspricht. Dies wiederum impliziert, dass die angewandte Klonierung erfolgreich verlief; bei beiden Konstrukten wurde die Erkennungsstelle für das Biotinylierungsenzym („BAP“ im „hCAT-1-BAP-N1“-Vektor und der „Avi-Tag“ im „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“-Vektor) im Leserahmen am 3'-Ende des hCAT-1-Proteins integriert. Diese Integration erfolgte bewusst am C-Terminus des hCAT-1-Proteins, da experimentell bereits durch hCAT-1-EGFP-Fusionsproteine bekannt war, dass eine C-terminale Fusion am hCAT-1 dessen Transporteigenschaften nicht beeinflusst (135).

Außerdem zeigten die Ergebnisse der Western-Blot-Analysen, dass die entsprechenden Erkennungsstellen für das Biotinylierungsenzym diesem auch für eine Biotinylierung des hCAT-1-Proteins zugänglich waren.

Für die Simultantransfektion mit den Plasmiden „hCAT-1-BAP-N1“ und „pCMV3-BirA“ wurde die Zelllinie U373-MG gewählt, da vorangehende Studien bereits gezeigt hatten, dass diese Zelllinie eine Expression des transfizierten hCAT-1-Proteins gut toleriert und der transfizierte hCAT-1 in ihnen eine gute Transportaktivität zeigt; dies gilt auch bei stabiler Expression des hCAT-1-Proteins (135). Des Weiteren wurde der PKC-vermittelte Effekt auf den hCAT-1 ebenfalls in Zellen der Linie U373-MG entdeckt (63); er ließe sich also auch in den U373-MG-Zellen mit erfolgreicher Simultantransfektion mit den Plasmiden „hCAT-1-BAP-N1“ und „pCMV3-BirA“ weiter untersuchen.

Transfektionsversuche der Zelllinie U373-MG mit dem „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“-Konstrukt verliefen frustrierend. Mitgeführte Kontrollen anderer Konstrukte zeigten Transfektionseffizienzen >85% sodass die unzureichende Transfektion des „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“-Konstrukts in dem Konstrukt selbst und nicht in der angewandten Methodik zu suchen ist.

Als Lösungsstrategie wurde das Expressionssystem für das „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“-Konstrukt von den U373-MG-Zellen auf Zellen der Zelllinie HEK293T gewechselt. In diese lassen sich auch große Vektoren in der Regel gut transfizieren.

Insgesamt gelang es transient sowohl in Zellen der Zelllinie U373-MG (mit Simultantransfektion der Plasmide „hCAT-1-BAP-N1“ und „pCMV3-BirA“) als auch in Zellen der Zelllinie HEK293T (mit Einfachtransfektion des Plasmids „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“) biotinyliertes hCAT-1-Protein zu exprimieren. Eine stabile Expression des biotinylierten hCAT-1-Proteins verlief im Expressionssystem HEK293T (Einfachtransfektion mit dem Plasmid „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“) erfolgreich.

Vorteilhaft bei der Einfachtransfektion war zum einen die vereinfachte Selektion erfolgreich transfizierter Zellen mit dem „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“-Vektor durch die Notwendigkeit nur eines Selektionsantibiotikums; zum anderen die Möglichkeit einer fluoreszenzmikroskopischen Kontrolle erfolgreich transfizierter Zellen durch Translation eines EGFP-Signals. Letzteres betreffend bleibt jedoch anzumerken, dass das EGFP-Signal an die Biotinligase „hBirA“ gekoppelt ist; ein fluoreszenz-positives Signal sprach folglich nur für die erfolgreiche Expression der Biotinligase und konnte keine Aussage über die Expression des markierten hCAT-1-Proteins treffen.

Ein weiterer Vorteil des „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“-Vektors stellt die humanisierte Biotinligase „hBirA“ dar, da die prokaryotische Biotinligase „BirA“ gelegentlich durch ihre Anzahl an bakterientypischen Codons Schwierigkeiten bei der Translation in Säugerzellen bereitet (139). Die Verwendung eines Konstrukts mit humanisierter „BirA“ sollte die Effizienz an biotinylierten Proteinen *in vivo* demzufolge erhöhen.

Die Western-Blot-Analysen der Transfektionsansätze erbrachten den Nachweis biotinylierten hCAT-1-Proteins.

Alle Transfektionsansätze sind als erfolgreich zu werten. Damit ist die Basis zum Erhalt von biotinyliertem Zielprotein gelegt und über zwei verschiedene Wege (Einfach- vs. Simultantransfektion) und in zwei verschiedenen Expressionssystemen (U373-MG vs. HEK293T) möglich; eine Aufreinigung des hCAT-1-Proteins unter Ausnutzung seiner Biotinylierung ist denkbar.

5.2.1.1 Etablierung einer Zelllinie mit stabiler Expression mit dem Mischklon „T7 HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“

Neben transienten Expressionen mit dem Vektor „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“ bestand das Ziel, eine Zelllinie mit stabiler Integration der transfizierten DNA in das Wirtsgenom und dauerhafter Expression dieser zu etablieren.

Es ist bekannt, dass erfolgreich integrierte Fremd-DNA durch Zellteilung und exogene Faktoren (166) im Laufe längerer Kultivierungsperioden von den Zellen wieder ausgeschlossen werden und verloren gehen kann. Die Wahrscheinlichkeit eines derartigen Ereignisses ist nach Transfektionen mit zwei Plasmiden höher als bei der Transfektion mit einem Vektor. Resultierend ist das erfolgreiche Etablieren einer Zelllinie mit stabiler Expression mit einem Vektorkonstrukt wahrscheinlicher.

Codieren beide Plasmide bei einer Simultantransfektion für verschiedene Resistenzgene, kann auch durch Selektion mit zwei differenten Resistenzantibiotika das Etablieren einer stabilen Expression erreicht werden. Aus diesem Grund folgte die Umklonierung der „BirA“-Sequenz aus dem Expressionsvektor „pcDNA3-cyt-BirA“ in den Vektor „ArgI-pCMV3-C-OFPSpark“ unter Erhalt des „pCMV3-BirA“-Vektors, codierend für eine Genemycin-Resistenz. Der Vektor „hCAT-1-BAP-N1“ codierte für eine Geneticinresistenz. Dies bedeutet, dass nur Zellen mit erfolgreicher Simultantransfektion unter doppeltem Selektionsdruck mit Geneticin und Genemycin wachsen konnten; fand eine frustrane oder eine Einfachtransfektion mit nur einem Vektor statt, fehlte der eukaryotischen Zelle eine bzw. beide Resistenzgene und sie ging zugrunde.

Unter Berücksichtigung der in Kapitel 5.2.1 dargelegten Vorteile des „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“-Konstrukts wurden mit diesem Konstrukt transfizierte Zellen nach wenigen Tagen der Kultivierung durchflusszytometrisch mit Hilfe ihres EGFP-Signals sortiert, als Einzel- und Mischklone aufgefangen und weiter kultiviert. Es erfolgten regelmäßige Medienwechsel unter Selektionsdruck und fluoreszenzmikroskopische Kontrollen auf Beibehalten des EGFP-Signals.

Nach Erreichen entsprechender Konfluenz wurden die Zellen auf größere Kultivierungsgefäße umgesetzt und in den üblichen Passagierungs-Rhythmus überführt.

Das Hochziehen der Einzelklone verlief in der vorliegenden Arbeit frustan; die vereinzelt Zellen wuchsen nicht. Möglicherweise wachsen HEK293T-Zellen nur im Verband, da sie sich gegenseitig mit Wachstumsfaktoren versorgen müssen. Eine Kultivierung von Einzelklonen in konditioniertem Medium könnte in diesem Fall ein Ansatz

zur Aufzucht von HEK293T-Einzelklonen sein. Konditionierte Medien bestehen aus einem Zellkultur-Überstand entsprechender Zelllinien und enthalten Faktoren, insbesondere Wachstumsfaktoren, die jene Zelltypen sezernieren und zum Wachstum benötigen. Der Einsatz von konditionierten Medien wurde in der vorliegenden Arbeit nicht verfolgt; es wurde stattdessen das Erreichen einer Zelllinie mit stabiler Expression durch Kultivierung des Mischklons („T7 Mischklon HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“) erreicht.

Zwischen 14 und 20 Wochen der Kultivierung des Mischklons und damit bis zu sieben Wochen der Kultivierung ohne Selektionsdruck erfolgte die Erstellung von Zell-Lysaten mit NP-40 Puffer und anschließender Western-Blot-Analyse. Es zeigte sich ein Beibehalten des Signals durch den gegen den hCAT-1 gerichteten Antikörper und mit HRP-Streptavidin auf der gleichen Höhe in allen untersuchten Proben. Dies lässt den Schluss zu, dass dieses Signal dem biotinylierten hCAT1-Protein entspricht.

Selbst nach Beendigung des Selektionsdruckes blieb das Signal erhalten. Eine Aussage zur quantitativen Menge des biotinylierten hCAT-1-Proteins im Zeitverlauf ließ sich aus den vorliegenden Daten nicht treffen; wenngleich das Signal in allen Spuren über den Zeitverlauf optisch gleichstark wirkte und in jeder Spur dieselbe Menge an Gesamtprotein aufgetragen wurde, könnte der Anteil an hCAT-1-Protein zwischen den Proben erheblich variieren. Durch Ladekontrollen mit Antikörpern gegen konstitutiv exprimierte, endogene Proteine könnte der Anteil jener Proteine in den verschiedenen Proben gemessen und darüber der Anteil der überexprimierten hCAT-1-Proteine beurteilt werden. Insbesondere kann so die Überexpression des hCAT-1-Proteins in Relation zu der endogen vorhandenen hCAT-1-Menge gesetzt und zwischen den einzelnen Proben verglichen werden. Anzumerken ist jedoch, dass die Fusionsproteine aus Erkennungsstelle für das Biotinylierungsenzym und dem hCAT-1 durch die angehängte Erkennungsstelle mit den eingesetzten Antikörpern schlechter gebunden werden könnte. Dies ist für EGFP-Fusionsproteine nichtzutreffend (135), sodass dies auch nicht für die vorliegenden Fusionsproteine zu erwarten wäre. Ein Vergleich der Menge an hCAT-1-EGFP-Fusionsprotein mit der Menge an hCAT-1-Fusionsprotein mit Erkennungsstelle könnte einen Effekt der angehängten Erkennungsstelle auf die Bindung durch die eingesetzten Antikörper beurteilen.

Ob jedoch die Menge des stabil exprimierten hCAT-1-Proteins nach Aufreinigung für massenspektrometrische Analysen ausreichend ist, kann erst durch entsprechende Western-Blot-Analysen nach Aufreinigung und schließlich durch die massenspektrometrischen Untersuchungen selbst beurteilt werden.

Der Mischklon „T7 HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“ scheint das transfizierte Plasmid „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“ bis dato (05.08.2019) stabil in sein Genom integriert zu haben. Eine stabile Expression des „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“-Konstrukts eröffnet weitere Möglichkeiten in Bezug auf funktionelle Untersuchungen des exprimierten hCAT-1-Proteins.

Eine stabile Expression bietet den Vorteil der Zellkultur-basierten Gewinnung von biotinyliertem hCAT-1-Protein für die geplanten massenspektrometrischen Analysen, ohne dieses vorher transfizieren zu müssen. Zudem können so funktionelle Analysen der Interaktionen zwischen dem Zielprotein und potenziell assoziierten Partnerproteinen *in vivo* über einen längeren Zeitraum abgebildet werden; transient exprimierte Fremdproteine und deren DNA werden durch die Wirtszelle schnell wieder abgebaut; funktionelle Untersuchungen müssen bei transientser Expression daher zeitlich eng an die Transfektion und über einen kürzeren Zeitraum als bei stabil exprimierenden Zellen erfolgen.

Beispielsweise ist eine Internalisierung des hCAT-1-Proteins durch PKC (63) beschrieben; sollte dies über die Modulation einer Interaktion zwischen hCAT-1 und seinem potenziellen Partnerprotein vermittelt werden, ermöglicht eine stabile Expression des biotinylierten hCAT-1-Proteins durch einen massenspektrometrischen Vergleich der mit dem hCAT-1 interagierenden Proteine zwischen PKC-exponierten und nicht-exponierten Zellen die Möglichkeit, jenes Partnerprotein leicht auffinden zu können.

Es ist in Betracht zu ziehen, den vorliegenden Mischklon unter Ausnutzung seines EGFP-Signals in Einzelklone zu sortieren und diese in konditioniertem Medium zu kultivieren. Die Klone einer einzelnen Zelle entsprechen genau einem Integrationsereignis in die Wirts-DNA; Mischklone sind eine Zellpopulation, zusammengesetzt aus verschiedenen Integrationsereignissen an unterschiedlichen Stellen.

Die Lokalisation des Integrationsereignisses der transfizierten DNA beeinflusst dessen Expression; bestimmte DNA-Abschnitte sind transkriptionell aktiver als andere und werden häufiger transkribiert (167-169). Eine hohe und nicht bedarfsadaptierte Expression des transfizierten Proteins belastet den Zellmetabolismus unter Umständen, diese Zellen proliferieren möglicherweise langsamer als solche mit niedrigerer Expression des Zielproteins. In einer Mischklonpopulation würden folglich Zellen mit einer

hohen Expression des transfizierten Genabschnitts und damit einer langsamen Zellproliferation langfristig von den Zellen mit einem niedrigeren Expressionsniveau der transfizierten DNA verdrängt (170, 171).

Einzelzellklone können in Western-Blot-Analysen auf die Stärke ihrer Signale für das biotinylierte hCAT-1-Protein untersucht und Einzelzellklone mit entsprechend starker Expression weiter kultiviert werden. So ließe sich ggf. der Anteil an biotinyliertem hCAT-1-Protein in Zellen mit stabiler Expression weiter optimieren.

Um abschließend den Nutzen einer stabilen Expression des „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“-Konstrukts in HEK293T-Zellen im Vergleich zu einer transienten Expression jenes Konstrukts in der gleichen Zelllinie und im Vergleich zu einer transienten Expression der „hCAT-1-BAP-N1“- und „pCMV3-BirA“-Konstrukte im Expressionssystem U373-MG im Hinblick auf das Ziel des Erhalts von ausreichend biotinyliertem hCAT-1-Protein mit potenziell assoziiertem Bindungspartner bewerten zu können, müssen entsprechende Aufreinigungen des Zielproteins und geplante massenspektrometrische Analysen durchgeführt und ausgewertet werden.

5.2.2 Vergleich verschiedener Zell-Lyse-Puffer zur Solubilisierung des „hCAT-1“-Proteins

Um integrale Membranproteine, zu denen auch die CAT-Vertreter gehören, aus der Zellmembran extrahieren zu können, müssen diese von den restlichen Bestandteilen der Zellmembran durch Detergenzien und Denaturierungsmitteln getrennt werden. Dies geschieht durch Einwirken von Lyse-Puffern auf die zu untersuchenden Zellen.

Die Stärke eines Lyse-Puffers hängt neben den enthaltenen Detergenzien und Denaturierungsmitteln entscheidend von dessen pH-Wert und Ionenstärke ab (172-174).

Einige Membranproteine, insbesondere solche mit intra- und transmembranösem Anteil, zu denen auch die Vertreter der CAT-Familie gehören, sind fest in der Membran verankert, sodass es harscher Lysebedingungen bedarf, um sie vollständig aus der Membran auslösen zu können. Die transmembranösen Bereiche derartiger Proteine sind über hydrophobe Wechselwirkungen mit den Lipiden der Zellmembran verbunden; ein geeignetes Lösungsmittel muss ebenfalls hydrophobe Anteile besitzen und sich zwischen den Membran-Lipiden und intramembranösen Anteilen des Transporters anlagern können.

Harsche Lysebedingungen können dazu führen, dass die Membranproteine ebenfalls denaturieren oder irreversibel aggregieren, sodass weitere Proteinanalysen unmöglich werden (174).

Das Solubilisieren von Membranproteinen stellt folglich einen Balanceakt zwischen vollständigem Auslösen des Zielproteins aus der Lipiddoppelschicht und seinem Strukturhalt dar.

Kompliziert wird die Situation, wenn bei der Solubilisierung über nicht-kovalente Bindungen assoziierte Proteine an den Membranproteinen gebunden bleiben sollen.

Detergenzien sind amphipathische (175) Moleküle mit einem polaren Kopf und einem hydrophobem Schwanz. Mit ihren hydrophoben Enden lagern sie sich in die Lipiddoppelschicht ein.

Wird eine kritische Menge an Detergens (Tabelle 39), die sogenannte kritische Mizellenbildungskonzentration (CMC) (176) überschritten, lagern sich die Detergensmoleküle unter Mitnahme von Membranbestandteilen zu Mizellen zusammen und lösen darüber die Zellmembran auf (177).

Bei dieser Mizellenbildung werden die in der Membran eingelagerten Proteine miteinander gebunden und extrahiert.

Entscheidend für den Erfolg der Extraktion ist dabei das Detergens-zu-Protein-Verhältnis (178, 179).

<i>Detergens</i>	<i>CMC [mM]</i>	<i>HLB-Wert</i>
Triton-X-100	0,24	13,5
NP-40	0,29	13,1
SDS	8,2	
Natrium-Desoxycholat	4-6	

Tabelle 39: Werte der hydrophilen-lipophilen Balance (HLB) und der kritischen Mizellenbildungskonzentration (CMC) (in mM) verschiedener Detergenzien (174).

Der HLB-Wert spiegelt das Verhältnis von hydrophilem zu lipophilem Anteil eines Detergens wider und ist ein Maß für die Fähigkeit des Detergens, Proteine aus der Zellmembran zu lösen. Detergenzien mit einem HLB-Wert über 12 sind in der Lage Membranproteine ohne vorangegangene Denaturierung aus der Lipidmembran zu solubilisieren.

Der CMC-Wert gibt die Detergenzkonzentration an, ab der sich die Detergensmoleküle mit Zellmembranbestandteilen zu Mizellen zusammen lagern.

Eine niedrige Menge an Detergens führt dazu, dass sich dieses lediglich in der Zellmembran einlagert, eine Erhöhung der Detergenzkonzentration lässt sich die Detergenzien mit Membranbestandteilen zu Lipid-Protein-Detergens-Mizellen zusammenlagern. Mit einer weiteren Erhöhung der Detergenzkonzentration werden die Lipid-Protein-Detergens-Mizellen zunehmend durch Verdrängung der Lipide von den Proteinen durch die ebenfalls hydrophoben Detergensanteile zu Detergens-Lipid- und Detergens-Protein-Mizellen heterogenisiert (Abbildung 39).

Mit wachsender Detergenzkonzentration steigt das Risiko für eine Proteindenaturierung und ein Verlust der assoziierten Bindungspartner (180).

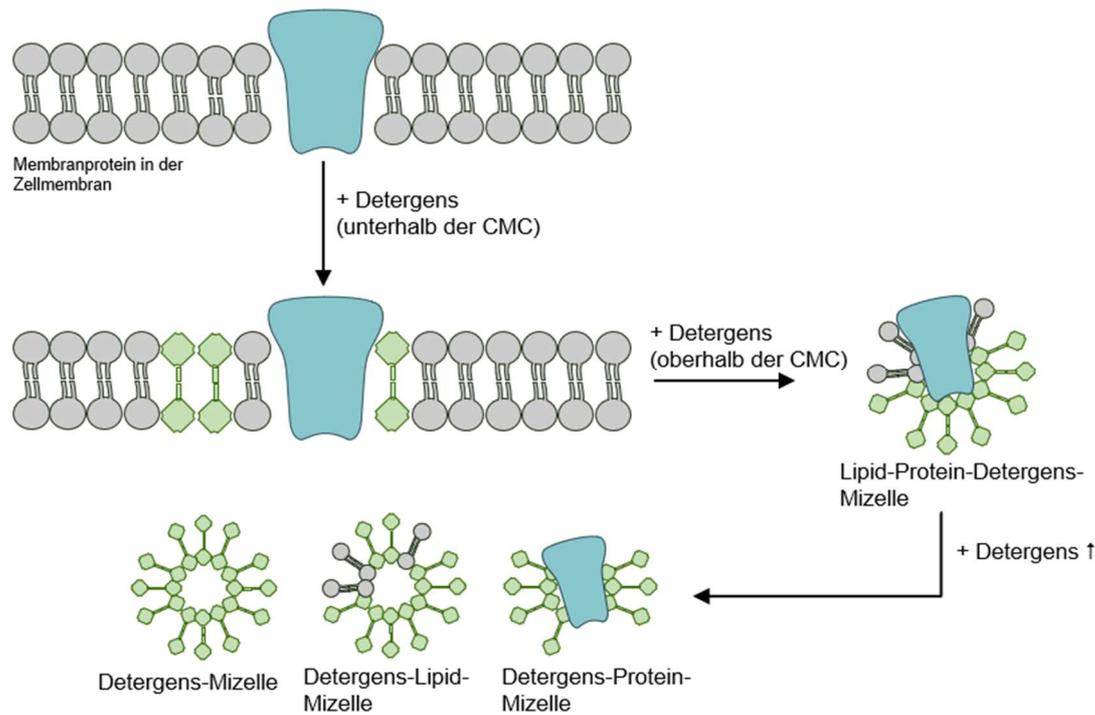


Abbildung 39: Schematische Darstellung des Solubilisierungsvorgangs von Membranproteinen aus der Lipiddoppelschicht durch Detergenzien.

Ein Zufügen von Lysepuffer mit Detergenzien zu Zellen führt mit schrittweiser Erhöhung der Detergenzenkonzentration zunächst zur Einlagerung des Detergens in die Lipidmembran, bei weiter zunehmender Konzentration oberhalb der CMC über die Bildung von Lipid-Protein-Detergens-Mizellen zur Verdrängung des Lipidanteils aus den Mizellen und damit schlussendlich zu reinen Detergens-Protein-Mizellen. Abbildung modifiziert nach *Kalipatnapu et al., 2005 (178)*.

Für die Extraktion von Membranproteinen haben sich nicht-ionische Detergenzien als vorteilhaft erwiesen; sie sind schwächer in ihrer Solubilisierungskraft, verändern aber gleichzeitig weniger stark die Struktur der gelösten Proteine (180). Sie besitzen keine dissoziative Gruppe und spalten sich im wässrigen Milieu nicht in Ionen auf. Prominente Vertreter sind Triton-X-100 (im RIPA-Puffer enthalten) und NP-40.

Das Ausmaß der Fähigkeit Proteine aus einer Membran zu lösen, kann für nicht-ionische Detergenzien durch das Verhältnis von ihrem hydrophilen zu lipophilen Anteil (HLB: hydrophile-lipophile Balance; Tabelle 39) wiedergegeben werden (181). Detergenzien mit einem HLB-Wert über 12 sind in der Lage Membranproteine ohne vorangegangene Denaturierung aus der Lipidmembran zu solubilisieren (182).

Im Gegensatz dazu stehen die ionischen Detergenzien mit geladener funktioneller Kopfgruppe. Zu ihnen zählen beispielsweise Natrium-Desoxycholat oder SDS (beide in RIPA-Puffer enthalten), welche als organische Tenside eine negative Nettoladung verzeichnen. Sie haben eine höhere Extraktionskraft, bergen jedoch die Gefahr, gelöste Proteine leichter in ihrer Struktur zu verändern (180).

Die in Kapitel 3.3.8 definierten Ansprüche an einen geeigneten Lyse-Puffer zur Solubilisierung des hCAT-1-Proteins aus der Zellmembran, begründen die Wahl für die Lysepuffer „RIPA“ und „NP-40“. Der Lyse-Puffer „RIPA“ stellt mit seiner Kombination aus enthaltenen ionischen und nicht-ionischen Tensiden einen stärkeren Solubilisierer als der NP-40-Puffer dar, jedoch unter Inkaufnahme eines höheren Verlustrisikos potenziell assoziierter Bindungspartner.

Die Western-Blot-Analysen der auf verschiedene Weisen lysierten Zellen zeigten hinsichtlich des Signals entsprechend des biotinylierten hCAT-1-Proteins weder durch einen gegen den hCAT-1 gerichteten Antikörper noch durch HRP-Streptavidin einen Unterschied. Sowohl der RIPA-Puffer als auch der NP-40-Puffer waren in der Lage das biotinylierte hCAT-1-Protein aus der Zellmembran zu extrahieren. Ob einer der beiden Lyse-Puffer zu einem Verlust eines potenziell assoziierten Partnerproteins geführt haben kann, kann nur ein Vergleich der massenspektrometrischen Probenanalysen erbringen.

Es ist im Fall eines massenspektrometrisch ausbleibenden Nachweises oder einem Auffinden zu vieler dem hCAT-1 potenziell assoziierter Proteine möglich, die Zusammensetzung und Konzentration der eingesetzten Detergenzien zu variieren, andere Lyse-Puffer einzusetzen und die Einwirkdauer der Lyse-Puffer zu verkürzen, um die Nachweiswahrscheinlichkeit für nicht-kovalent-assoziierte Proteine zu verändern (183).

Beispielsweise kann die CMC für ein Detergens durch Erhöhung des Salzgehalts im Lyse-Puffer erheblich gesenkt werden (178). Dies trifft besonders auf ionische Detergenzien zu, da Salzionen die Abstoßungskraft zwischen den geladenen Kopfgruppen der Detergenzien herabsetzen (185) und damit ihre CMC erniedrigen. Die Inkubation unter verschiedenen Temperaturbedingungen kann ebenfalls den Solubilisierungs-Erfolg verändern (184).

Dies erfordert eine kleinschrittige Modulation des beschriebenen Lyseprotokolls, um die optimalen Bedingungen zu finden.

Des Weiteren hat sich in letzter Zeit ein Ansatz zur detergentenfreien Präzipitation von Membranproteinen durch den Einsatz von Styrol-Maleinsäureanhydrid-Copolymeren (SMA) etabliert (186). SMAs extrahieren Membranproteine, indem sie diese mit ihrer umgebenden Lipiddoppelschicht aus dem Membranverband lösen und armbandartig umlagern (187). Die in diesen Scheiben enthaltenen Membranproteine können durch Affinitätschromatographie aufgereinigt und für weitere Analysemethoden verwendet werden. Diese Methode ermöglicht die Untersuchung von Membranproteinen in ihrer natürlichen Umgebung und bietet sich insbesondere zur Analyse mit dem extrahierten Protein interagierender Proteine an (188). Es besteht jedoch wie bei der Immunpräzipitation die Wahrscheinlichkeit, dass auch nicht-interagierende Proteine in räumlicher Nähe zum Zielprotein mitextrahiert werden. Es gestaltet sich schwierig, diese von den mit dem Zielprotein tatsächlich interagierenden Proteinen zu unterscheiden.

Ferner bleibt einzuwenden, dass eine massenspektrometrische Untersuchung derartig isolierter Membranproteine zurzeit eine große Herausforderung darstellt, da die Membranproteine mit den direkt benachbarten Lipidmembrananteilen in starkem Umfang wechselwirken (189).

Eine Verbesserung der dargelegten Methodik wird in Zukunft weitere Möglichkeiten in der Funktions- und Strukturanalyse von Membranproteinen eröffnen.

Zusammenfassend ist hinsichtlich der experimentellen Suche nach einem assoziierten Bindungspartner der CAT-Proteine Folgendes festzuhalten:

Die gewählten Transfektionsansätze verliefen erfolgreich. Die Basis zum Erhalt von biotinyliertem hCAT-1 ist gegeben; sie ist

1. über zwei verschiedene Wege (Einfach- vs. Simultantransfektion) und
2. in zwei verschiedenen Expressionssystemen (U373-MG vs. HEK293T) und
3. als transiente und stabile Expression

möglich.

Resultierend ist eine Aufreinigung des hCAT-1-Proteins unter Ausnutzung seiner Biotinylierung denkbar.

Um eine Präferenz zwischen

1. einer stabilen Expression mit dem „HC1-C-FTA/hBirA-EGFP“-Konstrukt in HEK293T-Zellen,
2. einer transienten Expression jenes Konstrukts in der gleichen Zelllinie oder
3. einer transienten Expression mit den „hCAT-1-BAP-N1“- und „pCMV3-BirA“-Konstrukten im Expressionssystem U373-MG

treffen zu können, bedarf es der Durchführung und Auswertung geplanter massenspektrometrischer Analysen entsprechender Proben.

Hinsichtlich der eingesetzten Lyse-Puffer „RIPA“ und „NP-40“ lässt sich festhalten, dass beide Puffer in der Lage waren, das biotinylierte hCAT-1-Protein aus der Zellmembran zu extrahieren.

Ob einer der beiden Lyse-Puffer zu einem Verlust eines potenziell assoziierten Partnerproteins geführt haben kann, kann nur ein Vergleich der massenspektrometrischen Probenanalysen erbringen.

6 Zusammenfassung

Die Transporter für kationische Aminosäuren nehmen eine bedeutende Stellung innerhalb der Zellmembrantransporter ein. Sie gewährleisten ein ausreichendes intrazelluläres Aufkommen jener Aminosäuren und sind damit für das Leben eines Organismus unabdingbar.

Die vorliegende Arbeit hatte es sich zum Ziel gesetzt, einerseits einen potenziellen Einfluss von Stickstoffmonoxid auf die Funktion jener Transporter zu untersuchen und andererseits eine grundlegende Basis für die Untersuchung diesen Transportern assoziierter Interaktionsproteine zu schaffen. Beides dient dem besseren Verständnis der Funktionsweise und Steuerung der kationischen Aminosäuretransporter.

Dargebotene Studienergebnisse zeigen eine fehlende Wirkung von NO und NO^+ auf die humanen Isoformen CAT-1 und -2A.

Es ergibt sich, dass im Expressionssystem *X. laevis*-Oozyte

1. die hCATs entweder keine Thiyl-Reste zur Nitrosylierung besitzen oder eine **Nitrosylierung** vorhandener Thiyl-Reste keine Auswirkung auf ihre Transportleistung hat

und

2. keine Modulation der hCAT-Funktion durch den Mechanismus der **(trans-) Nitrosylierung** stattfindet.

Diese Erkenntnisse stehen konträr zu den Forschungsarbeiten von *Zhou et al.* Potenzielle Erklärungsansätze hinsichtlich des Vorliegens divergenter Cysteinreste innerhalb der eingesetzten murinen und humanen CAT-Proteine, SNO-Bildung über ein assoziiertes Interaktom und Hemmung über assoziierte Interaktionsproteine wurden in der vorliegenden Arbeit diskutiert und geben Anstoß für zukünftige Forschungsarbeiten.

Bezüglich der praktischen Untersuchung auf das Vorhandensein potenziell mit den kationischen Aminosäuretransportern assoziierter Interaktionsproteine legt die vorliegende Arbeit Grundsteine.

Auf der Basis der vorliegenden Arbeit werden

1. zwei **Expressionsvektoren** zur Gewinnung des biotinylierten Zielproteins „hCAT-1“ in zwei verschiedenen Zelllinien, inklusive der Etablierung einer Zelllinie mit **stabiler Expression** des biotinylierten hCAT-1-Proteins

und

2. ein Arbeitsprotokoll bis zum Schritt der Aufreinigung des Zielproteins inklusive der Auswahl geeigneter **Lyse-Puffer** und Western-Blot-Analysen

vorgelegt und durch entsprechende Versuchsdaten dokumentiert.

Die vorliegende Arbeit stellt resümierend einen Ausgangspunkt für weitere Forschungsschritte zur Charakterisierung der Funktionsweise der hCAT-Proteine dar.

Sie ebnet Wege zur Entschlüsselung bisher unbekannter Steuerungsprozesse kationischer Aminosäuretransporter, insbesondere in Bezug auf deren Stabilität, Integration und Funktionsfähigkeit in der Zellmembran und liefert so einen potenziellen Beitrag zur Innovation therapeutischer Einflussnahmen durch Hemmung der intrazellulären Argininaufnahme in z. B. CLL-Zellen und damit einem potenziellen therapeutischen Nutzen in der Therapie maligner Erkrankungen.

7 Literaturverzeichnis

1. Palacin M, Estevez R, Bertran J, Zorzano A. Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiological reviews*. 1998;78(4):969-1054.
2. Broer S. Amino Acid Transporters as Disease Modifiers and Drug Targets. *SLAS discovery : advancing life sciences R & D*. 2018;23(4):303-20.
3. Werner A, Pieh D, Echchannaoui H, Rupp J, Rajalingam K, Theobald M, et al. Cationic Amino Acid Transporter-1-Mediated Arginine Uptake Is Essential for Chronic Lymphocytic Leukemia Cell Proliferation and Viability. *Frontiers in oncology*. 2019;9:1268.
4. Devés R, Angelo S, Chávez P. N-ethylmaleimide discriminates between two lysine transport systems in human erythrocytes. *The Journal of physiology*. 1993;468:753-66.
5. Beyer SR, Mallmann RT, Jaenecke I, Habermeier A, Boissel JP, Closs EI. Identification of cysteine residues in human cationic amino acid transporter hCAT-2A that are targets for inhibition by N-ethylmaleimide. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(42):30411-9.
6. Zhou J, Kim DD, Peluffo RD. Nitric oxide can acutely modulate its biosynthesis through a negative feedback mechanism on L-arginine transport in cardiac myocytes. *American journal of physiology Cell physiology*. 2010;299(2):C230-9.
7. Yan R, Zhao X, Lei J, Zhou Q. Structure of the human LAT1-4F2hc heteromeric amino acid transporter complex. *Nature*. 2019;568(7750):127-30.
8. Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC. *Biochemie & Pathobiochemie*. Heidelberg: Springer; 2006 2006.
9. Schmidt HH, Nau H, Wittfoht W, Gerlach J, Prescher KE, Klein MM, et al. Arginine is a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide. *European journal of pharmacology*. 1988;154(2):213-6.
10. Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, et al. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 1994;23(6 Pt 2):1121-31.
11. Bratt JM, Zeki AA, Last JA, Kenyon NJ. Competitive metabolism of L-arginine: arginase as a therapeutic target in asthma. *Journal of biomedical research*. 2011;25(5):299-308.

12. Barbul A. Arginine: biochemistry, physiology, and therapeutic implications. *JPEN Journal of parenteral and enteral nutrition*. 1986;10(2):227-38.
13. Sakami W, Harrington H. AMINO ACID METABOLISM. *Annual review of biochemistry*. 1963;32:355-98.
14. Jenkinson CP, Grody WW, Cederbaum SD. Comparative properties of arginases. *Comparative biochemistry and physiology Part B, Biochemistry & molecular biology*. 1996;114(1):107-32.
15. Closs EI. Virusrezeptoren und Transportproteine: Entdeckung einer neuen Familie von Carrier-Proteinen für basische Aminosäuren (CATs). 1998.
16. Van Winkle LJ, Christensen HN, Campione AL. Na⁺-dependent transport of basic, zwitterionic, and bicyclic amino acids by a broad-scope system in mouse blastocysts. *The Journal of biological chemistry*. 1985;260(22):12118-23.
17. Van Winkle LJ, Campione AL, Gorman JM. Na⁺-independent transport of basic and zwitterionic amino acids in mouse blastocysts by a shared system and by processes which distinguish between these substrates. *The Journal of biological chemistry*. 1988;263(7):3150-63.
18. Hatanaka T, Nakanishi T, Huang W, Leibach FH, Prasad PD, Ganapathy V, et al. Na⁺ - and Cl⁻ -coupled active transport of nitric oxide synthase inhibitors via amino acid transport system B(0,+). *The Journal of clinical investigation*. 2001;107(8):1035-43.
19. Deves R, Boyd CA. Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function. *Physiological reviews*. 1998;78(2):487-545.
20. Eleno N, Devés R, Boyd CA. Membrane potential dependence of the kinetics of cationic amino acid transport systems in human placenta. *The Journal of physiology*. 1994;479 (Pt 2)(Pt 2):291-300.
21. Christensen HN, Liang M. Transport of diamino acids into the Ehrlich cell. *The Journal of biological chemistry*. 1966;241(23):5542-51.
22. White MF, Christensen HN. Cationic amino acid transport into cultured animal cells. II. Transport system barely perceptible in ordinary hepatocytes, but active in hepatoma cell lines. *The Journal of biological chemistry*. 1982;257(8):4450-7.
23. Palacin M. A new family of proteins (rBAT and 4F2hc) involved in cationic and zwitterionic amino acid transport: a tale of two proteins in search of a transport function. *The Journal of experimental biology*. 1994;196:123-37.
24. Palacin M, Borsani G, Sebastio G. The molecular bases of cystinuria and lysinuric protein intolerance. *Current opinion in genetics & development*. 2001;11(3):328-35.

25. Goodyer P, Boutros M, Rozen R. The molecular basis of cystinuria: an update. *Experimental nephrology*. 2000;8(3):123-7.
26. Closs EI. Expression, regulation and function of carrier proteins for cationic amino acids. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2002;11(1):99-107.
27. White MF. The transport of cationic amino acids across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochimica et biophysica acta*. 1985;822(3-4):355-74.
28. Hanssen H, Brunini TM, Conway M, Banning AP, Roberts NB, Mann GE, et al. Increased L-arginine transport in human erythrocytes in chronic heart failure. *Clinical science (London, England : 1979)*. 1998;94(1):43-8.
29. Deves R, Chavez P, Boyd CA. Identification of a new transport system (γ +L) in human erythrocytes that recognizes lysine and leucine with high affinity. *The Journal of physiology*. 1992;454:491-501.
30. Torrents D, Estevez R, Pineda M, Fernandez E, Lloberas J, Shi YB, et al. Identification and characterization of a membrane protein (γ +L amino acid transporter-1) that associates with 4F2hc to encode the amino acid transport activity γ +L. A candidate gene for lysinuric protein intolerance. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(49):32437-45.
31. Verrey F, Meier C, Rossier G, Kuhn LC. Glycoprotein-associated amino acid exchangers: broadening the range of transport specificity. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2000;440(4):503-12.
32. Chillaron J, Estevez R, Mora C, Wagner CA, Suessbrich H, Lang F, et al. Obligatory amino acid exchange via systems bo,+/-like and γ +L-like. A tertiary active transport mechanism for renal reabsorption of cystine and dibasic amino acids. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(30):17761-70.
33. Verrey F, Closs EI, Wagner CA, Palacin M, Endou H, Kanai Y. CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2004;447(5):532-42.
34. Pfeiffer R, Rossier G, Spindler B, Meier C, Kuhn L, Verrey F. Amino acid transport of γ +L-type by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of the glycoprotein-associated amino acid transporter family. *The EMBO journal*. 1999;18(1):49-57.
35. Torrents D, Mykkanen J, Pineda M, Feliubadalo L, Estevez R, de Cid R, et al. Identification of SLC7A7, encoding γ +LAT-1, as the lysinuric protein intolerance gene. *Nature genetics*. 1999;21(3):293-6.
36. Esteve E, Krug P, Hummel A, Arnoux JB, Boyer O, Brassier A, et al. Renal involvement in lysinuric protein intolerance: contribution of pathology to

- assessment of heterogeneity of renal lesions. *Human pathology*. 2017;62:160-9.
37. Nunes V, Niinikoski H. Lysinuric Protein Intolerance. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, et al., editors. *GeneReviews*(®). Seattle (WA): University of Washington, Seattle University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.; 1993.
38. Oyanagi K, Sogawa H, Minami R, Nakao T, Chiba T. The mechanism of hyperammonemia in congenital lysinuria. *The Journal of pediatrics*. 1979;94(2):255-7.
39. Wu G, Morris SM, Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *The Biochemical journal*. 1998;336 (Pt 1)(Pt 1):1-17.
40. Closs EI, Graf P, Habermeier A, Cunningham JM, Forstermann U. Human cationic amino acid transporters hCAT-1, hCAT-2A, and hCAT-2B: three related carriers with distinct transport properties. *Biochemistry*. 1997;36(21):6462-8.
41. Closs EI, Lyons CR, Kelly C, Cunningham JM. Characterization of the third member of the MCAT family of cationic amino acid transporters. Identification of a domain that determines the transport properties of the MCAT proteins. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268(28):20796-800.
42. Kavanaugh MP, Wang H, Zhang Z, Zhang W, Wu YN, Dechant E, et al. Control of cationic amino acid transport and retroviral receptor functions in a membrane protein family. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(22):15445-50.
43. Hoshida R, Ikeda Y, Karashima S, Matsuura T, Komaki S, Kishino T, et al. Molecular cloning, tissue distribution, and chromosomal localization of human cationic amino acid transporter 2 (hCAT2). *Genomics*. 1996;38(2):174-8.
44. Kakuda DK, MacLeod CL. Na(+)-independent transport (uniport) of amino acids and glucose in mammalian cells. *The Journal of experimental biology*. 1994;196:93-108.
45. Kakuda DK, Sweet MJ, MacLeod CL, Hume DA, Markovich D. CAT2-mediated L-arginine transport and nitric oxide production in activated macrophages. *The Biochemical journal*. 1999;340 (Pt 2):549-53.
46. Habermeier A, Wolf S, Martine U, Graf P, Closs EI. Two amino acid residues determine the low substrate affinity of human cationic amino acid transporter-2A. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(21):19492-9.
47. Closs EI, Boissel JP, Habermeier A, Rotmann A. Structure and function of cationic amino acid transporters (CATs). *J Membr Biol*. 2006;213(2):67-77.

48. Albritton LM, Tseng L, Scadden D, Cunningham JM. A putative murine ecotropic retrovirus receptor gene encodes a multiple membrane-spanning protein and confers susceptibility to virus infection. *Cell*. 1989;57(4):659-66.
49. Reizer J, Finley K, Kakuda D, MacLeod CL, Reizer A, Saier MH, Jr. Mammalian integral membrane receptors are homologous to facilitators and antiporters of yeast, fungi, and eubacteria. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 1993;2(1):20-30.
50. Gräf P. Charakterisierung der Transportproteine für basische Aminosäuren: CAT-1, CAT-2A und CAT-2B. In: Mainz FCuPdJG-Ui, editor. *Dissertationsschrift ed1998*.
51. Kim JW, Cunningham JM. N-linked glycosylation of the receptor for murine ecotropic retroviruses is altered in virus-infected cells. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268(22):16316-20.
52. Sperandeo MP, Borsani G, Incerti B, Zollo M, Rossi E, Zuffardi O, et al. The gene encoding a cationic amino acid transporter (SLC7A4) maps to the region deleted in the velocardiofacial syndrome. *Genomics*. 1998;49(2):230-6.
53. Pisoni RL, Thoene JG, Christensen HN. 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*. 1985;260(8):4791-8.
54. Wolf S, Janzen A, Vékony N, Martiné U, Strand D, Closs EI. Expression of solute carrier 7A4 (SLC7A4) in the plasma membrane is not sufficient to mediate amino acid transport activity. *The Biochemical journal*. 2002;364(Pt 3):767-75.
55. Jaenecke I, Boissel JP, Lemke M, Rupp J, Gasnier B, Closs EI. 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*. 2012;287(36):30853-60.
56. Pisoni RL, Thoene JG, Lemons RM, Christensen HN. Important differences in cationic amino acid transport by lysosomal system c and system y+ of the human fibroblast. *The Journal of biological chemistry*. 1987;262(31):15011-8.
57. Wang H, Kavanaugh MP, North RA, Kabat D. Cell-surface receptor for ecotropic murine retroviruses is a basic amino-acid transporter. *Nature*. 1991;352(6337):729-31.
58. Kim JW, Closs EI, Albritton LM, Cunningham JM. Transport of cationic amino acids by the mouse ecotropic retrovirus receptor. *Nature*. 1991;352(6337):725-8.

59. Closs EI, Simon A, Vekony N, Rotmann A. Plasma membrane transporters for arginine. *The Journal of nutrition*. 2004;134(10 Suppl):2752S-9S; discussion 65S-67S.
60. Perkins CP, Mar V, Shutter JR, del Castillo J, Danilenko DM, Medlock ES, et al. Anemia and perinatal death result from loss of the murine ecotropic retrovirus receptor mCAT-1. *Genes & development*. 1997;11(7):914-25.
61. Hatzoglou M, Fernandez J, Yaman I, Closs E. Regulation of cationic amino acid transport: the story of the CAT-1 transporter. *Annual review of nutrition*. 2004;24:377-99.
62. Bussolati O, Sala R, Astorri A, Rotoli BM, Dall'Asta V, Gazzola GC. Characterization of amino acid transport in human endothelial cells. *The American journal of physiology*. 1993;265(4 Pt 1):C1006-14.
63. Rotmann A, Strand D, Martine U, Closs EI. 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*. 2004;279(52):54185-92.
64. Kavanaugh MP. Voltage dependence of facilitated arginine flux mediated by the system y⁺ basic amino acid transporter. *Biochemistry*. 1993;32(22):5781-5.
65. Hosokawa H, Sawamura T, Kobayashi S, Ninomiya H, Miwa S, Masaki T. Cloning and characterization of a brain-specific cationic amino acid transporter. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(13):8717-22.
66. Ito K, Groudine M. A new member of the cationic amino acid transporter family is preferentially expressed in adult mouse brain. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(42):26780-6.
67. Hosokawa H, Ninomiya H, Sawamura T, Sugimoto Y, Ichikawa A, Fujiwara K, et al. Neuron-specific expression of cationic amino acid transporter 3 in the adult rat brain. *Brain research*. 1999;838(1-2):158-65.
68. Vekony N, Wolf S, Boissel JP, Gnauert K, Closs EI. Human cationic amino acid transporter hCAT-3 is preferentially expressed in peripheral tissues. *Biochemistry*. 2001;40(41):12387-94.
69. Nicholson B, Manner CK, MacLeod CL. Cat2 L-arginine transporter-deficient fibroblasts can sustain nitric oxide production. *Nitric oxide : biology and chemistry*. 2002;7(4):236-43.
70. Nicholson B, Sawamura T, Masaki T, MacLeod CL. Increased Cat3-mediated cationic amino acid transport functionally compensates in Cat1 knockout cell lines. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(24):14663-6.

71. Gu Q, Yang X, Lin L, Li S, Li Q, Zhong S, et al. Genetic ablation of solute carrier family 7a3a leads to hepatic steatosis in zebrafish during fasting. *Hepatology* (Baltimore, Md). 2014;60(6):1929-41.
72. Nava C, Rupp J, Boissel JP, Mignot C, Rastetter A, Amiet C, et al. Hypomorphic variants of cationic amino acid transporter 3 in males with autism spectrum disorders. *Amino acids*. 2015;47(12):2647-58.
73. Casanello P, Krause B, Torres E, Gallardo V, Gonzalez M, Prieto C, et al. Reduced L-arginine transport and nitric oxide synthesis in human umbilical vein endothelial cells from intrauterine growth restriction pregnancies is not further altered by hypoxia. *Placenta*. 2009;30(7):625-33.
74. Flores C, Rojas S, Aguayo C, Parodi J, Mann G, Pearson JD, et al. Rapid stimulation of L-arginine transport by D-glucose involves p42/44(mapk) and nitric oxide in human umbilical vein endothelium. *Circulation research*. 2003;92(1):64-72.
75. Shin S, Mohan S, Fung HL. Intracellular L-arginine concentration does not determine NO production in endothelial cells: implications on the "L-arginine paradox". *Biochemical and biophysical research communications*. 2011;414(4):660-3.
76. Cooke JP, Singer AH, Tsao P, Zera P, Rowan RA, Billingham ME. Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. *The Journal of clinical investigation*. 1992;90(3):1168-72.
77. Chen PY, Sanders PW. L-arginine abrogates salt-sensitive hypertension in Dahl/Rapp rats. *The Journal of clinical investigation*. 1991;88(5):1559-67.
78. Cardounel AJ, Cui H, Samouilov A, Johnson W, Kearns P, Tsai AL, et al. Evidence for the pathophysiological role of endogenous methylarginines in regulation of endothelial NO production and vascular function. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(2):879-87.
79. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988;333(6174):664-6.
80. Bode-Boger SM, Scalera F, Ignarro LJ. The L-arginine paradox: Importance of the L-arginine/asymmetrical dimethylarginine ratio. *Pharmacology & therapeutics*. 2007;114(3):295-306.
81. Bednarz B, Jaxa-Chamiec T, Gebalska J, Herbaczynska-Cedro K, Ceremuzynski L. L-arginine supplementation prolongs exercise capacity in congestive heart failure. *Kardiologia polska*. 2004;60(4):348-53.
82. Barcelos GT, Rossato DD, Perini JL, Pinheiro LP, Carvalho C, Jaenisch RB, et al. Effects of L-arginine supplementation associated with continuous or interval

- aerobic training on chronic heart failure rats. *Metabolism: clinical and experimental*. 2017;76:1-10.
83. Chin-Dusting JP, Kaye DM, Lefkovits J, Wong J, Bergin P, Jennings GL. Dietary supplementation with L-arginine fails to restore endothelial function in forearm resistance arteries of patients with severe heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*. 1996;27(5):1207-13.
84. Simon A, Plies L, Habermeier A, Martine U, Reining M, Closs EI. Role of neutral amino acid transport and protein breakdown for substrate supply of nitric oxide synthase in human endothelial cells. *Circulation research*. 2003;93(9):813-20.
85. Fukuto JM, Carrington SJ, Tantillo DJ, Harrison JG, Ignarro LJ, Freeman BA, et al. Small molecule signaling agents: the integrated chemistry and biochemistry of nitrogen oxides, oxides of carbon, dioxygen, hydrogen sulfide, and their derived species. *Chemical research in toxicology*. 2012;25(4):769-93.
86. Heinrich TA, da Silva RS, Miranda KM, Switzer CH, Wink DA, Fukuto JM. Biological nitric oxide signalling: chemistry and terminology. *British Journal of Pharmacology*. 2013;169(7):1417-29.
87. Hakim TS, Sugimori K, Camporesi EM, Anderson G. Half-life of nitric oxide in aqueous solutions with and without haemoglobin. *Physiological measurement*. 1996;17(4):267-77.
88. Ford PC, Fernandez BO, Lim MD. Mechanisms of reductive nitrosylation in iron and copper models relevant to biological systems. *Chemical reviews*. 2005;105(6):2439-55.
89. Anand P, Stamler JS. Enzymatic mechanisms regulating protein S-nitrosylation: implications in health and disease. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2012;90(3):233-44.
90. Daiber A, Schildknecht S, Muller J, Kamuf J, Bachschmid MM, Ullrich V. Chemical model systems for cellular nitros(yl)ation reactions. *Free radical biology & medicine*. 2009;47(4):458-67.
91. Liu X, Miller MJ, Joshi MS, Thomas DD, Lancaster JR, Jr. Accelerated reaction of nitric oxide with O₂ within the hydrophobic interior of biological membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(5):2175-9.
92. Christen P, Jaussi R, Benoit R. *Biochemie und Molekularbiologie: Eine Einführung in 40 Lerneinheiten*: Springer Spektrum; 2015 2016. 577 p.
93. Hoque MT, Cole SP. Down-regulation of Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 1 increases expression and function of multidrug resistance protein 4. *Cancer research*. 2008;68(12):4802-9.

94. James DE, Brown R, Navarro J, Pilch PF. Insulin-regulatable tissues express a unique insulin-sensitive glucose transport protein. *Nature*. 1988;333(6169):183-5.
95. Leto D, Saltiel AR. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2012;13(6):383-96.
96. Yanagida O, Kanai Y, Chairoungdua A, Kim DK, Segawa H, Nii T, et al. Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochimica et biophysica acta*. 2001;1514(2):291-302.
97. Kanai Y, Segawa H, Miyamoto K, Uchino H, Takeda E, Endou H. 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*. 1998;273(37):23629-32.
98. Pfeiffer R, Spindler B, Loffing J, Skelly PJ, Shoemaker CB, Verrey F. Functional heterodimeric amino acid transporters lacking cysteine residues involved in disulfide bond. *FEBS letters*. 1998;439(1-2):157-62.
99. Reig N, Chillaron J, Bartoccioni P, Fernandez E, Bendahan A, Zorzano A, et al. The light subunit of system b(o,+) is fully functional in the absence of the heavy subunit. *The EMBO journal*. 2002;21(18):4906-14.
100. Rotmann A, Vekony N, Gassner D, Niegisch G, Strand D, Martine U, et al. Activation of classical protein kinase C reduces the expression of human cationic amino acid transporter 3 (hCAT-3) in the plasma membrane. *The Biochemical journal*. 2006;395(1):117-23.
101. Graf P, Forstermann U, Closs EI. The transport activity of the human cationic amino acid transporter hCAT-1 is downregulated by activation of protein kinase C. *Br J Pharmacol*. 2001;132(6):1193-200.
102. Bertran J, Werner A, Stange G, Markovich D, Biber J, Testar X, et al. Expression of Na(+)-independent amino acid transport in *Xenopus laevis* oocytes by injection of rabbit kidney cortex mRNA. *The Biochemical journal*. 1992;281 (Pt 3)(Pt 3):717-23.
103. Rodriguez PC, Quiceno DG, Ochoa AC. L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood*. 2007;109(4):1568-73.
104. Munder M, Schneider H, Luckner C, Giese T, Langhans CD, Fuentes JM, et al. Suppression of T-cell functions by human granulocyte arginase. *Blood*. 2006;108(5):1627-34.
105. Grohmann U, Bronte V. Control of immune response by amino acid metabolism. *Immunological reviews*. 2010;236:243-64.

106. Werner A, Amann E, Schnitzius V, Habermeier A, Luckner-Minden C, Leuchtner N, et al. Induced arginine transport via cationic amino acid transporter-1 is necessary for human T-cell proliferation. *European journal of immunology*. 2016;46(1):92-103.
107. Jansohn M, Rothhämel S. *Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor: Spektrum Akademischer Verlag*; 2012 2012. 683 p.
108. Wiederschain D, Wee S, Chen L, Loo A, Yang G, Huang A, et al. Single-vector inducible lentiviral RNAi system for oncology target validation. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2009;8(3):498-504.
109. Klenow H, Henningsen I. Selective elimination of the exonuclease activity of the deoxyribonucleic acid polymerase from *Escherichia coli* B by limited proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1970;65(1):168-75.
110. Green M, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual: Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.*; 2012. 2028 p.
111. Shih YC, Prausnitz JM, Blanch HW. Some characteristics of protein precipitation by salts. *Biotechnology and bioengineering*. 1992;40(10):1155-64.
112. Pitt-Rivers R, Impiombato FS. The binding of sodium dodecyl sulphate to various proteins. *The Biochemical journal*. 1968;109(5):825-30.
113. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of general virology*. 1977;36(1):59-74.
114. Ponten J, Macintyre EH. Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica*. 1968;74(4):465-86.
115. Sexton TJ. A new poultry semen extender. 5. Relationship of diluent components to cytotoxic effects of dimethylsulfoxide on turkey spermatozoa. *Poultry science*. 1980;59(5):1142-4.
116. Davies J, Jimenez A. A new selective agent for eukaryotic cloning vectors. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1980;29(5 Suppl):1089-92.
117. Graham FL, van der Eb AJ. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*. 1973;52(2):456-67.
118. Glover DJ, Lipps HJ, Jans DA. Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans. *Nature reviews Genetics*. 2005;6(4):299-310.
119. Harlow E, Lane D. *Using Antibodies: A Laboratory Manual: CSHL Press*; 1999. 495 p.

120. Hilken G, Iglauer F, Richter H-P, Crowell K. *Xenopus laevis* als Labortier: Biologie, Haltung, Zucht und experimenteller Nutzen. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag; 1997 1997.
121. Soreq H, Seidman S. *Xenopus* oocyte microinjection: from gene to protein. *Methods in enzymology*. 1992;207:225-65.
122. Taylor MA, Johnson AD, Smith LD. Growing *Xenopus* oocytes have spare translational capacity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985;82(19):6586-9.
123. Dumont JN. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *Journal of morphology*. 1972;136(2):153-79.
124. Bonath K. *Narkose der Reptilien, Amphibien u. Fische*. Berlin und Hamburg: Paul Parey Verlag; 1977.
125. Brown AL. *The African clawed toad, Xenopus laevis: A guide for laboratory practical work*. London: Butterworths; 1970. 0408403004 p.
126. Kaplan HM. Anesthesia in amphibians and reptiles. *Federation proceedings*. 1969;28(4):1541-6.
127. Neuschwander-Tetri BA, Roll FJ. Glutathione measurement by high-performance liquid chromatography separation and fluorometric detection of the glutathione-orthophthalaldehyde adduct. *Analytical biochemistry*. 1989;179(2):236-41.
128. Tsikas D, Sandmann J, Holzberg D, Pantazis P, Raida M, Frolich JC. Determination of S-nitrosoglutathione in human and rat plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet absorbance detection after precolumn derivatization with o-phthalaldehyde. *Analytical biochemistry*. 1999;273(1):32-40.
129. Lu X, Zheng R, Gonzalez J, Gaspers L, Kuzhikandathil E, Peluffo RD. L-lysine uptake in giant vesicles from cardiac ventricular sarcolemma: two components of cationic amino acid transport. *Bioscience reports*. 2009;29(4):271-81.
130. Chaturvedi R, Asim M, Hoge S, Lewis ND, Singh K, Barry DP, et al. Polyamines Impair Immunity to *Helicobacter pylori* by Inhibiting L-Arginine Uptake Required for Nitric Oxide Production. *Gastroenterology*. 2010;139(5):1686-98, 98.e1-6.
131. Leone M, Boyle WA. Decreased vasopressin responsiveness in vasodilatory septic shock-like conditions. *Critical care medicine*. 2006;34(4):1126-30.
132. Heinzl FR, Luo Y, Dodoni G, Boengler K, Petrat F, Di Lisa F, et al. Formation of reactive oxygen species at increased contraction frequency in rat cardiomyocytes. *Cardiovascular research*. 2006;71(2):374-82.

133. Ballatori N, Wang W, Li L, Truong AT. An endogenous ATP-sensitive glutathione S-conjugate efflux mechanism in *Xenopus laevis* oocytes. *The American journal of physiology*. 1996;270(5 Pt 2):R1156-62.
134. Paige JS, Xu G, Stancevic B, Jaffrey SR. Nitrosothiol reactivity profiling identifies S-nitrosylated proteins with unexpected stability. *Chemistry & biology*. 2008;15(12):1307-16.
135. Wolf S, Janzen A, Vekony N, Martine U, Strand D, Closs EI. Expression of solute carrier 7A4 (SLC7A4) in the plasma membrane is not sufficient to mediate amino acid transport activity. *The Biochemical journal*. 2002;364(Pt 3):767-75.
136. Ioannou M, Papageorgiou DN, Ogryzko V, Strouboulis J. Mammalian expression vectors for metabolic biotinylation tandem affinity tagging by co-expression in cis of a mammalian codon-optimized BirA biotin ligase. *BMC research notes*. 2018;11(1):390.
137. Tenzer S, Moro A, Kuharev J, Francis AC, Vidalino L, Provenzani A, et al. Proteome-wide characterization of the RNA-binding protein RALY-interactome using the in vivo-biotinylation-pulldown-quant (iBioPQ) approach. *Journal of proteome research*. 2013;12(6):2869-84.
138. Tirat A, Freuler F, Stettler T, Mayr LM, Leder L. Evaluation of two novel tag-based labelling technologies for site-specific modification of proteins. *International journal of biological macromolecules*. 2006;39(1-3):66-76.
139. Mechold U, Gilbert C, Ogryzko V. Codon optimization of the BirA enzyme gene leads to higher expression and an improved efficiency of biotinylation of target proteins in mammalian cells. *Journal of biotechnology*. 2005;116(3):245-9.
140. Fairhead M, Howarth M. Site-specific biotinylation of purified proteins using BirA. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2015;1266:171-84.
141. Wolf S. Funktionsanalyse des als kationischer Aminosäure-Transporter bezeichneten, humanen Membranproteins, hCAT-4. In: Mainz PIdJG-U, editor. 2001.
142. Lin H, Su X, He B. Protein lysine acylation and cysteine succination by intermediates of energy metabolism. *ACS chemical biology*. 2012;7(6):947-60.
143. Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2005;6(2):150-66.
144. Simmons WW, Closs EI, Cunningham JM, Smith TW, Kelly RA. Cytokines and insulin induce cationic amino acid transporter (CAT) expression in cardiac myocytes. Regulation of L-arginine transport and no production by CAT-1, CAT-2A, and CAT-2B. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(20):11694-702.

145. van Haeften TW, Konings CH. Arginine pharmacokinetics in humans assessed with an enzymatic assay adapted to a centrifugal analyzer. *Clinical chemistry*. 1989;35(6):1024-6.
146. Noeh FM, Wenzel A, Harris N, Milakofsky L, Hofford JM, Pell S, et al. The effects of arginine administration on the levels of arginine, other amino acids and related amino compounds in the plasma, heart, aorta, vena cava, bronchi and pancreas of the rat. *Life sciences*. 1996;58(8):P1131-8.
147. Toback FG, Mayers AM, Lowenstein LM. Alterations in renal and plasma amino acid concentrations during renal compensatory growth. *The American journal of physiology*. 1973;225(5):1247-51.
148. Seth D, Hess DT, Hausladen A, Wang L, Wang YJ, Stamler JS. A Multiplex Enzymatic Machinery for Cellular Protein S-nitrosylation. *Molecular cell*. 2018;69(3):451-64.e6.
149. Angelo M, Singel DJ, Stamler JS. An S-nitrosothiol (SNO) synthase function of hemoglobin that utilizes nitrite as a substrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(22):8366-71.
150. Luchsinger BP, Rich EN, Gow AJ, Williams EM, Stamler JS, Singel DJ. Routes to S-nitroso-hemoglobin formation with heme redox and preferential reactivity in the beta subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(2):461-6.
151. Puchulu-Campanella E, Chu H, Anstee DJ, Galan JA, Tao WA, Low PS. Identification of the components of a glycolytic enzyme metabolon on the human red blood cell membrane. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(2):848-58.
152. Pawloski JR, Hess DT, Stamler JS. Export by red blood cells of nitric oxide bioactivity. *Nature*. 2001;409(6820):622-6.
153. Campanella ME, Chu H, Wandersee NJ, Peters LL, Mohandas N, Gilligan DM, et al. Characterization of glycolytic enzyme interactions with murine erythrocyte membranes in wild-type and membrane protein knockout mice. *Blood*. 2008;112(9):3900-6.
154. Koonen DP, Coumans WA, Arumugam Y, Bonen A, Glatz JF, Luiken JJ. Giant membrane vesicles as a model to study cellular substrate uptake dissected from metabolism. *Molecular and cellular biochemistry*. 2002;239(1-2):121-30.
155. van den Berg WA, Hagen WR, van Dongen WM. The hybrid-cluster protein ('prismane protein') from *Escherichia coli*. Characterization of the hybrid-cluster protein, redox properties of the [2Fe-2S] and [4Fe-2S-2O] clusters and identification of an associated NADH oxidoreductase containing FAD and [2Fe-2S]. *European journal of biochemistry*. 2000;267(3):666-76.

156. Han KL, Yong TS, Ryu J-S, Hwang UW, Park SJ. Identification of the hybrid cluster protein, HCP, from amitochondriate eukaryotes and its phylogenetic implications. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2004;14:134-9.
157. van Lis R, Brugiere S, Baffert C, Coute Y, Nitschke W, Atteia A. Hybrid cluster proteins in a photosynthetic microalga. *The FEBS journal*. 2019.
158. Rotmann A, Simon A, Martine U, Habermeier A, Closs EI. Activation of classical protein kinase C decreases transport via systems y⁺ and y⁺L. *American journal of physiology Cell physiology*. 2007;292(6):C2259-68.
159. Dascal N. The Use of *Xenopus* Oocytes for the Study of Ion Channel. *Critical Reviews in Biochemistry*. 1987;22(4):317-87.
160. Tate SS, Urade R, Micanovic R, Gerber L, Udenfriend S. Secreted alkaline phosphatase: an internal standard for expression of injected mRNAs in the *Xenopus* oocyte. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1990;4(2):227-31.
161. Gurdon JB, Wickens MP. The use of *Xenopus* oocytes for the expression of cloned genes. *Methods in enzymology*. 1983;101:370-86.
162. Nakamura T, Lipton SA. Nitrosative Stress in the Nervous System: Guidelines for Designing Experimental Strategies to Study Protein S-Nitrosylation. *Neurochemical research*. 2016;41(3):510-4.
163. Ramachandran J, Schneider JS, Crassous P-A, Zheng R, Gonzalez JP, Xie L-H, et al. Nitric oxide signalling pathway in Duchenne muscular dystrophy mice: up-regulation of L-arginine transporters. *The Biochemical journal*. 2013;449(1):133-42.
164. Nguyen TM, Le TT, Blake DJ, Davies KE, Morris GE. Utrophin, the autosomal homologue of dystrophin, is widely-expressed and membrane-associated in cultured cell lines. *FEBS letters*. 1992;313(1):19-22.
165. von Mering C, Krause R, Snel B, Cornell M, Oliver SG, Fields S, et al. Comparative assessment of large-scale data sets of protein-protein interactions. *Nature*. 2002;417(6887):399-403.
166. Kim TK, Eberwine JH. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2010;397(8):3173-8.
167. Jorge SAC, Santos AS, Spina A, Pereira CA. Expression of the hepatitis B virus surface antigen in *Drosophila* S2 cells. *Cytotechnology*. 2008;57(1):51-9.
168. Santos MG, Jorge SA, Brillet K, Pereira CA. Improving heterologous protein expression in transfected *Drosophila* S2 cells as assessed by EGFP expression. *Cytotechnology*. 2007;54(1):15-24.

169. Vidigal J, Fernandes B, Dias MM, Patrone M, Roldao A, Carrondo MJT, et al. RMCE-based insect cell platform to produce membrane proteins captured on HIV-1 Gag virus-like particles. *Applied microbiology and biotechnology*. 2018;102(2):655-66.
170. Baum B, Cherbas L. *Drosophila* cell lines as model systems and as an experimental tool. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2008;420:391-424.
171. Zitzmann J, Sprick G, Weidner T, Schreiber C, Czermak P. Process optimization for recombinant protein expression in insect cells. *New Insights into Cell Culture Technology*; Gowder, SJT, Ed; InTech Open: Rijeka, Croatia. 2017:43-98.
172. Linke D. Detergents: an overview. *Methods in enzymology*. 2009;463:603-17.
173. Peach M, Marsh N, Miskiewicz EI, MacPhee DJ. Solubilization of proteins: the importance of lysis buffer choice. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2015;1312:49-60.
174. Helenius A, McCaslin DR, Fries E, Tanford C. Properties of detergents. *Methods in enzymology*. 1979;56:734-49.
175. Helenius A, Simons K. Solubilization of membranes by detergents. *Biochimica et biophysica acta*. 1975;415(1):29-79.
176. McNaught AD, Wilkinson A, Jenkins AD. *IUPAC Compendium of Chemical Terminology: the gold book*. 2nd, editor: International Union of Pure and Applied Chemistry.; 2006.
177. Tanford C. The hydrophobic effect and the organization of living matter. *Science* (New York, NY). 1978;200(4345):1012-8.
178. Kalipatnapu S, Chattopadhyay A. Membrane protein solubilization: recent advances and challenges in solubilization of serotonin1A receptors. *IUBMB life*. 2005;57(7):505-12.
179. Gether U. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocrine reviews*. 2000;21(1):90-113.
180. Seddon AM, Curnow P, Booth PJ. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochimica et biophysica acta*. 2004;1666(1-2):105-17.
181. Neugebauer JM. Detergents: an overview. *Methods in enzymology*. 1990;182:239-53.
182. Mohan C. *Detergents: A guide to the properties and uses of detergents in biological systems*. 2007.

183. le Maire M, Champeil P, Moller JV. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochimica et biophysica acta*. 2000;1508(1-2):86-111.
184. Clarke JA, Heron AJ, Seddon JM, Law RV. The diversity of the liquid ordered (Lo) phase of phosphatidylcholine/cholesterol membranes: a variable temperature multinuclear solid-state NMR and x-ray diffraction study. *Biophysical journal*. 2006;90(7):2383-93.
185. Chattopadhyay A, London E. Fluorimetric determination of critical micelle concentration avoiding interference from detergent charge. *Analytical biochemistry*. 1984;139(2):408-12.
186. Stroud Z, Hall SCL, Dafforn TR. Purification of membrane proteins free from conventional detergents: SMA, new polymers, new opportunities and new insights. *Methods (San Diego, Calif)*. 2018;147:106-17.
187. Dorr JM, Koorengevel MC, Schafer M, Prokofyev AV, Scheidelaar S, van der Cruijssen EA, et al. Detergent-free isolation, characterization, and functional reconstitution of a tetrameric K⁺ channel: the power of native nanodiscs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(52):18607-12.
188. Prabudiansyah I, Kusters I, Caforio A, Driessen AJ. Characterization of the annular lipid shell of the Sec translocon. *Biochimica et biophysica acta*. 2015;1848(10 Pt A):2050-6.
189. Hellwig N, Peetz O, Ahdash Z, Tascón I, Booth PJ, Mikusevic V, et al. Native mass spectrometry goes more native: investigation of membrane protein complexes directly from SMALPs. *Chemical communications (Cambridge, England)*. 2018;54(97):13702-5.

Danksagung

Ich möchte mich an erster Stelle herzlichst bei **meiner Doktormutter** für die Möglichkeit, meine Promotionsarbeit in ihrer Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen, ihr mir gegenüber entgegengebrachtes Vertrauen und ihre immer fortwährende Unterstützung bedanken.

Die Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe und die damit verbundenen Chancen haben mich fachlich und persönlich als Menschen wachsen lassen.

Ich bedanke mich bei **meinem Zweitgutachter** für die Übernahme des Zweitgutachtens für diese Arbeit und der damit verbundenen Bereitstellung seiner Expertise in der Bewertung meiner Forschungsergebnisse. Seine fachliche Einschätzung ist mir eine Ehre.

Besonderen Dank gilt **meiner Technischen Assistentin**, die mit ihrem überdurchschnittlichen Einsatz maßgeblich zum Voranschreiten dieser Arbeit beigetragen hat, mir in meiner Zeit in Mainz eine gute Freundin geworden ist und mich durch jeglichen Frustrationsmoment im Labor hinweg begleitet hat. Dass sich Johannes und meine Wege gekreuzt haben, war und ist für mich in jeder Hinsicht eine Bereicherung.

Großer Dank geht an das gesamte **Team des Pharmakologischen Instituts der Universitätsmedizin Mainz**. Danke, für die vielen Ratschläge, das Aushelfen bei Materialmangel und der Aufnahme in euer Team.

Insbesondere die **zweite Technische Assistentin meiner AG** ist hierbei hervorzuheben, der ich neben ihrer positiven Art vor allem für die Durchführung der HPLC-Messungen danken möchte.

Ich danke allen, die auf unterschiedlicher Weise einen fachlichen Beitrag an dieser Arbeit geleistet haben

Danke an all meine **Freunde**, dass ihr mich auch während meiner Laborarbeit im fernen Mainz begleitet, meine Klagen ertragen und mir einen Ausgleich zum Laboralltag geschenkt habt.

Danke **an meinen Freund**, dass er Teil meines Lebens geworden ist, mich mit seiner Zuneigung und seinem Vertrauen in dem Erreichen meiner Träume nicht allein lässt und mir stets zur Seite steht.

Meinen größten Dank möchte ich **meinen Eltern und Geschwistern** aussprechen. Eure unabdingbare Liebe, euer unerschütterliche Glaube an mich und eure nie enden wollende Unterstützung haben mich zu dem Menschen gemacht, der ich heute bin und mich meine Ziele nie aus den Augen verlieren lassen. Ihr seid mein größtes Geschenk.

Ich liebe euch!

Lebenslauf Anastasia Janina Hobbach

Geburtsort: Waldbröl

Familienstand: Ledig

AUSBILDUNG UND BERUFLICHER WERDEGANG

Seit 04/2020

ASSISTENZÄRZTIN

Tätigkeit als Assistenzärztin in der Klinik für Kardiologie I: Koronare Herzkrankheit, Herzinsuffizienz und Angiologie des Universitätsklinikums Münster

08/2018 – 04/2020

PROMOTION

Promotionsstudentin am Institut für Pharmakologie der Universitätsmedizin Mainz, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Ellen I. Closs

06/2018 – 08/2018

GASTÄRZTIN

Tätigkeit als Gastärztin in der Medizinischen Klinik III für Kardiologie, Angiologie und Internistische Intensivmedizin des Kreisklinikums Siegen

25. Mai 2018

APPROBATION

Erteilung der Approbation als Ärztin

04/2012 – 05/2018

STUDIUM

Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen

- **Mai 2018:** Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- **Mai 2017:** Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- **April 2014:** Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung

10/2011 – 04/2012

AUSBILDUNG

Ausbildung zur Gesundheits- und Krankenpflegerin an der Krankenpflegeschule der St. Marien-Krankenhaus gem. GmbH Siegen

- ohne Abschluss durch Beginn des Studiums der Humanmedizin

SCHULE

2002 – 2011

Gymnasium Netphen

- **Juni 2011:** allgemeine Hochschulreife

1998 – 2002

Katholische Grundschule Salchendorf

PUBLIKATIONEN UND VORTRÄGE

PUBLIKATION

Hobbach, A. J.; Closs, E. I:

Arbeitstitel: *Human cationic amino acid transporters are not affected by direct nitros(yl)ation*

Veröffentlichung in einer Fachzeitschrift; in Vorbereitung.

09/2019

VORTRAG

Greifswalder Transporttage der Universitätsmedizin
Greifswald

Hobbach, A. J.; Closs, E. I: *Human cationic amino acid transporters are not affected by direct nitros(yl)ation*