

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



**Regulation der Genexpression
des humanen kationischen Aminosäuretransporters
hCAT-1**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz



Susanne Katharina Muther
geb. am 01.02.1988 in Kirn

Mainz am Rhein, 2017

Dekan:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Prüfung:

„First they sequenced it.

Now they have surveyed its hinterlands.

But no one knows how much more information the human genome holds,

or when to stop looking for it.“

Brendan Maher

(Maher 2012)

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	X
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XIV
TABELLENVERZEICHNIS	XVII
1 ZUSAMMENFASSUNG	1
2 ENGLISH ABSTRACT	1
3 EINLEITUNG	2
3.1 Der humane kationische Aminosäuretransporter hCAT-1	2
3.2 Struktur und Aufbau von hCAT-1	4
3.3 Expressionsregulation von CAT-1 in Mensch und Ratte	5
3.3.1 Transkriptionelle Regulation.....	5
3.3.2 Posttranskriptionelle Regulation.....	6
3.3.3 Translationale Regulation.....	7
3.4 Die Rolle von CAT-1 in T-Zellen	8
4 ZIEL DER ARBEIT	11
5 MATERIAL UND METHODEN	12
5.1 Laborgeräte und Software	12
5.2 Chemikalien	13
5.3 Zellbiologische Methoden	13
5.3.1 Kulturmedien und Medienzusätze.....	13
5.3.2 Zellsysteme.....	15
5.3.3 Handhabung von Zellen - Kultivieren, Splitten, Zählen und Einfrieren.....	15
5.3.4 Isolation von primären T-Zellen aus Vollblutkonserven.....	16

5.3.5	Reinheitskontrolle von isolierten primären T-Zellen durch FACS-Analyse	18
5.3.6	Behandlung von primären T-Zellen mit Inhibitoren	18
5.3.7	Co-Stimulation von T-Zellen	19
5.4	Proteinbiochemische Methoden	19
5.4.1	Herstellung von Zellysat und Proteinbestimmung durch BCA-Assay	19
5.4.2	Glycosidase-Behandlung	20
5.4.3	Western Blot	21
5.4.3.1	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) für Proteine	21
5.4.3.2	Proteintransfer	22
5.4.3.3	Proteinnachweis durch Antikörper	22
5.5	Molekular- und Mikrobiologische Methoden	24
5.5.1	Isolation genomischer DNA	24
5.5.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	25
5.5.3	Restriktion	25
5.5.4	Klenow-Fragment-Behandlung	25
5.5.5	Elektrophoretische Auftrennung über Agarosegele	26
5.5.6	DNA-Extraktion aus Agarosegelen und DNA-Aufreinigung	27
5.5.7	Ligation	27
5.5.8	Medien zur Kultivierung von Bakterien	27
5.5.9	Klonierung von PCR-Produkten	27
5.5.10	Transformation	28
5.5.11	Plasmidpräparation	28
5.5.12	Dauerkulturen von Bakterien	29
5.5.13	Konzentrationsbestimmung von DNA und/oder RNA	29
5.5.14	Sequenzierung	29
5.5.15	RNA-Isolation	29
5.5.16	cDNA-Synthese	30
5.5.17	Quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR)	30
5.5.18	RNase-Verdauungsschutzanalyse (RVA)	31
5.5.19	Transiente Transfektion von DLD-1- und EA.hy926-Zellen	35
5.5.20	Transfektion von primären humanen T-Zellen durch Elektroporation	36
5.5.21	Luciferase-Reportergen-Analyse (LUC-Analyse)	37
5.6	PC-Software und Datenbanken	38
6	ERGEBNISSE	39

6.1	Etablierung eines geeigneten Zellmodellsystems zur Untersuchung der Regulation von hCAT-1	39
6.1.1	Aminosäuremangel führt zur Induktion der hCAT-1-Expression in Endothelzellen	39
6.1.2	PMA bewirkt eine Induktion der mRNA-Expression von hCAT-1 in Endothelzellen	42
6.1.3	mRNA-Expression von hCAT-1 wird durch Zugabe von INF- γ , IL-1 β und TNF- α in Kolonkarzinomzellen stimuliert	43
6.2	Regulation von hCAT-1: transkriptionell oder posttranskriptionell?	44
6.2.1	Die Steigerung der hCAT-1-mRNA-Expression unter Aminosäuremangel benötigt Transkription	44
6.2.2	Analyse der mRNA-Stabilität von hCAT-1	46
6.3	Determinierung des Transkriptionsstarts von hCAT-1	48
6.3.1	Datenbanken-Analyse ergibt zwei putative Transkriptionsstarts	48
6.3.2	Analyse des Transkriptionsstarts über RNase-Verdauungsschutzanalysen	49
6.3.2.1	Herstellung des Matrizen-Plasmids der TSS1/2-Sonde	50
6.3.2.2	Transkriptionsstart von hCAT-1 konnte nicht bestimmt werden	50
6.3.3	TSS2 befindet sich nachweislich in der mRNA von hCAT-1	53
6.4	Charakterisierung des hCAT-1-Promotors	55
6.4.1	Herstellung der Promotorkonstrukte	55
6.4.2	Detektion und Eingrenzung des hCAT-1-Kernpromotors durch Luciferase-Reporter-Gen-Analysen in DLD-1-Zellen	59
6.4.2.1	5'-flankierenden Bereich und Exon 1 des hCAT-1-Gens induzieren keine Luciferaseexpression	60
6.4.2.2	Analyse von CpG-Inseln, Histonmodifikationen, DNase-Clustern und Transkriptionsfaktorbindungsstellen liefert Hinweis auf die Lokalisation des Promotors im hCAT-1-Gen	61
6.4.2.3	Luciferaseaktivität bei Anwesenheit der ersten 3 kb von Intron 1	63
6.4.2.4	5'-flankierender Bereich ist nicht Teil des Kernpromotors	64
6.4.2.5	Exon 1 ist Teil des Promotors von hCAT-1	65
6.4.2.6	Anwesenheit der 3'-Spleiß-Akzeptorstelle des Introns 1 und Exons 2 von hCAT-1 verstärkt die Luciferaseaktivität und mRNA-Expression	66
6.4.2.7	Deletion des 5'-flankierenden Bereichs in inCAT-Konstrukten führt zur Verminderung der Luciferaseaktivität und mRNA-Expression	68

6.4.2.8	Deletion von Exon 1 führt auch in inCAT-Konstrukten zum Verlust der Luciferaseaktivität und mRNA-Expression.....	69
6.4.2.9	Determinierung des 3'-Endes des hCAT-1-Promotors.....	70
6.4.2.10	Teilbereiche von Exon 1 sind wichtig für die Luciferaseaktivität.....	72
6.4.3	Putative cis-regulatorische Elemente im eingegrenzten Bereich in dem sich der hCAT-1-Kernpromotor befindet	72
6.4.4	Luciferaseaktivität der Promotorkonstrukte ist auch in T-Zellen nachweisbar	73
6.4.5	Signalwege in T-Zellen: hCAT-1-Expression wird durch NF-κB-Inhibition stark verringert.....	74
6.4.6	Inhibition von NF-κB vermindert auch die Luciferaseaktivität und mRNA-Expression	76
6.4.7	Aufspüren von NF-κB-Bindestellen im hCAT-1-Gen.....	78
6.4.7.1	Keine Bindestellen im Bereich des Kernpromotors über Analyse mit Konsensussequenz von NF-κB aufspürbar	78
6.4.7.2	Sequenzanalyse durch P-Match zeigt mehrere mögliche Bindestellen für NF-κB.....	79
6.4.7.3	Mutation von putativer NF-κB-Bindestelle reduziert die Luciferaseaktivität und mRNA-Expression in DLD-1-Zellen.....	80
6.4.8	Translationsinhibition in primären humanen T-Zellen vermindert stark die mRNA-Expression von hCAT-1	81
6.5	Mutation des μORFs hat keine Auswirkung auf die Luciferaseaktivität und mRNA-Expression in DLD-1-Zellen.....	82
7	DISKUSSION.....	85
7.1	Die Induktion der hCAT-1-Expression unter Aminosäuremangel benötigt Transkription.....	85
7.2	Der Kernpromotor von hCAT-1	86
7.2.1	Identifizierung des Transkriptionsstarts von hCAT-1	86
7.2.2	Der für hCAT-1 publizierte Kernpromotor konnte nicht detektiert werden	89
7.2.3	Promotoraktivität in einem Bereich, beginnend von 270 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts bis einschließlich der ersten 3 kb von Intron 1	90
7.2.4	Bereich, in dem der Kernpromotor von hCAT-1 lokalisiert ist, konnte auf 365 bp im Exon 1 und Intron 1 eingegrenzt werden	91
7.2.5	Charakterisierung des hCAT-1-Promotors.....	94
7.3	Regulation der mRNA-Expression von hCAT-1.....	96

7.3.1	NF- κ B ist ein positiver Regulator von hCAT-1	96
7.3.2	Aktivierung der Transkription von hCAT-1 erfolgt wahrscheinlich nicht über eine einzelne NF- κ B-Bindestelle	98
7.3.3	hCAT-1-regulierender Faktor wird bei Stimulation in T-Zellen neu gebildet	99
7.3.4	Untersuchung der transkriptionellen Regulation von hCAT-1 in T-Zellen.....	99
7.4	Regulation der Translation von hCAT-1 über einen μORF bleibt weiterhin offen.....	100
8	LITERATURVERZEICHNIS	104
	ANHANG	119
A	Oligonukleotide und TaqMan-Sonden.....	119
B	Promotorkonstrukte	120
C	Übersicht über die Herkunft der n-Zahlen.....	123
	TEILVERÖFFENTLICHUNGEN DER VORLIEGENDEN ARBEIT	126
	LEBENS LAUF	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.
	DANKSAGUNG	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.
	ERKLÄRUNG	128

Abkürzungsverzeichnis

μORF	engl. <i>upstream open reading frame</i>
AARE	engl. <i>amino acid response element</i>
ADC	Arginindecarboxylase
AGAT	Arginin:Glycin-Amidino-transferase
AKT	Genname der Proteinkinase B
AKV-Puffer	Antikörperverdünnungs-Puffer
AmpR	Gen für Ampicillinresistenz
AP2	engl. <i>activating protein 2</i>
Arg	L-Arginin
ATF4	aktivierender Transkriptionsfaktor 4
ARE	AU-reiches Element
b	Basen
B2M	β2-Mikroglobin
BiP	engl. <i>immunoglobulin heavy chain binding protein</i>
bp	Basenpaare
BRE ^d	engl. <i>downstream TFIIIB recognition element</i>
BRE ^u	engl. <i>upstream TFIIIB recognition element</i>
BSA	engl. <i>bovine serum albumin</i>
CAT	kationischer Aminosäuretransporter
CAT-1	kationischer Aminosäuretransporter 1
CHOP	C/EBP-homologes Protein
CHX	Cycloheximid
cpm	engl. <i>counts per minute</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	engl. <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
DPE	engl. <i>downstream promoter element</i>
DRB	5,6-Dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazol
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
ERSE-II-like-Element	engl. <i>(endoplasmicreticulum-stress-element-II)-like element</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Evi-1	engl. <i>ecotropic virus integration site 1</i>

FBS	fötales bovines Serum
GAMT	Guanidinoacetat-N-Methyltransferase
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCN2	<i>general control nonderepressible 2</i>
gDNA	genomische DNA
H3K4Me1	Monomethylierung des Lysinrests an Position 4 in Histon 3
H3K4Me3	Trimethylierung des Lysinrests an Position 4 in Histon 3
H3K27Ac	Acetylierung des Lysinrests an Position 27 in Histon 3
HAT	heteromerer Aminosäuretransporter
hCAT-1	humaner kationischer Aminosäuretransporter 1
HLF	engl. <i>hepatic leukemia factor</i>
IL-2	Interleukin-2
INE	engl. <i>intrinsic enhancer element</i>
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
Inr	Initiator-Element
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
LB	engl. <i>lysogeny broth</i>
LUC-Analyse	Luciferase-Reportergen-Analyse
Lys	L-Lysin
MCS	Multiple Klonierungsstelle
Met-tRNAs	Methionin-Boten-RNAs
MTE	engl. <i>motif ten element</i>
NF- κ B	engl. <i>nuclear factor-kappa B</i>
NMD	engl. <i>nonsense-mediated mRNA decay</i>
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NS-ARE	Nährstoffsensor-ARE

OAT	Ornithinaminotransferase
ODC	Ornithindecaboxylase
ORF	offener Leserahmen
PBMCs	engl. <i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PERK	<i>PKR-like ER kinase</i>
PHA-L	Phytohaemagglutinin-L
PKC	Proteinkinase C
PKR	Proteinkinase R
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
Pur- α	engl. <i>purine-rich element binding protein A</i>
qRT-PCR	quantitativen Real-Timer-PCR
rCAT-1	Ratten-CAT-1
RIPA-Lysepuffer	engl. <i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
RVA	RNase-Verdauungsschutzanalysen
rpm	engl. <i>revolutions per minute</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
Ser473	Serin 473
SLC	engl. <i>solute carrier family</i>
SLC7	Aminosäuretransporter vom engl. <i>solute carrier family 7</i>
SLC7A1	CAT-1, Kationischer Aminosäuretransporter 1
SLC7A2	CAT-2A und CAT-2B, Kationische Aminosäuretransporter 2A und 2B
SLC7A3	CAT-3, Kationischer Aminosäuretransporter 3
SP1	engl. <i>specificity protein 1</i>
TAF	engl. <i>transcription initiation factor TFIID subunit</i>
TBS	engl. <i>tris buffered saline</i>
TBS-T	engl. <i>tris buffered saline with tween</i>
TF	Transkriptionsfaktor
TFIID	Transkriptionsfaktor IID
Thr308	Threonin 308
TSS	engl. <i>transcription start site</i>

Abkürzungsverzeichnis

UPR	ungefaltete Proteinantwort, aus dem engl. <i>unfolded protein response</i>
UTR	untranslatierte Region
XBP1s	X-Box-bindendes Protein 1s

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: hCAT-1 und die von den transportierten Aminosäuren abhängigen Stoffwechselwege in humanen Zellen.....	3
Abb. 2: Aufbau der gDNA und mRNA von hCAT-1.....	4
Abb. 3: Aminosäuremangel führt zur Akkumulation der endogenen rCAT-1-mRNA.....	6
Abb. 4: Translation von hCAT-1 wird in Huh7-Leberzellenellen durch miR-122 unterdrückt. .	8
Abb. 5: mRNA- und Proteinexpression von hCAT-1 werden durch Stimulation in T-Zellen induziert.....	9
Abb. 6: Auftrennung des Ficoll-Gradienten nach Zentrifugation.....	17
Abb. 7: Schichtung und Orientierung in der Blotkammer.	22
Abb. 8: Hochregulation der hCAT-1-mRNA-Expression unter Aminosäuremangel.	40
Abb. 9: Proteinanstieg von hCAT-1 unter Aminosäuremangel im Zeitverlauf.....	40
Abb. 10: Induktion der Proteinexpression von hCAT-1 nach 24 h durch Aminosäuremangel.	41
Abb. 11: mRNA-Induktion von hCAT-1 ist abhängig von der FBS-Konzentration.....	42
Abb. 12: PMA steigert die mRNA-Expression von hCAT-1.....	43
Abb. 13: hCAT-1-mRNA-Expression wird durch eine Kombination aus INF- γ , 1 IL-1 β und TNF- α gesteigert.	44
Abb. 14: DRB vermindert die mRNA-Expression von hCAT-1.....	45
Abb. 15: DRB vermindert die Proteinexpression von hCAT-1 unter Hungerbedingungen.	46
Abb. 16: Bestimmung der Halbwertszeit der hCAT-1-mRNA.....	47
Abb. 17: Putative Transkriptionsstarts von hCAT-1.....	49
Abb. 18: Transkriptionslevel-Analyse der putativen Transkriptionsstarts von hCAT-1.....	49
Abb. 19: RNase-Verdauungsschutzanalyse zur Aufklärung des Transkriptionsstarts von hCAT-1.....	52
Abb. 20: Nachweis des Transkriptionsstarts von hCAT-1 über PCR.....	54
Abb. 21: Nachweis von Exon 1 bis 3 in der mRNA von hCAT-1 über PCR.....	55
Abb. 22: Vektorkarte von pGL3 control inglo ASV40.....	57
Abb. 23: Vektorkarte pRL-EF1 α	58
Abb. 24: Vektorkarte von pRHCglo.....	59
Abb. 25: Keine Luciferaseaktivität innerhalb von 5 kb vor dem TSS oder in Exon 1.	61
Abb. 26: Analyse von CpG-Inseln, Histonmodifikationen, DNase-Clustern und Transkriptionsfaktorbindestellen im hCAT-1-Gen.	63
Abb. 27: Luciferaseaktivität im Intron 1 in Verbindung mit Exon 1 aus hCAT-1.....	64
Abb. 28: Deletion des 5'-flankierenden Bereichs hat keinen Einfluss auf die Luciferaseaktivität.	65

Abb. 29: Sequenzvergleich zwischen dem 5'-flankierenden Bereich und der Vektorsequenz in DE inglo und DE-5' inglo.	65
Abb. 30: Deletion von Exon 1 führt zum Verlust der Luciferaseaktivität.	66
Abb. 31: Austausch der 3'-Spleiß-Akzeptorstelle im Intron und Hinzufügen von Teilen des hCAT-1-Exons 2 erhöht Luciferaseaktivität.....	67
Abb. 32: Komplettierung von Exon 2 aus hCAT-1 erhöht nicht die mRNA-Expression.....	67
Abb. 33: In inCAT-Konstrukten führt die Deletion des 5'-flankierenden Bereichs des hCAT-1-Exons 1 zur Halbierung der Luciferaseaktivität.	68
Abb. 34: In inCAT-Konstrukten führt Deletion des 5'-flankierenden Bereichs des hCAT-1-Exons 1 zur Halbierung der mRNA-Expression.	69
Abb. 35: In inCAT-Konstrukten führt die Deletion von Exon 1 zum fast vollständigen Verlust der Luciferaseaktivität.....	70
Abb. 36: In inCAT-Konstrukten führt Deletion von Exon 1 zum Verlust der mRNA-Expression.	70
Abb. 37: Erste 287 bp des Introns 1 von hCAT-1 sind essentiell für die Luciferaseaktivität. .	71
Abb. 38: 3'-Ende des hCAT-1-Exons 1 hat einen starken Einfluss auf die Luciferaseaktivität.	72
Abb. 39: Putative cis-regulatorische Elemente im eingegrenzten Bereich des Kernpromotors von hCAT-1.	73
Abb. 40: Luciferaseaktivität von DE inCAT ist auch in T-Zellen nachweisbar.....	74
Abb. 41: Auswirkungen verschiedener Inhibitoren auf die Expression von hCAT-1 und IL-2 in T-Zellen.....	76
Abb. 42: NF- κ B-Inhibition vermindert die Luciferaseaktivität und mRNA-Expression von DE inCAT.	77
Abb. 43: NF- κ B-Inhibitor vermindert die Luciferaseaktivität in I1 Δ 8 inCAT.....	78
Abb. 44: Analyse des hCAT-1-Gens auf putative NF- κ B-Bindestellen.	79
Abb. 45: P-Match-Analyse von putativen NF- κ B-Bindestellen.....	80
Abb. 46: Mutation von putativer NF- κ B-Bindestelle in eine NotI-Schnittstelle.....	80
Abb. 47: Mutation der Bindestelle von NF- κ B mit der höchsten Kern- und Matrixähnlichkeit in I1 Δ 8 inCAT führt zur Reduktion der Luciferaseaktivität.	81
Abb. 48: Mutation der Bindestelle von NF- κ B mit der höchsten Kern- und Matrixähnlichkeit in I1 Δ 8 inCAT führt zur Reduktion der mRNA.....	81
Abb. 49: Translationsinhibition vermindert mRNA-Expression von hCAT-1 in primären humanen T-Zellen.	82
Abb. 50: Mutation des μ ORF-Startcodons.	83
Abb. 51: Mutation des μ ORFs in I1 Δ 6 inCAT hat keinen Einfluss auf die Luciferaseaktivität.	83

Abb. 52: Mutation des μ ORFs in I1 Δ 8 inCAT hat auch keinen Einfluss auf die Luciferaseaktivität.....	84
Abb. 53: Nachweisbarer Bereich mit der Sonde TSS1/2.....	87
Abb. 54: Beispiel für Oligonukleotid- und Sondensysteme zum quantitativen Nachweis von TSS1 und/oder TSS2.	88
Abb. 55: Überprüfung des Einflusses vom μ ORF auf eine mögliche IRES in hCAT-1.....	102

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Medien und Medienzusätze für die Arbeit mit Zellen in der Zellkultur	13
Tab. 2: Zusammensetzung der Kulturmedien	14
Tab. 3: Verwendete Zellsysteme und deren Kultivierung	15
Tab. 4: Ansätze zur Überprüfung der T-Zell-Reinheit	18
Tab. 5: Inhibitoren	18
Tab. 6: Pipettierschema für eine BSA-Standardreihe	20
Tab. 7: Pipettierschema für ein SDS-Gel.....	21
Tab. 8: Primäre Antikörper	24
Tab. 9: Sekundärer Antikörper.....	24
Tab. 10: Restriktionsansatz	25
Tab. 11: Pipettieransatz Klenow-Behandlung	26
Tab. 12: Eingesetzte Agarosekonzentration in Bezug auf die Produktgröße.....	26
Tab. 13: Chemisch kompetente Bakterienzellen.....	28
Tab. 14: Pipettieransatz zur cDNA-Synthese.....	30
Tab. 15: PCR-Cycler-Programm zur cDNA-Synthese.....	30
Tab. 16: Pipettieransatz zur qRT-PCR	31
Tab. 17: PCR-Cycler Programm zur qRT-PCR.....	31
Tab. 18: RNA-Sonden	33
Tab. 19: in vitro-Transkription	33
Tab. 20: DNase-Verdau.....	33
Tab. 21: Fällungsansatz	34
Tab. 22: RNase-Verdau.....	34
Tab. 23: Transfektionsansatz mit GeneJuice®	36
Tab. 24: Optimierungsversuche gegenüber dem verwendeten Standardprotokoll für RNase-Verdauungsschutzanalysen.....	53
Tab. 25: Vergleich der Kozak-Sequenzen aus hCAT-1 und Firefly-Luciferase mit der Konsensussequenz.....	101

1 Zusammenfassung

Der humane kationische Aminosäuretransporter hCAT-1 (SLC7A1) repräsentiert in den meisten Säugerzellen den Hauptaufnahmeweg für die kationischen Aminosäuren L-Arginin, L-Lysin und L-Ornithin. Diese werden für die Proteinbiosynthese und/oder andere wichtige Stoffwechselwege wie Stickstoffmonoxid-Produktion, Polyamin-, Agmatin-, Kreatin- und Harnstoffsynthese sowie die Synthese der Aminosäuren Prolin und Glutamin benötigt. Insbesondere L-Arginin ist essentiell für die Proliferation, Zytokinproduktion und somit für die effiziente Funktion von T-Lymphozyten.

Aufgrund der Wichtigkeit von hCAT-1 für das humane Immunsystem und der Tatsache, dass die hCAT-1-Expression in T-Zellen unter Stimulation auf mRNA- wie auch auf Proteinebene stark ansteigt, war das Ziel dieser Arbeit, die bei der Induktion zugrundeliegenden Mechanismen aufzuklären. Zudem sollte herausgefunden werden, welche regulatorischen Elemente an der Expressionsinduktion des Transporters in stimulierten primären humanen T-Lymphozyten beteiligt sind.

Da die hCAT-1-Induktion mit großer Wahrscheinlichkeit vor allem auf eine gesteigerte Transkription zurückzuführen ist, wurde der Promotor von hCAT-1 untersucht. Dabei stellte sich in Luciferase-Reporter-Gen-Analysen heraus, dass sich dieser nicht, wie bisher vermutet, 5'-flankierend von dem Exon 1 von hCAT-1 befindet. Eine Datenbankanalyse gab den Hinweis darauf, dass der Promotor in einem Bereich am Übergang von Exon 1 nach Intron 1 des hCAT-1-Gens lokalisiert sein könnte. Über weitere Luciferase-Reporter-Gen-Analysen konnte in dieser Region tatsächlich eine starke Promotoraktivität nachgewiesen werden. In den nachfolgenden experimentellen Versuchen wurde über zahlreiche 5'- und 3'-Deletionen der Bereich, in dem sich der Kernpromotor befindet, auf einen Abschnitt von 365 bp im Exon 1 und Intron 1 des Gens eingegrenzt. Dieser liegt mit 78 bp im Exon 1 und mit 287 bp im Intron 1. Somit besitzt hCAT-1 einen geninternen Promotor. Des Weiteren besitzt der Kernpromotor von hCAT-1 keine offensichtlichen TATA-Box-Sequenzen, weshalb vermutet wird, dass dieser über andere Promotorelemente reguliert wird, wie z.B. die Bindung von SP1 an GC-reiche Sequenzen. Das Gen von hCAT-1 hat mit hoher Wahrscheinlichkeit, wie auch der Großteil der TATA-Box-losen Promotoren, mehrere Transkriptionsstarts. Dies könnte erklären, warum der Nachweis eines definierten Transkriptionsstarts über RNase-Verdauungsschutz-Analysen nicht gelang. Durch gezielte Inhibition einzelner Signalwege in primären humanen T-Zellen, die bei der Aktivierung der Immunzellen eine entscheidende Rolle spielen, konnte der Transkriptionsfaktor NF- κ B als positiver Regulator von hCAT-1 identifiziert werden. Zudem wurde eine NF- κ B-Bindestelle in dem Bereich, in dem sich der Kernpromotor befindet, funktionell nachgewiesen, was beweist, dass der Transkriptionsfaktor direkt an die genomische DNA von hCAT-1 bindet und somit die Expression aktivieren könnte. Da die Mutation einer einzelnen

NF- κ B-Bindestelle nicht zu einem vollständigen Verlust der Promotoraktivität führte und auch die Inhibition von NF- κ B in T-Zellen nicht eine komplette Auslöschung der endogenen hCAT-1-mRNA-Expression bewirkte, muss der Transkriptionsfaktor entweder an mehreren Stellen im Gen binden, um die Transkription zu aktivieren, oder es müssen weitere Transkriptionsfaktoren daran beteiligt sein, die in Verbindung mit NF- κ B die hCAT-1-Expression anschalten.

2 English Abstract

The human cationic amino acid transporter hCAT-1 (SLC7A1) represents the main uptake route for the cationic amino acids L-arginine, L-lysine and L-ornithine in most mammalian cells. These amino acids are required for protein biosynthesis or/and other important metabolic pathways such as nitric oxide production, polyamine, agmatine, creatine and urea synthesis, as well as the synthesis of the amino acids proline and glutamine. In particular, L-arginine is essential for proliferation, cytokine production and thus for the efficient function of human T lymphocytes.

Due to the importance of hCAT-1 for the human immune system and the fact that hCAT-1 expression in T cells is strongly stimulated on mRNA and protein levels, the aim of this work was to elucidate the mechanisms underlying the hCAT-1 induction. In particular, the regulatory elements involved in the expression induction of the transporter in stimulated primary human T lymphocytes should be determined.

As increased transcription is presumably mainly responsible for hCAT-1 induction, the core promoter of hCAT-1 was investigated. It was found using luciferase reporter gene assays that it is not located in the 5'-flanking region of the exon 1 of hCAT-1 as hitherto presumed. A database analysis indicated that the core promoter might be located in a region at the transition from exon 1 to intron 1 of the hCAT-1 gene. Applying further luciferase reporter gene assays, a strong promoter activity could be detected in this region. In subsequent experiments the range in which the core promoter is located was narrowed down to a section of 365 bp in the exon 1 and intron 1 of the gene via numerous 3' and 5' deletions with 78 bp in the exon 1 and at 287 bp in the intron 1. Thus, hCAT-1 has a gene-internal promoter. In addition, the core promoter of hCAT-1 does not have any obvious TATA-box sequences, why it is suspected that it is regulated for example via SP1. The gene of hCAT-1 presumably has several transcriptional start sites, as most of the TATA-box-less promoters. This could explain why the detection of a defined transcriptional start site could not be achieved by RNase protection analyzes. The transcription factor NF- κ B could be identified as a positive regulator of hCAT-1 by targeted inhibition of single signaling pathways in primary human T cells, which play a decisive role in the activation of immune cells. Furthermore, a putative binding sequence of NF- κ B was detected in the region in which the core promoter is located, which indicates that the transcription factor binds directly to the genomic DNA of hCAT-1 and thus could activate its expression. However, it was also shown that mutation of a single NF- κ B binding site does not lead to a complete loss of promoter activity and the inhibition of NF- κ B in T-cells did not result in a full decrease of endogenous hCAT-1 mRNA expression indicating binding of NF- κ B at several sites in the gene or involvement of further transcription factors that activate hCAT-1 expression in cooperation with NF- κ B.

3 Einleitung

3.1 Der humane kationische Aminosäuretransporter hCAT-1

Der natürliche Schutz einer jeglichen eukaryotischen Zelle ist ihre Zellmembran, die aus einer Lipiddoppelschicht besteht. Die darin eingebauten Phospholipide sind dabei so angeordnet, dass sie eine hydrophobe Barriere bilden und dadurch wasserlösliche Substanzen durch einfache Diffusion nicht passieren lassen. Aminosäuren sind hydrophil, bilden die Bausteine für sämtliche Proteine und werden für viele verschiedene Stoffwechselwege im Körper benötigt. Damit Aminosäuren vom extrazellulären Raum in das Zytoplasma von Zellen gelangen können, gibt es spezielle in die Membran eingebaute Proteine, die eine hydrophile Schleuse bilden und so den spezifischen Transport von Aminosäuren ermöglichen, weshalb sie Aminosäuretransporter genannt werden. Zu diesen gehört auch die *solute carrier family 7* (SLC7). Diese Gruppe von Transportern wird unterteilt in heteromere Aminosäuretransporter (HATs) und kationische Aminosäuretransporter (CATs). Die HATs müssen, um in der Membran zu binden und so ihr Substrat transportieren zu können, zusätzlich mit einem Glycoprotein (SLC3A1 oder A2) assoziiert sein (Closs et al. 2006). Diese Transporter wurden aufgrund ihrer hohen Übereinstimmung in der Quartärstruktur in eine Gruppe eingeordnet. Dahingegen wurden die CATs aufgrund der Gemeinsamkeit des Transports von kationischen Aminosäuren zusammengefasst. Die CATs werden weiterhin aufgegliedert in CAT-1 (SLC7A1), die beiden Spleißvarianten CAT2-A und CAT2-B (SLC7A2) sowie CAT-3 (SLC7A3) (Verrey et al. 2004; Albritton et al. 1989; Kim et al. 1991; Closs et al. 1993; MacLeod et al. 1990; Ito und Groudine 1997; Hosokawa et al. 1997; Hammermann et al. 2001). SLC7A4 (Sperandeo et al. 1998) weist zwar eine hohe Sequenzhomologie gegenüber den anderen CATs auf, jedoch konnte bisher keine Transportaktivität für dieses Protein beobachtet werden (Wolf et al. 2002), weshalb es nicht zu den CATs gezählt wird. Die SLC7-Familie gehört zu der Großgruppe der SLC, welche aus insgesamt 395 verschiedenen Mitgliedern bestehen und in 52 Familien (SLC1-52) unterteilt werden (Hediger et al. 2013; Hediger et al. 2004).

CAT-1 weist die typischen Eigenschaften des γ^+ -Systems auf, welches durch Anwesenheit von extra- und intrazellulärem Substrat stark *trans*-stimulierbar sowie Natrium- und pH-unabhängig ist (Devés und Boyd 1998; Closs et al. 2006). Der kationische Aminosäuretransporter 1 ist ein Austauscher. Während bei einer Depolarisation der Membran hauptsächlich ein Efflux des Substrats stattfindet, erfolgt bei einer Hyperpolarisation ein Influx (Kavanaugh 1993; Bussolati et al. 1987). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem humanen CAT-1 (hCAT-1). Dieser wird außer in der adulten Leber (Closs et al. 2006; Devés und Boyd 1998) und den Tränenrüsen (Jager et al. 2009) ubiquitär exprimiert, wobei die Expression von Gewebe zu Gewebe jedoch stark variiert (Closs et al. 2006; Closs 2002; Verrey et al. 2004; Hatzoglou et al. 2004).

In den meisten humanen Zellen bildet hCAT-1 den Hauptaufnahmeweg für die kationischen Aminosäuren L-Arginin, L-Lysin und L-Ornithin (Closs et al. 2006). Diese werden im Folgenden nur noch als Arginin oder Arg, Lysin oder Lys sowie Ornithin bezeichnet. Bei einem saurem pH kann zusätzlich auch der Transport von L-Histidin beobachtet werden (Kim et al. 1991; Vekony et al. 2001). Kationische Aminosäuren werden für zahlreiche Stoffwechselwege im Körper benötigt (Abb. 1).

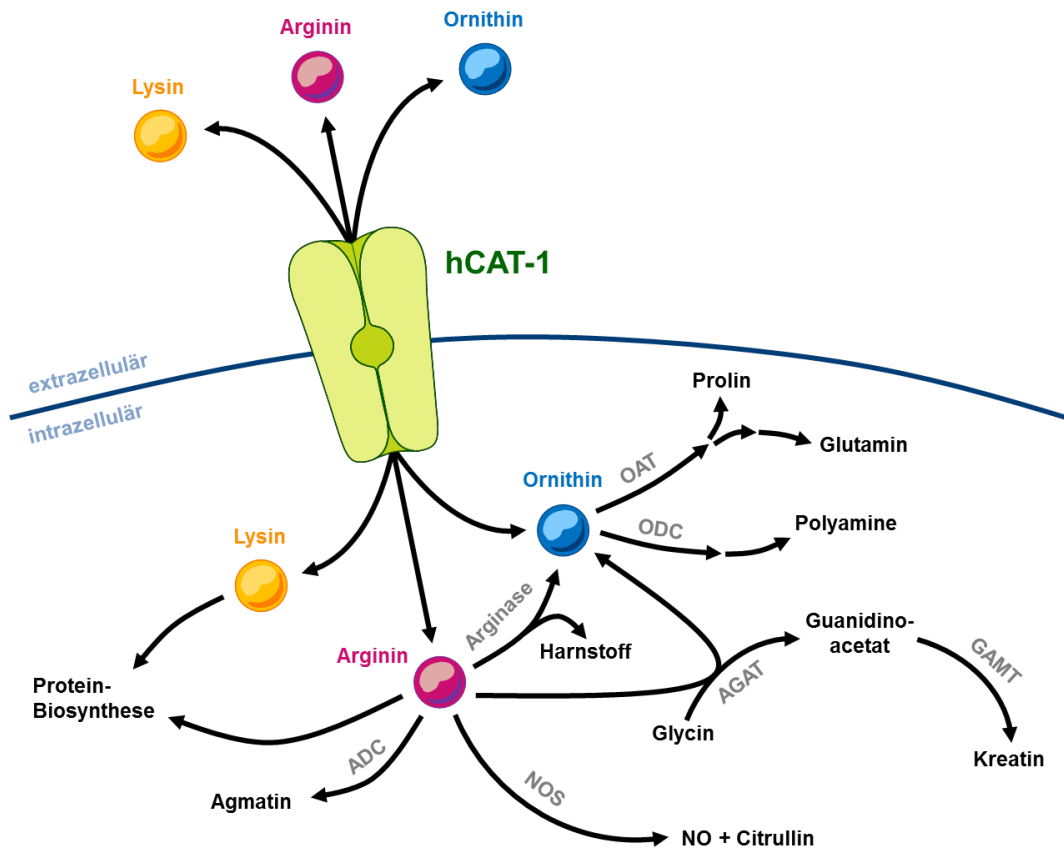


Abb. 1: hCAT-1 und die von den transportierten Aminosäuren abhängigen Stoffwechselwege in humanen Zellen.

Schematische Darstellung der wichtigsten Stoffwechselwege von Arginin, Lysin sowie Ornithin und die daran beteiligten Enzyme (grau), welche durch den Transport von hCAT-1 im Körper des Menschen ermöglicht werden. ADC: Arginindecarboxylase, AGAT: Arginin:Glycinamidinotransferase, NOS: Stickstoffmonoxid-Synthase, GAMT: Guanidinoacetat-N-Methyltransferase, OAT: Ornithinaminotransferase, ODC: Ornithindecaboxylase.

Zu diesen gehören z.B. die Proteinbiosynthese sowie viele andere enzymatische Reaktionen wie die Synthese von Stickstoffmonoxid, Harnstoff, Kreatin und Agmatin aus Arginin (Wu und Morris 1998) oder die Synthese von Polyaminen, Prolin und Glutamin aus Ornithin (Closs et al. 2006; Closs 2002). All diese Stoffwechselwege sind somit indirekt von hCAT-1 abhängig. Insbesondere die semi-essentielle Aminosäure Arginin wird z.B. bei der Wundheilung (Albina et al. 1988) oder von Makrophagen für Arginin-abhängige Stoffwechselwege und damit letztendlich auch für ihre Funktion als „Fresszellen“ benötigt (Rath et al. 2014; Albina et al. 1989). Wie wichtig der Transporter für den Organismus ist, zeigte die Arbeitsgruppe um Perkins. Diese generierte ein homozygoten mCAT-1-Knockout-Mausmodell. Die Tiere hatten bei der

Geburt ein um 25% vermindertes Körpergewicht gegenüber Wildtypmäusen, waren stark anämisch und starben noch am Tag der Geburt (Perkins et al. 1997).

3.2 Struktur und Aufbau von hCAT-1

Das hCAT-1-Protein besteht aus 629 Aminosäuren (Albritton et al. 1992; Yoshimoto et al. 1991). In der Zellmembran eingebaut, besitzt es vermutlich 14 Transmembrandomänen, wobei zwischen der 5. und 6. zwei Glykosylierungsstellen liegen (Closs et al. 2006). Sowohl der N- als auch der C-Terminus sind wahrscheinlich in den intrazellulären Raum gerichtet (*ibid.*).

Das hCAT-1-Gen ist auf dem Chromosom 13q12-q14 lokalisiert (Albritton et al. 1992; Hammermann et al. 2001). Das Gen (Abb. 2 A) besteht aus 13, in der Größe stark variierenden (100-2.247 bp) Exons, die von zwölf Introns mit einer Größe von bis zu 41.550 bp getrennt sind und überschneidet sich nicht mit anderen Genen.

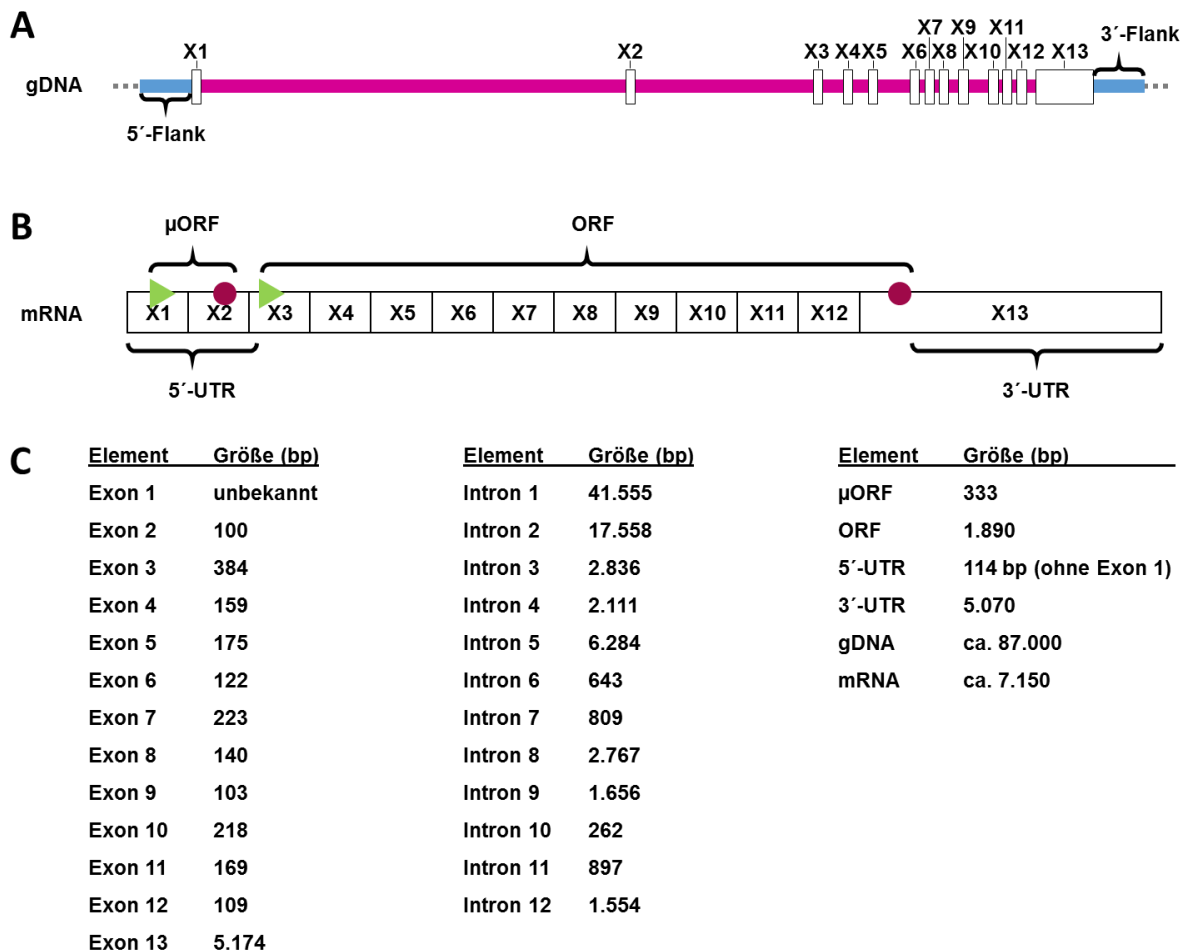


Abb. 2: Aufbau der gDNA und mRNA von hCAT-1.

Schematische Darstellung der gDNA (A) und mRNA von hCAT-1 (B) sowie Größe der einzelnen darin enthaltenen Elemente (C). Das Gen und die mRNA bestehen aus 13 Exons (X1-13). Innerhalb der gDNA werden die Exons von zwölf Introns (pink) abgetrennt und von dem 5'- sowie dem 3'-flankierenden Bereich (blau) umrahmt. Innerhalb der mRNA sind ein μORF (*upstream open reading frame*) und der ORF (*open reading frame*) des hCAT-1-Gens zu finden, welche jeweils durch ein Startcodon (grünes Dreieck) und ein Stoppcodon (roter Kreis) begrenzt werden. Vor und nach dem ORF befindet sich die 5'- sowie 3'-gelegene untranslatierte Region (UTR) von hCAT-1.

Das hCAT-1-Gen hat eine Länge von ca. 87 kb. Da der genaue Transkriptionsstart unbekannt ist, bleibt die Größe von Exon 1 bisher ungeklärt. In der mRNA (Abb. 2 B) startet der offene Leserahmen (ORF), welcher für das Protein von hCAT-1 codiert, mittig in Exon 3 und endet am Anfang von Exon 13. Die 5'-gelegene untranslatierte Region (UTR) des Gens beinhaltet Exon 1, Exon 2 und die erste Hälfte von Exon 3. Neben dem ORF von hCAT-1 gibt es auch einen sogenannten „*upstream open reading frame*“ (μ ORF), welcher 333 bp lang ist und in der 5'-UTR liegt. Die 3'-UTR besteht aus dem Großteil des Exons 13 und ist relativ groß (5.070 bp), was auf eine starke posttranskriptionelle Regulation hindeutet (Matoulkova et al. 2012; Conne et al. 2000). Die genauen Größen aller genannten Elemente in der genomischen DNA und in der mRNA sind in Abb. 2 C aufgeführt.

3.3 Expressionsregulation von CAT-1 in Mensch und Ratte

Die Expression von CAT-1 wird auf transkriptioneller, posttranskriptioneller und translationaler Ebene in Abhängigkeit von den vorherrschenden Bedingungen in der Zelle moduliert (Hatzoglou et al. 2004).

3.3.1 Transkriptionelle Regulation

Über den Promotor des humanen CAT-1 (hCAT-1) ist nur recht wenig bekannt. Gonzalez et al. (2011) und Guzman-Gutierrez et al. (2012) untersuchten einen Bereich zwischen dem Transkriptionsstart des Gens und 650 bp stromaufwärts davon, der eine basale Promotoraktivität zeigte. Diese Aktivität könnte durch Insulin induziert werden.

Die Regulation des Promotors vom Ratten-CAT-1 (rCAT-1) ist dahingegen deutlich besser untersucht. Dieser befindet sich im 5'-flankierenden Bereich des Gens und zieht sich ins Exon 1 hinein (Fernandez et al. 2003). Er besitzt, wie etwa 76% aller humanen Gene (Yang et al. 2007), keine TATA-Box (Fernandez et al. 2003). Im Gegensatz zu anderen TATA-Box-losen Genen, das sind i.d.R. überwiegend Haushaltsgene, welche ubiquitär exprimiert werden (Thomas und Chiang 2006; Yang et al. 2007; Roy und Singer 2015), hat er nur einen Transkriptionsstart (Fernandez et al. 2003). Für gewöhnlich variiert dieser bei solchen Promotoren. Des Weiteren hat er weder ein Initiator-Element (Inr), noch eine CAT-Box (Fernandez et al. 2003). Die basale Promotoraktivität von rCAT-1 kann jedoch über mehrere putative Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren *specificity protein 1* (SP1) und *activating protein 2* (AP2) gesteuert werden. Durch deren Bindung an die DNA könnte somit das Ablesen des Gens aktiviert werden (*ibid.*). Im ungestressten Zustand findet eine Bindung des Transkriptionsfaktors *purine-rich element binding protein A* (Pur- α) an das *intronic enhancer element* (INE) innerhalb des rCAT-1-Introns 1 statt, was zu einer Steigerung der Transkriptionsrate führt (Huang et al. 2009).

Im Falle von Endoplasmatischem Retikulum (ER)-Stress, verursacht durch Aminosäuremangel bzw. der ungefalteten Proteinantwort (UPR, aus dem engl. *unfolded protein response*), wird die mRNA-Expression von rCAT-1 induziert (Abb. 3) (Fernandez et al. 2003; Hyatt et al. 1997). Dieser Effekt konnte bereits für die Expression von dem C/EBP-homologen Protein (CHOP) und der Asparagin-Synthetase in Säugerzellen beobachtet werden, vermittelt durch ein im Englischen genanntes *amino acid response element* (AARE), an welches Transkriptionsfaktoren binden, die die Produktion von Proteinen begrenzen oder erhöhen (Bruhat et al. 2002; Bruhat et al. 2000; Kilberg und Barbosa-Tessmann 2002; Ma et al. 2002). Im CAT-1 von Ratten gibt es mehrere Regulationsmöglichkeiten, abhängig von der Dauer des Stresses. Frühe UPR (innerhalb der ersten drei Stunden) verursacht die Phosphorylierung und damit Aktivierung des eukaryotischen Initiationsfaktors (eIF) 2 α (Huang et al. 2010). Dies führt zu einer Zunahme des aktivierenden Transkriptionsfaktor 4 (ATF4), welcher an das AARE im Exon 1 von rCAT-1 bindet und somit die Transkription induziert (*ibid.*). Bei einer länger anhaltenden UPR (ab drei bis zwölf Stunden) wird die rCAT-1-Transkription durch ein zusätzliches Binden des X-Box-bindenden Proteins 1s (XBP1s) an das (*endoplasmicreticulum-stress-element-II*)-like element (ERSE-II-like-Element) im Promotor aufrechterhalten (*ibid.*).

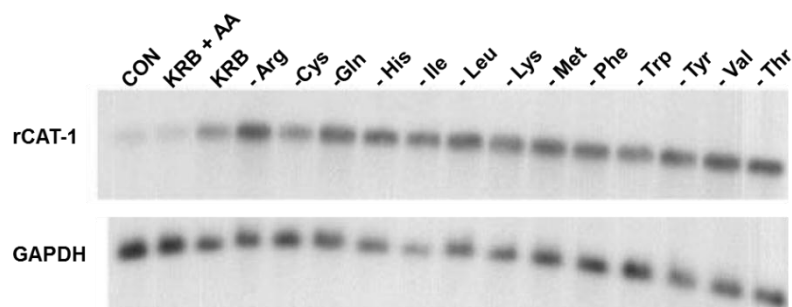


Abb. 3: Aminosäuremangel führt zur Akkumulation der endogenen rCAT-1-mRNA.

C6-Rattengliomazellen wurden für 4 h in Vollmedium (CON), Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer (KRB) mit 20 verschiedenen Aminosäuren (AA) und ohne Aminosäuren oder KRB mit allen bis auf die angegebene Aminosäure inkubiert. Anschließend wurden über Northern Blot-Analysen der mRNA-Gehalt von rCAT-1 und dem Haushaltsgen Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) bestimmt. Die Abbildung wurde modifiziert nach Fernandez et al. (2003).

Die Expressionsinduktion unter Mangelbedingungen ist relativ gut untersucht, dennoch sind mit großer Wahrscheinlichkeit noch viele weitere und bisher unbekannte Regulationsmechanismen an der differentiellen Expression des Aminosäuretransporters beteiligt. Die Unterschiede in der CAT-1-Expression zwischen verschiedener Gewebetypen hängt vermutlich mit einer gewebsspezifischen Regulation der mRNA-Expression zusammen (Hatzoglou et al. 2004).

3.3.2 Posttranskriptionelle Regulation

Ein Mangel an Aminosäuren erhöht nicht nur die Transkription von rCAT-1, sondern auch die mRNA-Stabilität (Hatzoglou et al. 2004; Aulak et al. 1999). Ein Grund dafür sind mehrere AU-

reiche Elemente (ARE) in der 3'-UTR der mRNA an die stabilisierende RNA-bindende Proteine binden können (Aulak et al. 1996). Unter Mangelbedingungen steigt die Konzentration des ELAV-Proteins (*embryonic lethal abnormal vision*) HuR im Zytoplasma an (Aulak et al. 1999; Brennan und Steitz 2001; Yaman et al. 2002), woraufhin dieses an eine als Nährstoffsensoren-ARE (NS-ARE) bezeichnete Sequenz bindet und so die mRNA-Stabilität erhöht (*ibid.*).

3.3.3 Translationale Regulation

In der Abwesenheit von Aminosäuren erfolgt in der Zelle die Deaktivierung des Translationsinitiationskomplexes eIF4F und so die 5'-Kappen-abhängige Translation (Kimball 2002). Des Weiteren wird auch die Wiederverwendung von Methionin-Boten-RNAs (Met-tRNAs) unterbunden, sodass diese nicht erneut genutzt werden können (*ibid.*). Für die meisten mRNAs führen diese beiden Prozesse zum völligen Erliegen der Translation. Dennoch steigt das Proteinlevel von rCAT-1 unter Mangelbedingungen stark an (Fernandez et al. 2001), was zeigt, dass das Protein im Gegensatz zu den meisten anderen Proteinen in der Zelle unter Mangelbedingungen weiterhin und wahrscheinlich sogar vermehrt translatiert wird (Hatzoglou et al. 2004). Dies wird vermutlich über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) in der 5'-UTR der mRNA bewirkt (Fernandez et al. 2001; Fernandez et al. 2002a; Fernandez et al. 2003; Fernandez et al. 2005; Fernandez et al. 2002b; Fernandez et al. 2002c; Hatzoglou et al. 2004; Komar und Hatzoglou 2011). Die IRES bildet in ihrer aktiven Form eine Sekundärstruktur aus, an die die ribosomalen 60S- und 40S-Untereinheiten binden, sodass der eIF4F-Komplex nicht mehr benötigt wird (Fernandez et al. 2001). Die Aktivierung der IRES erfolgt unter Mangelbedingungen über die Phosphorylierung von eIF2 α entweder durch die Kinase *general control nonderepressible 2* (GCN2), die *PKR-like ER kinase* (PERK) oder die Proteinkinase R (PKR) (Fernandez et al. 2002a; Fernandez et al. 2002c; Lopez et al. 2007; Fernandez et al. 2002b). Um eine aktive IRES zu bilden, ist die Translation des 144 bp langen μ ORFs, welcher mit der IRES in der 5'-UTR überlappt, nötig (Yaman et al. 2003; Fernandez et al. 2002b; Fernandez et al. 2001; Fernandez et al. 2005). Das langsame Ablesen des μ ORFs sorgt für eine Entwirrung der starken Sekundärstruktur und somit für die Bildung der IRES (Hatzoglou et al. 2004; Yaman et al. 2003). Das entstehende Peptid des μ ORFs hat auf den Prozess dabei jedoch keinen Einfluss (*ibid.*). Diese Theorie wird von Kozak (2005) stark kritisiert. So sagt sie, dass sich putative IRESs bei sorgfältiger Untersuchung oftmals als kryptische Promotoren oder Spleißstellen erweisen. Ein kryptischer Promotor ist ein durch epigenetische Regulation inaktivierter Promotor, der für die Bildung von *antisense*-RNA und interferierender RNAs verantwortlich sein kann. In Bezug auf die rCAT-1-mRNA kritisiert Kozak zudem eine zu geringe Aktivität der putativen IRES, sodass es nicht gerechtfertigt sei, diese als IRES zu bezeichnen.

In der translationalen Regulation spielen miRNAs ebenfalls eine große Rolle. Durch Binden an die mRNA von Genen können sie entweder eine Inhibition der Translation herbeiführen oder

die Stabilität der mRNA beeinflussen. In der mRNA von hCAT-1 befinden sich innerhalb der 3'-UTR zahlreiche potentielle Zielstrukturen für die miRNA 122. Die Klonierung dieser Strukturen in eine chimäre mRNA hat einen positiven Einfluss auf deren Translation und Stabilität (Chang et al. 2004). In den humanen Huh7-Leberkarzinomzellen wird die Translation der endogenen hCAT-1-mRNA über die miRNA-122 unterdrückt (Bhattacharyya et al. 2006). Hierbei interagiert die miRNA mit der 3'-UTR der hCAT-1-mRNA, was zur Inhibition der Translation führt (Abb. 4).

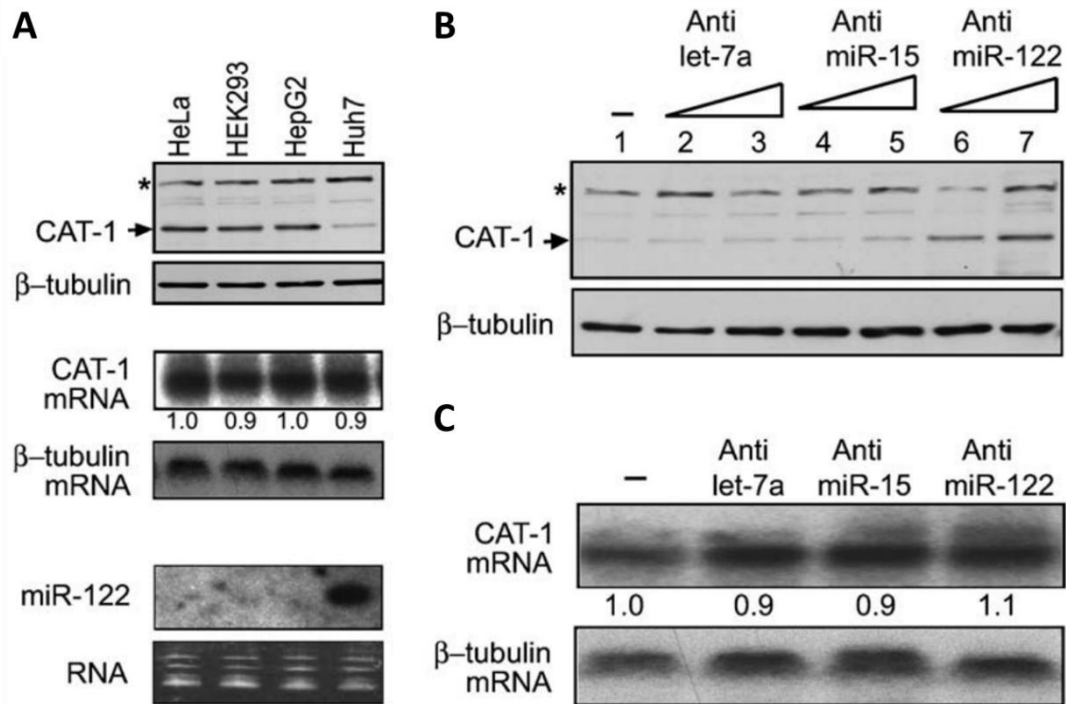


Abb. 4: Translation von hCAT-1 wird in Huh7-Leberzellenellen durch miR-122 unterdrückt.

A Analyse von Proteinen (zwei obere Blots) und RNAs (vier untere Gelbilder), die in vier verschiedenen menschlichen Zelllinien exprimiert wurden. Die verwendeten Zellextrakte wurden deglycosyliert und hCAT-1 sowie β-Tubulin über Western Blot analysiert. Die Position von hCAT-1 wird durch einen Pfeil angezeigt. Für den Northern Blot wurde Gesamt-RNA verwendet. Die relativen Werte der hCAT-1-mRNA sind unter dem Blot angegeben und wurden auf β-Tubulin bezogen. Das untere Gelbild zeigt eine EtBr-Färbung des für die miR-122-Analyse verwendeten Gels. **B** Western Blot-Analyse des hCAT-1- und β-Tubulinproteins aus Huh7-Zellen, die 24 h mit 0,1 oder 0,2 mM der angegebenen Oligonukleotide transfiziert wurden. **C** Northern Blot-Analyse der mRNA von hCAT-1 und β-Tubulin in Huh7-Zellen, welche 24 h mit 0,2 mM der angegebenen Oligonukleotide transfiziert wurden. Unspezifische Banden, welche mit dem Antikörper gegen hCAT1 kreuzreagierten, sind mit einem Sternchen gekennzeichnet. Die Abbildung stammt aus der Publikation von Bhattacharyya et al. (2006).

3.4 Die Rolle von CAT-1 in T-Zellen

CAT-1 bildet durch seine Funktion als Transporter von kationischen Aminosäuren in den meisten humanen Zellen den Hauptaufnahmeweg von Arginin, Lysin und Ornithin. Die semi-essentielle Aminosäure Arginin wird in vielen zentralen Stoffwechselwegen benötigt, welche auch Auswirkungen auf das Immunsystem haben. So spielt sie auch in humanen T-Lymphozyten, welche einen Teil der adaptiven Immunantwort im Körper darstellen, eine wichtige Rolle. Arginin wird neben der Proliferation (Munder et al. 2006; Rodriguez et al. 2007) auch für die Pro-

duktion einiger Zytokine (Feldmeyer et al. 2012; Munder et al. 2006) benötigt. Unter Argininmangel, z.B. hervorgerufen durch eine vermehrte Ausschüttung des Arginin-abbauenden Enzyms Arginase von myeloiden Supressorzellen (MDSCs) (Rodriguez und Ochoa 2008), verbleiben T-Zellen in den Zellzyklusphasen G_0 - G_1 stehen, wodurch sie nicht mehr proliferieren und so zu ruhenden Zellen werden (Rodriguez et al. 2007). Damit wird auch die T-Zell-vermittelte Immunantwort unterdrückt (Marvel und Gabrilovich 2015; Munder et al. 2006; Rodriguez et al. 2007; Werner et al. 2016). Dies hat neben der Proliferationsverminderung auch eine Einschränkung der INF- γ -Produktion zur Folge (Bronte und Zanovello 2005; Gabrilovich und Hurwitz 2008; Rodriguez et al. 2007; Rodriguez et al. 2002; Taheri et al. 2001). Ein weiteres Beispiel für die Wichtigkeit von Arginin zeigt ein Versuch von Geiger et al. (2016). Hierbei wurden murine B16.OVA-Melanomzellen in C57BL/6-Mäuse injiziert und 5 Tage wachsen gelassen. B16-OVA ist ein Ovalbumin-transfizierter Klon, der von der murinen Melanomzelllinie B16 abgeleitet ist. Im Anschluss erhielten die Mäuse entweder eine orale Arginin-Supplementierung oder zur Kontrolle lediglich das Lösungsmittel in dem das Arginin gelöst war. Einen Tag später wurden naive CD8⁺-OT-I-T-Zellen in die Tumor-tragenden Mäuse transferiert und mit OVA-Peptid immunisiert. Gegenüber den Mäusen ohne zusätzliche Zugabe von Arginin hatten die Mäuse mit Arginin eine verlängerte Lebenszeit sowie kleinere Tumore. Arginin trägt somit zur Antitumorantwort bei. Werden T-Zellen stimuliert, erfolgt eine stark vermehrte Argininaufnahme ins Zytoplasma der Zellen (Werner et al. 2016). Gleichzeitig fällt die intrazelluläre Arginkonzentration ab, wohingegen die Konzentration von Metaboliten, welche aus Arginin entstehen, ansteigt (Geiger et al. 2016). Des Weiteren kann auch ein bedeutender Anstieg von hCAT-1 auf mRNA- sowie auf Proteinebene beobachtet werden (Abb. 5).

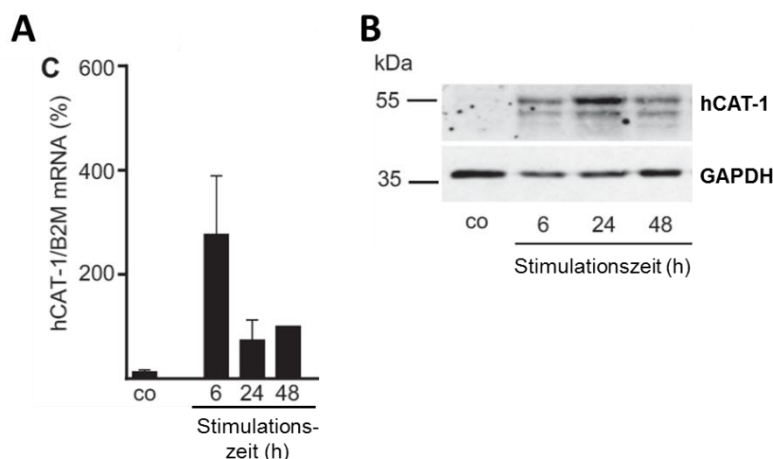


Abb. 5: mRNA- und Proteinexpression von hCAT-1 werden durch Stimulation in T-Zellen induziert.

Primäre humane T-Zellen wurden für 6, 24 oder 48 h mit an Metallkugeln gekoppelte CD3/CD28-Antikörper stimuliert. **A** Anschließend erfolgte eine qRT-PCR-Analyse der mRNA-Expression von hCAT-1 und dem Haushaltsgen β 2-Mikroglobulin (B2M). Die Werte werden als Prozentsatz des hCAT-1/B2M-Verhältnisses bei 48 h angegeben. **B** Die Proteinexpression von hCAT-1- und GAPDH wurden mittels Western Blot bestimmt. Die Abbildung wurde modifiziert nach Werner et al. (2016).

Argininmangel verlängert die Dauer der Expressionsinduktion (Werner et al. 2016). Inhibiert man die hCAT-1-Expression über eine siRNA, wird die Aufnahme von Arginin und die Proliferation von T-Zellen stark eingeschränkt (*ibid.*). Dies zeigt wie wichtig hCAT-1 für T-Zellen und damit für die Funktion des Immunsystems ist.

4 Ziel der Arbeit

Der Transporter hCAT-1 bildet in den meisten Säugetieren den Hauptaufnahmeweg für kationische Aminosäuren in die Zelle. Somit sorgt er für die Aufrechterhaltung der Proteinbiosynthese und vieler weiterer Stoffwechselwege. Jedoch weiß man noch sehr wenig über seine Expressionsregulation.

Aufgrund einer starken Induktion der mRNA-Expression von hCAT-1 in stimulierten humanen T-Zellen war das Ziel dieser Arbeit herauszufinden, welche Regulationsmechanismen an diesem Prozess beteiligt sind. Primäre humane T-Lymphozyten sind in ihrer Aufreinigung und der Versuchsdurchführung sehr aufwändig. Aus diesem Grund sollte zunächst ein geeignetes Zellsystem etabliert werden, in dem die Genregulation des Aminosäuretransporters untersucht werden kann. Da der Anstieg der hCAT-1-mRNA in T-Zellen unter Anwesenheit eines Transkriptionshemmers ausblieb, wurde vermutet, dass die Induktion aus einer transkriptionellen Regulation hervorgeht. Deshalb lag der Fokus auf der Analyse des hCAT-1-Promotors. Um diesen genau bestimmen und charakterisieren zu können, sollte zunächst der genaue Transkriptionsstart des hCAT-1-Gens determiniert werden, da dieser bisher noch nicht nachgewiesen wurde. Dies sollte mit RNase-Verdauungsschutzanalysen gelingen. Für die darauffolgende Untersuchung des Promotors sollte der von Gonzalez et al. (2011) und Guzman-Gutierrez et al. (2012) publizierte DNA-Abschnitt, in dem der Promotor zu erwarten war, in einen Reportervektor hineinkloniert werden, um ihn so in Luciferase-Reportergen-Analysen zu untersuchen. Sobald der Promotor gefunden wurde, sollte dieser im nächsten Schritt auf den kleinstmöglichen Bereich eingegrenzt werden, in dem sich der Kernpromotor aufhält. Anschließend sollten die *cis*-regulatorischen Elemente auffindig gemacht werden, welche die Expressionsregulation von hCAT-1 steuern. Eine weitere Möglichkeit, um die transkriptionelle Regulation von hCAT-1 zu erforschen, ist herauszufinden, welche Signalkaskaden an der Aktivierung oder auch Deaktivierung der Transkription beteiligt sind. Hierfür sollte die mRNA-Expression des Transporters in stimulierten T-Zellen durch Hemmung einzelner Signalproteine über spezifische Inhibitoren untersucht werden. Darüber kann festgestellt werden, welche Signalwege eine Rolle für die hCAT-1-Expression spielen sowie welche Transkriptionsfaktoren die mRNA-Expression initiieren.

5 Material und Methoden

5.1 Laborgeräte und Software

- Agarose-Gelelektrophoresekammer Wide Mini-Sub™ Cell (Bio-Rad Laboratories GmbH)
- Blotkammer Trans Blot® Electrophoretic TransferCell (Bio-Rad Laboratories GmbH)
- Brutschrank (Bakterien) Typ 1705309900312 (BINDER GmbH)
- Brutschrank (Zellkultur) Function Line (Heraeus Instruments GmbH)
- Chemilumineszenz-Detektor Molecular Imager ChemiDoc XRS (Bio-Rad Laboratories GmbH)
Software: Quantity One
- Elektroporationsgerät Gene Pulser Xcell™ Total System (Bio-Rad Laboratories GmbH)
- FACS BD ACCURI C6 PLUS (BD Biosciences)
Software: BD Accuri™ C6 Plus Software
- Gelrockner Modell 543 und 583 Gel Dryer (Bio-Rad Laboratories GmbH)
- Gewebe-Lysierer TissueLyser LT (QIAGEN GmbH)
- H₂O_{reinst.}-Anlage Milli-Q Plus (Merck Millipore KGaA)
- Luminometer Centro LB960 (BERTHOLD TECHNOLOGIES GmbH & Co. KG)
Software: Mikro Win 2000
- Mikroskop DM IL (Leitz GmbH & Co KG)
- Mikrozentrifuge (1,5-2 ml-Gefäße) Centrifuge 5417R (Eppendorf AG)
- Multifuge (15-50 ml-Gefäße) Heraeus™ Multifuge™ X3 Centrifuge Series (Thermo Fisher Scientific GmbH)
- Nanodrop NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific GmbH)
Software: NanoDrop 2000
- PCR-Cycler MyCycler thermal cycler (Bio-Rad Laboratories GmbH)
- Plattenlesegerät Sunrise™ (Tecan Group AG)
Software: Magellan6
- Power Unit Power Pac 300 (Bio-Rad Laboratories GmbH)
- qPCR-Cycler StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
Software: StepOne Software v2.3

- Schüttelinkubator innova40 (New Brunswick Scientific GmbH)
- SDS-Gelelektrophoresekammer Model 45-2010-i (Peqlab Biotechnologie GmbH)
- Speed Vac Speed Vac® SC 110 (Savant Instruments Inc.)
- Szintillationszähler für β -Strahlung Tri-Carb 2810 TR (PerkinElmer GmbH)
Software: Quanta Smart
- Taumler Duomax 1030 (Heidolph Instruments GmbH Co.
KG Labortechnik)
- Ultrazentrifuge (Gefäße > 50 ml) Avanti J-30 Centrifuge, Rotor: JLA 16.250
(Beckman Coulter GmbH)
- Ultrazentrifuge (Gefäße > 50 ml) J2-MC Centrifuge, Rotor: JS13.1 (Beckman
Coulter GmbH), Ausschwingrotor
- UV-Bank Mini Transilluminator (Bio-Rad Laboratories
GmbH)
Software: Multi-Analyst Alias
Kamera: Polaroid® MP-4+ camera system
(Sigma-Aldrich Co. LLC.)
- Vakuumpumpe Vacuubrand Typ R25 (VACUUBRAND GMBH +
CO KG)

5.2 Chemikalien

Alle Chemikalien zum Ansetzen von Puffern oder Lösungen wurden, wenn nicht anders gekennzeichnet, von AppliChem GmbH, Carl Roth GmbH & Co. KG, Merck KGaA und Sigma-Aldrich Chemie GmbH bezogen.

5.3 Zellbiologische Methoden

Alle Arbeiten fanden unter sterilen Bedingungen statt. Die Verbrauchsmaterialien (sterile Pipetten, Plastikgefäße, Kulturflaschen und -platten) stammten von Greiner Bio-One GmbH.

5.3.1 Kulturmedien und Medienzusätze

Für Arbeiten in der Zellkultur wurden die in Tab. 1 aufgeführten Produkte verwendet.

Tab. 1: Medien und Medienzusätze für die Arbeit mit Zellen in der Zellkultur

Produkt	Hersteller, Artikelnr.
Dimethylsulfoxid	Carl Roth GmbH & Co. KG, #A994.1
DMEM, high glucose, no glutamine (Normalmedium)	Thermo Fisher Scientific GmbH, #11960044
DMEM, high glucose, no glutamine, no lysine, no arginine (Mangelmedium)	Thermo Fisher Scientific GmbH, #A1443101
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, #D8537

Material und Methoden

Fötales bovines Serum (FBS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, #F9665
Histopaque®-1077 (Ficoll)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, #10771
L-Arginin Monohydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, #11039
L-Glutamin 200 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, #G5713
L-Leucin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, #61819
L-Lysin Monohydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, #62929
Na-Pyruvat 100 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, #S8636
Opti-MEM® I Reduced Serum Medium	Thermo Fisher Scientific GmbH, #31985070
Penicillin-Streptomycin 10 mg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, #P0781
RPMI 1640 Medium, no glutamine (Normalmedium)	Thermo Fisher Scientific GmbH, #31870025
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, #T6146
Trypsin-EDTA solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, #T3924

Die Kulturmedien wurden wie in Tab. 2 angesetzt. Da die zugesetzten L-Arginin- und L-Lysin-Lösungen unsteril waren, wurden die angesetzten Mangelmedien zusätzlich durch 0,2 µm-Filter sterilfiltriert.

Tab. 2: Zusammensetzung der Kulturmedien

Medium	Zusatzstoff	Volumen
DMEM, 500 ml (Normalmedium)	DMEM, high glucose, no glutamine	500 ml
	FBS	50 ml
	L-Glutamin 200 mM	10 ml
	Na-Pyruvat 100 mM	5 ml
DMEM, 500 ml (mit Pen/Strep)	DMEM, high glucose, no glutamine	500 ml
	FBS	50 ml
	L-Glutamin 200 mM	10 ml
	Na-Pyruvat 100 mM	5 ml
	Penicillin-Streptomycin 10 mg/ml	500 µl
DMEM, 500 ml (FBS-frei)	DMEM, high glucose, no glutamine	500 ml
	L-Glutamin 200 mM	10 ml
	Na-Pyruvat 100 mM	5 ml
DMEM, 500 ml (für Mangelmedium)	DMEM, high glucose, no glutamine, no lysine, no arginine	500 ml
	L-Glutamin 200 mM	10 ml
	Na-Pyruvat 100 mM	5 ml
DMEM - Arg/Lys, 50 ml (Mangelmedium)	DMEM, 500 ml (Mangelmedium)	45 ml
	dialysiertes FBS	5 ml
DMEM + Arg/Lys, 50 ml (Vollmedium)	DMEM, 500 ml (Mangelmedium)	45 ml
	dialysiertes FBS	5 ml
	L-Arginin 100 mM	500 µl
	L-Lysin 100 mM	500 µl
Opti-MEM, 500 ml	Penicillin-Streptomycin 10 mg/ml	5 ml
	FBS	50 ml
RPMI, 500 ml (Normalmedium)	L-Glutamin 200 mM	5 ml
	foetal bovine serum (FBS)	50 ml

Material und Methoden

	Penicillin-Streptomycin 10 mg/ml	5 ml
RPMI, 50 ml - Arg (Mangelmedium)	RPMI-1640 Medium	45 ml
	dialysiertes FBS	5 ml
	L-Leucin 100 mM	200 µl
	L-Lysin 100 mM	110 µl
	Penicillin-Streptomycin 10 mg/ml	500 µl
	L-Glutamin 200 mM	500 µl
RPMI, 50 ml + Arg (Mangelmedium)	RPMI-1640 Medium	45 ml
	dialysiertes FBS	5 ml
	L-Leucin 100 mM	200 µl
	L-Lysin 100 mM	110 µl
	Penicillin-Streptomycin 10 mg/ml	500 µl
	L-Glutamin 200 mM	500 µl
	L-Arginin 100 mM	500 µl

5.3.2 Zellsysteme

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Zellsysteme (Tab. 3) verwendet.

Tab. 3: Verwendete Zellsysteme und deren Kultivierung

Zellsystem	DLD-1	EA.hy926	T-Zellen
Beschreibung	humane Kolon-Adenokarzinomzelllinie	humane endotheliale Zelllinie aus Fusion von humanen Alveolarepithel-ähnlichen Lungenkarzinomzelllinie A549/8 mit humanen Umbilikalvenen Endothelzellen (HUVEC)	humane primäre T-Lymphozyten
Herkunft	ATCC (CCL-221)	Geschenk von Cora-Jean S. Edgell von der University of North Carolina at Chapel Hill, USA	isoliert aus Vollblutkonserven (Überschussmaterial) von gesunden Spendern der Transfusionszentrale der Universitätsmedizin der JGU Mainz
Medium	DMEM	DMEM	RPMI
Wachstum	adhärent	adhärent	in Suspension
Inkubation	37 °C, 5% CO ₂	37 °C, 10% CO ₂	37 °C, 5% CO ₂
Splittung	1:20, 2x pro Woche	1:10, 1x pro Woche	nie, da Zellen nicht proliferieren

5.3.3 Handhabung von Zellen - Kultivieren, Splitten, Zählen und Einfrieren

Zur Kultivierung eines bei -80 °C tiefgefrorenen Zell-Aliquots wurden die Zellen aufgetaut. Danach wurden sie in 10 ml Kulturmedium aufgenommen, durch mehrmaliges Auf- und Abpipetieren homogenisiert und anschließend für 5 min bei 1.500 rpm zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml frischem Medium resuspendiert.

Die Zellsuspension wurde dann in eine für die Zellart optimale Kulturflasche gegeben und im Brutschrank bei 37 °C und 5% oder 10% CO₂ (Tab. 3) bis zum nächsten Splitten inkubiert.

Da Zellen aus immortalisierten Zelllinien unentwegt proliferieren, müssen diese in regelmäßigen Abständen gesplittet werden. Hierzu wurde bei adhärenenten Zellen das Medium abgesaugt, um sie danach mit 10 ml DPBS (engl. *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*) zu waschen. Dann wurde 1 ml Trypsin-EDTA auf die Zellen gegeben. Diese wurden dann für 1-5 min im Brutschrank inkubiert, bis sie sich vom Flaschenboden abgelöst hatten. Im Anschluss wurden die Zellen in 9 ml Kulturmedium resuspendiert, sodass sie nun im Medium suspendiert und im gewünschten Verhältnis (Tab. 3) gesplittet werden konnten. Die verbleibenden Zellen wurden in 10 ml Medium aufgenommen, homogenisiert und bis zum nächsten Versuch oder Splitten in den Brutschrank gestellt.

Beim Aussähen von Zellen für Versuche ist es wichtig, die genaue Zellzahl zu wissen, um in allen Ansätzen die gleichen Bedingungen herzustellen. Dafür wurden 50 µl der mit Trypsin-EDTA abgelösten (wie oben beschrieben) adhärenenten Zellen oder Suspensionszellen mit 50 µl einer Trypanblau-Lösung (0,5 g Trypanblau in 100 ml DPBS) vermischt und in eine Zählkammer (KOVA Glasstic® Slide 10 with Counting Grids, #87144E, KOVA International) gegeben. Um die Zellzahl pro ml zu bestimmen, wurden drei der insgesamt neun Quadrate ausgezählt und mit folgender Formel hochgerechnet:

$$N \left[\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right] = \text{Summe gezählter Zellen} \cdot 2 \text{ (Verdünnungsfaktor)} \cdot 10.000 \text{ (Kammerkonstante)}$$

Um Zellen längerfristig zu konservieren, können diese in der Gasphase von flüssigem Stickstoff bei -155 °C aufbewahrt werden. Hierfür wurden die adhärenenten Zellen (wie oben beschrieben) von dem Kulturflaschenboden gelöst und 5 min bei 1.500 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 6 ml Medium + 10% DMSO (Dimethylsulfoxid) aufgenommen. Anschließend konnte die Zellsuspension auf sechs Cryoröhrchen aufgeteilt und im Stickstofftank gelagert werden.

5.3.4 Isolation von primären T-Zellen aus Vollblutkonserven

Im ersten Schritt erfolgte die Isolation von PBMCs (engl. *peripheral blood mononuclear cells*) aus einer humanen und frisch gespendeten Vollblutkonserve (500 ml, enthalten ca. 10⁹ PBMCs oder 5 · 10⁶ T-Zellen). Diese wurden freundlicherweise von Dr. Roland Conradi (leitender Oberarzt der Transfusionszentrale an der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz) zur Verfügung gestellt. Die Konserve wurde zu je 25 ml auf 50 ml-Gefäße aufgeteilt und mit 10 ml DPBS/EDTA auf 35 ml aufgefüllt. Das Gemisch wurde danach vorsichtig über 15 ml Ficoll (Histopaque®-1077, Sigma Aldrich) geschichtet und 15 min bei

2.500 rpm ohne Bremse (Ac: 6, Dc: 0) in der Multifuge zentrifugiert. Dabei bildet sich ein Gradient mit 4 verschiedenen Phasen (Abb. 6) aus. In der oberen Phase befinden sich Blutplasma sowie Thrombozyten. In der Schicht darunter sind die PBMCs lokalisiert. In der zweiten Interphase sammelt sich der Ficoll und in der untersten Phase befinden sich die Erythrozyten. Um nun den PBMC-Ring vom Rest zu trennen, wurde dieser behutsam mit einer Pipette abgezogen. Dabei wurden immer zwei Ringe (etwa 20-35 ml) vereinigt. Diese wurden mit DPBS/EDTA auf 50 ml aufgefüllt und 15 min bei 1.800 rpm und 10 °C in der Multifuge zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgesaugt, je zwei Pellets in 30 ml DPBS/EDTA resuspendiert und 5 min bei 1.500 rpm und 4 °C in der Multifuge zentrifugiert. Danach wurden alle Pellets auf insgesamt zwei 50-ml-Gefäße aufgeteilt, erneut auf 30 ml DPBS/EDTA aufgefüllt, resuspendiert und 5 min bei 1.500 rpm in der Multifuge zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die letzten beiden Pellets in 50 ml DPBS/EDTA vereinigt und auf Eis gestellt. Um die Zellzahl der PBMCs zu bestimmen, wurden 50 µl einer 4% Essigsäure zu 50 µl der Zellsuspension gegeben und danach wie in Kapitel 5.3.2 beschrieben fortgefahren.

DPBS/EDTA	500 ml	DPBS
	2 ml	EDTA (0,5 M), steril filtriert (0,2 µm)

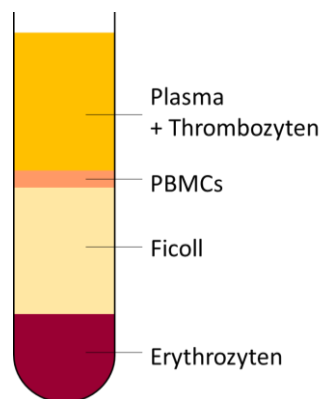


Abb. 6: Auftrennung des Ficoll-Gradienten nach Zentrifugation.

Bei der Auftrennung des Vollblutes über einen Ficoll-Gradienten entstehen vier verschiedene Schichten. PBMCs: *Peripheral Blood Mononuclear Cells*.

Nach der Isolierung der PBMCs aus dem Vollblut wurden die T-Zellen aus den mononuklearen Zellen des peripheren Blutes isoliert. Dafür wurde das Kit „EasySep™ Human T Cell Enrichment Kit“ (#19051, STEMCELL Technologies SARL) nach Manual verwendet. Damit die T-Zellen durch die Selektion nicht schon stimuliert werden, erfolgt bei diesem Kit eine Negativselektion durch die Antikörperkomplexe CD14, CD16, CD19, CD20, CD36, CD56, CD66b, CD123, Glycophorin A, welche an mit Dextran überzogene Metallkügelchen gebunden sind.

5.3.5 Reinheitskontrolle von isolierten primären T-Zellen durch FACS-Analyse

Um die Effizienz der T-Zell-Aufreinigung (Kapitel 5.3.4) zu überprüfen, wurde eine Reinheitskontrolle über eine FACS-Analyse von CD3 Zellen durchgeführt. Dies ist ein Oberflächenmarker, welcher charakteristisch für T-Lymphozyten ist und somit von einem Antikörper gegen CD3 markiert werden kann. Für die Messung wurden drei Ansätze (Tab. 4) mit je $3 \cdot 10^6$ Zellen mit 1 ml DPBS gewaschen und für 3 min bei 1.800 rpm in der Multifuge zentrifugiert. Anschließend wurde das Gefäß mit den pelletierten Zellen kurz invertiert, um den Überstand abzuschütten. Zu den ersten beiden Ansätzen wurden 3 µl des Antikörpers hinzugegeben und für 10 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Zum Schluss wurden die Zellen wie oben noch zweimal mit 1 ml DPBS gewaschen und zentrifugiert, bis sie letztendlich in je 300 µl DPBS/FBS/EDTA aufgenommen wurden und durch eine Analyse mit dem FACS-Gerät gemessen wurden.

Tab. 4: Ansätze zur Überprüfung der T-Zell-Reinheit

Ansatz	Funktion	Antikörper	Hersteller, Artikelnr.
1	Überprüfung der T-Zell-Reinheit	PE Mouse Anti-Human CD3	BD Biosciences, #555333
2	Negativkontrolle für Isotyp	PE Mouse IgG1, κ Isotype Control	BD Biosciences, #555749
3	Negativkontrolle ohne Antikörper	-	-

DPBS/FBS/EDTA	45 ml	DPBS
	5 ml	FBS
	200 µl	EDTA (0,5 M), steril filtriert (0,2 µm)

5.3.6 Behandlung von primären T-Zellen mit Inhibitoren

Pro Versuchsansatz wurden $5 \cdot 10^6$ primäre T-Zellen (Isolation siehe Kapitel 5.3.4), aufgeteilt auf fünf Vertiefungen (96-Loch-Platte, Rundboden), in 190 µl Versuchsmedium, welches bereits den Inhibitor in der gewünschten Konzentration (Tab. 5) enthielt, ausgesetzt. Diese wurden dann für 1 h im Brutschrank präinkubiert. Erst danach erfolgte die Co-Stimulation durch an Metallkügelchen gekoppelte CD3/CD28-Antikörper (Kapitel 5.3.7). Im Anschluss wurden 10 µl der homogenen Antikörpersuspension in jede Vertiefung pipettiert, sodass ein finales Volumen von 200 µl erreicht wurde. Die Ansätze wurden dann für 3 h bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Um die Versuchsansätze abzustoppen, wurden immer alle Vertiefungen von einem Ansatz in ein 1,5 ml-Gefäß überführt und dann bei 390 x g für 5 min in der Mikrozentrifuge pelletiert. Danach wurde für eine RNA-Isolation (Kapitel 5.5.15) 1 ml QIAzol Lysis Reagent (#79306, QIAGEN GmbH) oder für Proteinanalysen 100 µl RIPA-Lysepuffer (Kapitel 5.4.1) hinzugegeben.

Tab. 5: Inhibitoren

Inhibitor	inhibiert	Endkonzentration	gelöst in	Hersteller, Artikelnr.
AKT inhibitor VIII	AKT	4 µM	DMSO	Tocris Bioscience, # 5773

Bay 11-7082	NF-κB	5 μM	DMSO	Tocris Bioscience, # 1744
Cyclosporin A	Calcineurin	1 μM	DMSO	Tocris Bioscience, #1101
Gö 6983	PKC α/β/γ/δ/ε/η/θ	1 μM	DMSO	Tocris Bioscience, # 2285

5.3.7 Co-Stimulation von T-Zellen

Die T-Zellen wurden mit an Metallkügelchen gekoppelte CD3/CD28-Antikörper (Dynabeads® Human T-Activator CD3/CD28, #11123D, Thermo Fisher Scientific GmbH) stimuliert. Die Antikörpersuspension wurde im 5:1-Verhältnis zu den T-Zellen eingesetzt. Das verwendete Volumen Antikörpersuspension wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Volumen der Antikörpersuspension } [\mu\text{l}] = (T - \text{Zellanzahl} \div \text{Vertiefung} \cdot 5) \div 10^6$$

Um die Antikörper-beschichteten Metallkügelchen für die Stimulation vorzubereiten, wurde das berechnete Volumen in 1 ml DPBS aufgenommen und für 1 min bei 14.000 rpm in der Mikrozentrifuge zentrifugiert. Dann wurde der Überstand abgenommen und die Kügelchen im Versuchsmedium resuspendiert, dessen Volumen sich wie folgt berechnet:

$$\text{Volumen des Versuchsmediums } [\mu\text{l}] = \text{eingesetztes Volumen Antikörpersuspension } [\mu\text{l}] \cdot 2,2$$

Danach konnten nun 10 μl der an Metallkügelchen gekoppelte CD3/CD28-Antikörper zu jeder Vertiefung gegeben werden. Bei der Stimulation von T-Zellen mit anschließender Elektroporation wurde zusätzlich Interleukin-2 (IL-2, 600 U/ml) hinzugegeben.

5.4 Proteinbiochemische Methoden

5.4.1 Herstellung von Zellysat und Proteinbestimmung durch BCA-Assay

Zur Proteinanalyse von Versuchsansätzen wurde zunächst das Medium von den Zellen entfernt. Dies geschah bei adhärennten Zellen durch einfaches Absaugen des Mediums oder bei Suspensionszellen durch Zentrifugation für 5 min bei 390 x g in der Mikrozentrifuge mit anschließendem Absaugen des Mediums. Um die Zellen zu lysieren, wurden dann 100 μl (bei T-Zellen) oder 200 μl (bei allen anderen Zellen) RIPA-Lysepuffer (engl. *radioimmunoprecipitation assay buffer*) auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen in dem Puffer resuspendiert und für eine Stunde bei 4 °C auf dem Taumler geschüttelt. Im nächsten Schritt erfolgte die Entfernung der Zelltrümmer durch eine Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 14.000 rpm in der Mikrozentrifuge. Die Proteine befand sich nun im Überstand und wurde in ein neues 1,5 ml-Gefäß überführt, dann auf Eis gestellt. Zur Proteinbestimmung wurde eine Verdünnungsreihe mit einem Proteinstandard (Tab. 6) erstellt. Hierzu wurde BSA (engl. *bovine serum albumin*) verwendet. Für die Messung der Proben wurde von diesen eine 100 μl-Verdünnung (1:5 bei T-Zell-Lysaten, 1:10 bei allen anderen Zellen) mit H₂O_{reinst.} erstellt. Dann wurden für

Doppelbestimmung zweimal je 25 µl pro Vertiefung von den Standards und den zu bestimmenden Proben in eine 96-Loch-Platte gegeben. Zum Schluss erfolgte die Zugabe von 200 µl pro Vertiefung von einem frisch angesetzten Gemisch aus Reagenz A und B (50:1-Verhältnis, #23228 und #1859078, Thermo Fisher Scientific GmbH) und eine Inkubation von 20 min bei 37 °C. Die im Reagenzgemisch aus Lösung A und B enthaltenen Cu²⁺-Ionen bilden mit den Peptiden einen Chelatkomplex, wobei die Kupferionen zu Cu reduziert werden. Die ebenfalls in dem Gemisch enthaltenen Bicinsäure reagiert mit diesen Komplexen, sodass es zu einem violetten Farbumschlag im Gemisch kommt, der bei 562 nm eine starke Absorption aufweist. Die Absorptionsmessung der Proben erfolgte bei 562 nm im Plattenlesegerät. Dabei gilt die Regel: Je mehr Protein in der Lösung enthalten ist, desto höher ist die gemessene Absorption.

Bicinsäure

RIPA-Lysepuffer	150 mM	NaCl
	50 mM	Tris pH (8,0)
	1%	Triton X100
	0,5%	Na-Deoxycholat
	0,1%	SDS
	1 Tablette	cOmplete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail (#11836153001, Roche Deutschland Holding GmbH)
	1 Tablette	PhosSTOP™ (#04906837001, Roche Deutschland Holding GmbH)
	ad 10 ml	H ₂ O _{reinst.}

Tab. 6: Pipettierschema für eine BSA-Standardreihe

Standard	Konzentration [µg/ml]	H ₂ O _{reinst.}	BSA
A	2.000	2.000 µl	4 mg
B	1.500	500 µl	1.500 µl aus Standard A
C	1.000	500 µl	1.000 µl aus Standard B
D	750	250 µl	750 µl aus Standard C
E	500	300 µl	600 µl aus Standard D
F	250	500 µl	500 µl aus Standard E
G	125	500 µl	500 µl aus Standard F
H	25	800 µl	200 µl aus Standard G
I	0	1.000 µl	-

5.4.2 Glycosidase-Behandlung

Bei stark glycosylierten Proteinen, wie dem hCAT-1, wurde eine Glycosidasebehandlung des Proteinlysats durchgeführt. Hierbei wurde zu 30 µg Protein 1 µl N-Glycosidase F

(#111365193001, Roche Deutschland Holding GmbH) hinzugegeben und 45 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

5.4.3 Western Blot

5.4.3.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) für Proteine

Die Auftrennung der in den Zelllysaten enthaltenen Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte über SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Hierfür wurden zunächst 30 µg Zelllysate mit dem gleichen Volumen an 2x SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Bei der Detektion von hCAT-1 wurde zuvor immer eine Glycosidase-Behandlung (Kapitel 5.4.2) durchgeführt. Anschließend wurden die Proben auf ein SDS-Gel aufgetragen, welches aus einem Sammel- und Trenngel bestand. Die Konzentration des Trenngels wurde an die Größe der zu analysierenden Proteine angepasst. Bei Proteinen >70 kDa wurde ein 12,5%- und bei <70kDa ein 10%-Trenngel verwendet. Die Zusammensetzung ist Tab. 7 zu entnehmen. Das Gel wurde in der SDS-Gelelektrophoresekammer frisch hergestellt, mit 1x SDS-Laupuffer befüllt und dann mit den Proteinproben und einem Größenmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, #26616, Thermo Fisher Scientific GmbH) beladen. Um ein gleichmäßiges Einlaufen der Proben zu gewähren, wurde das Gel zunächst 10 min bei 200 V (constant) einlaufen gelassen und dann bis zum Ende runter auf 120 V (constant) gestellt.

2x SDS-Probenpuffer	125 mM	Tris
	20%	Glycerol
	5%	SDS
	0,001%	Bromphenolblau
	8 M	Harnstoff
	2%	β-Mercaptoethanol (frisch zugegeben)
	in H ₂ O _{reinst.}	

Tab. 7: Pipettierschema für ein SDS-Gel

Chemikalie	Sammelgel (6%)	Trenngel (12,5%)	Trenngel (10%)
H ₂ O _{reinst.}	6,1 ml	7,13 ml	9 ml
1 M Tris pH 8,8	/	5,63 ml	5,63 ml
0,5 M Tris pH 6,8	2,5 ml	/	/
10% SDS	100 µl	225 µl	225 µl
Acrylamid	2,3 ml	9,38 ml	7,5 ml
APS	66 µl	150 µl	150 µl
TEMED	14 µl	15 µl	15 µl

10x SDS-Laufpuffer	240 mM	Tris
	1,9 M	Glycin
	1%	SDS
	in H ₂ O _{reinst.}	

5.4.3.2 Proteintransfer

Nachdem das Zellysate über ein SDS-Gel (Kapitel 5.4.3.1) aufgetrennt worden war, erfolgte die Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran. Dabei wurde das Gel wie in Abb. 7 luftblasenfrei geschichtet, in die Blotkammer gegeben und dabei so orientiert, dass die Membran zur Anode zeigte. Anschließend wurde die Blotkammer mit ElektrobloTTingpuffer befüllt, an eine Power Unit angeschlossen und über Nacht bei 4 °C und 200 mA (constant) laufen gelassen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Spannung zwischen 30 und 50 V lag. Ob die Proteine relativ vollständig auf die Nitrozellulosemembran übertragen worden waren, konnte mit Hilfe einer Ponceau S-Färbung überprüft werden. Hierbei wurde die Membran nach dem Blotting in eine Ponceau S-Lösung getaucht und 30 min auf dem Taumler inkubiert. Danach erfolgte ein mehrmaliges Waschen der Membran mit H₂O_{reinst.}, bis ein Kontrast zwischen Hintergrund und angefärbten Proteinen zu erkennen war. Die Essigsäure in der Lösung diente gleichzeitig der Fixierung der Proteine auf der Nitrozellulosemembran.

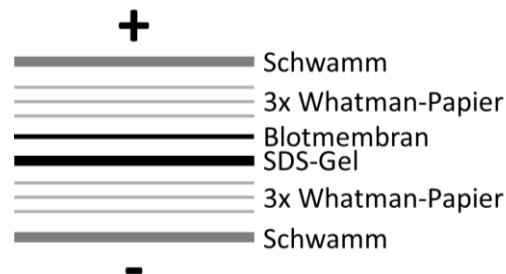


Abb. 7: Schichtung und Orientierung in der Blotkammer.

ElektrobloTTingpuffer	20 mM	Tris
	150 mM	Glycin
	20%	Methanol
	in H ₂ O _{reinst.}	
Ponceau S-Lösung	0,5%	Ponceau S
	1%	Essigsäure

5.4.3.3 Proteinnachweis durch Antikörper

Nach dem Proteintransfer (Kapitel 5.4.3.2) erfolgte über Antikörper eine spezifische Detektion von Proteinen auf der Nitrozellulosemembran. Um unspezifische Bindungsstellen auf der

Membran abzudecken, wurde diese zunächst 1 h in 20 ml Blotto, versetzt mit 1 ml Ziegen serum (Goat serum, # G9023, Sigma-Aldrich Chemie GmbH), auf dem Taumler inkubiert. Danach wurde die Membran 3x 10 min in AKV-Puffer (Antikörperverdünnungs-Puffer) gewaschen. Wenn der primäre Antikörper in Blotto gelöst war, entfiel dieser Schritt. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper (Tab. 8) in Blotto, AKV-Puffer oder Verdünnungs-Puffer über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, erfolgte ein dreimal 10-minütiges Waschen der Blotmembran mit Blotto. Im nächsten Schritt wurde der passende sekundäre Antikörper (Tab. 9) hinzugegeben und für 1 h auf dem Taumler inkubiert. Dann wurde die Nitrocellulosemembran zuerst 3x 10 min mit TBS-T (engl. *tris buffered saline with tween*) und dann 10 min mit TBS (engl. *tris buffered saline*) gewaschen. Nun konnte für 1 min das ECL-Reagenz (Western Lightning® Plus-ECL, #NEL103001EA, PerkinElmer GmbH) auf den Blot gegeben werden. Anschließend erfolgte eine Belichtungsaufnahme mit einem Chemilumineszenzfilm (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare Life Sciences) oder mit einem Chemilumineszenz-Detektor. Sollte die gleiche Membran mit weiteren Antikörpern behandelt werden, wurde diese für 30 min bei 50 °C in Strip-Puffer im Wasserbad „gestripped“ und 6x 10 min mit PBS (engl. *Phosphate Buffered Saline*) gewaschen. Danach konnte mit einer weiteren Antikörperbehandlung begonnen werden.

Blotto	50 mM	Tris-HCl (pH 8)
	2 mM	CaCl ₂
	0,01%	Antifoam A
	5%	Magermilchpulver
	in H ₂ O _{reinst.}	
AKV-Puffer	1%	BSA
	0,1%	Tween-20
	in 1x PBS	
Verdünnungs-Puffer	5%	BSA
	in 1x TBS-T	
1x TBS-T	0,05%	Tween-20
	in 1x TBS	
1x TBS	10 mM	Tris
	150 mM	NaCl
	0,01%	Antifoam A
	5%	Magermilchpulver
	in H ₂ O _{reinst.}	

10x PBS	17,6 mM	KH ₂ PO ₄
	26,8 mM	KCl
	1,4 M	NaCl
	101 mM	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
	in H ₂ O _{reinst.}	
Strip-Puffer	2%	SDS
	100 mM	β-Mercaptoethanol
	62,5 mM	Tris (pH 6,8)
	in H ₂ O _{reinst.}	

Tab. 8: Primäre Antikörper

Antikörper	Proteingröße (kDa)	Verdünnung	Phosphorylierungsstelle	Hersteller, Artikelnr.	sek. Antikörper
hCAT-1, (Rohserum)	ca. 95 (glycosyliert), 68 (deglycolysiert)	1:10.000 in AKV-Puffer	/	AG Closs	Goat-anti-Rabbit IgG
GAPDH	37	1:5.000 in AKV-Puffer	/	Cell Signaling Technology Corp., #2118	Goat-anti-Rabbit IgG
AKT pan	60	1:2.000 in Verdünnungs-Puffer	/	Cell Signaling Technology Corp., #4691	Goat-anti-Rabbit IgG
AKT Ser473	60	1:2.000 in Verdünnungs-Puffer	Serin 473	Cell Signaling Technology Corp., #9271 und #4060	Goat-anti-Rabbit IgG
AKT Thr308	60	1:2.000 in Verdünnungs-Puffer	Threonin 308	Cell Signaling Technology Corp., #2965	Goat-anti-Rabbit IgG

Tab. 9: Sekundärer Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller, Artikelnr.
Goat-anti-Rabbit IgG	1:10.000 in Blotto	Calbiochem, #401393

5.5 Molekular- und Mikrobiologische Methoden

5.5.1 Isolation genomischer DNA

Zur Isolation genomischer DNA aus PBMCs wurde das Kit „PureLink® Genomic DNA Mini Kit“ (#K182001, Invitrogen AG) verwendet. Die Isolation erfolgte nach Angaben des Herstellers.

5.5.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR, aus dem engl. *polymerase chain reaction*) wurde in dieser Arbeit zur Klonierung und Mutagenese von diversen Plasmidkonstrukten (Anhang B) verwendet. Dabei wurden unterschiedliche Kits bzw. Polymerasen nach Herstellerangaben verwendet:

- „Q5® High-Fidelity DNA Polymerase“ (#M0491S, New England BioLabs GmbH)
- „Phusion® High-Fidelity PCR Kit“ (#E0553S, New England BioLabs GmbH)
- „TOPO® TA Cloning® Kit for Subcloning“ (#450641, Thermo Fisher Scientific GmbH)
- Taq-Polymerase (hergestellt von AG Kleinert, Institut für Pharmakologie der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz)

Die in dieser Arbeit eingesetzten Oligonukleotide sind in Anhang A aufgeführt. Dabei wurde die in der PCR gewählte Annealing-Temperatur an die verwendeten Oligonukleotide, wie in dem jeweiligen Kit-Manual empfohlen wurde, angepasst.

5.5.3 Restriktion

Um PCR-Produkte (PCR siehe Kapitel 5.5.1) oder Plasmide gezielt zu schneiden, wurden Restriktionsenzyme von New England BioLabs GmbH benutzt. Dabei wurde der Standardansatz in Tab. 10 verwendet. Die Restriktion geschah, wenn nicht anders vom Hersteller vorgegeben, bei 37 °C im Wasserbad. Sollte nur eine Kontrollrestriktion zu Überprüfung des Klonierungserfolges durchgeführt werden, wurde der Ansatz ca. 1 h inkubiert, für alle andere Zwecke über Nacht.

Tab. 10: Restriktionsansatz

Komponente	Menge
H ₂ Oreinst.	ad 50 µl
10x CutSmart Buffer/ NEBuffer 1.1, 2.1 oder 3.1	5 µl
PCR-Produkt oder Plasmid	1-5 µg
Restriktionsenzym	1 µl (10 Units)

5.5.4 Klenow-Fragment-Behandlung

Bei der Restriktion (Kapitel 5.5.3) von DNA entstehen sogenannte *sticky* (Enden mit einem 3'- oder 5'-Überhang) oder *blunt ends* (glatte Enden). Sollen zwei Fragmente mit unterschiedlichen, also nicht-kompatiblen, *sticky ends* über eine Ligation miteinander verbunden werden, müssen beide Fragmente zuvor einer Behandlung mit dem Enzym Klenow-Fragment (#EP0051, Thermo Fisher Scientific GmbH) der DNA-Polymerase I unterzogen werden. Dieses Enzym besitzt eine 5'→3'-Polymerase- und eine 3'→5'-Exonuklease-Aktivität, allerdings keine 5'→3'-Exonuklease-Aktivität mehr. Somit werden *sticky ends* zu *blunt ends*, welche leicht ligiert werden können. Der verwendete Standardansatz ist in Tab. 11 aufgeführt.

Tab. 11: Pipettieransatz Klenow-Behandlung

Komponente	Menge
Restriktionsansatz (Kapitel 3.5.3)	50 µl
10x Klenow Buffer	6 µl
Klenow Fragment	1 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
H ₂ Oreinst.	2 µl

5.5.5 Elektrophoretische Auftrennung über Agarosegele

Für die Auftrennung bzw. Aufreinigung oder Überprüfung von PCR-Produkten (PCR siehe Kapitel 5.5.1) oder DNA-Fragmenten aus Restriktionen (Kapitel 5.5.3) wurden diese über 1-2% Agarosegele (Tab. 12) elektrophoretisch aufgetrennt. Bei der Herstellung des Gels wurde die benötigte Menge an Agarose in 1x TAE-Puffer gegeben und im Mikrowellenherd bis zur vollständigen Lösung aufgeköcht. Nach Abkühlung des Gemischs auf etwa 50 °C wurde 1 Tropfen einer Ethidiumbromid-Lösung (Ethidiumbromid - Lösung 0,07 % "dropper-bottle", #A2273,0005, AppliChem GmbH) auf 100 ml Agarose-Lösung gegeben und diese danach in eine Gießvorrichtung mit passendem Kamm gegossen. Um die Gelelektrophorese durchzuführen, wurde das Gel in eine Agarose-Gelelektrophoresekammer gelegt, welche mit 1x TAE-Puffer befüllt war, sodass das Gel vollkommen bedeckt war. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Taschen des Gels zur Kathode und das andere Ende zur Anode zeigten. Die Proben wurden mit einem 6x Gelladepuffer (Gel Loading Dye, Purple (6X), no SDS, #N0550S, New England BioLabs GmbH) versetzt und in die Taschen im Agarosegel gegeben. Zur Bestimmung der DNA-Fragmentgröße wurde zusätzlich ein Größenmarker (Quick-Load® Purple 2-Log DNA Ladder (0.1 - 10.0 kb), #N0550S, New England BioLabs GmbH oder GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, #SM0321, Thermo Fisher Scientific GmbH) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 90 V (constant) für ca. 1 h. Danach konnte das Gel unter einer UV-Bank betrachtet und dokumentiert werden.

Tab. 12: Eingesetzte Agarosekonzentration in Bezug auf die Produktgröße

Agarose (w/v)	Konzentration	Trennbereich (bp)
1 g auf 100 ml	1%	50-3.000
1,5 g auf 100 ml	1,5%	500-3.000
2 g auf 100 ml	2%	3.000-10.000

50x TAE-Puffer	2 M	Tris-Base
	5,71%	Eisessig
	50 mM	EDTA
	in H ₂ O _{reinst.}	

5.5.6 DNA-Extraktion aus Agarosegelen und DNA-Aufreinigung

Um elektrophoretisch aufgetrennte DNA oder RNA (Kapitel 5.5.5) aus einem Agarosegel zu isolieren oder DNA aufzureinigen, wurde das Kit „NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up“ (#740609.50, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) nach Herstellerangaben eingesetzt. Aufgrund des Ethanols im Waschpuffer wurde vor der Elution eine Inkubation mit offenem Deckel von 10 min bei RT durchgeführt.

5.5.7 Ligation

Zum Bilden eines Ringschlusses in Plasmiden oder Zusammenfügen von DNA-Fragmenten wurde die „T4 DNA Ligase“ (#EL0014, Thermo Fisher Scientific GmbH) nach Herstellerangaben verwendet.

5.5.8 Medien zur Kultivierung von Bakterien

Für die Kultivierung von Bakterien nach einer Transformation (Kapitel 5.5.10) oder bei einer Plasmidpräparation (Kapitel 5.5.11) wurde LB-Medium (engl. *lysogeny broth*) in flüssiger oder für Bakterienplatten in fester Form (mit Agar-Agar) verwendet. Dieses wurde nach der Herstellung des gewünschten Volumens autoklaviert. Da das Antibiotikum Ampicillin hitzeinstabil ist, wurde es erst nach der Abkühlung auf mindestens 50 °C hinzugegeben.

LB-Medium (flüssig)	1%	Pepton
	0,5%	Hefeextrakt
	1%	NaCl
	in H ₂ O _{reinst.}	
	mit NaOH auf pH 7, dann autoklaviert	
	100 µg/ml	Ampicillin (nach Abkühlung auf 50 °C)
LB-Medium (fest)	1%	Pepton
	0,5%	Hefeextrakt
	1%	NaCl
	1,5%	Agar-Agar
	in H ₂ O _{reinst.}	
	mit NaOH auf pH 7,5, autoklaviert	
	100 µg/ml	Ampicillin (nach Abkühlung auf 50 °C)

5.5.9 Klonierung von PCR-Produkten

Zur (Sub-)Klonierung von PCR-Produkten wurde das Kit“ TOPO® TA Cloning® Kit for Subcloning, with One Shot® TOP10 chemically competent E. coli cells“ (#K450001, Invitrogen AG) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

5.5.10 Transformation

Zur Vervielfältigung von Plasmiden wurden diese über eine Transformation in Bakterienzellen eingebracht. Im ersten Schritt wurde ein Aliquot chemisch kompetenter Zellen (Tab. 13) für 10 min auf Eis aufgetaut. Währenddessen wurden 1-5 µl eines Ligationsansatzes oder einer 1:1.000-Verdünnung eines präparierten Plasmids in ein „Falcon™ Round-Bottom Polystyrene Tube“ (#352059, Fisher Scientific GmbH) gegeben und auf Eis vorgekühlt. Nach dem Auftauen der Bakterienzellen wurden diese vorsichtig und in Kreisbewegungen zu dem Plasmid gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte für 45 s ein Hitzeschock im Wasserbad bei 42 °C. Im Anschluss wurde das Reaktionsgemisch wieder 5 min auf Eis gestellt. Für die Vor- kultur wurden 200 µl „Corning™ SOC Medium“ (#MT46003CR, Fisher Scientific GmbH) hinzugegeben und 1 h bei 37 °C und 250 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Nachdem die Bak- terien gut gewachsen waren, wurden sie auf eine LB-Amp-Agarplatte (Kapitel 5.5.8) ausge- strichen und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C wachsen gelassen.

Tab. 13: Chemisch kompetente Bakterienzellen

Zellen	Hersteller, Artikelnr.
XL1-Blue Competent Cells	Agilent Technologies Deutschland GmbH & Co. KG, #200249
NEB® 5-alpha Competent E. coli	New England Bio-Labs GmbH, #C2987H
One Shot® TOP10 Chemically Competent E. coli	Thermo Fisher Scientific GmbH, #C404010

5.5.11 Plasmidpräparation

Um Plasmide zu vervielfältigen, wurde zunächst nach Transformation (Kapitel 5.5.10) eine Kolonie von der ausgestrichenen LB-Amp-Agarplatte mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in 3 ml (Minipräparation) oder 200 ml (Midipräparationen) flüssiges LB-Amp-Medium über- führt. Die so angelegte Kultur wurde anschließend über Nacht bei 37 °C und 250 rpm im Schüt- telinkubator inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Bakterienlösung nach Herstelleranga- ben weiterbearbeitet. Hierfür wurden folgende Kits verwendet:

- QIAprep Spin Miniprep Kit (#27106, QIAGEN GmbH)
→ für Minipräparationen
- PureLink® HiPure Plasmid Midiprep Kit (#K210004, Thermo Fisher Scientific GmbH)
→ für Midipräparationen

Aufgrund des Ethanols im Waschpuffer wurde vor der Elution eine Inkubation mit offenem Deckel von 10 min bei RT durchgeführt, sodass dieser verdampfen konnte.

5.5.12 Dauerkulturen von Bakterien

Um Bakterienkulturen über einen langen Zeitraum lagern zu können, wurde von diesen Dauerkulturen hergestellt. Diese setzten sich aus 600 µl 80 % Glycerin und 400 µl Bakterienflüssigkultur zusammen. Die beiden Komponenten wurden gut vermischt und dann zur Lagerung bei -80 °C gehalten.

5.5.13 Konzentrationsbestimmung von DNA und/oder RNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA- oder RNA-Lösungen erfolgte mit einem Nanodrop.

5.5.14 Sequenzierung

Die Sequenzierungen von Plasmiden oder PCR-Fragmenten wurde durch StarSEQ® GmbH durchgeführt.

5.5.15 RNA-Isolation

Bei der Isolation von Gesamt-RNA aus Kulturzellen oder primären Zellen wurden diese durch Zentrifugation (Suspensionszellen) oder einfaches Abpipettieren (adhärente Zellen) vom Kulturmedium befreit. Um die Zellen zu lysieren, wurden bei einer Kultivierung in einer 6-Loch-Platte 500 µl „QIAzol Lysis Reagent“ (#79306, QIAGEN GmbH) pro Vertiefung hinzugegeben. Durch Abschaben (adhärente Zellen) oder Resuspendieren (Suspensionszellen) wurden die Zellen gelöst und anschließend für 5 min inkubiert. Bei der Isolation von RNA aus murinem Gewebe wurde ein kleiner Splitter vom tiefgefrorenem Gewebe abgeschlagen und mit 500 µl „QIAzol Lysis Reagent“ versetzt. Zur Homogenisierung wurden kleine Stahlkügelchen mit in das Gefäß gegeben. Die Probe wurden dann im tiefgekühlten Einsatz (-20°C) 1 min bei 50 Hz im Gewebe-Lysierer zerkleinert und anschließend bei 850 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Die nun folgende Prozedur war für alle Extrakte gleich. Zunächst wurden 200 µl Chloroform zu der RNA-Lösung dazu pipettiert. Dieser Ansatz wurde gut durchmischt, bis er homogen milchig war, und für weitere 5 min inkubiert. Darauf erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 14.000 rpm für 15 min. Hierbei kam es zu einer Auftrennung in zwei Phasen. In der unteren Phase befand sich ein Phenol-Chloroform-Gemisch, in dem sich die DNA und Proteine aufhielten und in der oberen Phase die RNA. Diese wurde äußerst behutsam abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Durch Zugabe von 500 µl Isopropanol und einer Inkubation von mindestens 4 Stunden oder über Nacht bei -20 °C wurde die RNA gefällt, sodass diese nach einer Zentrifugation von 15 min bei 4 °C und 14.000 rpm pelletiert werden konnte. Der Überstand wurde verworfen. Zu dem Pellet wurde 1 ml 70% Ethanol hinzugegeben und für 15 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Dieser Schritt wurde insgesamt zweimal durchgeführt, um das RNA-Pellet zu waschen. Um mögliche Ethanol-Rückstände loszuwerden, wurde im Anschluss das Pellet etwa 10-20 min kopfüber im

Reaktionsgefäß getrocknet. Danach wurde das Pellet in 20-30 µl RNase-freiem Wasser (#129112, QIAGEN GmbH) aufgenommen und konnte dann bei -20 °C weggefroren werden.

5.5.16 cDNA-Synthese

Um isolierte RNA (Kapitel 5.5.15) in der quantitativen Real-Time-PCR (qRT-PCR siehe Kapitel 5.5.17) zu analysieren, musste diese zuerst in cDNA umgeschrieben werden. Dies erfolgte mit dem Kit „High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“ (#4368814, Thermo Fisher Scientific GmbH). Der Pipettieransatz und das PCR-Cycler-Programm sind in Tab. 14 und Tab. 15 aufgeführt. Zum Ansetzen wurde „RNase-Free Water“ (#129112, QIAGEN GmbH) verwendet.

Tab. 14: Pipettieransatz zur cDNA-Synthese

Komponente	Volumen
10x RT-Puffer	2 µl
25x dNTP Mix (100mM)	0,8 µl
10x RT Random Primer	2 µl
Multi Scribe RT	0,5 µl
RNA (50-100 ng/µl)	10 µl
RNase-Free Water	ad 20 µl

Tab. 15: PCR-Cycler-Programm zur cDNA-Synthese

Phase	Temperatur	Dauer	Zyklusanzahl
1.	25 °C	10 min	1x
2.	37 °C	120 min	1x
3.	85 °C	5 min	1x
4.	8 °C	∞	1x

5.5.17 Quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR)

Nach der cDNA-Synthese (Kapitel 5.5.16) konnte die umgeschriebene RNA quantifiziert werden. Bei der Reaktion wurden ein FAM- und TAMRA-markiertes TaqMan-Sonden- und geeignete Oligonukleotide verwendet, welche in Anhang A aufgeführt sind. Für die Reaktion wurde ein eigens hergestellter 2x Taq-Puffer eingesetzt und die dNTPs wurden von QIAGEN GmbH (dNTP Mix, PCR Grade, # 201900) bezogen. Die Synthese erfolgte durch eine Taq-Polymerase (hergestellt von AG Kleinert, Institut für Pharmakologie der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität). Der Pipettieransatz und das qRT-PCR-Cycler-Programm sind in Tab. 16 und Tab. 17 aufgeführt. Zum Ansetzen wurde RNase-freies Wasser (#129112, QIAGEN GmbH) verwendet.

Tab. 16: Pipettieransatz zur qRT-PCR

Komponente	Volumen
2x Taq-Puffer	12,5 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Oligonukleotid for (10 pmol/µl)	2 µl
Oligonukleotid rev (10 pmol/µl)	2 µl
TaqMan-Sonde (10 pmol/µl)	1 µl
Taq-Polymerase	0,5 µl
cDNA (50-100 ng/µl)	4 µl
RNase-Free Water	ad 25 µl

Tab. 17: PCR-Cycler Programm zur qRT-PCR

Phase	Temperatur	Dauer	Zyklusanzahl
1.	95 °C	5 min	1x
2.	94 °C	15 s	45x
3.	60 °C	1 min	
4.	4 °C	∞	1x

2x Taq-Puffer	4 ml	1 M Tris-HCl pH 8,7
	2 ml	1 M NH ₄ SO ₄
	0,8 ml	1 M MgCl ₂
	2 ml	KCl
	ad 100 ml RNase-Free Water, dann steril filtriert	

5.5.18 RNase-Verdauungsschutzanalyse (RVA)

In den ersten Schritten erfolgte die Herstellung der Sonde. Hierfür wurde das Plasmid (Tab. 18), welches als Matrize für die Sonde diente, durch Restriktion (Kapitel 5.5.3) über Nacht bei 37 °C im Wasserbad linearisiert, sodass ein 5'-Überhang entstand. Welche Plasmide mit welchem Restriktionsenzym geschnitten wurden, ist Tab. 18 zu entnehmen. Ob das Plasmid korrekt linearisiert wurde, wurde mit einer elektrophoretischen Auftrennung über ein Agarosegel (Kapitel 5.5.5) kontrolliert werden. Nach der Restriktion wurde die DNA aufgereinigt (Kapitel 5.5.6) und mit DEPC-H₂O auf 0,5 µg/µl eingestellt. Im Anschluss wurde die Sonde durch eine *in vitro*-Transkription synthetisiert. Der Ansatz (Tab. 19) wurde 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Dann erfolgte ein DNase-Verdau (Tab. 20) für 45 min bei 37 °C im Wasserbad. Im nächsten Schritt wurde die Sonden über eine Säule (#G25DNA-RO ROCHE, Roche Diagnostics Deutschland GmbH) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Es folgte eine Messung der Radioaktivität im Szintillationszähler für β-Strahlung. Diese durfte nicht unter 100.000 cpm/µl sein. Im Folgenden wurde die Konzentration mit DEPC-H₂O auf 40.000 cpm/µl eingestellt. Nun

konnte die fertige Sonde mit der isolierten und zu analysierenden Gesamt-RNA (Kapitel 5.5.15) 1 h bei -80 °C inkubiert werden. Der Fällungsansatz ist in

Tab. 21 aufgeführt. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 30 min bei 4 °C und 14.000 rpm. Der Überstand wurde abgezogen, das Pellet mit 1 ml eiskaltem 80% Ethanol gewaschen und erneut wie zuvor zentrifugiert. Anschließend wurde noch einmal der Überstand abgezogen und das Pellet in 15 µl DEPC-H₂O resuspendiert. Im darauffolgenden Schritt wurde das Pellet mit einer Zentrifuge, angeschlossen an eine Vakuumpumpe (Speed Vac), bis kurz vor Trockenheit eingengt, um dann in 40 µl eiskaltem Hybridisierungs-Puffer wieder aufgenommen zu werden. Die Lösung wurde in ein Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel gegeben und in einem Bleigefäß
zunächst 30 min bei 85 °C, dann über Nacht bei 51 °C im Wasserbad inkubiert. Am nächsten Tag wurde ein RNase-Verdau (Tab. 22) von 30 min bei 30 °C im Wasserbad durchgeführt. Dieser wurde danach direkt durch Zugabe von 72 µl Stopp-Puffer und einer anschließenden Inkubation von 15 min bei 37 °C beendet. Nun musste die Proteinase K durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion wieder entfernt werden. Dies geschah durch Zugabe von 500 µl eiskaltem Phenol-Chloroform. Die entstandene Mischung wurde gut geschüttelt, bis sie homogen milchig wurde. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 2.000 rpm. Dabei entstand eine Auftrennung in zwei Phasen. Die Obere (ca. 380 µl) wurde abgenommen, in ein neues Gefäß überführt und mit 1 ml eiskaltem 96% Ethanol versetzt. Es folgte eine Inkubation bei -80 °C für 30 min. Anschließend wurde 30 min bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abgenommen, es wurde 1 ml eiskalter 80% Ethanol hinzugegeben, wie zuvor bei -80 °C inkubiert, danach zentrifugiert und der Überstand erneut abgenommen. Im nächsten Schritt wurde die Probe bei 80 °C in den Heizblock gestellt. Nach 1 min wurde die Temperatur auf 95 °C erhöht und solange darin belassen, bis der Alkohol verdampft war. Als letztes wurde die Probe in 7 µl Formamid-Propenpuffer gelöst, 5 min bei 95 °C denaturiert und auf Eis gestellt. Nachfolgend wurde die Probe zur Auftrennung auf ein 6%-A/B-Gel aufgetragen. Dieses wurde zuvor in einer Halterung zwischen zwei Glasplatten im Abstand von 1 mm gegossen und auspolymerisiert. Das Gel wurde in eine Laufvorrichtung gestellt, diese wurde mit 1x TBE befüllt, dann wurde es mit der Probe beladen und solange bei 25 mA (constant) an eine Power Unit laufengelassen, bis die Xylencyanol-Bande (türkis) etwa 5 cm von der Unterkante des Gels entfernt war. Im Anschluss wurde das Gel 15 min in Fixierlösung gebadet, dann auf Whatman 3MM Papier gezogen und im Gelrockner bei ca. 70 °C getrocknet. Im letzten Schritt wurde ein Chemilumineszenzfilm (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare Life Sciences) auf das Gel gelegt und

bis zur gewünschten Schwärze (etwa 2-4 Tage) bei -80 °C in einer Röntgenkassette mit Verstärkerfolien belichtet. Schließlich konnte der Film danach entwickelt und so die aufgetrennten, mit [α - 32 P]-markierten, Banden sichtbar gemacht.

Tab. 18: RNA-Sonden

Plasmid	Sonde	linearisiert mit	RNA-Polymerase	unverdautes Fragment	geschütztes Fragment
phCAT-1/ ribo I	hCAT-1	NcoI	T3	215 bp	201 bp
phCAT-1/ ribo II	hCAT-1	XbaI	T3	252 bp	201 bp
ph-actin 5	h β -Aktin	Acc65I	T3	228 bp	109 bp
pmBetaActin	m β -Aktin	Acc65I	T3	187 bp	109 bp
pMH214	mCAT-2A	EcoRI	SP6	193 bp	129 bp
prgamma actin	r γ -Aktin	BamHI	T7	165 bp	110 bp
TSS1/2	TSS1/2	EcoRI	T7	215 bp	139 oder 112 bp

DEPC-H₂O 0,1% DEPC
in H₂O_{reinst.}

Tab. 19: *in vitro*-Transkription

Komponente	Volumen
linearisiertes Plasmid (0,5 μ g/ μ l)	2 μ l
10x Transkriptionspuffer	1 μ l
Ribonucleotidmix A, G, U (je 3,3 mM)	3 μ l
CTP (100 μ M)	1 μ l
RNase-Inhibitor (40 U/ μ l)	1 μ l
CTP [α - 32 P] (3.000 Ci/mM)	4 μ l
T7/T3/SP6-Polymerase (20 U/ μ l)	1 μ l
DEPC-H ₂ O	7 μ l

10x Transkriptionspuffer 400 mM Tris-HCl pH 7,5
 100 mM NaCl
 60 mM MgCl₂
 20 mM Spermidin
 in DEPC-H₂O

Tab. 20: DNase-Verdau

Komponente	Volumen
synthetisierte Sonde	20 μ l
10x Transkriptionspuffer	30 μ l
DNase I (10 U/ μ l)	3 μ l

Tab. 21: Fällungsansatz

Komponente	Menge/Volumen
Gesamt-RNA	20 µg
AL-Puffer	200 µl
Ethanol (96%)	600 µl
Sonde (40.000 cpm/µl)	5 µl

AL-Puffer	2 M 0,2% in DEPC-H ₂ O	Ammoniumacetat pH 5,0 N-Laurylsarcosin
Hybridisierungs-Puffer	400 mM 40 mM 1 mM 50% in DEPC-H ₂ O	NaCl PIPES pH 6,7 EDTA Formamid (entionisiert)

Tab. 22: RNase-Verdau

Komponente	Volumen
Hybridisierungsansatz	40 µl
RNase A/T1-Puffer	300 µl
RNase A (10 mg/ml)	0,35 µl
RNase T1(100 U/µl)	0,25 µl

RNase A/T1-Puffer	300 mM 10 mM 5 mM	NaCl Tris-HCl pH 7,5 EDTA
Stopp-Puffer	47,5 µl 2,5 µl 2 µl 20 µl	Proteinase K-Puffer Proteinase K (20 µg/µl) tRNA (10 µg/µl) SDS (10%)
Proteinase K-Puffer	10 mM 10 mM	Tris-HCl pH 7,4 EDTA

Formamid-Probenpuffer	80%	Formamid (entionisiert)
	0,1%	SDS
	10 mM	EDTA
	0,1%	Xylencyanol
	0,1%	Bromphenolblau
A/B-Gel	12 g	Harnstoff
	2,5 ml	10x TBE
	4 ml	40% Acrylamid-Bisacrylamid (19:1)
	ad 25 ml H ₂ O _{reinst.} , dann Ultraschallbehandlung zur Entgasung	
	225 µl	APS
	22,5 µl	TEMED
10x TBE	108 g	Tris
	55 g	Borsäure
	40 ml	0,5 M EDTA pH 8
	ad 1 l H ₂ O _{reinst.}	
Fixierlösung	10%	Essigsäure
	10%	Methanol

5.5.19 Transiente Transfektion von DLD-1- und EA.hy926-Zellen

Vor der eigentlichen Transfektion wurden zunächst die Zellen kultiviert. Hierfür wurden ca. 80.000 Zellen in 500 µl DMEM mit Pen/Strep (Kapitel 5.3.1) à vier Replikate pro Ansatz in 24-Loch-Platten ausgesät. Um eine 70-80% Konfluenz zu erhalten, wurden die Zellen i.d.R. für 24 h im Brutschrank bei 37 °C und der passenden CO₂-Konzentration inkubiert. Dann wurde der Transfektionsansatz (Tab. 23) zusammenpipettiert und für 20 min ohne jegliche Bewegung inkubiert, damit sich die Lipidtröpfchen, welche zur Transfektion benötigt werden, ausbilden konnten. Der Ansatz bestand aus dem Transfektionsreagenz „GeneJuice® Transfection Reagent“ (#70967, Merck KGaA), FBS-freiem Medium (Kapitel 5.3.1) und den einzubringenden Plasmiden (Anhang B). Zur Kontrolle wurde mit einem Plasmid für Renilla (*pRL-EF1α*, für Luciferase-Reporter-Gen-Analysen) oder β-Globin (*pRHCglo*, für RNA-Analysen durch qRT-PCR) co-transfiziert, um bei der Auswertung darauf normieren zu können und somit eventuelle Zellzahldifferenzen oder Unterschiede in der Transfektionseffizienz in den einzelnen Vertiefungen auszugleichen. Während der Inkubation des Transfektionsansatzes erfolgte ein Mediumswechsel bei den zu transfizierenden Zellen. Nach der Inkubation wurden 25 µl des Transfektionsansatzes vorsichtig und tröpfchenweise in jede Vertiefung gegeben. 24 h später wurde das Medium mitsamt dem Transfektionsreagenz abgesaugt und zu den Zellen wurden entweder für nachfolgende Luciferase-Reporter-Gen-Analysen 100 µl 1x PLB („Passive Lysis 5X Buffer“,

#E1941, Promega GmbH) oder für RNA-Analysen 250 µl „QIAzol Lysis Reagent“ (#79306, QIAGEN GmbH) pro Vertiefung hinzupipettiert. Im nächsten Schritt wurden die Ansätze für mindestens 1 h bei -80 °C weggefroren. Um die Proben in einer Luciferase-Reportergen-Analyse (Kapitel 5.5.21) oder einer quantitative Real Time-PCR (Kapitel 5.5.17) bei vorheriger RNA-Isolation (Kapitel 5.5.15) analysieren zu können, wurden diese auf dem Taumler wieder aufgetaut, abgekratzt, in ein Reaktionsgefäß überführt und gut durchmischt.

Tab. 23: Transfektionsansatz mit GeneJuice®

Komponente	eingesetzte Menge für vier Vertiefungen + Puffer
GeneJuice®	6 µl
Kontroll-Plasmid (<i>pRL-EF1α</i> oder <i>pRHCglo</i>)	0,5 µg
zu untersuchendes Plasmid (Anhang B)	1,5 µg
FBS-freies Medium	ad 125 µl

5.5.20 Transfektion von primären humanen T-Zellen durch Elektroporation

Nachdem die primären T-Zellen aus dem Blut von humanen Spendern isoliert worden waren (Kapitel 5.3.4), wurden die Zellen zunächst 24 h im Inkubator ruhen gelassen, bevor mit ihnen Versuche durchgeführt wurden. Zu Beginn des Versuchs erfolgte eine 72-stündige Co-Stimulation der T-Zellen mit an Metallkugeln gebundene CD3/CD28-Antikörper (Kapitel 5.3.7, hier jedoch 6er-Loch-Platte, 4 ml Medium/Vertiefung, 2 Mio. Zellen/Ansatz und 1,5 Mio. Zellen/Vertiefung) und 600 U/ml IL-2 (PROLEUKIN® S 18 Mio., #709400, Novartis Pharma AG) in RPMI-Medium im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Nach der Stimulation wurden die an Metallkugeln gekoppelte CD3/CD28-Antikörper mit einem Magneten (DynaMag™-50, #12302D, Thermo Fisher Scientific GmbH) entfernt. Dafür wurden die Zellen wieder alle einem 50 ml Reaktionsgefäß vereinigt und 10 min im Magneten stehen gelassen, sodass sich die Metallkugeln an der Gefäßwand sammelten. Das Zellgemisch konnte dann vorsichtig abpipettiert und 5 min bei 1.500 rpm zentrifugiert werden. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet in 30 ml DPBS resuspendiert und erneut wie zuvor zentrifugiert. Danach wurde das Pellet noch einmal in 30 ml Versuchsmedium (hier: Opti-MEM) aufgenommen und nochmals zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde das Zellpellet in Versuchsmedium aufgenommen, sodass eine Konzentration von 2 Mio. Zellen/600 µl Medium erzielt wurde. Nun konnten die Zellen elektroporiert werden. Dazu wurde zuvor 1 ml/Ansatz Versuchsmedium in eine 24-Loch-Platte vorgelegt und bei 32°C und 5% CO₂ im Brutschrank vorinkubiert. Im nächsten Schritt wurden pro Ansatz 5 µg des zu transfizierenden Plasmids in eine 4 mm-Küvette (Elektroporationsküvetten 4 mm, #732-2924, Peqlab Biotechnologie GmbH) vorgelegt. Dann wurden 600 µl (2 Mio. Zellen) der Zellsuspension hinzugegeben. Nun wurde die Küvette in das Elektroporationsgerät gestellt und elektroporiert (300 V, 10 ms, 2 Pulse, 1 s Pulsintervall). Danach wurde die Zellsuspension in das vorbereitete Medium gegeben. Zuletzt wurden pro Vertiefung 600 U/ml IL-2 zu den Zellen gegeben und diese 24 h bei 32°C und 5% CO₂ im Brutschrank

inkubiert. Nach der Ruhephase wurden die Zellen erneut 24 h mit an Metallkugeln gekoppelte CD3/CD28-Antikörper (Kapitel 5.3.7) co-stimuliert. Um den Versuch abzustoppen, wurden danach die Zellen 5 min bei 1.500 rpm zentrifugiert und mit 100 µl 1x PLB versetzt. Die Ansätze wurden nun mindestens für 2 h bei -80°C tiefgefroren bis sie wieder aufgetaut und 15 min bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert wurden. Im letzten Schritt wurde der Überstand abgenommen und in ein neues Gefäß überführt, sodass dieser nun mittels Luciferase-Reporter-Gen-Analysen (Kapitel 5.5.21) analysiert werden konnte.

5.5.21 Luciferase-Reporter-Gen-Analyse (LUC-Analyse)

Nach einer transienten Transfektion (Kapitel 5.5.19) oder Elektroporation (Kapitel 5.5.20) wurden von jeder Probe je 20 µl Lysat auf zwei, für Lumineszenz-Messungen geeignete, 96-Loch-Platten (Black/White Isoplate-96 Black Frame White Well, #6005039, PerkinElmer GmbH) gegeben. Dann wurden die zwei Platten, eine für die Messung der Firefly-Aktivität und eine für die Messung der Renilla-Aktivität, nacheinander in den Chemilumineszenz-Detektor zur Messung gestellt. Nach Zugabe von 100 µl des jeweiligen Substrates über einen Injektor erfolgte nach 5 s die Messung der Lumineszenz durch das Gerät.

Firefly-Substrat (110 µl/Probe)	15 ml 1,128 ml 300 µl 159 µl ad 30 ml H ₂ O _{reinst.}	2x Firefly-Puffer 12,5 M D-Luciferin (#A1029, AppliChem GmbH) Coenzym A (#A0813, AppliChem GmbH) ATP (#A1348, AppliChem GmbH)
2x Firefly-Puffer	60 mM 0,2 mM 30 mM 20 mM in H ₂ O _{reinst.}	Trizin EDTA MgSO ₄ DTT
Renilla-Substrat (110 µl/Probe)	1% in Renilla-Puffer	Coelenterazine h (#10111-2, BIOTREND Chemikalien GmbH)
Renilla-Puffer	0,1 M 1 mM 25 mM in H ₂ O _{reinst.}	NaCl ₂ CaCl ₂ Tris HCl pH 7,5

5.6 PC-Software und Datenbanken

Zur Analyse von DNA-Sequenzen und Plasmiden sowie für Sequenzvergleiche wurden die Programme ApE- A Plasmid Editor (Version 2.0.50) und Geneious Pro (Version 5.4.3) verwendet.

Für statistische Analysen und zum Erstellen von Diagrammen diente das Programm GraphPad Prism 5 (Version 5.02).

Alle SLC7A1-Gensequenzen wurden von der Online-Datenbank NCBI (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine) bezogen.

Bei der Lokalisierung möglicher Transkriptionsstarts wurde die Online-Datenbank Promotor Database EIDorado (Genomatix GmbH) benutzt.

Struktur- und Homologie-Analysen erfolgten mit dem Online-Tool ECR Browser (Ovcharenko et al. 2004).

Die Ergebnisse von ChIP-Seq- und RNA-Seq-Daten lieferte die Online-Datenbank UCSC Genome Browser (Kent et al. 2002).

Die Analyse von putativen Transkriptionsfaktor-Bindestellen wurde mit dem Online-Programm P-Match (Chekmenev et al. 2005) durchgeführt.

6 Ergebnisse

6.1 Etablierung eines geeigneten Zellmodellsystems zur Untersuchung der Regulation von hCAT-1

Aufgrund einer starken Induktion der mRNA- und Proteinexpression von hCAT-1 unter CD3/CD28-Stimulation in primären humanen T-Zellen war das Ziel dieser Arbeit herauszufinden, welche Regulationsmechanismen an diesem Prozess beteiligt sind. Ein besonderer Fokus lag dabei auf der Lokalisation des hCAT-1-Promotors. Da primäre humane T-Lymphozyten in ihrer Aufreinigung und der Handhabung sehr aufwändig sind, wurde zunächst versucht ein Zellsystem zu finden, das geeignet ist den Promotor zu untersuchen.

6.1.1 Aminosäuremangel führt zur Induktion der hCAT-1-Expression in Endothelzellen

Erste Vorversuche von Isabel Jaenecke hatten eine Induktion der hCAT-1-Expression in humanen EA.hy926-Endothelzellen unter Arginin- und Lysin-Mangel gezeigt. Um herauszufinden, ob dieses Induktionsmodell anstelle von T-Zellen für die Untersuchung der Expressionsregulation geeignet ist, wurden daher weitere Versuche durchgeführt.

Pro Versuchsansatz wurden 5×10^5 EA.hy926-Zellen in 6-Loch-Platten mit 1,5 ml DMEM-Normalmedium (enthält 10% FBS) ausgesät und bis zur völligen Konfluenz (i.d.R. 5-6 Tage) wachsen gelassen. Vor dem Versuchsbeginn wurden die Zellen mehrfach mit DPBS gewaschen. Anschließend erfolgte ein Mediumswechsel auf DMEM-Vollmedium (enthält 10 % FBS sowie Arginin und Lysin) oder DMEM-Mangelmedium (enthält 10 % FBS, ohne Arginin und Lysin). Darin wurden die Zellen für 4, 10 oder 24 h inkubiert. Zur Analyse der hCAT-1-mRNA wurde aus den Zellen RNA isoliert (Kapitel 5.5.15), diese wurde danach in cDNA umgeschrieben (Kapitel 5.5.16) und mittels qRT-PCR (Kapitel 5.5.17) analysiert. Zur Normierung diente die Expression von GAPDH.

EA.hy926-Zellen zeigten unter Normalbedingungen eine gleichbleibende basale hCAT-1-mRNA-Expression (Abb. 8). Diese wurde durch einen 4-stündigen Entzug der Aminosäuren Arginin und Lysin signifikant gesteigert und blieb für den Rest der Versuchszeit (10 und 24 h) auf gleich hohem Niveau.

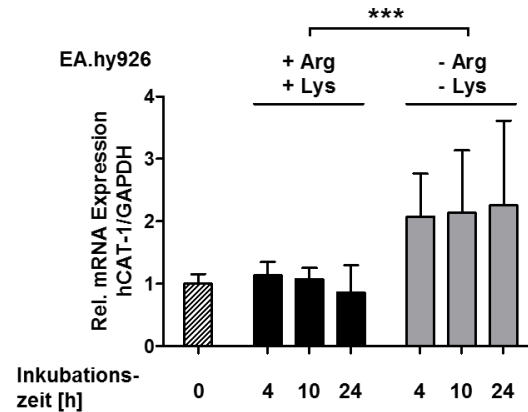


Abb. 8: Hochregulation der hCAT-1-mRNA-Expression unter Aminosäuremangel.

EA.hy926-Zellen wurden ausgesät, bis zur völligen Konfluenz wachsen gelassen und danach für 4, 10 oder 24 h in DMEM-Voll- (DMEM-Medium mit Arginin und Lysin) oder DMEM-Mangelmedium (DMEM-Medium ohne Arginin und Lysin) inkubiert. Als Kontrolle (t=0) dienten Zellen, die bei Versuchsbeginn geerntet wurden. Die Bestimmung der hCAT-1-mRNA-Expression erfolgte mittels qRT-PCR. Diese Werte wurden auf die jeweiligen GAPDH-Werte normiert. Gezeigt sind Mittelwerte + SD (n=12), jeweils geteilt durch den Mittelwert von t=0 der entsprechenden Versuchsreihe. Bei der interferenzstatistischen Analyse (2way ANOVA mit Bonferroni-Posttest) wurden die Faktoren Arginin- und Lysinmangel (***) sowie Zeit (nicht signifikant unterschiedlich) getestet.

In weiteren Versuchen wurde die Proteinexpression von hCAT-1 unter Aminosäuremangel untersucht. Dafür wurden die Zellen wie oben beschrieben kultiviert und anschließend nach mehrmaligem Waschen mit DPBS entweder für einen Zeitraum von 1-24 h unter DMEM-Mangelmedium (Abb. 9) oder 24 h in DMEM-Voll- oder DMEM-Mangelmedium (Abb. 10) gehalten. Anschließend erfolgte die Herstellung von Zelllysaten (Kapitel 5.4.1) und eine Untersuchung des hCAT-1- und GAPDH-Proteins über eine Western Blot-Analyse (Kapitel 5.4.3).

Unter Arginin- und Lysinmangel konnte mit einer zeitlichen Verzögerung zur mRNA ein stetiger Anstieg des Proteins beobachtet werden (Abb. 9).

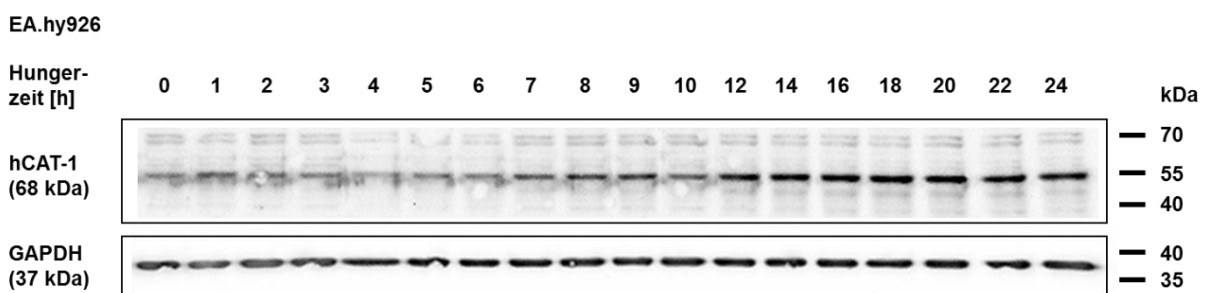


Abb. 9: Proteinanstieg von hCAT-1 unter Aminosäuremangel im Zeitverlauf.

EA.hy926-Zellen wurden in DMEM-Normalmedium ausgesät, bis zur völligen Konfluenz wachsen gelassen und dann für 1-24 h in DMEM-Mangelmedium inkubiert. Als Kontrolle (t=0) dienten Zellen die bei Versuchsbeginn geerntet wurden. Die Detektion des hCAT-1-Proteins erfolgte über Western Blot-Analysen. GAPDH diente als Hausgen zur Normierung der in jeder Spur vorhandenen Proteinmenge.

Dieser setzte bereits nach etwa 7 h unter Mangelbedingungen ein und erreichte nach ca. 16 h das Maximum. Bis hin zu 24 h blieb die Proteinexpression konstant. Dieser Anstieg ließ sich auch in einem weiteren Versuch (Abb. 10) reproduzieren. Dabei war eine deutliche Induktion

nach 24 h unter Mangelbedingungen im Vergleich zu Zellen, die in Anwesenheit der beiden Aminosäuren inkubiert wurden, zu sehen.

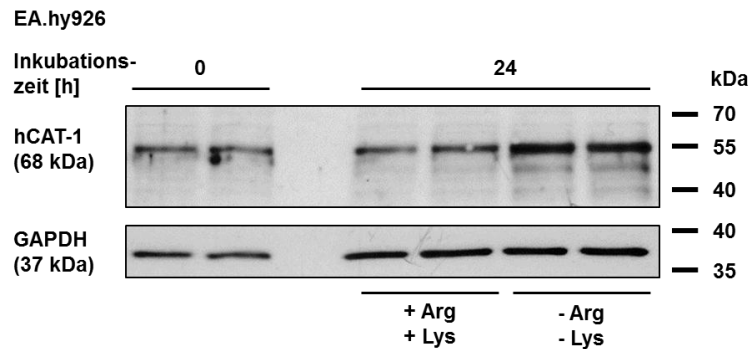


Abb. 10: Induktion der Proteinexpression von hCAT-1 nach 24 h durch Aminosäuremangel.

EA.hy926-Zellen wurden in DMEM-Normalmedium ausgesät, bis zur völligen Konfluenz wachsen gelassen und danach für 24 h in DMEM-Voll- oder DMEM-Mangelmedium inkubiert. Als Kontrolle (t=0) dienten Zellen, die zu Beginn des Versuchs geerntet wurden. Die Detektion des hCAT-1-Proteins erfolgte über Western Blot-Analysen (n=2). GAPDH diene als Maß der in jeder Spur vorhandenen Proteinmenge.

Um herauszufinden, ob der Mangel des im Medium enthaltenen Serums (FBS) den Hungereffekt steigern kann, wurden EA.hy926-Zellen, wie weiter oben beschrieben, ausgesät und bis zur Konfluenz wachsen gelassen. Für den Versuch wurden die Zellen mehrfach mit DPBS gewaschen und dann 24 h in DMEM-Voll- oder DMEM-Mangelmedium und zusätzlich mit unterschiedlichen FBS-Konzentrationen inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die in DMEM-Normalmedium (mit 10% FBS) gehalten wurden. Die Messung des Haushaltgens B2M diene der Normierung.

In Anwesenheit beider Aminosäuren war eine Verdopplung der mRNA-Expression bei 7,5% FBS im Vergleich zu 10% FBS zu verzeichnen (Abb. 11). Dies war auch bei weiter abnehmender FBS-Konzentration zu beobachten. Im Mangelmedium war dagegen die hCAT-1-Expression schon in Zellen, die mit 10 %FBS inkubiert wurden, ähnlich hoch wie in Zellen in Vollmedium mit 7,5% FBS. Eine Reduktion der FBS-Konzentration im Mangelmedium führte dagegen zu keiner weiteren Steigerung der hCAT-1-Expression.

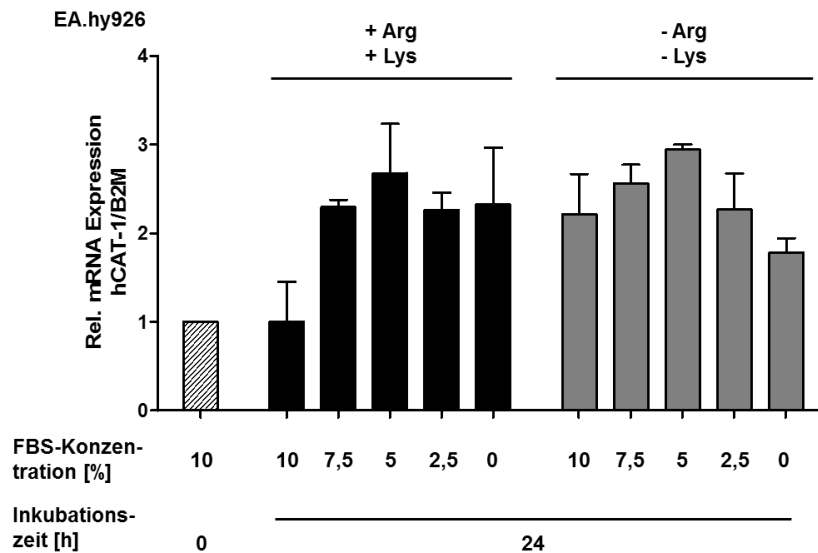


Abb. 11: mRNA-Induktion von hCAT-1 ist abhängig von der FBS-Konzentration.

EA.hy926-Zellen wurden in DMEM-Normalmedium ausgesät, bis zur völligen Konfluenz wachsen gelassen und 24 h in DMEM-Voll- oder DMEM-Mangelmedium mit unterschiedlichen FBS-Konzentrationen (0-10%) inkubiert. Als notwendige Bezugsgröße wurde eine Kontrolle mit 10% FBS in DMEM-Normalmedium mitgeführt, die zu Versuchsbeginn abgestoppt wurde. Die Bestimmung der hCAT-1-mRNA erfolgte mittels qRT-PCR und wurde auf die jeweiligen B2M-Werte normiert. Gezeigt sind Mittelwerte (n=2), jeweils geteilt durch den Wert der Kontrolle mit 10% FBS aus demselben Versuchsdurchlauf. Die Kontrolle wurde zur Referenz einmal mitgeführt, weshalb sich hier n=1 ergibt.

6.1.2 PMA bewirkt eine Induktion der mRNA-Expression von hCAT-1 in Endothelzellen

Bereits Petra Gräf zeigte über RNase-Verdauungsschutzanalysen eine starke Zunahme der mRNA von hCAT-1 durch Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) in EA.hy926-Zellen (Gräf et al. 2001). Deshalb wurde auch dieses Stimulationssystem zur Ergründung der Regulation von hCAT-1 untersucht.

Für den Versuch wurden 5×10^5 EA.hy926-Zellen in einer 6-Loch-Platte mit 1,5 ml DMEM-Normalmedium ausgesät und bis zur völligen Konfluenz wachsen gelassen. Im Anschluss erfolgte ein Mediumswechsel auf DMEM-Normalmedium, welches entweder 0,1% DMSO oder 100 μ M PMA und 0,1% DMSO enthielt. Die Kontrolle erhielt frisches Medium ohne weitere Zusätze. Die Zellen wurden danach für 4 h inkubiert. Die Messung des hCAT-1-mRNA-Gehalts erfolgte mittels qRT-PCR (Kapitel 5.5.17). Zur Normierung diente die GAPDH-Expression.

Das Lösungsmittel DMSO zeigte keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von hCAT-1 (Abb. 12). Dahingegen konnte durch die Behandlung mit dem PKC-Aktivator PMA eine Vervierfachung der hCAT-1-mRNA detektiert werden.

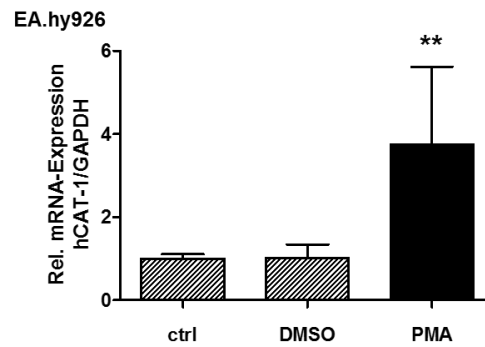


Abb. 12: PMA steigert die mRNA-Expression von hCAT-1.

EA.hy926-Zellen wurden in DMEM-Normalmedium ausgesät und bis zur völligen Konfluenz wachsen gelassen. Danach erfolgte eine 4-stündige Inkubation mit entweder DMSO (0,1%) oder PMA (100 μ M, gelöst in 0,1% DMSO) in DMEM-Normalmedium. Als Kontrolle dienten Zellen, die während des Versuchs unbehandelt blieben. Die Bestimmung der hCAT-1-mRNA erfolgte mittels qRT-PCR. Alle Werte wurden auf die entsprechenden GAPDH-Werte normiert. Gezeigt sind Mittelwerte + SD (n=3), jeweils geteilt durch den entsprechenden Wert der Kontrolle der selben Versuchsreihe. Die interferenzstatistische Analyse (beidseitiger ungepaarter t-Test) erfolgte zwischen den Werten der DMSO-Kontrolle und denen der Zellen, welche mit PMA behandelt wurden (** p < 0,01).

6.1.3 mRNA-Expression von hCAT-1 wird durch Zugabe von INF- γ , IL-1 β und TNF- α in Kolonkarzinomzellen stimuliert

Neben Endothelzellen wurde auch die DLD-1-Kolonkarzinomzellen auf eine mögliche Stimulation, welche zur Aufklärung der hCAT-1-Regulation genutzt werden kann, getestet. Die Arbeitsgruppe von Prof. Kleinert an unserem Institut zeigte über RNase-Verdauungsschutzanalysen eine starke Zunahme der mRNA-Expression der humanen iNOS (induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase) durch Zugabe von INF- γ , IL-1 β und TNF- α in DLD-1-Zellen (Kleinert et al. 1998). Da die humane iNOS die Bildung von Stickstoffmonoxid aus Arginin katalysiert und Arginin über hCAT-1 in die Zelle gelangt, stellte sich die Frage, ob hCAT-1 über dieselben Zytokine wie die iNOS reguliert wird. Aus diesem Grund wurde in DLD-1-Zellen ebenfalls eine mögliche Stimulation untersucht.

Für diesen Versuch wurden von Fabian Gather (Doktorand innerhalb der AG Kleinert, Institut für Pharmakologie der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz) erstellte cDNAs über qRT-PCR-Analysen (Kapitel 5.5.17) auf deren hCAT-1-mRNA-Gehalt untersucht. Zur Normierung diente die Expression der GAPDH-mRNA. Die Herstellung der cDNA wird im Folgenden beschrieben. Für jeden Versuchsansatz wurden pro Vertiefung 8×10^4 DLD-1-Zellen in einer 24-Loch-Platte mit 500 μ l DMEM-Normalmedium ohne Serum ausgesät, sodass sie am nächsten Tag eine Konfluenz von etwa 80% aufwiesen. Zu Beginn des Versuchs wurde ein Mediumswechsel auf DMEM-Normalmedium durchgeführt. Dieses erhielt entweder keine weiteren Zusätze oder 100 u/ml INF- γ , 50 u/ml IL-1 β und 10 ng/ml TNF- α zur Stimulation mit Zytokinen. Um einen Zeitverlauf zu erhalten, wurde der Versuch nach 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4,5, 6, 12 oder 24 h abgestoppt. Als Ausgangswert für die stimulierten und unstimulierten Ansätze wurden Zellen herangezogen, die zu Beginn des Versuchs geerntet wurden.

Innerhalb der ersten drei Stunden schwankte der hCAT-1-mRNA-Gehalt (Abb. 13). Erst danach war die Expression anhaltend erhöht. Zwischen 6-24 h wurde das Maximum erreicht, welches einer Verdopplung des Ausgangswertes entspricht.

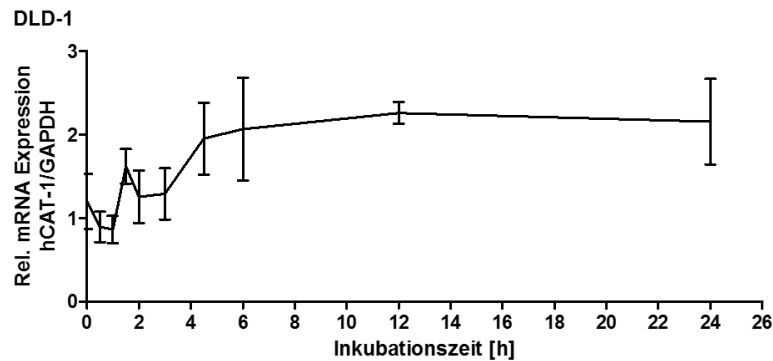


Abb. 13: hCAT-1-mRNA-Expression wird durch eine Kombination aus $\text{INF-}\gamma$, 1 $\text{IL-1}\beta$ und $\text{TNF-}\alpha$ gesteigert. DLD-1-Zellen wurden in DMEM-Normalmedium ohne Serum ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80% wachsen gelassen. Danach erfolgte ein Mediumswechsel auf DMEM-Normalmedium (mit 10% FBS) entweder ohne Zusätze oder mit 100 u/ml $\text{INF-}\gamma$, 50 u/ml $\text{IL-1}\beta$ und 10 ng/ml $\text{TNF-}\alpha$. Die Ansätze wurden nach 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4,5, 6, 12 oder 24 h abgestoppt. Die Bestimmung der hCAT-1-mRNA-Expression erfolgte mittels qRT-PCR. Alle Werte wurden auf die entsprechenden GAPDH-Werte normiert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD (n=4), jeweils geteilt durch den entsprechenden Wert von gleich lang unstimulierten Zellen. Die cDNA-Proben für die durchgeführte qRT-PCR-Analyse stammten von Fabian Gather (Doktorand innerhalb der AG Kleinert, Institut für Pharmakologie der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz).

6.2 Regulation von hCAT-1: transkriptionell oder posttranskriptionell?

5,6-Dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazol (DRB) ist ein Nukleosidanalogen, welches die Elongation durch die RNA Polymerase II verhindert und somit die Transkription unterbindet. Die Folge davon ist, dass keine mRNA gebildet werden kann. Dies wurde sich zunutze gemacht, um der Frage nachzugehen, ob hCAT-1 transkriptionell oder posttranskriptionell reguliert wird.

6.2.1 Die Steigerung der hCAT-1-mRNA-Expression unter Aminosäuremangel benötigt Transkription

Für jeden Ansatz wurden 5×10^5 EA.hy926-Zellen in 6-Loch-Platten mit 1,5 ml DMEM-Normalmedium ausgesät und bis zur völligen Konfluenz inkubiert. Vor dem Versuchsbeginn wurden die Zellen mehrfach mit DPBS gewaschen. Anschließend erfolgte ein Mediumswechsel auf DMEM-Vollmedium oder DMEM-Mangelmedium mit oder ohne 60 μM DRB. Daraufhin wurden die Zellen für 4 h inkubiert. Da DMSO keine Auswirkungen auf die hCAT-1-mRNA-Expression zeigte (Abb. 12), wurde im Folgenden auf weitere Kontrollen hierfür verzichtet. Zur Analyse der hCAT-1-mRNA wurde die Gesamt-RNA aus den Proben isoliert (Kapitel 5.5.14), in cDNA umgeschrieben (Kapitel 5.5.16) und mittels qRT-PCR (Kapitel 5.5.16) auf deren hCAT-1-Gehalt gemessen. Zur Normierung diente GAPDH.

In Anwesenheit von Arginin und Lysin war eine starke Verminderung der mRNA von hCAT-1 durch DRB messbar (Abb. 14). Dies konnte auch unter Mangelbedingungen beobachtet werden. Auch hier kam es nicht zu einer völligen Eliminierung der hCAT-1-mRNA-Expression. Die gemessenen Werte ohne DRB-Behandlung unterschieden sich signifikant. Dahingehen konnte bei DRB-Zugabe zwischen den Proben mit und ohne Arginin und Lysin kein Unterschied verzeichnet werden.

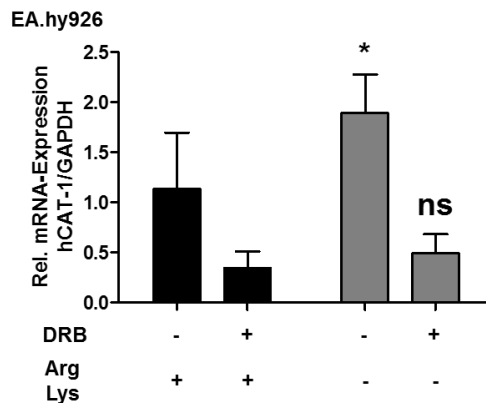


Abb. 14: DRB vermindert die mRNA-Expression von hCAT-1.

EA.hy926-Zellen wurden in DMEM-Normalmedium ausgesät und bis zur völligen Konfluenz wachsen gelassen. Danach erfolgte eine Inkubation von 4 h mit DRB (60 μ M, gelöst in 0,0015% DMSO), in DMEM-Voll- oder Mangelmedium. Als jeweilige Kontrolle für die ungehungenerten und gehungenerten Zellen dienten Zellen, die kein DRB erhielten. Die Bestimmung der hCAT-1-mRNA erfolgte mittels qRT-PCR. Alle Werte wurden auf die entsprechenden GAPDH-Werte normiert. Gezeigt sind die Mittelwerte + SD (n=6) jeweils geteilt durch den Mittelwert der Zellen ohne DRB sowie mit Arginin und Lysin. Bei der interferenzstatistischen Analyse (1way ANOVA mit Bonferroni-Posttest) wurde gegen den jeweiligen Wert mit Arginin und Lysin getestet (ns $p > 0,05$, * $p < 0,1$).

Um das Protein von hCAT-1 unter Anwesenheit von DRB zu untersuchen, wurden Zellen, wie bereits oben beschrieben, ausgesät, kultiviert und vor Versuchsbeginn mehrfach mit DPBS gewaschen. Zu Versuchsbeginn wurde zu den Zellen 1,5 ml Mangel- oder Vollmedium, welches mit oder ohne 60 μ M DRB versetzt war, hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen 24 h inkubiert und danach abgestoppt. Als Kontrolle wurden Zellen verwendet, die direkt zu Versuchsbeginn abgestoppt wurden. Es folgte eine Lyse der Zellen mit anschließender Western Blot-Analyse (Kapitel 5.4.3). Die Detektion des hCAT-1-Proteins wurde mit Hilfe von spezifischen Antikörpern durchgeführt. Als Ladekontrolle dienten Antikörper gegen das Haushaltsgen GAPDH.

Auf Proteinebene konnte im Vollmedium in Anwesenheit von DRB eine schwache Abnahme von hCAT-1 beobachtet werden (Abb. 15). Unter Arginin- und Lysinmangel war die Proteinexpression stark erhöht. Die Inkubation mit DRB führte zu einer deutlichen Abnahme des hCAT-1-Proteins. Die Expression war ähnlich der unter Anwesenheit der Aminosäuren.

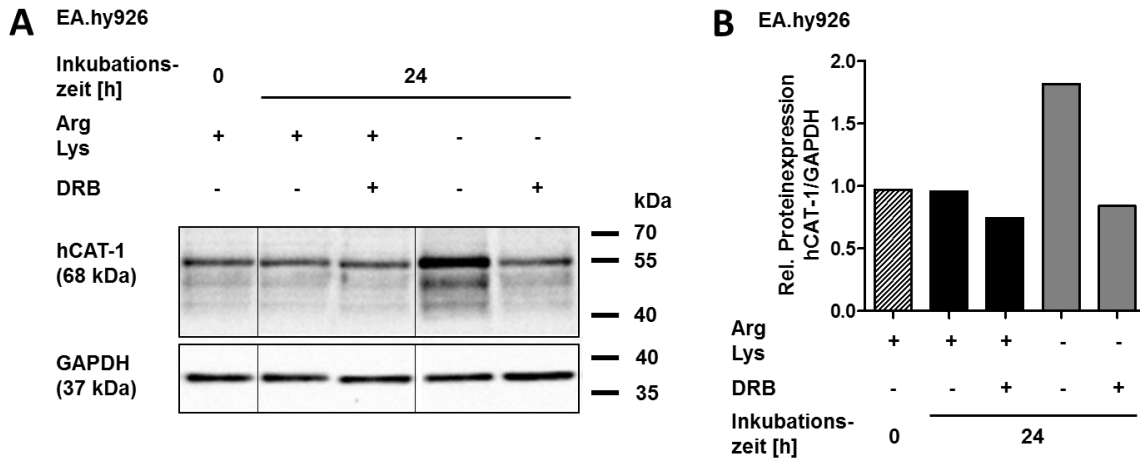


Abb. 15: DRB vermindert die Proteinexpression von hCAT-1 unter Hungerbedingungen.

EA.hy926-Zellen wurden in DMEM-Normalmedium ausgesät und bis zur völligen Konfluenz wachsen gelassen. Danach erfolgte eine Inkubation für 24 h mit DMEM-Voll- oder Mangelmedium mit oder ohne DRB (60 μ M, in 0,0015% DMSO). Zellen, welche direkt zu Versuchsbeginn abgestoppt wurden ($t=0$), dienten als Kontrolle. Als jeweilige interne Kontrolle für die ungehungerten und gehungerten Zellen dienten Zellen, die während des Versuchs ohne DRB behandelt wurden. Die Detektion des hCAT-1-Proteins erfolgte durch Western Blot-Analysen. **A** zeigt die Antikörper-Detektion auf der geblotteten Membran während in **B** die densitometrische Auswertung der Antikörper-Detektion von hCAT-1, normiert auf die in jeder Spur vorhandenen Proteinmenge von GAPDH, dargestellt ist.

6.2.2 Analyse der mRNA-Stabilität von hCAT-1

Unter Aminosäuremangel konnte in EA.hy926-Zellen sowohl ein Anstieg der mRNA (Abb. 8) als auch des Proteins (Abb. 9 und Abb. 10) von hCAT-1 beobachtet werden. Diese Induktion könnte neben einer transkriptionellen Regulation auch über eine Zunahme der mRNA-Stabilität erwirkt werden. Zwar konnte die hCAT-1-Induktion der mRNA durch die Behandlung der Zellen mit dem Transkriptioneninhibitor DRB verhindert werden (Abb. 14), jedoch kann dabei nicht ausgeschlossen werden, dass der Faktor, welcher die mRNA stabilisieren könnte, nicht erst neu synthetisiert werden muss. Aufgrund dieser Unklarheit wurden Versuche zur Bestimmung der Halbwertszeit bzw. Stabilität der hCAT-1-mRNA durchgeführt.

Für die Stabilitätsversuche wurden pro Ansatz 5×10^5 EA.hy926-Zellen in 6-Loch-Platten mit 1,5 ml DMEM-Normalmedium ausgesät und bis zur völligen Konfluenz inkubiert. Vor dem Versuchsbeginn wurden die Zellen mehrfach mit DPBS gewaschen. Daraufhin erfolgte die Zugabe von entweder DMEM-Voll- oder Mangelmedium. In diesem Medium wurden die Zellen für 4 h gehalten. Im nächsten Schritt wurde das Versuchsmedium durch frisches Medium ersetzt. Dieses enthielt 60 μ M DRB. Nach einer weiteren Inkubation von 1, 3, 5 oder 7 h wurden die Ansätze abgestoppt (Abb. 16 A). Um die Proben auf ihren mRNA-Gehalt zu testen, wurde die Gesamt-RNA (Kapitel 5.5.15) isoliert, in cDNA umgeschrieben (Kapitel 5.5.16) und quantitativ (Kapitel 5.5.17) auf hCAT-1-mRNA untersucht. Hierbei wurde GAPDH als Haushaltsgen verwendet.

In allen hierzu durchgeführten Versuchen waren starke Schwankungen in dem hCAT-1-mRNA-Gehalt zu messen (Abb. 16).

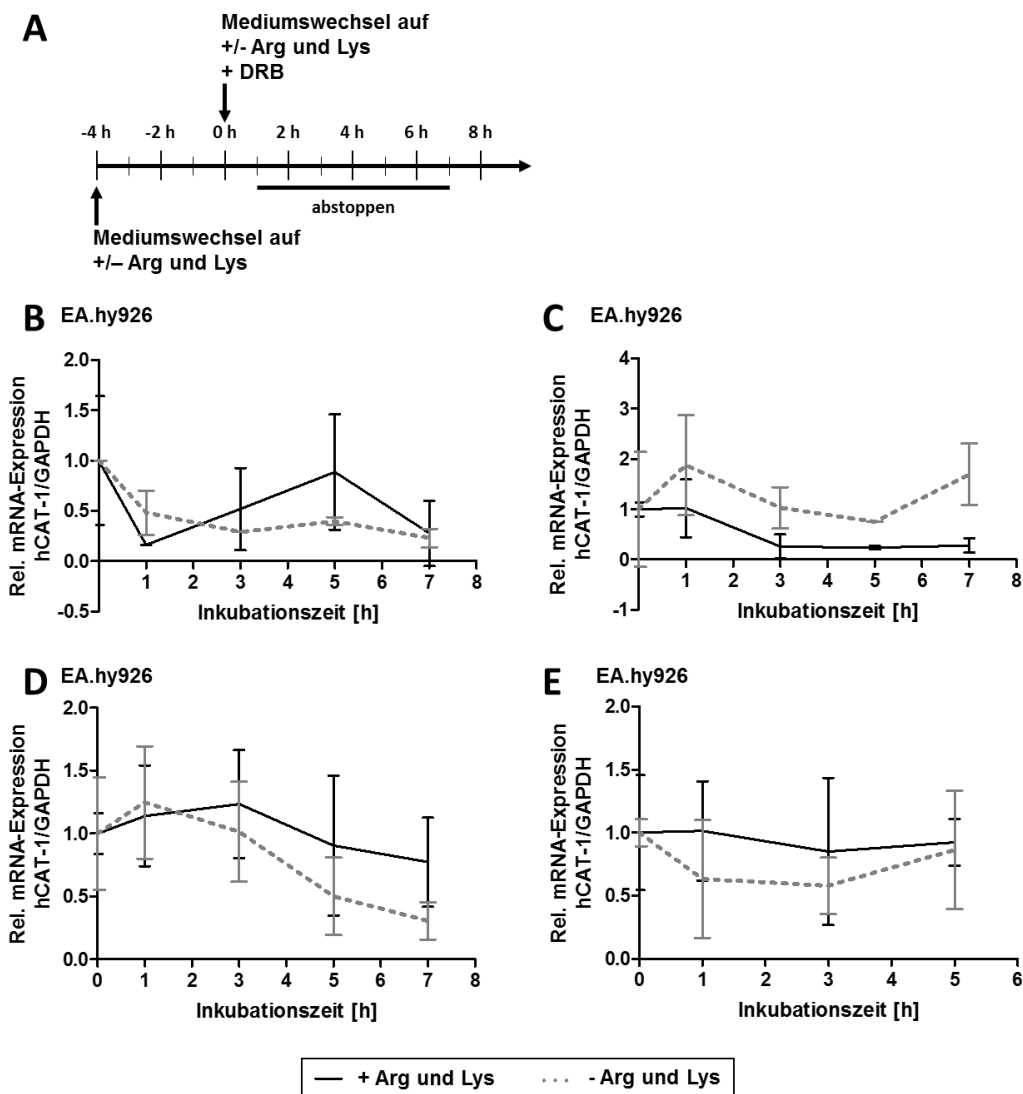


Abb. 16: Bestimmung der Halbwertszeit der hCAT-1-mRNA.

EA.hy926-Zellen wurden in DMEM-Normalmedium ausgesät und bis zur völligen Konfluenz wachsen gelassen. Danach erfolgte eine Inkubation von 4 h in DMEM-Voll- oder Mangelmedium. Im Anschluss wurde das Medium gegen DRB-haltiges Medium (60 μ M, gelöst in 0,0015% DMSO) ausgetauscht. Darin wurden die Zellen für weitere 1, 3, 5 oder 7 h gehalten. Die Bestimmung der hCAT-1-mRNA erfolgte über qRT-PCR. Alle Werte wurden durch den entsprechenden GAPDH-Wert geteilt. **A** veranschaulicht den Versuchsablauf. **B, C, E** (jeweils n=3) und **D** (n=6) stellen an unterschiedlichen Versuchstagen durchgeführte Einzelversuche dar. Gezeigt sind Mittelwerte + SD. Der Ausgangswert wurde bei allen Versuchen auf 1 gesetzt.

Dabei machte es keinen Unterschied, ob die untersuchten Zellen Arginin und Lysin erhielten oder nicht. Auch innerhalb der einzelnen Replikate lagen hohe Abweichungen vor. Da somit kein eindeutiger Verlauf beobachtet werden konnte, war die Bestimmung der Halbwertszeit nicht möglich. Lediglich in einem Versuch (Abb. 16 D) schien die hCAT-1-mRNA in Zellen, inkubiert in Mangelmedium, eine längere Halbwertszeit zu haben. In den Versuchen in Abb. 16 C sah es umgekehrt aus. Des Weiteren waren teilweise (in einigen Versuchen stärker, in

anderen schwächer) Schwankungen in der mRNA-Expression für das gemessene Haushaltsgen GAPDH zu verzeichnen (Daten nicht gezeigt), sodass diese Werte Auswirkungen auf die Normierung der Werte der hCAT-1-mRNA hatten.

Da die Ergebnisse bis dahin nicht reproduzierbar waren, wurden die Versuche erneut, jedoch mit einer Änderung, durchgeführt. Statt des zweiten Mediumswechsels auf DRB-haltiges Medium, wurde DRB direkt zu dem Medium gegeben, worin die Zellen bereits seit 4 h inkubiert worden waren. Dadurch sollten zusätzliche Stressfaktoren, wie vorübergehend einen suboptimalen pH-Wert oder zu niedrige Inkubationstemperaturen zu haben, so gering wie möglich gehalten werden. Aber auch dies trug nicht zur Reproduzierbarkeit bei (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt ergab sich kein Hinweis auf eine veränderte Halbwertszeit für die hCAT-1-mRNA aufgrund von Aminosäuremangel.

6.3 Determinierung des Transkriptionsstarts von hCAT-1

Die vorrausgehenden Versuche deuteten darauf hin, dass die hCAT-1-Expression vor allem transkriptionell reguliert wird. Dies kann mit Versuchen von Anke Werner (Doktorandin innerhalb der AG Closs) in T-Zellen unterstützt werden. Hierbei führte die Zugabe von DRB zu den stimulierten Zellen ebenfalls zu einer dramatischen Reduktion der hCAT-1-mRNA (Daten nicht gezeigt). Aufbauend auf diesen Erkenntnissen ist es unerlässlich die Regulation des Promotors zu studieren. Um den Promotor jedoch charakterisieren und seinen Locus genau bestimmen zu können, sollte zunächst der Transkriptionsstart von hCAT-1 definiert werden.

6.3.1 Datenbanken-Analyse ergibt zwei putative Transkriptionsstarts

Um mögliche Transkriptionsstarts ausfindig zu machen, wurde das Programm Gene2Promoter verwendet. Hierbei wird auf die Datenbank EIDorado (Genomatix GmbH) zurückgegriffen, in der experimentell ermittelte Daten von z.B. RefSeq, GenBank und Ensembl einfließen.

Durch die Analyse mit dem Programm Gene2Promoter konnten zwei putative Transkriptionsstarts (TSS1 und TSS2) ausgemacht werden (Abb. 17 A). Diese liegen 27 bp voneinander entfernt und befinden sich innerhalb einer sehr GC-haltigen Region (Abb. 17 B). Geht man von TSS1 aus, würde sich das Exon 1 über einen Bereich von 300 bp erstrecken. Wäre jedoch TSS2 der reelle Transkriptionsstart von hCAT-1 hätte Exon 1 somit eine Größe von 273 bp.

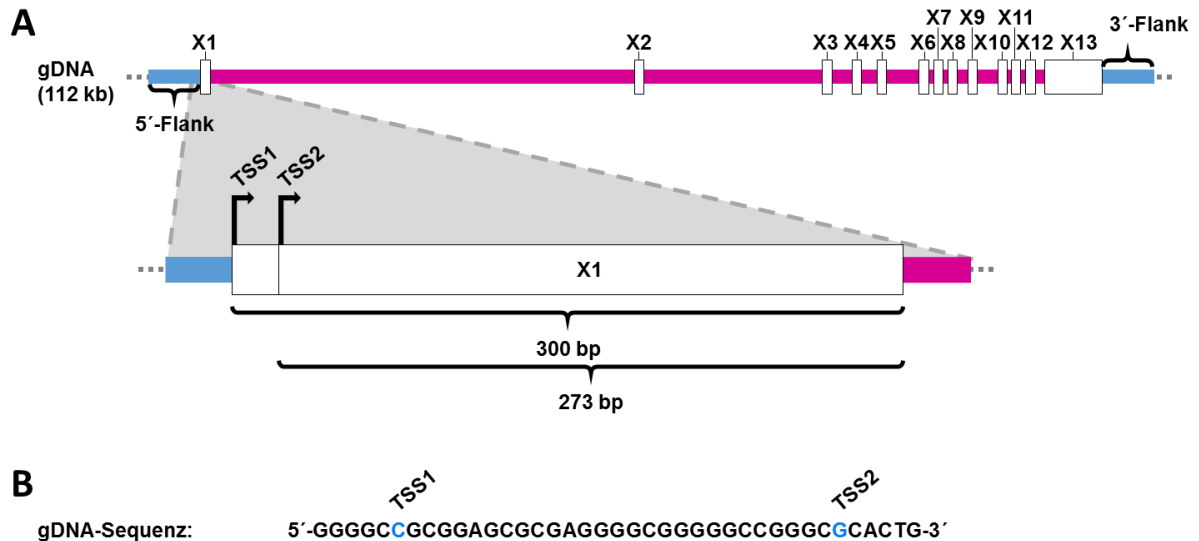


Abb. 17: Putative Transkriptionsstarts von hCAT-1.

A Schematische Darstellung der Lokalisation der von Gene2Promoter annotierten putativen Transkriptionsstarts TSS1 und TSS2 im hCAT-1-Gen. **B** Genomische Sequenz im Bereich der putativen Transkriptionsstarts.

Um weitere Informationen zu erhalten, wurde zusätzlich eine Transkriptionslevel-Analyse von hCAT-1 mit dem UCSC Genome Browser (Kent et al. 2002) durchgeführt (Abb. 18). Die Analyse beruht auf RNA-Seq-Daten des ENCODE-Projekts (Birney et al. 2007) von neun verschiedenen humanen Zelllinien. Dabei war zu erkennen, dass eine Vielzahl der untersuchten Transkripte den putativen Transkriptionsstart TSS2 aufweisen. TSS1 konnte ebenfalls darin detektiert werden. Jedoch ist die Anzahl der zugeordneten Transkripte etwas geringer als bei TSS2. Außerdem gibt es auch Transkripte, die noch länger sind als TSS1. Das längste Transkript hat seinen Anfang 43 bp vor dem TSS1.

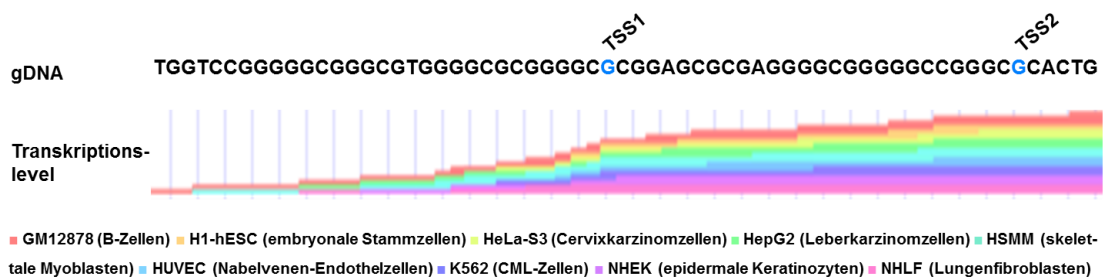


Abb. 18: Transkriptionslevel-Analyse der putativen Transkriptionsstarts von hCAT-1.

Die Analyse der hCAT-1-Transkripte erfolgte mit dem UCSC Genome Browser (Kent et al. 2002). Hierbei wurde das Transkriptionslevel im Bereich der zwei putativen Transkriptionsstarts (TSS1 und TSS2) anhand von RNA-Seq-Daten von insgesamt neun verschiedenen humanen Zelltypen (siehe Abbildungslegende) analysiert. Die Dicke der Balken jeder Farbe gibt Auskunft über die Häufigkeit gefundener Transkripte in jeder einzelnen Zelllinie. Die Ergebnisse werden übereinander angeordnet gezeigt.

6.3.2 Analyse des Transkriptionsstarts über RNase-Verdauungsschutzanalysen

Die RNase-Verdauungsschutz-Analyse wurde früher, vor der Zeit der quantitativen RT-PCR, zur Quantifizierung von RNA in Zellen verwendet. Jedoch eignet sie sich auch zur Überprüfung

des Vorkommens bestimmter DNA-Abschnitte in der mRNA. So auch zur Aufklärung des genauen TSS eines Gens. Hierbei wird eine revers-komplementäre radioaktiv markierte und einzelsträngige RNA-Sonde mit der Ziel-mRNA hybridisiert und anschließend einem RNase-Verdau unterzogen. Dieser bewirkt das Zerschneiden einzelsträngiger Fragmente und somit auch nicht hybridisierter, und daher überhängende Teile der Sonde, sodass nur noch das durch die mRNA geschützte Stück der Sonde übrig bleibt. Da die Sonde radioaktiv markiert ist, kann die Größe des geschützten Fragments nach Auftrennung über ein Polyacrylamidgel mit der Exposition eines Röntgenfilms bestimmt werden.

6.3.2.1 Herstellung des Matrizen-Plasmids der TSS1/2-Sonde

Die eingesetzte Sonde *hCAT-1_TSS1/2* zur Bestimmung des genauen Transkriptionsstarts musste, um an die mRNA binden zu können, zu dieser revers-komplementär sein. Dies wurde erreicht, indem eine *in vitro*-Transkription (Kapitel 5.5.18) mit der Sondenvorlage durchgeführt wurde, wobei die eigentliche Sonde entstand. Die Herstellung der Sondenvorlage erfolgte zuvor in mehreren Schritten. Zunächst wurde genomische DNA aus PBMCs isoliert (Kapitel 5.5.1). Diese DNA diente als Template in einer PCR (Kapitel 5.5.2) mit den Oligonukleotiden (Sequenzen der Oligonukleotide sind in Anhang A aufgeführt) 5'X1.for (bindet im 5'-flankierenden Bereich) und X1.rev (bindet gegen Ende des Exons 1) unter Verwendung des Kits „Phusion® High-Fidelity PCR Kit“. Nach der Synthese wurde das PCR-Produkt über ein Agarosegel aufgetrennt (Kapitel 5.5.5). Im Anschluss wurde die Bande, die dem gewünschten Fragment mit einer Größe von 511 bp entsprach, aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt (Kapitel 5.5.6). Im nächsten Schritt wurde das DNA-Fragment in den Vektor „pCR™ 2.1-TOPO® TA“ kloniert, transformiert (Kapitel 5.5.9 und 5.5.10) und überexprimiert. Die gewachsenen Bakterienkolonien wurden kultiviert und die Plasmide mit dem Kit „PureLink® HiPure Plasmid Midiprep Kit“ aufgereinigt (Kapitel 5.5.11). Um den Klonierungserfolg und die Insertion des DNA-Fragments in das Plasmid in richtiger Orientierung zu überprüfen, wurde eine Sequenzierung mit den Oligonukleotiden „T7 for“ und „M13 rev“ durchgeführt (Kapitel 5.5.14). Das PCR-Produkt war zwar in richtiger Orientierung inseriert, aber es wies zwei Punktmutationen auf. Da diese Mutationen weit von der mit der Sonde zu untersuchenden Region entfernt waren, wurden diese lediglich über einen Verdau mit NotI deletiert (Kapitel 5.5.3) und das Plasmid religiert (Kapitel 5.5.7). Zum Schluss wurde eine erneute Sequenzierung durchgeführt, wodurch die Korrektheit bestätigt werden konnte.

6.3.2.2 Transkriptionsstart von *hCAT-1* konnte nicht bestimmt werden

Um die über das Programm Gene2Promoter ausfindig gemachten putativen Transkriptionsstarts (Abb. 17) zu überprüfen, sollten RNase-Verdauungsschutzanalysen zur eindeutigen Bestimmung durchgeführt werden.

Die bereits in der Arbeitsgruppe etablierten Sonden *mCAT-2A* (Simmons et al. 1996) und *hCAT-1_ORF* (Gräf 1998) wurden hierbei als Größenmarker eingesetzt. Speziell die Sonde *hCAT-1_ORF*, welche im ORF der hCAT-1-mRNA bindet, wurde als Positivkontrolle für die Sonde *hCAT-1_TSS1/2* eingesetzt. *hCAT-1_TSS1/2* sollte Aufschluss über die Position des Transkriptionsstarts geben. Bei einem Signal mit einer Größe von 139 b wäre es TSS1 und bei 112 bp TSS2. Jedoch könnte der Transkriptionsstart auch an einer anderen Stelle liegen.

2×10^5 cpm der über *in vitro*-Transkription mit [α - 32 P]-UTP (spezifische Aktivität: 3.000 Ci/mmol) radioaktiv markierte Sonden wurden mit 20 μ g Gesamt-RNA aus DLD-1-Zellen oder Mausleberzellen hybridisiert und danach einem RNase-Verdau unterzogen (Kapitel 5.5.18). Eine Hybridisierung jeder Sonde (Tab. 18) mit tRNA diente als Kontrolle. Nach dem Verdau wurden die Proben denaturiert und über ein 6%-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Zum Schluss wurde das Gel getrocknet und ein Röntgenfilm aufgelegt, welcher über 2 Tage exponiert wurde.

Das in Abb. 19 gezeigte Autoradiogramm einer RNase-Verdauungsschutzanalyse steht repräsentativ für zahlreiche durchgeführte Analysen. Die mit Mausleber-RNA hybridisierte Sonde ergab ein prominentes geschütztes Fragment, das deutlich kleiner war als die eingesetzte 193 b lange Sonde und im Gel im Bereich des erwarteten 129 b-Fragments lief. Die unverdaute *mCAT-2A*-Sonde zeigte ein Signal, welches aus Erfahrungswerten innerhalb der Arbeitsgruppe einer Größe von 193 b entspricht. Bei der Hybridisierung mit der tRNA konnte keine definierte Bande detektiert werden. Somit sahen alle drei Proben aus wie erwartet, was zeigt, dass die Methode funktionierte. Zudem konnten die detektierten Banden dadurch als Größenmarker für 193 und 129 b verwendet werden.

Die mit DLD-RNA hybridisierte *hCAT-1_ORF*-Sonde zeigte ein geschütztes Fragment mit einer erwarteten Größe von 201 b. Da auch eine Bande zu sehen war, die der unverdauten Sonde entspricht (252 b), ist davon auszugehen, dass der Verdau nach der Hybridisierung nicht ganz vollständig war. Dennoch zeigt dieses Ergebnis, dass sowohl die DLD-1-RNA intakt war, als auch dass eine Detektion der hCAT-1-mRNA über eine Ribosonde möglich war. Die tRNA-Kontrolle der *hCAT-1_ORF*-Sonde zeigte mehrere, in der Intensität schwankende Banden. Vermutlich ist dies auf ein „Herüberschwappen“ beim Auftragen der Proben zurückzuführen. So könnte etwas von der Probe mit der mit DLD-1-RNA hybridisierten Sonde in die Spur gelangt sein. Für die unverdaute *hCAT-1_ORF*-Sonde (entspricht 252 b) konnte wie erwartet ein äußerst starkes Signal detektiert werden.

In der Spur der mit DLD-1-RNA hybridisierten Sonde konnte entgegen den Erwartungen keine dominante Bande detektiert werden, obwohl die unverdaute *hCAT-1_TSS1/2*-Sonde ein äußerst starkes Signal mit der Größe von etwa 418 b zeigte. Die Spur, in der die Sonde hybridisiert mit der tRNA aufgetragen wurde, war bis auf eine äußerst schwache Bande bei 148 b

leer. Auch hier könnte das Signal über ein „Herüberschwappen“ der Probe links davon verursacht worden sein.

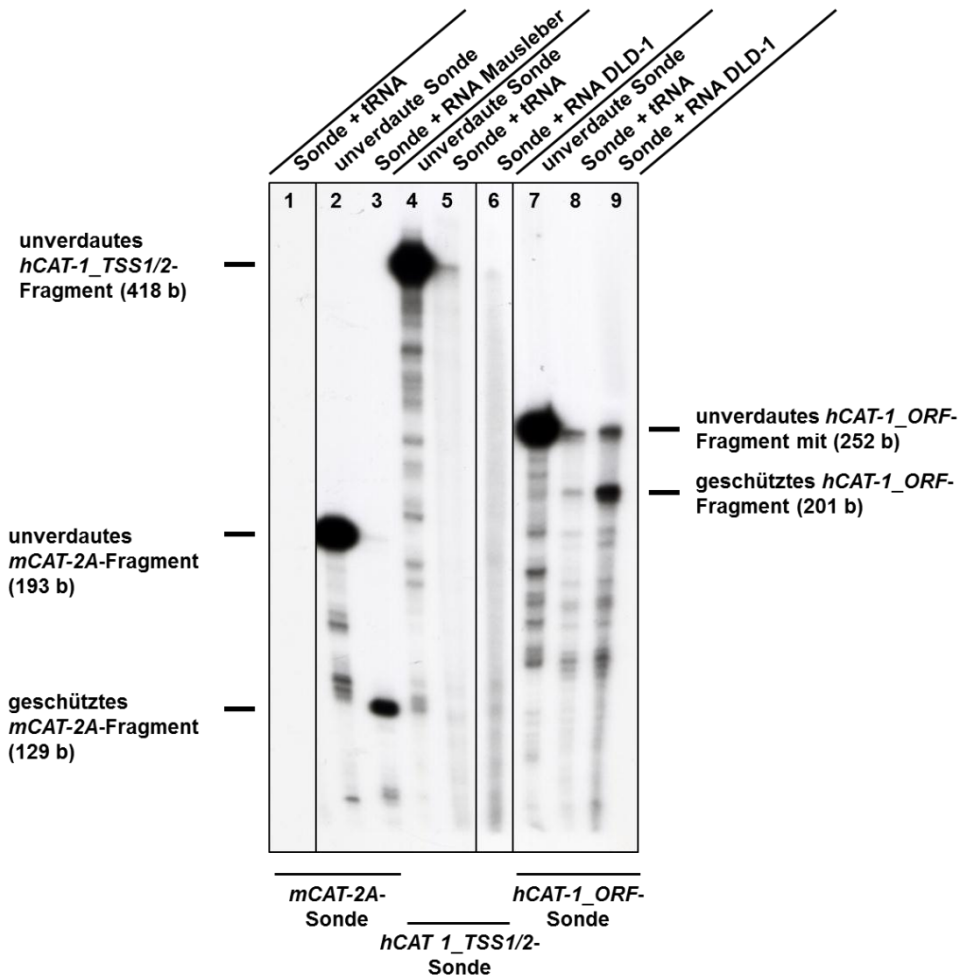


Abb. 19: RNase-Verdauungsschutzanalyse zur Aufklärung des Transkriptionsstarts von hCAT-1.

Je 20 µg Gesamt-RNA, stammend aus DLD-1-Zellen oder Mausleber, wurden mit der Sonde *mCAT-2A* (Spur 3), *hCAT-1_TSS1/2* (Spur 6) oder *hCAT-1_ORF* (Spur 9) hybridisiert. Ansätze der unterschiedlichen Sonden mit je 20 µg tRNA (Spuren 1, 5 und 8) dienten als Kontrollen. Nach Behandlung der Hybride mit RNase A und T1 wurden die geschützten Fragmente auf einem 6%-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Auf die Gele wurden zusätzlich Aliquots der unverdauten Sonden (Spuren 2, 4 und 7) aufgetragen. Der Röntgenfilm wurde 2 Tage dem getrockneten Gel exponiert. Die schwarzen Striche dienen der Größenorientierung.

Obwohl die Verdauungsschutzanalysen für die *mCAT-2A*- und *hCAT-1_ORF*-Sonde für die kodierende Region des Gens erwartungsgemäße Ergebnisse lieferten, konnte trotz Optimierungsversuche (Tab. 24) im Standardprotokoll (Kapitel 5.5.18) in keinem der durchgeführten Versuche definierte Banden detektiert werden. Hierbei wurde, durch die Verwendung eines sensitiveren Films, versucht ein eventuell schwaches Signal zu verstärken. Da die Sequenz um die putativen Transkriptionsstarts sehr GC-reich war, wurde auch statt wie im Standardprotokoll [α - 32 P]-UTP, [α - 32 P]-CTP eingesetzt, um so die Sonde „heißer“ zu machen. Um eine Verstärkung des spezifischen Signals zu erreichen, wurde die doppelte Menge des radioaktivmarkierten [α - 32 P]-CTPs für die Herstellung der Sonde und auch eine höhere Sondenkonzentration an sich verwendet. Der hohe GC-Gehalt war auch ein Grund für die Erhöhung der

Temperatur bei der Hybridisierung, wodurch die Spezifität gesteigert werden sollte. Da der Transkriptionsstart und/oder die Expressionsstärke von hCAT-1 in unterschiedlichen Zelltypen variieren kann, wurden neben der Gesamt-RNA aus DLD-1-Zellen auch RNA aus EA.hy926-Zellen und stimulierten humanen T-Zellen eingesetzt, die zuvor immer auf ihre Qualität überprüft wurde. Um unspezifische Signale zu verringern wurde neben Gesamt-RNA auch aufgereinigte poly A⁺ RNA eingesetzt.

Tab. 24: Optimierungsversuche gegenüber dem verwendeten Standardprotokoll für RNase-Verdauungsschutzanalysen.

Veränderung	Grund
sensitiverer Film [α - ³² P]-CTP statt [α - ³² P]-UTP	Verstärkung des Signals schwacher Banden da die Sequenz um die putativen Transkriptionsstarts TSS1 und TSS2 prozentual am meisten Cytosin aufwies, wurde versucht das spezifische Signal zu verstärken
6 statt 3 μ l [α - ³² P]-CTP in <i>in vitro</i> -Transkription eingesetzt	Verstärkung des spezifischen Signals
höhere Sondenkonzentration bei Hybridisierung: bis zu 8×10^5 cpm	Verstärkung des spezifischen Signals
höhere Hybridisierungstemperatur: bis zu 70°C	zur Erhöhung der Spezifität, da ein hoher GC-Gehalt in der Sequenz im Bereich der putativen Transkriptionsstarts TSS1 und TSS2 vorliegt
Qualitätsüberprüfung der eingesetzten RNA mittels Agarosegel	z.B. zu hohe Temperaturen oder RNasen aus der Laborumgebung können die RNA schädigen bzw. zerschneiden, sodass die Sonde nicht mehr richtig binden kann
RNA aus unterschiedlichen Zelltypen: EA.hy926, stimulierte T-Zellen	unterschiedlich starke hCAT-1-Expression oder verschiedene Transkriptionsstarts
poly A ⁺ RNA statt Gesamt-RNA	Verringerung von unspezifischen Signalen und Verstärkung des spezifischen Signals

6.3.3 TSS2 befindet sich nachweislich in der mRNA von hCAT-1

Da der Nachweis des Transkriptionsstarts über RNase-Verdauungsschutzanalysen nicht möglich war (Kapitel 6.3.2), wurde versucht durch PCRs mit unterschiedlichen Oligonukleotidkombinationen einen Anhaltspunkt zu finden, welcher TSS der eigentliche ist. Die Oligonukleotide X1TS1.for (für TSS1) und X1TS2.for (für TSS2) binden direkt an einem der beiden putativen Transkriptionsstarts in „sense“-Orientierung. Die Sequenzen aller Oligonukleotide sind in Anhang A aufgeführt. X1.for bindet mittig in Exon 1, X2.for am Anfang des Exons 2 und X3.for am Anfang von Exon 3. Diese Oligonukleotide sind ebenfalls in „sense“-Orientierung. Sie alle wurden mit den an dem „antisense“-Strang-bindenden Oligonukleotiden X2.rev, welcher gegen Ende des Exons 2 bindet, und X3.rev, welcher relativ am Anfang von Exon 3 bindet, kombiniert.

Zur Untersuchung der mRNA wurde zunächst Gesamt-RNA aus EA.hy926-Zellen und primären humanen T-Zellen isoliert (Kapitel 5.5.15). Nach der Umschreibung der RNA in cDNA (Kapitel 5.5.16) wurde diese unter Verwendung der oben angegebenen Oligonukleotide mittels PCR analysiert (Kapitel 5.5.1, Kit: „Phusion® High-Fidelity PCR Kit“). Die aus der PCR entstandenen Fragmente wurden über ein Agarosegel aufgetrennt (Kapitel 5.5.5). DNA aus Banden, die der erwarteten Größe entsprachen, wurden aus dem Gel isoliert (Kapitel 5.5.6) und mit den bei der PCR verwendeten Oligonukleotiden sequenziert (Kapitel 5.5.14).

Für die Oligonukleotidkombinationen mit X1TS1.for konnten keine Banden in den erwarteten Größen detektiert werden (Abb. 20 A).

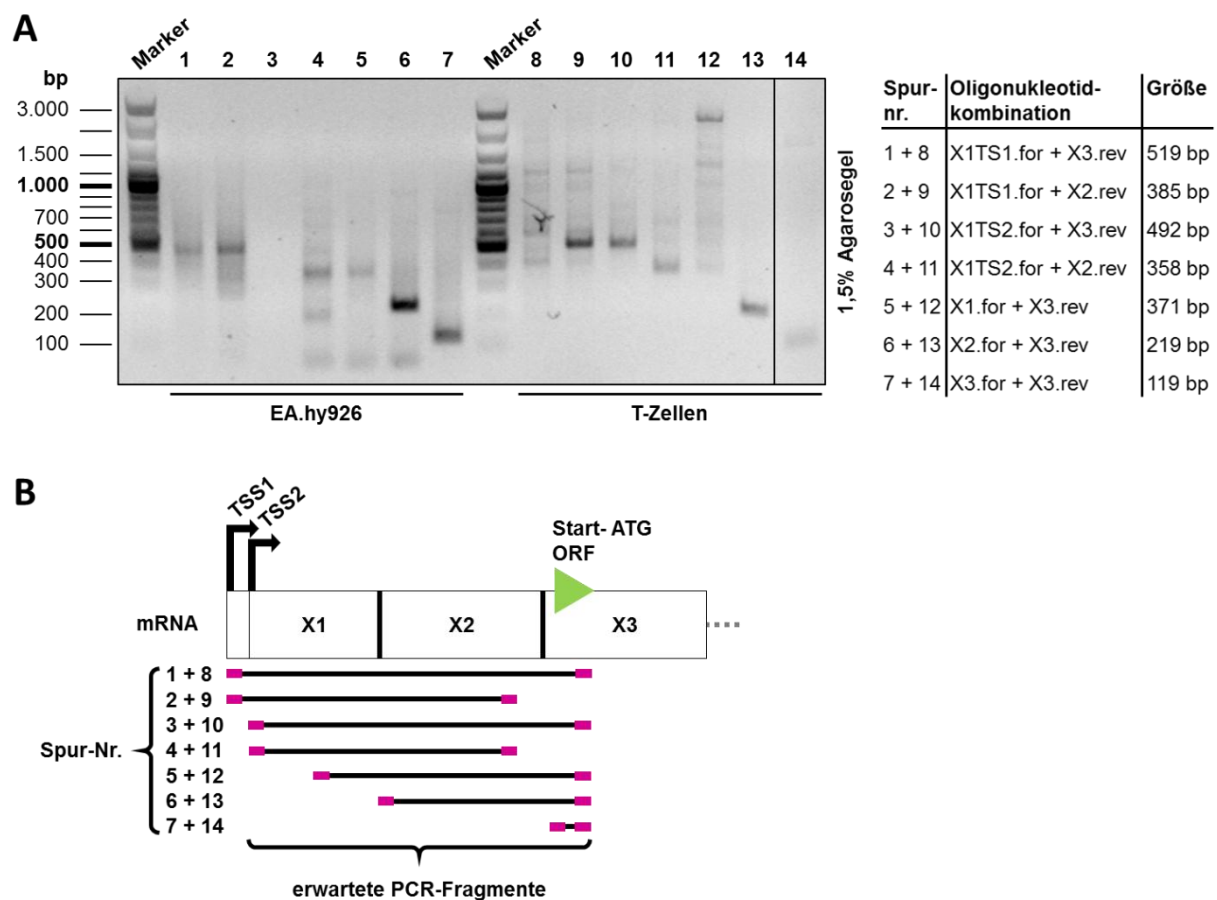


Abb. 20: Nachweis des Transkriptionsstarts von hCAT-1 über PCR.

A Auftrennung von PCR-Proben, welche aus einer Kombination der Oligonukleotide X1TS1.for, X1TS2.for, X1.for, X2.for und X3.for mit X2.rev und X3.rev hervorgingen. Die dabei eingesetzten cDNAs entstanden durch eine cDNA-Synthese aus isolierten Gesamt-RNAs von EA.926-Endothelzellen und primären humanen T-Zellen. Die PCR-Produkte wurden über ein 1,5%-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Bestimmung der Größe der einzelnen Fragmente wurde ein Marker mitlaufen gelassen. **B** beschreibt die DNA-Fragmente in den erwarteten Größen und ihre Lokalisation in der hCAT-1-mRNA. Pinke Kästchen stellen Oligonukleotidbindestellen dar.

Wenn X1TS2.for mit den gleichen *antisense*-Oligonukleotiden eingesetzt wurde, konnten DNA-Fragmente in den passenden Größen amplifiziert werden. Eine Sequenzierung verifizierte die erwartete Sequenz. Die entstandenen Abschnitte überlagerten sich über weite Teile hinweg (Abb. 20 B). Setzt man diese zusammen, gelingt dadurch der qualitative Nachweis,

dass der Bereich ab TSS2 bis zum Start-ATG des ORFs in Exon 3 in der hCAT-1-mRNA zusammenhängend ist. Über die Oligonukleotidkombination von X1.for + X3.rev konnte zudem gezeigt werden, dass Exon 1, Exon 2 und Exon 3 zusammenhängend nicht nur in den mRNAs von EA.hy926-Endothelzellen und primären humanen T-Zellen vorkommt, sondern auch in humanen DLD-1-Kolonkarzinomzellen und humanen A673-Rhabdomyosarkomzellen (Abb. 21).

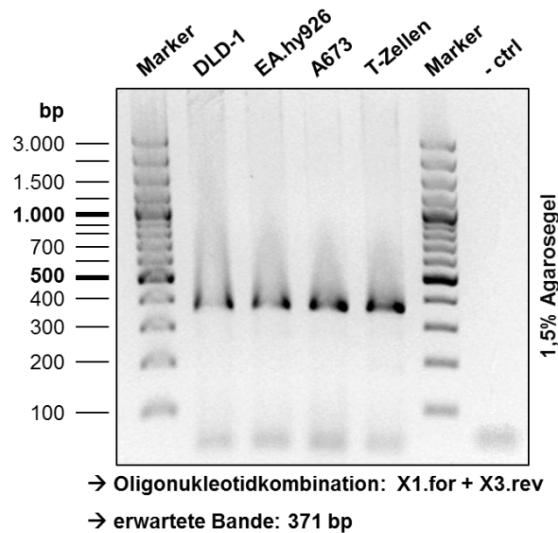


Abb. 21: Nachweis von Exon 1 bis 3 in der mRNA von hCAT-1 über PCR.

Auftrennung von PCR-Proben, welche aus einer Oligonukleotidkombination von X1.for + X3.rev hervorgingen. Die dabei eingesetzten cDNAs entstanden durch cDNA-Synthese aus isolierten Gesamt-RNAs von humanen DLD-1-Kolonkarzinomzellen, EA.926-Endothelzellen, humanen A673-Rhabdomyosarkomzellen und primären human T-Zellen. Die PCR-Produkte würden über ein 1,5%-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Bestimmung der Größe der einzelnen Fragmente wurde ein Marker mitlaufen gelassen.

6.4 Charakterisierung des hCAT-1-Promotors

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit der Charakterisierung des hCAT-1-Promotors. Hierzu sollte durch Eingrenzung die genaue Lokalisation des Hauptpromotors bestimmt werden. Im Anschluss sollten dann die regulatorischen Elemente aufgespürt werden, welche die Transkription von hCAT-1 in humanen Zellen regulieren.

Weil bisher nur TSS2 nachweisbar war (Abb. 20), wurde dieser der Einfachheit wegen in den folgenden LUC-Analysen als Transkriptionsstart und dadurch als Beginn des Exons 1 definiert. Dieser entspricht auch dem bei NCBI annotierten Transkriptionsstart in der mRNA (*Sequence Accession ID*: NM_003045, Stand: 20.02.2016).

6.4.1 Herstellung der Promotorkonstrukte

Um einen bestimmten Bereich der genomischen DNA auf Promotoraktivität zu untersuchen, wurde das gewünschte Fragment in ein Vektorsystem ohne Promotor kloniert. Da innerhalb

dieser Arbeit zahlreiche Promotorkonstrukte kloniert wurden, wird im Folgenden nur die Erstellung des Konstrukts *A basic* im Detail beschrieben. Genaue Angaben über die Herstellung aller anderen Konstrukte sind Anhang B zu entnehmen.

Zur Herstellung des Konstrukts *A basic* wurde eine PCR (Kapitel 5.5.2) mit den Oligonukleotiden 5kb_A.ss und 5kb_A.as durchgeführt. Hierbei kam das Kit „Phusion® High-Fidelity PCR Kit“ zum Einsatz. Als Template diente der hCAT-1-Klon „RPCI-11 HS BAC CLONE“ (#RPCI11.C, Life Technologies GmbH). Im nächsten Schritt erfolgte eine Auftrennung des PCR-Produkts über ein Agarosegel (Kapitel 5.5.5) mit anschließender Extraktion der gewünschten Bande (Kapitel 5.5.6). Dann wurde das PCR-Fragment und der Zielvektor *pGL3 basic* mit *Acc65I* und *SacI* geschnitten (Kapitel 5.5.3). Über eine erneute gelelektrophoretische Auftrennung und Gelextraktion wurden so die abgeschnittenen Enden des PCR-Produkts und der zu ersetzende Bereich im Zielvektor entfernt. Danach wurde über eine Ligation (Kapitel 5.5.7) das in der PCR entstandene Fragment mit dem Zielvektor zusammengefügt. Im Anschluss erfolgte eine Transformation in XL1-Blue-Zellen (Kapitel 5.5.10) und Minipräparation der Plasmid-DNA (Kapitel 5.5.11). Um den Klonierungserfolg zu überprüfen, wurde zunächst eine Kontrollrestriktion mit einem Enzym durchgeführt, das innerhalb des Inserts schnitt. Nach positiver Restriktion wurde das Promotorkonstrukt zur Kontrolle der Sequenz sequenziert (Kapitel 5.5.14).

Bis auf zwei Plasmide wurden alle Klonierungsstrategien von mir entwickelt. Die Plasmide *X1Δ2 inCAT* und *X1Δ3 inCAT* wurden von Tamara Rothenburger (Masterandin innerhalb der AG Closs) im Rahmen ihrer Masterarbeit erstellt. Auch die Klonierung der Promotorkonstrukte, Luciferase-Reporter-Gen-Analysen und die quantitative Untersuchung der mRNA erfolgte unter meiner Betreuung teilweise durch T. Rothenburger. Eine Aufstellung darüber, welche Konstrukte von ihr und welche von mir erstellt wurden, ist Anhang B zu entnehmen. Informationen über die Herkunft der Daten aus Luciferase-Reporter-Gen-Analysen und den quantitativen Untersuchungen der mRNA sind Anhang C zu entnehmen.

Aufgrund der Vielzahl der getesteten Konstrukte wurde nicht für jedes einzelne Konstrukt eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt, sondern nur bei jedem Versuchsdurchlauf, in dem in der Regel mehrere Promotorkonstrukte gleichzeitig getestet wurden. Daher kommt es innerhalb der einzelnen Abbildungen in diesem Kapitel teilweise zu Mehrfachverwendungen bei den untersuchten Plasmiden und Kontrollen. Aus diesem Grund ist in Anhang C aufgeführt, in welchen Abbildungen Ergebnisse aus demselben Versuch eingegangen sind.

Die Ausgangsplasmide und damit ein Teil der Kontrollen wurden freundlicherweise von AG Kleinert zur Verfügung gestellt. Zu diesen gehört der über Promega GmbH bezogene Vektor

pGL3 control, welcher einen starken SV40-Promotor mit dem dazugehörigen *Enhancer* aufweist und in den LUC-Analysen ohne Intronsequenzen als Positivkontrolle (hier: + ctrl) diene. Ein *Enhancer* ist ein *cis*-regulatorisches Element in der genomischen DNA, welches das Anlagern des Transkriptionskomplexes an den Promotor begünstigt und somit die Transkription verstärkt. Das Plasmid *pGL3 basic* (Promega GmbH) enthielt keinen Promotor, war demnach die Negativkontrolle (hier: - ctrl) und diente als Ausgangsplasmid für alle in dieser Arbeit hergestellten Promotorkonstrukte ohne Intron. Das Plasmid *pGL3 control inglo ASV40* (bezogen durch Promega GmbH, modifiziert durch Mitglieder der AG Kleinert, Vektorkarte in Abb. 22) hatte neben einem SV40-Promotor auch Exon 1 und 2 sowie Intron 1 aus dem Vektor *pRHCglo* (Singh und Cooper 2006).

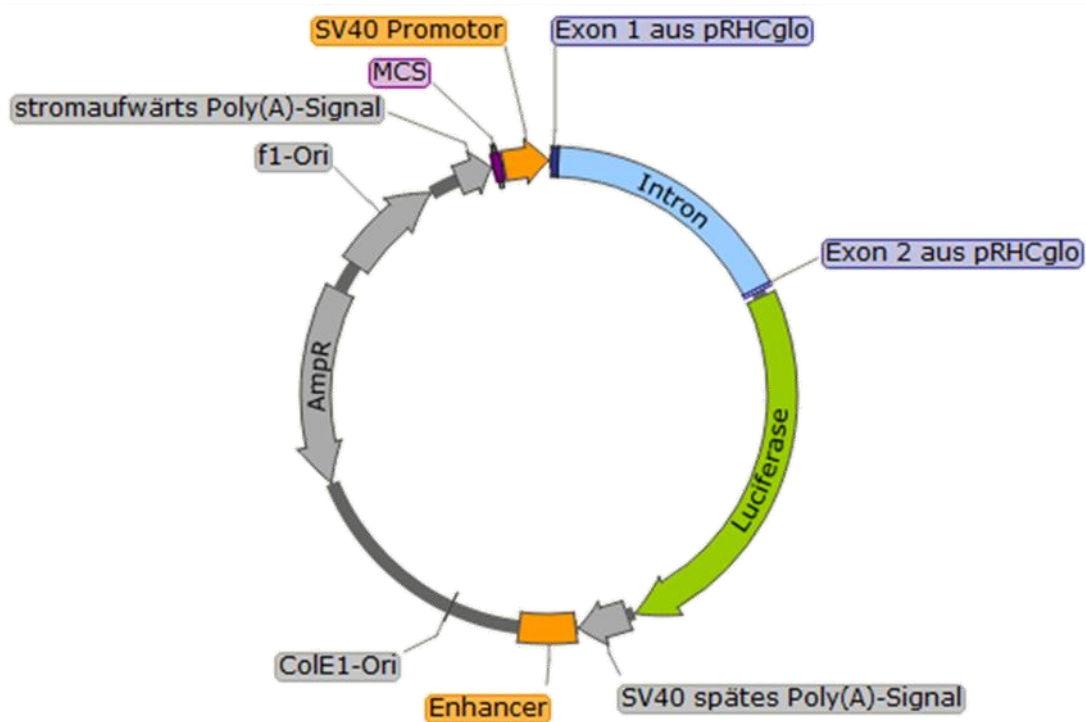


Abb. 22: Vektorkarte von *pGL3 control inglo ASV40*.

Der Vektor *pGL3 control inglo SV40* wurde in LUC-Analysen aufgrund seines starken SV40-Promotors, verstärkt durch den dazugehörigen *Enhancer*, als Positivkontrolle verwendet. In der qRT-PCR wurde er als Negativkontrolle eingesetzt, da hier die zur Untersuchung verwendeten Oligonukleotide und die Sonde nicht binden können. AmpR: Gen für eine Ampicillinresistenz, MCS: Multiple Klonierungsstelle.

Die beiden Exons und das Intron in *pGL3 control inglo ASV40* werden der Einfachheit wegen in folgenden Abbildungen zusammengefasst und als „inglo“ bezeichnet (siehe z.B. Abb. 27). In den LUC-Analysen wurde *pGL3 control inglo ASV40* als Positivkontrolle (hier: + ctrl) und in mRNA-Analysen durch qRT-PCR als Negativkontrolle (hier: - ctrl) eingesetzt, da die verwendeten Oligonukleotide hier nicht binden konnten. *pGL3 promoter inglo ASV40* diene als Ausgangskonstrukt für die Promotorkonstrukte mit Intron und nach Entfernung des Promotors (*pGL3 basic inglo*) auch als Negativkontrolle (hier: - ctrl) in den LUC-Analysen. Um die durch

die Analysen erhaltenen Messwerte zu normieren, erfolgte bei LUC-Analysen eine Co-Transfektion mit *pRL-EF1 α* (Vektorkarten in Abb. 23).

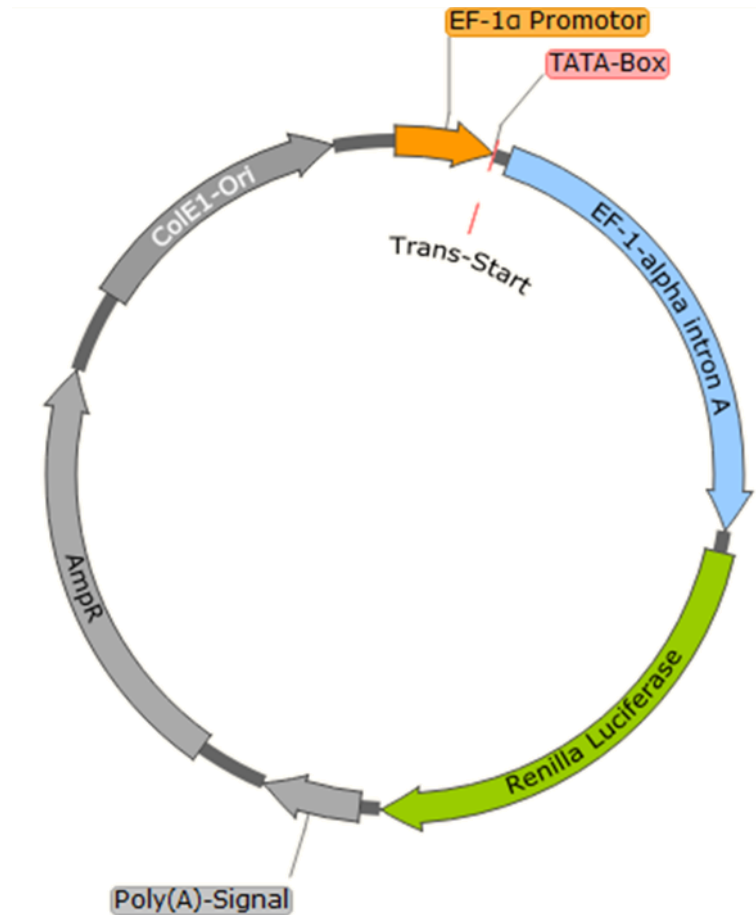


Abb. 23: Vektorkarte *pRL-EF1 α* .

Der Vektor *pRL-EF1 α* wurde zur Normierung der Transfektionseffizienz und Zellzahl bei LUC-Analysen mit dem zu untersuchenden Promotorkonstrukt co-transfiziert. AmpR: Gen für eine Ampicillinresistenz.

Dieses Plasmid kodiert für eine Renilla-Luciferase und wird zur Normierung der gemessenen Firefly-Luciferasewerte verwendet. Für mRNA-Analysen über qRT-PCR wurde mit *pRHCglo* (Vektorkarten in Abb. 24) co-transfiziert. Dieses Plasmid wird zur Normierung der gemessenen Promotorkonstrukt-mRNA herangezogen. Beide Plasmide stammten ebenfalls von der AG Kleinert.

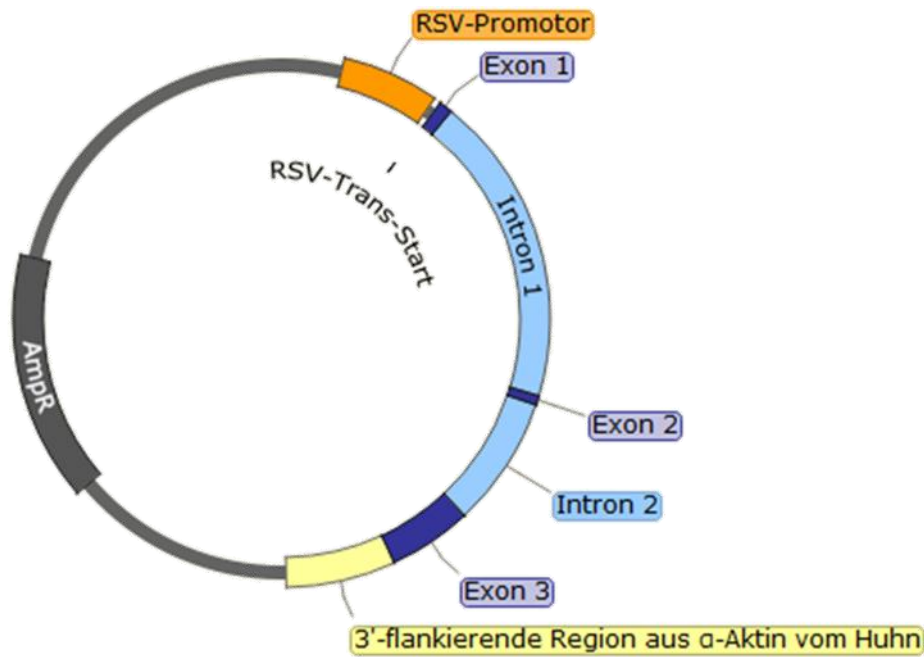


Abb. 24: Vektorkarte von *pRHCglo*.

Der Vektor *pRHCglo* wurde zur Normierung der mRNA bei der qRT-PCR mit dem zu untersuchenden Promotorkonstrukt co-transfiziert. AmpR: Gen für eine Ampicillinresistenz.

6.4.2 Detektion und Eingrenzung des hCAT-1-Kernpromotors durch Luciferase-Reporter-Gen-Analysen in DLD-1-Zellen

Bei Luciferase-Reporter-Gen-Analysen wird ein Vektorsystem genutzt, welches neben Elementen, die für die Transkription benötigt werden, noch ein Reporter-Gen aufweist, das für eine Luciferase kodiert. Unter Anwesenheit eines Promotors wird das Gen abgelesen, sodass das Protein entsteht. Gibt man nun ein spezifisches Luciferase-Substrat hinzu, wird dieses durch das Enzym umgesetzt, wodurch Licht emittiert wird. Je stärker die Promotoraktivität ist, desto mehr Protein wird von der Firefly-Luciferase hergestellt und desto stärker ist das gemessene Lumineszenzsignal. Hierbei spielen jedoch auch translationale Effekte eine Rolle. Enthält das Vektorsystem keine Promotorelemente, wird das Gen nicht synthetisiert und man erhält auch kein Signal. Als Bezugsgröße wird zusätzlich zur Firefly-Luciferase auch ein Plasmid mit einer Renilla-Luciferase transfiziert. Durch die Quantifizierung der Renilla-Luciferase und Verrechnung mit den entsprechenden Werten der Firefly-Luciferase können so die unterschiedliche Transfektionseffizienz und Zellzahl in den untersuchten Proben normiert werden. Da Firefly- und Renilla-Luciferase unterschiedliche Substrate benötigen, werden diese getrennt voneinander quantifiziert.

Um den hCAT-1-Promotor über Luciferase-Reporter-Gen-Analysen unter der Verwendung von Promotorkonstrukten zu analysieren, wurden humane DLD1-Kolonkarzinomzellen eingesetzt. Hierbei war es zunächst nicht wichtig, ob eine Regulation von hCAT-1 in dem gewählten Zellsystem vorliegt, sondern dass die Zellen eine hohe endogene Expression des hCAT-1-Gens

aufweisen, um so eine große Wahrscheinlichkeit zu haben, dass der Promotor in den Zellen aktiv ist. DLD-1-Zellen zeigen eine solche starke hCAT-1-Expression (Rotmann et al. 2004).

Für die Durchführung der Versuche wurden 8×10^5 DLD-1-Zellen mit 500 μ l DMEM-Normalmedium in 24-Loch-Platten ausgesät. Nach ca. 24 h und einer Konfluenz von 80% erfolgte die Transfektion mit dem zu untersuchenden Plasmid und einem weiteren Kontroll-Plasmid zur Normierung (Kapitel 5.5.19). Nach weiteren 24 h wurden die Zellen lysiert und in Luciferase-Reportergen-Analysen (Kapitel 5.5.21) oder durch qRT-PCR (Kapitel 5.5.17) analysiert.

6.4.2.1 5'-flankierenden Bereich und Exon 1 des hCAT-1-Gens induzieren keine Luciferaseexpression

Der Kernpromotor eines Gens ist definiert als der kleinste Abschnitt, welcher für die Aktivator-unabhängige basale Transkription durch die RNA-Polymerase II *in vitro* benötigt wird (Butler und Kadonaga 2002; Gross und Oelgeschlager 2006; Danino et al. 2015; Roy und Singer 2015). Um den Kernpromotor von hCAT-1 zu untersuchen, wurde zu Beginn ein Bereich von 5 kb vor dem Exon 1 sowie Exon 1 selbst untersucht. Hierfür wurden die Promotorkonstrukte *A basic*, *B basic*, *AB basic*, *C basic*, *ABC basic* und *CD basic* erstellt (Abb. 25). Diese enthalten jeweils Teilabschnitte des erwähnten Bereichs, welche in den multiplen Klonierungsabschnitt von *pGL3 basic* eingefügt wurden. Um die Konstrukte zu untersuchen, wurden LUC-Analysen durchgeführt. Als Positivkontrolle (+ ctrl) wurde der Vektor *pGL3 control* verwendet und als Negativkontrolle (- ctrl) diente *pGL3 basic*. Die Herstellung und eine Beschreibung aller Plasmide ist Anhang B zu entnehmen.

In den durchgeführten LUC-Analysen konnte bei keinem der untersuchten Promotorkonstrukte Luciferaseaktivität festgestellt werden (Abb. 25). Diese war stets auf einem ähnlichen Level wie die Negativkontrolle ohne Promotor. Dabei spielte es auch keine Rolle, ob das Plasmid nur Teilstücke des 5 kb großen Fragments vor dem Exon 1 enthielt oder den gesamten Abschnitt. Auch das Hinzufügen von Exon 1, in Kombination mit ca. 1 kb der 5'-flankierenden Region, erhöhte nicht die Aktivität. Die Positivkontrolle mit dem SV40-Promoter, verstärkt durch seinen *Enhancer*, zeigte hingegen wie erwartet eine deutliche Luciferaseaktivität.

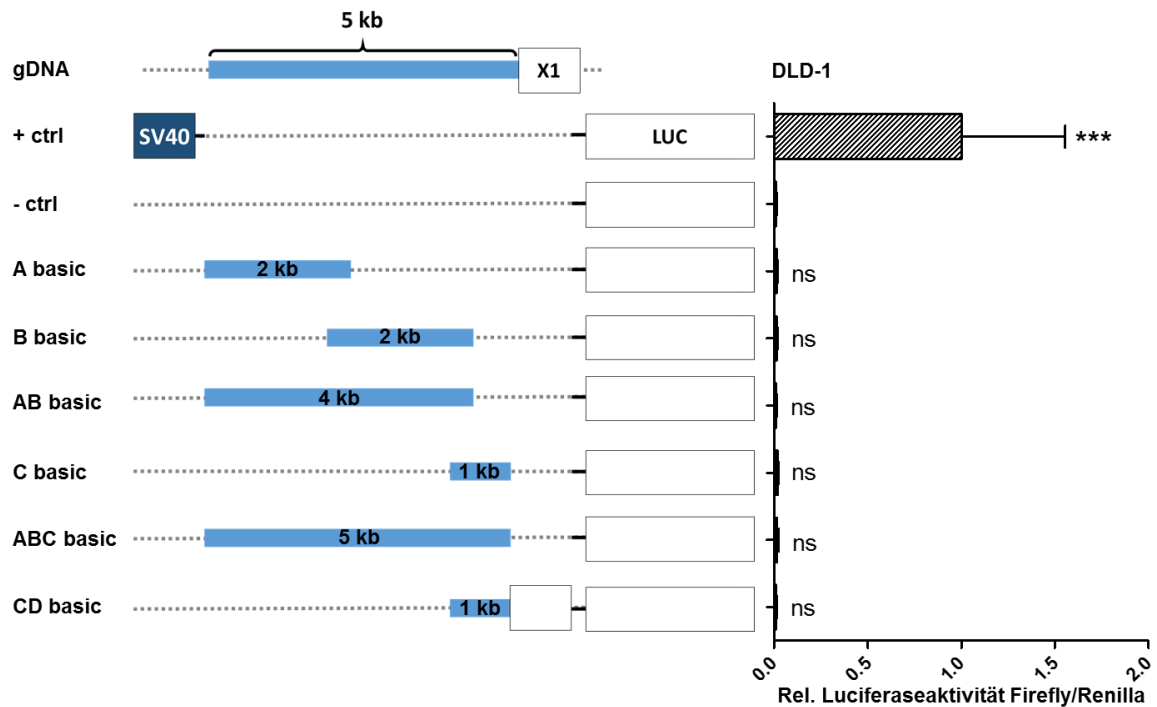


Abb. 25: Keine Luciferaseaktivität innerhalb von 5 kb vor dem TSS oder in Exon 1.

DLD-1-Zellen wurden ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80% wachsen gelassen. Danach wurden die Ansätze mit dem zu analysierenden Plasmid, welches für eine Firefly-Luciferase kodiert, zusammen mit dem Plasmid *pRL-EF1α*, welches für eine Renilla-Luciferase codiert, co-transfiziert und für 24 h inkubiert. Nach Beendigung des Versuchszeitraums wurde die Luciferaseaktivität der Proben gemessen. Zur Normierung der Transfektionsrate wurden die Firefly-Werte durch den jeweiligen Renilla-Wert geteilt. Als Positivkontrolle (+ ctrl) diente das Plasmid *pGL3 control*, welches einen starken SV40-Viruspromotor, verstärkt durch einen *Enhancer*, enthält. Für die Negativkontrolle (- ctrl) wurde das Plasmid *pGL3 basic* eingesetzt, welches keinerlei Promotorstrukturen aufweist. Die Daten wurden durch den Mittelwert von + ctrl der entsprechenden Versuchsreihe geteilt und sind gezeigt als Mittelwert + SD (n=10-20). Bei der interferenzstatistischen Analyse (1way ANOVA mit Dunnett-Posttest) wurden alle Werte gegen die Negativkontrolle getestet (ns $p > 0,05$, *** $p < 0,001$).

6.4.2.2 Analyse von CpG-Inseln, Histonmodifikationen, DNase-Clustern und Transkriptionsfaktorbindestellen liefert Hinweis auf die Lokalisation des Promotors im *hCAT-1-Gen*

Entgegen den Erwartungen und den publizierten Daten (Guzman-Gutierrez et al. 2012; Gonzalez et al. 2011) wiesen die ersten 5 kb 5'-flankierend von Exon 1 und das Exon 1 selbst keine Luciferaseaktivität auf (Abb. 25). Daher wurde das gesamte *hCAT-1-Gen* und etwa 20 kb stromaufwärts und stromabwärts mit dem UCSC Genome Browser (Kent et al. 2002) untersucht. Die Datenbank hat den Vorteil, dass sie auf *in vitro*-Daten des ENCODE-Projekts (Birney et al. 2007), in diesem Fall in Form von ChIP-Seq-Analysen (Furey 2012) aus einer großen Bandbreite von verschiedenen humane Zelltypen, zurückgreift und diese für jedes Gen vereint. Bei der ChIP-Seq-Analyse werden die in der Zelle an die genomische DNA gebundenen Proteine über Formaldehyd fixiert. Danach erfolgt die Lyse der Zelle, um das Chromatin freizusetzen. Mit Ultraschall wird die DNA zerkleinert, sodass Fragmente mit einer Länge von 200-1000 bp entstehen. Im Anschluss wird eine Immunpräzipitation durchgeführt, bei der spe-

zifische Antikörper gegen das zu untersuchende Protein an die Protein-DNA-Komplexe binden, sodass diese über Magnetbeads oder Sepharose aufgereinigt werden können. Die dadurch isolierten Komplexe werden verdaut, um die DNA vom Rest zu trennen. Nach einem weiteren Aufreinigungsschritt können dann die erhaltenen DNA-Fragmente sequenziert und mit dem Genom verglichen werden, wodurch man letztendlich die Information über die Lokalisation der Proteinbindung erhält. Für die Analysen lag der Fokus auf CpG-Inseln, den Histonmodifikationen Monomethylierung des Lysinrests an Position 4 in Histon 3 (H3K4Me1), Trimethylierung des Lysinrests an Position 4 in Histon 3 (H3K4Me3) und Acetylierung des Lysinrests an Position 27 in Histon 3 (H3K27Ac) sowie DNase-Clustern und nachgewiesene Bindestellen von Transkriptionsfaktoren (Txn Factor ChIP). CpG-Inseln, auch Cytosin-phosphatidyl-Guanin-Inseln genannt, sind Regionen mit einer erhöhten CpG-Dinukleotiddichte. Sie kommen vorwiegend in der Nähe des TSS vor und werden mit Promotorregionen assoziiert. Die Histonmodifikation H3K4Me1 wird assoziiert mit *Enhancern* und stromabwärts-Regionen vom Transkriptionsstart. Ganz anders ist es bei H3K4Me3. Solche Methylierungen findet man in der Nähe von aktiven oder bald aktiven Promotoren. H3K27Ac ist bekannt dafür die Transkriptionswahrscheinlichkeit zu erhöhen und ist in der Promotorregion zu finden. DNase-Cluster beschreiben Regionen in der genomischen DNA in denen das Chromatin aufgrund von transkriptioneller Aktivität offen vorliegt, wodurch diese daher hypersensitiv für DNasen ist. Transkriptionsfaktoren (Txn Factor ChIP) binden ebenfalls an oder in der Nähe von Promotoren, um so RNA-Polymerasen zu rekrutieren und die Transkription zu regulieren.

CpG-Inseln treten gehäuft in einem Bereich von etwa 450 bp stromaufwärts bis ca. 1 kb stromabwärts von Exon 1 auf (Abb. 26). Ähnliches gilt auch für DNase-Cluster. Deren Maximum reichte jedoch deutlich weiter, etwa 1,6 kb, in das Intron 1 im hCAT-1-Gen hinein. Auch danach sind viele mehr oder weniger starke Cluster zu finden. Ca. 450 bp vor und 1,75 kb nach dem Exon 1 wurden auch die meisten gebundenen Transkriptionsfaktoren sowie die Histonmodifikationen H3K4Me3 und H3K27Ac detektiert. Lediglich H3K4Me1 trat in dieser Region deutlich seltener auf.

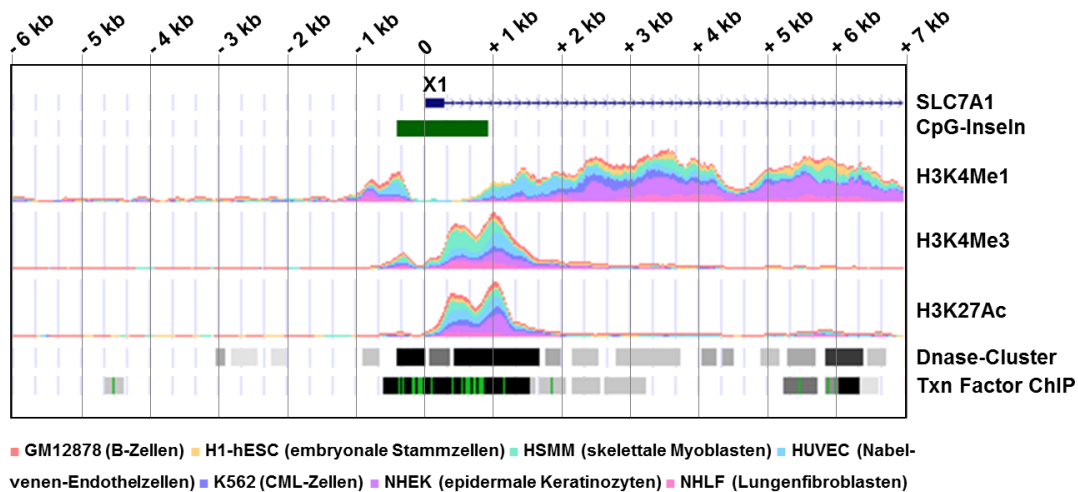


Abb. 26: Analyse von CpG-Inseln, Histonmodifikationen, DNase-Clustern und Transkriptionsfaktorbindstellen im hCAT-1-Gen.

Die Analyse des hCAT-1-Gens erfolgte mit dem UCSC Genome Browser (Kent et al. 2002). Dabei wurden CpG-Inseln (GC-reiche Abschnitte in der DNA), die Histonmodifikationen H3K4Me1 (Monomethylierung des Lysinrests an Position 4 in Histon 3; wird assoziiert mit *Enhancern* und *downstream*-Regionen vom TSS), H3K4Me3 (Trimethylierung des Lysinrests an Position 4 in Histon 3; in der Nähe von aktiven oder bald aktiven Promotoren zu finden) und H3K27Ac (Acetylierung des Lysinrests an Position 27 in Histon 3; bekannt dafür, die Transkriptionswahrscheinlichkeit zu erhöhen), DNase-Cluster (Regionen in der DNA in denen das Chromatin aufgrund von transkriptioneller Aktivität offen vorliegt und daher hypersensitiv für DNasen ist) und Txn Factor ChIP (gebundene Transkriptionsfaktoren in der Nähe von Promotoren, um so mit RNA-Polymerasen zu interagieren und die Transkription zu regulieren) analysiert. Die Datenbank vergleicht hierbei ChIP-Seq-Daten einer Vielzahl von unterschiedlichen humanen Zelltypen. In dunkelblau dargestellt ist das hCAT-1-Exon 1 und der Bereich von 6 kb stromabwärts und 7 kb stromaufwärts. Dunkelgrüne Boxen bezeichnen CpG-Inseln. Die Höhe der Peaks bei den Histonmodifikationen gibt den Acetylierungs- oder Methylierungsgrad an. Dabei entspricht jede Farbe einer anderen humanen Zelllinie (siehe Abbildungslegende). Bei DNase-Clustern symbolisieren graue Boxen DNase-hypersensitive Regionen. Die Dunkelheit ist proportional zur maximalen Signalstärke kumulativ in allen untersuchten Zellen. Hellgrüne Bereiche innerhalb eines solchen Clusters kennzeichnen die höchste Punktzahl eines von Factorbook identifizierten kanonischen Motivs für den entsprechenden Faktor (ENCODE Enzyklopädie, Zugriff unter: http://v1.factorbook.org/mediawiki/index.php/Welcome_to_factorbook).

6.4.2.3 Luciferaseaktivität bei Anwesenheit der ersten 3 kb von Intron 1

Aufgrund der Ergebnisse der Analyse durch den UCSC Genome Browser lag nun die Vermutung nahe, dass sich der Promotor von hCAT-1 innerhalb von Exon 1 und dem Beginn von Intron 1 befindet. Deshalb wurde das Promotorkonstrukt *DE inglo* kloniert. Dieses basiert auf dem Plasmid *pGL3 control inglo ASV40* und enthält neben einer 270 bp großen 5'-flankierenden Region, auch das komplette Exon 1 und ungefähr 3 kb des Introns 1 von hCAT-1. Der *Enhancer* des SV40-Promotors wurde entfernt. Da nun auch ein Teil des Introns mit einer 5'-Spleiß-Donorstelle untersucht werden sollte, wurden in demselben Konstrukt die 3'-Spleiß-Akzeptorstelle (186 bp) eines Introns aus dem β -Globingen (bereits in *pGL3 control inglo SV40* enthalten) dahinter gesetzt, um so das funktionelle Spleißen der mRNA gewährleisten zu können. Um das Konstrukt zu untersuchen, wurden LUC-Analysen durchgeführt. Als Positivkontrolle (+ ctrl) wurde daher auch der Vektor *pGL3 control inglo ASV40*, welcher einen starken SV40-Promotor, verstärkt durch einen *Enhancer*, besitzt, und als Negativkontrolle (- ctrl) *pGL3 basic inglo*, welche keinen Promotor innehat, verwendet. Die Herstellung und eine Beschreibung aller Plasmide ist Anhang B zu entnehmen.

Bei der LUC-Analyse des Plasmids *DE inglo* zeigte sich eine sehr ausgeprägte Aktivität. Diese war sogar fast doppelt so stark wie die der Positivkontrolle mit einem dominanten SV40-Virus-Promotor und dazugehörigem *Enhancer*.

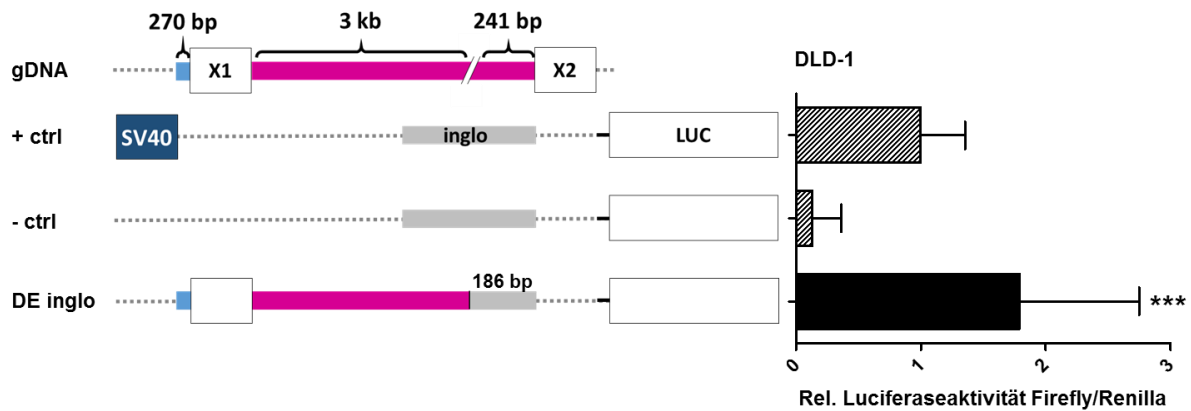


Abb. 27: Luciferaseaktivität im Intron 1 in Verbindung mit Exon 1 aus hCAT-1.

DLD-1-Zellen wurden ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80% wachsen gelassen. Danach wurden die Ansätze mit dem zu analysierenden Plasmid zusammen mit *pRL-EF1 α* co-transfiziert und für 24 h inkubiert. Nach Beendigung des Versuchszeitraums wurden die Proben über LUC-Analysen auf deren relative Luciferaseaktivität überprüft. Als Positivkontrolle (+ ctrl) diente das Plasmid *pGL3 control inglo ASV40*, welches einen starken SV40-Viruspromotor, verstärkt durch den dazugehörigen *Enhancer*, enthält. Für die Negativkontrolle (- ctrl) wurde das Plasmid *pGL3 basic inglo* eingesetzt, welches keinerlei Promotorstrukturen aufweist. Die Daten wurden durch den Mittelwert von + ctrl der entsprechenden Versuchsreihe geteilt und sind gezeigt als Mittelwert + SD (n=20-44). Die interferenzstatistische Analyse (beidseitiger ungepaarter t-Test) erfolgte zwischen - ctrl und *DE inglo* (***) ($p < 0,001$).

6.4.2.4 5'-flankierender Bereich ist nicht Teil des Kernpromotors

Nachdem bei *DE inglo* eine starke Luciferaseaktivität gemessen werden konnte (Abb. 27), wurde nun untersucht, ob der 5'-flankierende Bereich von 270 bp vor Exon 1 dafür notwendig ist. Dieser wurde deletiert, wodurch das Konstrukt *DE-5' inglo* entstand.

Die Deletion des 5'-flankierenden Bereichs hatte nahezu keine Auswirkungen auf die Luciferaseaktivität in der LUC-Analyse (Abb. 28). Die Luciferaseaktivität nahm zwar, betrachtet man den Mittelwert im Vergleich mit *DE inglo*, etwas ab, dennoch war der Unterschied nicht signifikant.

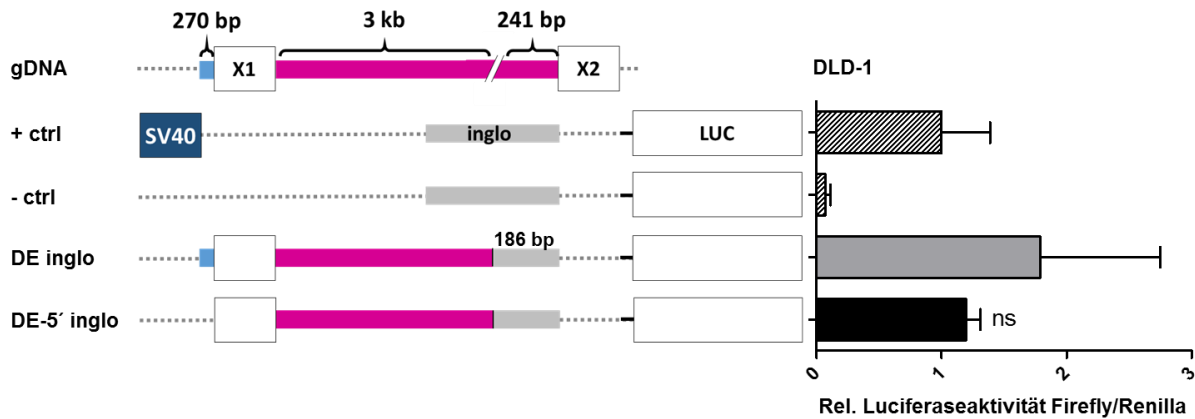


Abb. 28: Deletion des 5'-flankierenden Bereichs hat keinen Einfluss auf die Luciferaseaktivität.

DLD-1-Zellen wurden ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80% wachsen gelassen. Danach wurden die Ansätze mit dem zu analysierenden Plasmid zusammen mit *pRL-EF1α* co-transfiziert und für 24 h inkubiert. Nach Beendigung des Versuchszeitraums wurden die Proben über LUC-Analysen auf deren relative Luciferaseaktivität überprüft. Als Positivkontrolle (+ ctrl) diente *pGL3 control inglo ASV40* und für die Negativkontrolle (- ctrl) wurde *pGL3 basic inglo* eingesetzt. Die Daten wurden durch den Mittelwert von + ctrl der entsprechenden Versuchsreihe geteilt und sind gezeigt als Mittelwert + SD (n=4-20). Die interferenzstatistische Analyse (beidseitiger ungepaarter t-Test) wurde zwischen *DE inglo* und *DE-5' inglo* durchgeführt (ns $p > 0,05$).

Um auszuschließen, dass der Vektor, in dem sich das Insert befand, eine dem 5'-flankierenden Bereich ähnliche Sequenz aufweist, die deren Funktion übernimmt, wurden die Sequenzen von *DE inglo* und *DE-5' inglo* miteinander verglichen. Die Analyse ergab innerhalb der 270 bp vor dem Exon 1 in *DE inglo* im Vergleich mit den 270 bp Vektorsequenz in *DE-5' inglo* jedoch nur eine Übereinstimmung von 23,2% (Abb. 29). Zudem waren die übereinstimmenden Basenpaare recht homogen verteilt und nicht in einzelnen Clustern aggregiert.

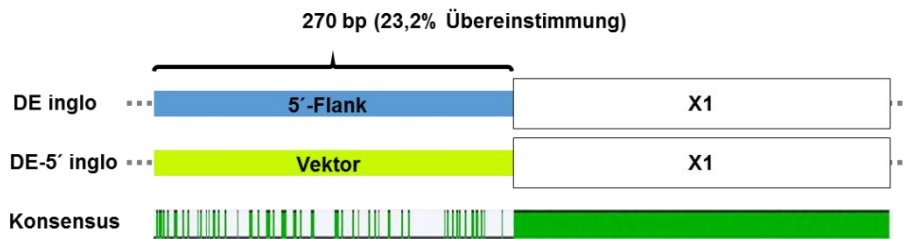


Abb. 29: Sequenzvergleich zwischen dem 5'-flankierenden Bereich und der Vektorsequenz in *DE inglo* und *DE-5' inglo*.

Der Sequenzvergleich von *DE inglo* mit *DE-5' inglo* (entspricht *DE inglo* ohne 5'-flankierenden Bereich) wurde mit dem Programm Geneious Pro erstellt. Hierbei wurde der Bereich 270 bp vor dem Exon 1 auf Homologien zwischen den beiden Promotorkonstrukten analysiert. Die verglichenen Regionen wiesen dabei eine Sequenzübereinstimmung von 23,2% auf, welche in der Konsensussequenz dargestellt ist. Dunkelgrüne Bereiche symbolisieren eine Übereinstimmung. Hellgrüne Strukturen stehen für Bereiche aus dem Vektor *pGL3 inglo ASV40* und die Region in blau stellt den 5'-flankierenden Bereich (270 bp) dar.

6.4.2.5 Exon 1 ist Teil des Promotors von *hCAT-1*

Im nächsten Schritt wurde das Konstrukt *E inglo* erstellt, indem das Exon 1 aus *DE inglo* herausgeschnitten wurde. Damit jedoch die Spleißstelle noch funktionell blieb, wurden die letzten 33 bp des Exons erhalten.

Bei den Analysen stellte sich heraus, dass durch die Deletion des Großteils von Exon 1 auch die Aktivität ausgelöscht wurde (Abb. 31). Diese war sogar noch geringer als die Negativkontrolle ohne Promotor.

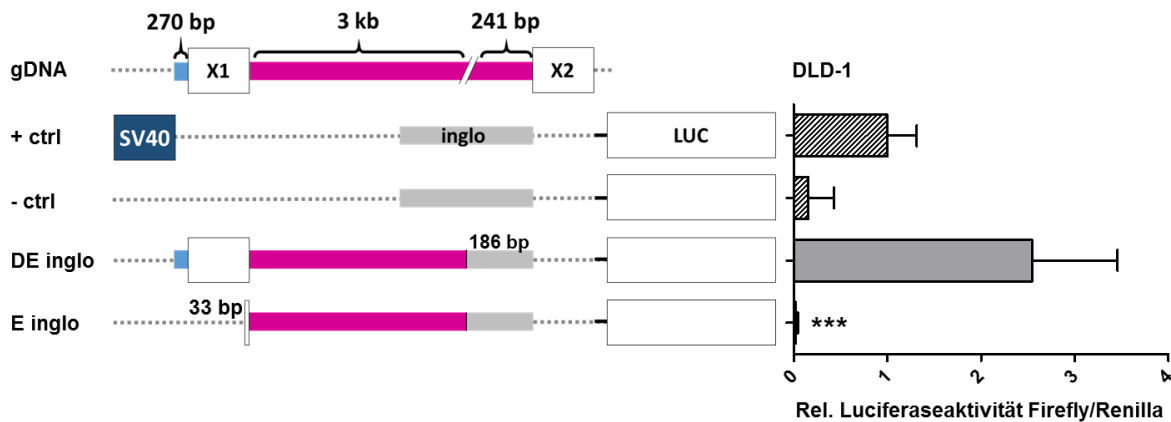


Abb. 30: Deletion von Exon 1 führt zum Verlust der Luciferaseaktivität.

DLD-1-Zellen wurden ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80% wachsen gelassen. Danach wurden die Ansätze mit dem zu analysierenden Plasmid zusammen mit *pRL-EF1 α* co-transfiziert und für 24 h inkubiert. Nach Beendigung des Versuchszeitraums wurden die Proben über LUC-Analysen auf deren relative Luciferaseaktivität überprüft. Als Positivkontrolle (+ ctrl) diente *pGL3 control inglo ASV40* und für die Negativkontrolle (- ctrl) wurde *pGL3 basic inglo* eingesetzt. Die Daten wurden durch den Mittelwert von + ctrl der entsprechenden Versuchsreihe geteilt und sind gezeigt als Mittelwert + SD (n=18-32). Die interferenzstatistische Analyse (beidseitiger ungepaarter t-Test) wurde zwischen *DE inglo* und *E inglo* durchgeführt (***) $p < 0,001$.

6.4.2.6 Anwesenheit der 3'-Spleiß-Akzeptorstelle des Introns 1 und Exons 2 von *hCAT-1* verstärkt die Luciferaseaktivität und mRNA-Expression

In den bisherigen Promotorkonstrukten stammte die 3'-Spleiß-Akzeptorstelle des Introns aus einem Intron des β -Globins. Um die im *hCAT-1*-Gen vorliegende Struktur besser abzubilden, erfolgte ein Austausch dieses Teils gegen die letzten 241 bp des Introns 1 von *hCAT-1*. Zusätzlich wurde auch entweder das gesamte Exon 2 mit vollständigem μ ORF (*DE inCAT*) oder nur die ersten 46 bp des Exons 2 und somit ohne das Stoppcodon des μ ORFs (*DE inCAT_B*) hineinkloniert. Um die Promotorkonstrukte zu untersuchen, wurden neben LUC-Analysen auch zusätzlich qRT-PCR-Analysen durchgeführt. Bei der Kontaminationskontrolle wurde *pGL3 control inglo ASV40* (- ctrl) eingesetzt, da hier weder die für die *hCAT-1*-Konstrukte eingesetzten Oligonukleotide noch die Sonde binden konnten.

In den LUC-Analysen konnte eine massive Zunahme der beiden neuen Konstrukte in der Luciferaseaktivität gegenüber *DE inglo* beobachtet werden (Abb. 31). Für *DE inCAT_B* entsprach das einer Verdopplung und für *DE inCAT* sogar einer Verdreifachung. Zwischen dem Konstrukt *DE inCAT* mit dem kompletten Exon 2 und damit auch dem vollen μ ORF (Startcodon in Exon 1 und Stoppcodon in Exon 2) und *DE inCAT_B*, welches nur die ersten 46 bp von Exon 2 aufweist und damit kein Stoppcodon für den μ ORF besitzt, bestand zudem ein signifikanter Unterschied. Dieser Unterschied war allerdings auf mRNA-Ebene nicht zu sehen, was jedoch

aufgrund einer zu geringen n-Zahl nicht über eine interferenzstatistische Analyse bestätigt werden konnte (Abb. 32).

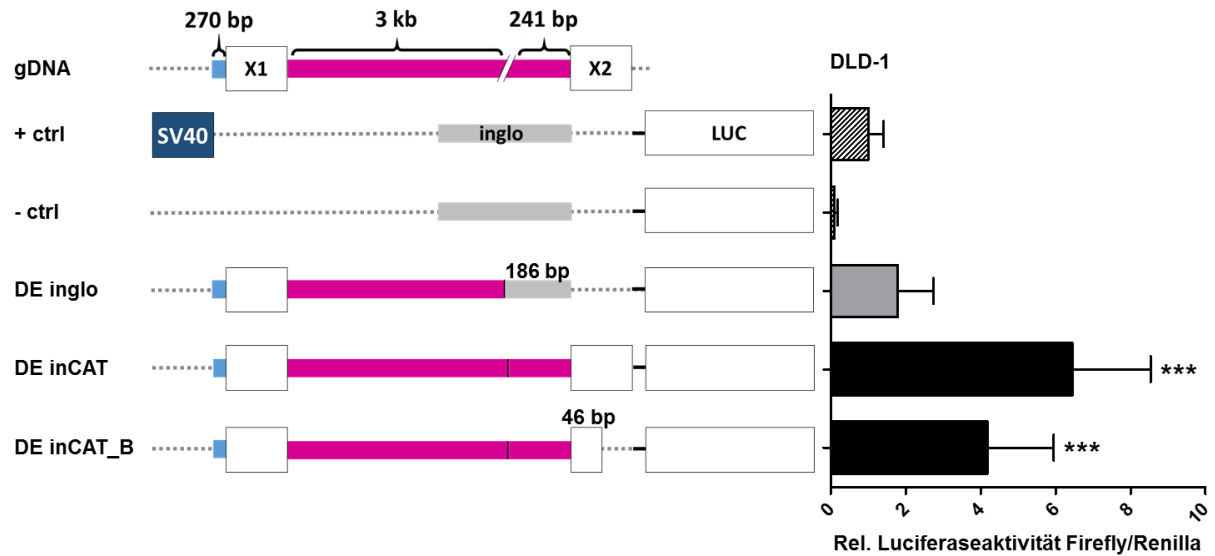


Abb. 31: Austausch der 3'-Spleiß-Akzeptorstelle im Intron und Hinzufügen von Teilen des hCAT-1-Exons 2 erhöht Luciferaseaktivität.

DLD-1-Zellen wurden ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80% wachsen gelassen. Danach wurden die Ansätze mit dem zu analysierenden Plasmid zusammen mit *pRL-EF1α* co-transfiziert und für 24 h inkubiert. Nach Beendigung des Versuchszeitraums wurden die Proben über LUC-Analysen auf deren relative Luciferaseaktivität überprüft. Als Positivkontrolle (+ ctrl) diente *pGL3 control inglo ASV40* und für die Negativkontrolle (- ctrl) wurde *pGL3 basic inglo eingesetzt*. Die Daten wurden durch den Mittelwert von + ctrl der entsprechenden Versuchsreihe geteilt und sind gezeigt als Mittelwert + SD (n=16-32). Bei der interferenzstatistischen Analyse (1way ANOVA mit Bonferroni-Posttest) wurden *DE inCAT* und *DE inCAT_B* gegen *DE inglo* getestet (***) $p < 0,001$). Des Weiteren erfolgte eine Analyse (beidseitiger ungepaarter t-Test) zwischen *DE inCAT* und *DE inCAT_B*, welche einen signifikanten Unterschied ergab ($p < 0,001$).

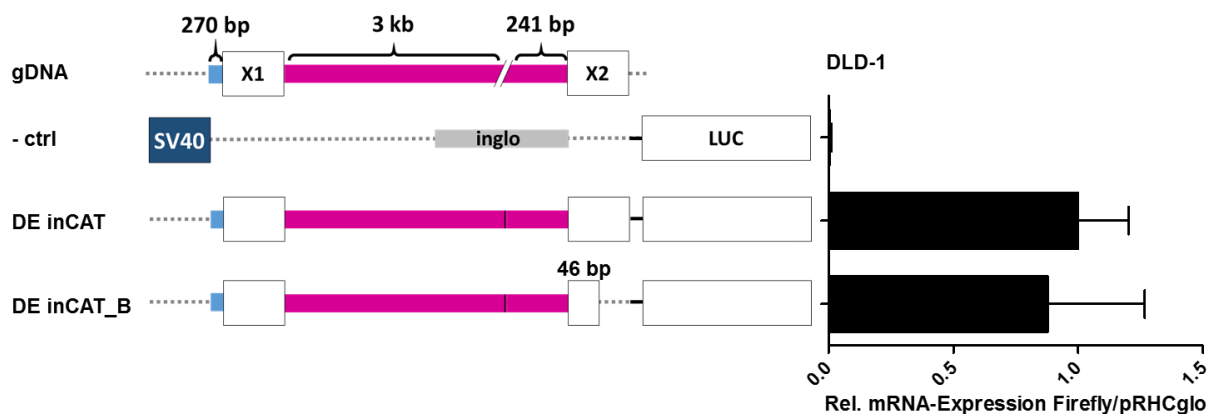


Abb. 32: Komplettierung von Exon 2 aus hCAT-1 erhöht nicht die mRNA-Expression.

DLD-1-Zellen wurden ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80% wachsen gelassen. Danach wurden die Ansätze mit dem zu analysierenden Plasmid zusammen mit *pRHCglo* co-transfiziert und für 24 h inkubiert. Nach Beendigung des Versuchszeitraums wurden die Proben über qRT-PCR-Analysen auf deren relative mRNA-Expression der Firefly-Luciferase überprüft. Dabei wurde auf die entsprechenden *pRHCglo*-Werte normiert. Bei der Kontaminationskontrolle (- ctrl) wurde das Plasmid *pGL3 control inglo ASV40* eingesetzt, da hierin die zur qRT-PCR-Analyse verwendeten Oligonukleotide nicht binden konnten. Die Daten wurden durch den Mittelwert von *DE inCAT* der entsprechenden Versuchsreihe geteilt und sind gezeigt als Mittelwert + SD (n=2-6).

6.4.2.7 Deletion des 5'-flankierenden Bereichs in *inCAT*-Konstrukten führt zur Verminderung der Luciferaseaktivität und mRNA-Expression

Da *DE inCAT* eine deutlich höhere Aktivität als *DE inglo* aufwies (Abb. 31 und Abb. 32) und zudem dem hCAT-1-Gen im Aufbau ähnlicher war, wurde nun ausgehend von *DE inCAT* eine weitere Eingrenzung des Promotors vorgenommen. Zunächst wurde auch hier im ersten Schritt der 5'-flankierende Bereich von 270 bp entfernt, wodurch das Konstrukt *DE-5' inCAT* entstand.

Die Deletion des 5'-flankierenden Bereichs in *DE-5' inCAT* resultierte in einer signifikanten Abnahme der Luciferaseaktivität (Abb. 33). Gleiches konnte auch auf mRNA-Ebene beobachtet werden (Abb. 34). Nichtsdestotrotz waren die gemessenen Werte der Luciferaseaktivität noch deutlich höher als die der Positivkontrolle mit einem SV40-Promotor.

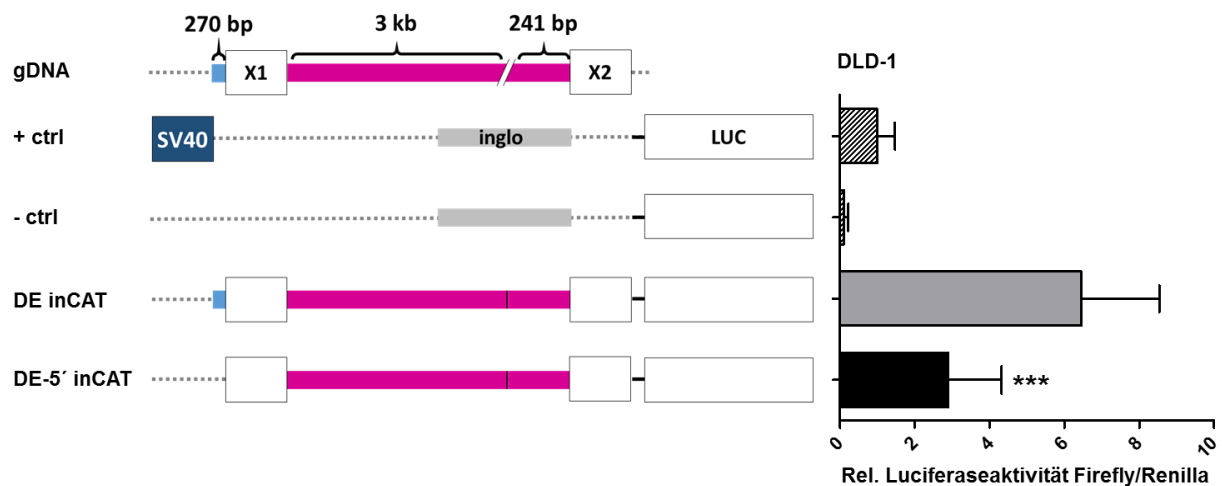


Abb. 33: In *inCAT*-Konstrukten führt die Deletion des 5'-flankierenden Bereichs des hCAT-1-Exons 1 zur Halbierung der Luciferaseaktivität.

DLD-1-Zellen wurden ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80% wachsen gelassen. Danach wurden die Ansätze mit dem zu analysierenden Plasmid zusammen mit *pRL-EF1 α* co-transfiziert und für 24 h inkubiert. Nach Beendigung des Versuchszeitraums wurden die Proben über LUC-Analysen auf deren relative Luciferaseaktivität überprüft. Als Positivkontrolle (+ ctrl) diente *pGL3 control inglo ASV40* und für die Kontaminationskontrolle (- ctrl) wurde *pGL3 basic inglo* eingesetzt. Die Daten wurden durch den Mittelwert von + ctrl der entsprechenden Versuchsreihe geteilt und sind gezeigt als Mittelwert + SD (n=20-32). Die interferenzstatistische Analyse (beidseitiger ungepaarter t-Test) erfolgte zwischen *DE inCAT* und *DE-5' inCAT* (***) ($p < 0,001$).

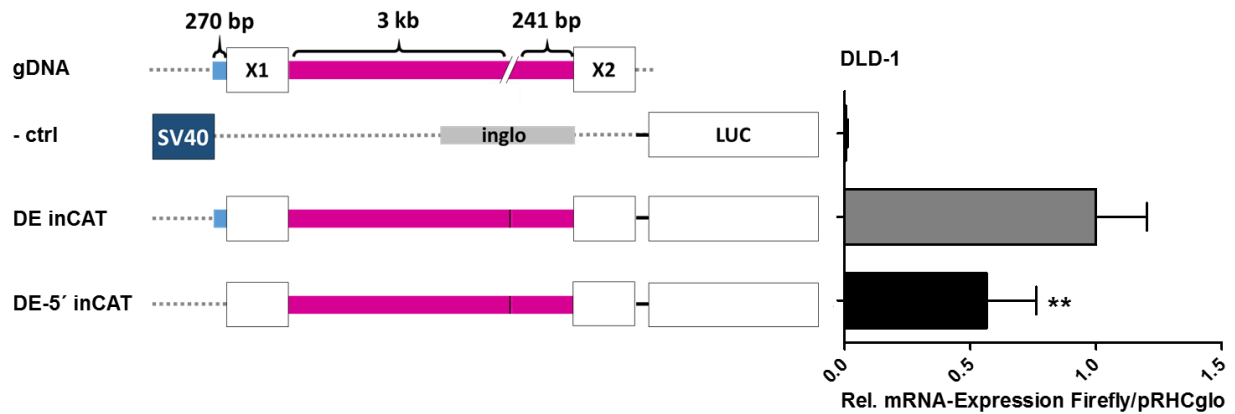


Abb. 34: In inCAT-Konstrukten führt Deletion des 5'-flankierenden Bereichs des hCAT-1-Exons 1 zur Halbierung der mRNA-Expression.

DLD-1-Zellen wurden ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80% wachsen gelassen. Danach wurden die Ansätze mit dem zu analysierenden Plasmid zusammen mit *pRHCglo* co-transfiziert und für 24 h inkubiert. Nach Beendigung des Versuchszeitraums wurden die Proben über qRT-PCR-Analysen auf deren relative mRNA-Expression der Firefly-Luciferase überprüft. Dabei wurde auf die entsprechenden *pRHCglo*-Werte normiert. Als Kontaminationskontrolle (- ctrl) diente *pGL3 control inglo ASV40*. Die Daten wurden durch den Mittelwert von *DE inCAT* der entsprechenden Versuchsreihe geteilt und sind gezeigt als Mittelwert + SD (n=4-6). Die interferenzstatistische Analyse (beidseitiger ungepaarter t-Test) wurde zwischen *DE inCAT* und *DE-5' inCAT* durchgeführt (** $p < 0,01$).

6.4.2.8 Deletion von Exon 1 führt auch in inCAT-Konstrukten zum Verlust der Luciferaseaktivität und mRNA-Expression

Um auch bei dem *inglo*-Konstrukt herauszufinden, ob der Promotor in Exon 1 liegt, wurde das Konstrukt *E inCAT* hergestellt. Dieses enthielt wie *E inglo* noch 33 bp des Exons 1, um funktionelles Spleißen zu ermöglichen.

Die Deletion von Exon 1 im inCAT-Konstrukt führte zu einer massiven Abnahme der Luciferaseaktivität, jedoch nicht zur Auslöschung (Abb. 35). Dahingegen konnte bei der Messung der mRNA keine nennenswerte Expression gemessen werden (Abb. 36). Aufgrund einer zu geringen n-Zahl konnte keine interferenzstatistische Analyse durchgeführt werden.

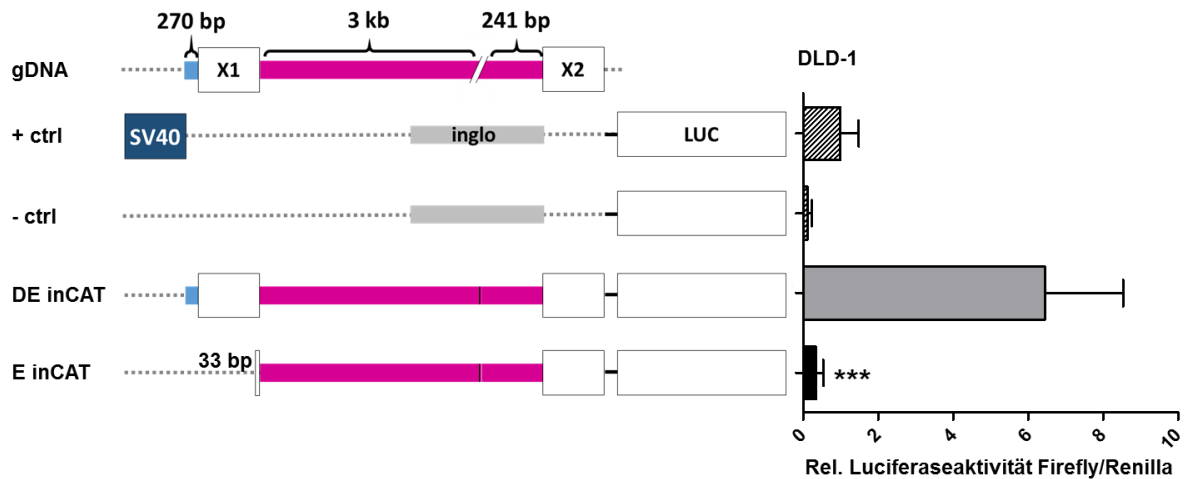


Abb. 35: In inCAT-Konstrukten führt die Deletion von Exon 1 zum fast vollständigen Verlust der Luciferaseaktivität.

DLD-1-Zellen wurden ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80% wachsen gelassen. Danach wurden die Ansätze mit dem zu analysierenden Plasmid zusammen mit *pRL-EF1α* co-transfiziert und für 24 h inkubiert. Nach Beendigung des Versuchszeitraums wurden die Proben über LUC-Analysen auf deren relative Luciferaseaktivität überprüft. Als Positivkontrolle (+ ctrl) diente *pGL3 control inglo ASV40* und für die Negativkontrolle (- ctrl) wurde *pGL3 basic inglo* eingesetzt. Die Daten wurden durch den Mittelwert von + ctrl der entsprechenden Versuchsreihe geteilt und sind gezeigt als Mittelwert + SD (n=12-28). Die interferenzstatistische Analyse (beidseitiger ungepaarter t-Test) erfolgte zwischen *DE inCAT* und *E inCAT* (***) $p < 0,001$). Anschließend wurde ebenfalls eine interferenzstatistische Analyse (beidseitiger ungepaarter t-Test) zwischen - ctrl und *E inCAT* durchgeführt die einen signifikanten Unterschied ergab ($p < 0,001$).

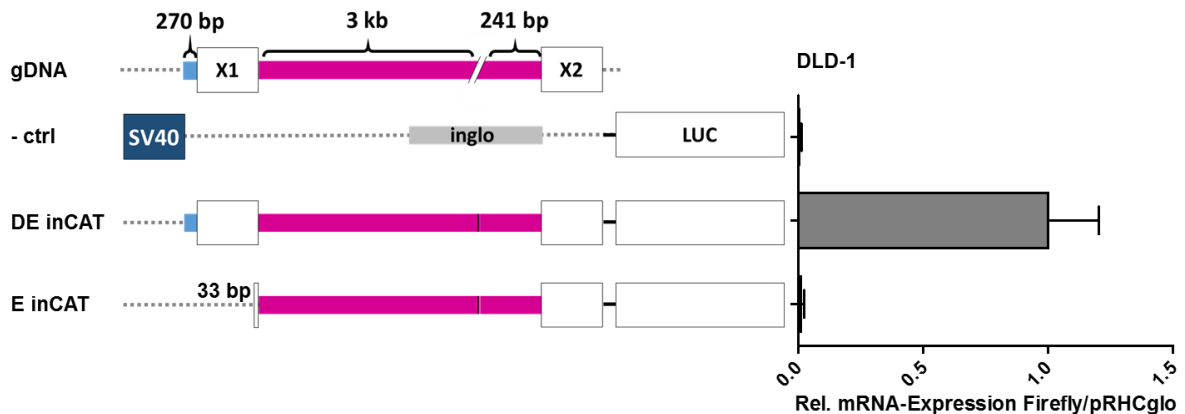


Abb. 36: In inCAT-Konstrukten führt Deletion von Exon 1 zum Verlust der mRNA-Expression.

DLD-1-Zellen wurden ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80% wachsen gelassen. Danach wurden die Ansätze mit dem zu analysierenden Plasmid zusammen mit *pRHCglo* co-transfiziert und für 24 h inkubiert. Nach Beendigung des Versuchszeitraums wurden die Proben über qRT-PCR-Analysen auf deren relative mRNA-Expression der Firefly-Luciferase überprüft. Dabei wurde auf die entsprechenden *pRHCglo*-Werte normiert. Als Kontaminationskontrolle (- ctrl) diente *pGL3 control inglo ASV40*. Die Daten wurden durch den Mittelwert von *DE inCAT* der entsprechenden Versuchsreihe geteilt und sind gezeigt als Mittelwert + SD (n=2-6).

6.4.2.9 Determinierung des 3'-Endes des *hCAT-1*-Promotors

Da gezeigt werden konnte, dass das Exon 1 von *hCAT-1* für die Luciferaseaktivität notwendig ist, erfolgte die weitere Eingrenzung vom 3'-Ende her. Aus diesem Grund wurden zehn neue Konstrukte, basierend auf *DE-5' inCAT*, hergestellt. Hierbei wurde das Intron immer weiter verkürzt, beginnend mit nur noch 1620 bp bis hin zu 45 bp (*I1Δ1 inCAT* - *I1Δ10 inCAT*).

Innerhalb der ersten beiden Deletionskonstrukte *I1Δ1 inCAT* und *I1Δ2 inCAT* konnte im Vergleich zum Ausgangskonstrukt *DE-5' inCAT* eine signifikante Zunahme der Luciferaseaktivität gemessen werden (Abb. 37). In den weiteren Deletionskonstrukten *I1Δ3 inCAT* bis *I1Δ8 inCAT* war die Luciferaseaktivität vergleichbar mit der von *DE-5' inCAT*. Mit der Verkürzung des Introns auf 164 bp (*I1Δ9 inCAT*) oder 45 bp (*I1Δ10 inCAT*) war die Promotoraktivität nahezu vergleichbar mit der Negativkontrolle ohne Promotor. Eine interferenzstatistische Analyse zeigte jedoch, dass die Luciferaseaktivität von *I1Δ9 inCAT* und *I1Δ10 inCAT* dennoch signifikant höher war als die der Negativkontrolle.

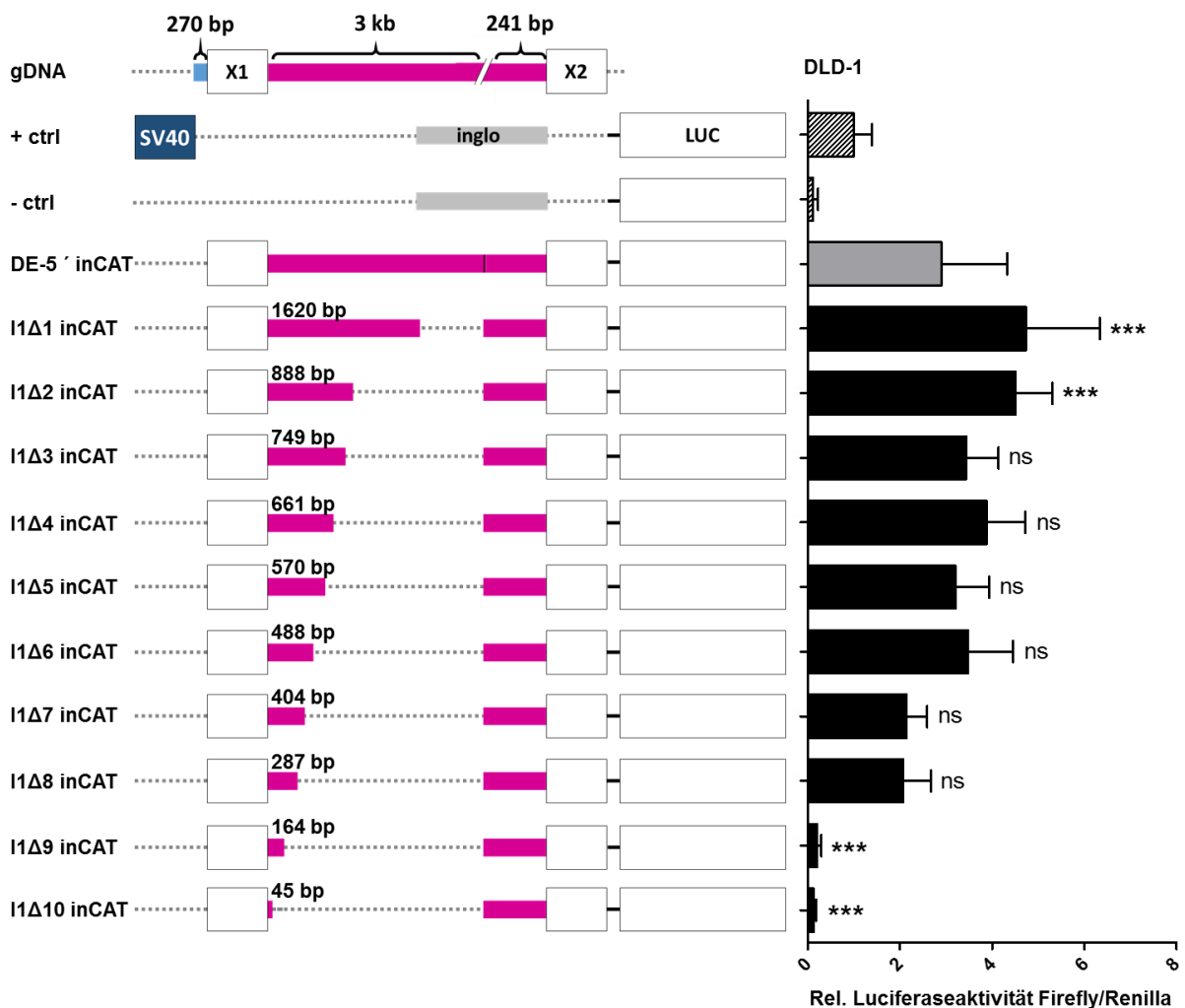


Abb. 37: Erste 287 bp des Introns 1 von hCAT-1 sind essentiell für die Luciferaseaktivität.

DLD-1-Zellen wurden ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80% wachsen gelassen. Danach wurden die Ansätze mit dem zu analysierenden Plasmid zusammen mit *pRL-EF1α* co-transfiziert und für 24 h inkubiert. Nach Beendigung des Versuchszeitraums wurden die Proben über LUC-Analysen auf deren relative Luciferaseaktivität überprüft. Als Positivkontrolle (+ ctrl) diente *pGL3 control inglo ASV40* und für die Negativkontrolle (- ctrl) wurde *pGL3 basic inglo* eingesetzt. Die Daten wurden durch den Mittelwert von + ctrl der entsprechenden Versuchsreihe geteilt und sind gezeigt als Mittelwert + SD (n=12-44). Bei der interferenzstatistischen Analyse (1way ANOVA mit Bonferroni-Posttest) wurden alle Werte der Konstrukte gegen den von *DE-5' inCAT* (ns $p > 0,05$, *** $p < 0,001$) getestet. Anschließend erfolgte eine weitere interferenzstatistische Analyse zwischen - ctrl und *I1Δ9 inCAT* sowie - ctrl und *I1Δ10 inCAT*, die in beiden Fällen einen signifikanten Unterschied ergab ($p < 0,001$).

6.4.2.10 Teilbereiche von Exon 1 sind wichtig für die Luciferaseaktivität

Für eine weitere 5'-Eingrenzung des Promotors wurden in *I1Δ6 inCAT* Teile des Exons 1 deletiert, sodass das Exon von 273 bp auf entweder 152 bp (*X1Δ2 inCAT*) oder 78 bp (*X1Δ3 inCAT*) verkürzt wurde.

Abb. 38 zeigt, dass das Herausschneiden der ersten 121 bp von Exon 1 (*X1Δ2 inCAT*) nicht zu Abnahme der Luciferaseaktivität führte, sondern zu einer signifikanten Zunahme. Die Deletion weiterer 74 bp (*X1Δ3 inCAT*) reduzierte die Aktivität drastisch, sodass *X1Δ3 inCAT* eine schwächere Luciferaseaktivität aufwies als die Positivkontrolle. Im Vergleich zur Negativkontrolle war die Aktivität allerdings immer noch signifikant erhöht.

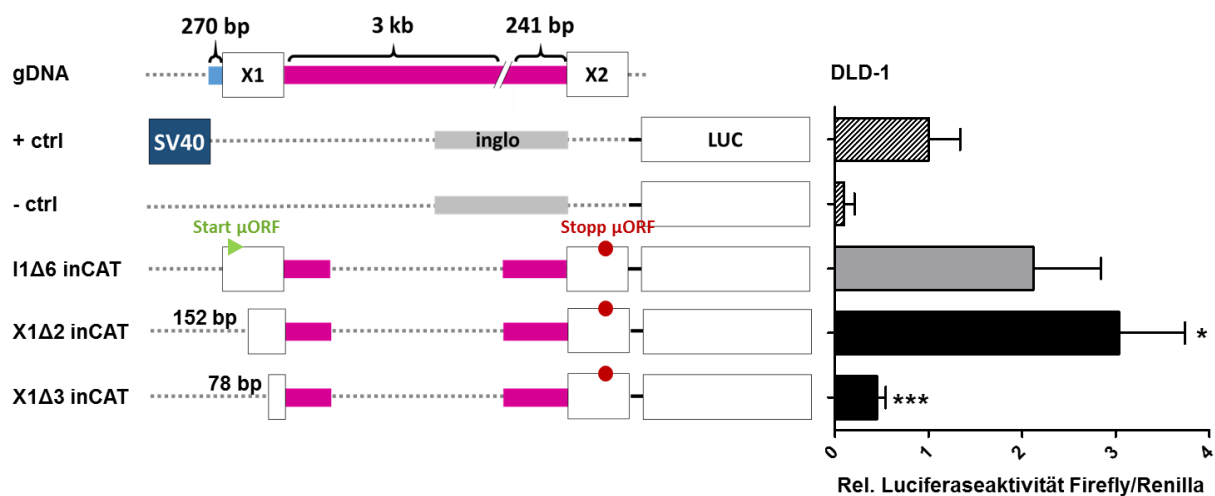


Abb. 38: 3'-Ende des hCAT-1-Exons 1 hat einen starken Einfluss auf die Luciferaseaktivität.

DLD-1-Zellen wurden ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80% wachsen gelassen. Danach wurden die Ansätze mit dem zu analysierenden Plasmid zusammen mit *pRL-EF1α* co-transfiziert und für 24 h inkubiert. Nach Beendigung des Versuchszeitraums wurden die Proben über LUC-Analysen auf deren relative Luciferaseaktivität überprüft. Als Positivkontrolle (+ ctrl) diente *pGL3 control inglo ASV40* und für die Negativkontrolle (- ctrl) wurde *pGL3 basic inglo* eingesetzt. Die Daten wurden durch den Mittelwert von + ctrl der entsprechenden Versuchsreihe geteilt und sind gezeigt als Mittelwert + SD (n=4-28). Bei der interferenzstatistischen Analyse (1way ANOVA, Bonferroni-Posttest) wurde die Werte von *X1Δ2 inCAT* und *X1Δ3 inCAT* gegen den von *I1Δ6 inCAT* (* p < 0,05, *** p < 0,001) getestet. Des Weiteren erfolgte eine interferenzstatistische Analyse (beidseitiger ungepaarter t-Test) zwischen - ctrl und *X1Δ3 inCAT*, welche einen signifikanten Unterschied ergab (p < 0,001). Zusätzlich sind das Startcodon (grün) und das Stoppcodon (rot) des μ ORFs in hCAT-1 eingesehnet.

6.4.3 Putative cis-regulatorische Elemente im eingegrenzten Bereich in dem sich der hCAT-1-Kernpromotor befindet

Anhand der in Kapitel 6.4.2 durchgeführten Versuche konnte der Bereich, in dem sich der Kernpromotor von hCAT-1 aufhält, auf einen Abschnitt von 365 bp, beginnend in den letzten 78 bp von Exon 1 und endend nach den ersten 287 bp von Intron 1, eingegrenzt werden (Abb. 39). Innerhalb dieses Bereichs findet man anhand ihrer Konsensussequenz viele putative cis-regulatorische DNA-Elemente, die zur Steuerung der Transkription von hCAT-1 beitragen können. Darunter befindet sich im Ende von Exon 1 eine putative Bindestelle für den Transkriptionsfaktor AP2 (Konsensus: GCCNNGGC). Im Intron 1 sind zwei GC-Boxen (Konsensus:

GGGCGG), eine putative INE-Sequenz (Konsensus: TGATGCAAC) und mehrere mögliche Initiator-Sequenzen (Konsensus: YYANWYY). Dahingegen konnten keine Sequenzen für die putativen Kernpromotorelemente TATA-Box (Konsensus: TATAAA, TATAAWWR oder HWHWWWWR), *downstream promoter element* (DPE; Konsensus: RGWCGTG), *motif ten element* (MTE; Konsensus CSARCSSAACGS), *downstream TFIIIB recognition element* (BRE^u; Konsensus: RTDKKKK) oder *upstream TFIIIB recognition element* (BRE^d; Konsensus: SSRCGCC) sowie das proximale Kernpromotorelement CAT-Box (Konsensus: GGCCAATCT) gefunden werden. Die Bedeutung der einzelnen Elemente wird in Kapitel 7.2.5 erläutert.

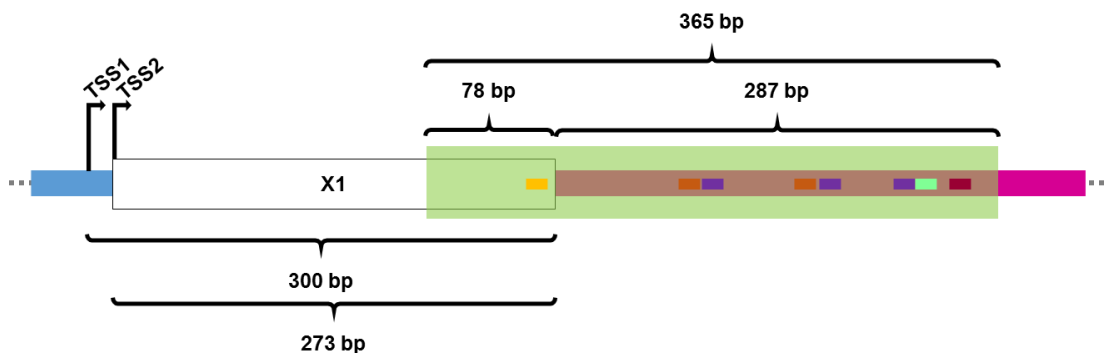


Abb. 39: Putative *cis*-regulatorische Elemente im eingegrenzten Bereich des Kernpromotors von hCAT-1. Schematische Darstellung des Abschnitts (grün) in dem sich der Kernpromotor von hCAT-1 aufhält und der darin enthaltenen putativen *cis*-regulatorischen DNA-Elemente (Gelb: AP2-Bindestelle, Orange: GC-Box, Lila: Initiatorsequenz, Türkis: BRE^d, Rot: INE). Dieser beginnt 78 bp vor dem Ende von Exon 1 (X1) und endet nach den ersten 287 bp im Intron 1 (pinke Region). In dieser Abbildung wird der Beginn von Exon 1 mit TSS2 definiert. TSS1 und TSS2: putative Transkriptionsstarts, blaue Region: 5'-flankierende genomische Sequenz, pinke Region: Intron 1, X1: Exon 1.

6.4.4 Luciferaseaktivität der Promotorkonstrukte ist auch in T-Zellen nachweisbar

In DLD-1-Kolonkarzinomzellen war es möglich den hCAT-1-Promotors über LUC-Analysen zu detektieren. Das Ziel dieser Arbeit war neben dem Auffinden des Promotors auch die Aufklärung der Promotorregulation in T-Lymphozyten. Deshalb wurde im nächsten Schritt versucht, die T-Zellen mit den bereits in DLD-1-Zellen etablierten Promotorkonstrukten zu transfizieren. Dies wurde mit *DE inCAT* durchgeführt, dem Promotorkonstrukt mit der höchsten gemessenen Aktivität. In den T-Zellen war von einem geringen Transfektionserfolg auszugehen. Daher bot das erwähnte Plasmid die größte Wahrscheinlichkeit auch in diesem schwierigeren Zellsystem Luciferaseaktivität zu messen.

Pro Versuchsansatz wurden 2×10^6 primäre humane T-Zellen mit an Metallkügelchen gekoppelte CD3/CD28-Antikörper und einer Zugabe von IL-2 (600 U/ml) vorstimuliert. 72 h später wurde eine Co-Transfektion (Kapitel 5.5.20) mit den Plasmiden *DE inCAT* und *pRHCglo* durchgeführt. Es folgte eine weitere Inkubation der T-Zellen von 24 h mit IL-2. Danach wurden die Zellen erneut über an Metallkügelchen gekoppelte CD3/CD28-Antikörper für 24 h stimuliert.

Reporteranalysen ergaben in den primären humanen T-Lymphozyten für *DE inCAT* eine etwa 18-fach höhere Promotoraktivität als für die Positivkontrolle (Abb. 40). In DLD-1-Zellen war sie im Vergleich zur Positivkontrolle nur 6-fach erhöht (Abb. 31).

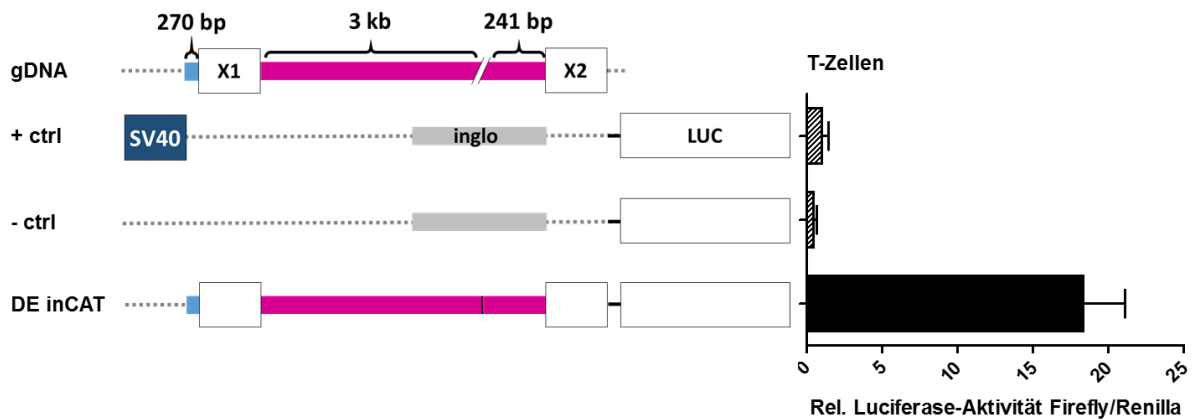


Abb. 40: Luciferaseaktivität von *DE inCAT* ist auch in T-Zellen nachweisbar.

Primäre humane T-Lymphozyten wurden mit IL-2 (600 U/ml) und mit an Metallkugeln gekoppelte CD3/CD28-Antikörper in RPMI co-stimuliert. Nach 72 h erfolgte eine Co-Transfektion über Elektroporation mit dem zu analysierenden Plasmid und dem Plasmid *pRL-EF1 α* in Opti-MEM-Medium. Im Anschluss wurden die Zellen erneut mit IL-2 für 24 h inkubiert und danach erneut für weitere 24 h mit an Metallkugeln gekoppelte CD3/CD28-Antikörper co-stimuliert. Nach Beendigung des Versuchszeitraums wurden die Proben über LUC-Analysen auf deren relative Luciferaseaktivität überprüft. Als Positivkontrolle (+ ctrl) diente *pGL3 control inglo ASV40* und für die Negativkontrolle (- ctrl) wurde *pGL3 basic inglo* eingesetzt. Die Daten wurden durch Wert von + ctrl der entsprechenden Versuchsreihe geteilt und sind gezeigt als Mittelwert + SD (n=2).

Da die T-Zellen durch die Vorstimulation zum Zeitpunkt der Transfektion immer noch stimuliert waren und somit eine Induktion des Promotors in den Promotorkonstrukten nicht studiert werden konnte, wurde der Versuchsablauf verändert. Hierfür wurden die Zellen, statt wie zuvor für 72 h, für 168 h (7 Tage) nach der Transfektion inkubiert, um sie bis zur erneuten Stimulation wieder in den Ruhezustand zu bringen. Die in diesen Proben gemessene Luciferaseaktivität war im Vergleich zu den über 72 h inkubierten T-Zellen etwa um die Hälfte niedriger (Daten nicht gezeigt). Zudem konnte immer noch kein Unterschied zwischen restimulierten und nicht-restimulierten Zellen detektiert werden.

6.4.5 Signalwege in T-Zellen: hCAT-1-Expression wird durch NF- κ B-Inhibition stark verringert

Neben Luciferase-Reporteranalysen gibt es noch andere Ansätze, um die transkriptionelle Regulation eines Gens zu erforschen. Einer davon ist herauszufinden, welche Signalkaskaden an der Aktivierung oder auch Deaktivierung der Transkription beteiligt sind. Die Beteiligung einzelner Proteine kann mit dem Einsatz von spezifischen Inhibitoren untersucht werden. Da sich innerhalb dieser Arbeit mit der Aufklärung der hCAT-1-Regulation in T-Zellen beschäftigt wurde, wurden die Inhibitoren für die Signalproteine AKT (Genname der Proteinkinase B), Calcineurin, NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*) und PKC (Proteinkinase C) eingesetzt. Die genannten Proteine spielen eine wichtige Rolle in zentralen Signalwegen zur Aktivierung

des T-Zell-Rezeptors in T-Lymphozyten. Sie beeinflussen auch die mRNA-Expression von Interleukin-2 (Huse 2009). Aus diesem Grund wurde die mRNA-Expression von IL-2 zur Überprüfung der Inhibition genutzt.

Für die Versuche wurden pro Ansatz 5×10^6 primäre humane T-Zellen in 96-Rundboden-Loch-Platten mit RPMI-Medium ausgesät. Diese wurden für 1 h mit dem Inhibitor AKT-i (AKT inhibitor VIII; 4 μ M; 0,04% DMSO), Calcineurin-i (Cyclosporin A; 1 μ M; 0,05% DMSO), NF- κ B-i (Bay 11-7082; 5 μ M; 0,04% DMSO) oder PKC-i (Gö 6983; 1 μ M; 0,1% DMSO) vorinkubiert (Kapitel 5.3.6). Anschließend wurde für 3 h mit an Metallkugeln gekoppelte CD3/CD28-Antikörper stimuliert (Kapitel 5.3.7). Als Kontrollen dienten entweder gänzlich unbehandelte und unstimulierte Zellen, oder Zellen die nur mit 0,1% DMSO vorbehandelt und dann stimuliert wurden. Zur Analyse der hCAT-1- und IL-2-mRNA wurde aus den Proben Gesamt-RNA isoliert (Kapitel 5.5.15), in cDNA umgeschrieben (Kapitel 5.5.16) und diese mittels qRT-PCR (Kapitel 5.5.17) analysiert. Hierbei diente B2M der Normierung.

Die Inhibition von AKT hatte keine Auswirkung auf die mRNA-Expression von hCAT-1 (Abb. 41 A). Auch bei der Hemmung von Calcineurin und PKC konnten keine Unterschiede gemessen werden. Nur durch die Zugabe von NF- κ B-i wurde eine signifikante Reduktion bewirkt. Die IL-2-Expression war bei der Inhibition von Calcineurin, NF- κ B und PKC stark vermindert (Abb. 41 B), sodass davon auszugehen ist, dass in diesen Zellen die entsprechende Hemmung stattgefunden hat. Zwar konnte auch bei der AKT-Inhibition eine signifikante Reduktion der IL-2-mRNA nachgewiesen werden, jedoch war diese nicht vollständig. Aus diesem Grund wurde der Phosphorylierungsgrad von AKT mittels Western Blot überprüft. AKT ist eine Kinase, die bei Aktivierung an Serin 473 (Ser473) und Threonin 308 (Thr308) phosphoryliert wird (Coffer et al. 1998). Wird die Kinase mit AKT-i gehemmt, kann sie nicht mehr phosphoryliert werden und bleibt somit inaktiv. Für Proteinanalysen wurde nach dem Versuchsende ein Zelllysate unter Zugabe eines Phosphataseinhibitors hergestellt (Kapitel 5.4.1). Im Anschluss wurde das Zelllysate über Western Blot-Analysen (Kapitel 5.4.3) mit den spezifischen Antikörpern pAKT Thr308, pAKT Ser473 sowie AKT pan (Gesamtprotein von AKT) detektiert. Dabei diente GAPDH als Ladekontrolle.

In Abb. 41 C zeigt sich, dass die AKT-Inhibition zu einer massiven Reduktion des Phosphorylierungsgrades von Thr308 und Ser473 führt. Dahingegen bleibt das AKT-Gesamtprotein unverändert.

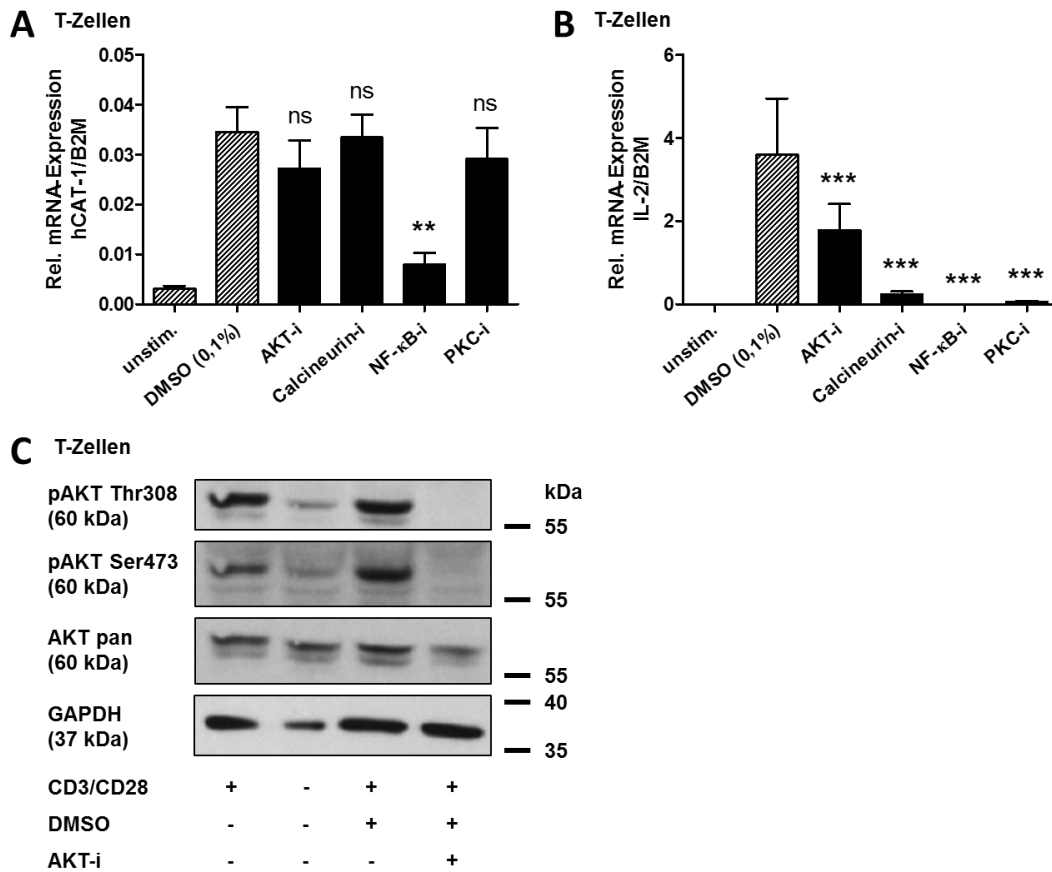


Abb. 41: Auswirkungen verschiedener Inhibitoren auf die Expression von hCAT-1 und IL-2 in T-Zellen.

Primäre humane T-Zellen wurden in RPMI für 1 h mit den Inhibitoren AKT-i (AKT inhibitor VIII; 4 µM; 0,04% DMSO), Calcineurin-i (Cyclosporin A; 1 µM; 0,05% DMSO), NF-κB-i (Bay 11-7082; 5 µM; 0,04% DMSO) oder PKC-i (Gö 6983; 1 µM; 0,1% DMSO) vorinkubiert. Danach erfolgte eine Stimulation für 3 h mit an Metallkugeln gekoppelte CD3/CD28-Antikörper. Die Bestimmung der mRNA von hCAT-1 (A) und IL-2 (B) erfolgte mittels qRT-PCR und wurde jeweils entsprechenden B2M-Werte normiert. Die Daten werden gezeigt als Mittelwert + SD (n=5-8) und wurden durch die DMSO-Kontrolle der entsprechenden Versuchsreihe geteilt. In der interferenzstatistischen Analyse (1way ANOVA mit Dunnett-Posttest) wurde der Wert der DMSO-Kontrolle gegen alle Werte der mit Inhibitor behandelten Proben getestet (ns p > 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001). Um die Funktion des Inhibitors AKT-i zu überprüfen wurden ebenfalls Western Blot-Analysen mit Antikörpern gegen pAKT Thr308, pAKT Ser473, AKT pan durchgeführt (C). Hierbei wurde das Haushaltsgen GAPDH zur Normierung verwendet.

6.4.6 Inhibition von NF-κB vermindert auch die Luciferaseaktivität und mRNA-Expression

Die Inhibition von NF-κB in T-Zellen bewirkte eine deutliche Reduktion der mRNA-Expression von hCAT-1 (Abb. 41). Anlässlich dieser Ergebnisse stellte sich die Frage, ob NF-κB auch Einfluss auf die Luciferaseaktivität in den hCAT-1-Promotorkonstrukten hat.

Um das herauszufinden, wurden 8×10^5 DLD-1-Zellen mit 500 µl DMEM-Normalmedium in 24-Loch-Platten ausgesät. Nach ca. 24 h und einer Konfluenz von 80% erfolgte eine Vorinkubation der Zellen mit 10 µM NF-κB-i (0,083% DMSO) in DMEM-Normalmedium. Darauf folgend wurden die Zellen in Anwesenheit von 10 µM NF-κB-i mit *DE inCAT* oder *l1Δ8 inCAT* (Herstellung und Beschreibung siehe Anhang B) und zusätzlich mit entweder *pRL-EF1α* (für LUC-Analysen) oder *pRHCglo* (für mRNA-Analysen) für 8 oder 24 h co-transfiziert (Kapitel 5.5.19). Als Kontrolle dienten transfizierte unbehandelte Zellen und transfizierte Zellen, die statt des

Inhibitors mit 0,083% DMSO behandelt wurden. Nach dem Abstoppen der Versuchsansätze wurde über LUC-Analysen (Kapitel 5.5.21) die Luciferaseaktivität oder qRT-PCR-Analysen (Kapitel 5.5.17) die mRNA-Expression der Promotorkonstrukte bestimmt. Zusätzlich erfolgte auch eine Analyse der endogenen hCAT-1-mRNA-Expression mit Hilfe einer qRT-PCR-Analyse.

Die mit *DE inCAT* (Abb. 42 C) transfizierten Zellen, welche mit dem NF-κB-Inhibitor behandelt wurden, zeigten eine deutlich reduzierte Luciferaseaktivität im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Abb. 42 A). Auf mRNA-Ebene erfolgte eine noch stärkere Verminderung (Abb. 42 B). Auch in dem kleineren Promotorkonstrukt *11Δ8 inCAT* wurde eine signifikante Abnahme der Aktivität ermittelt (Abb. 43 A). Eine Bestimmung der endogenen hCAT-1-mRNA in den transfizierten Zellen brachte keine auswertbaren Ergebnisse, da der Inhibitor auch immer Auswirkungen auf die beiden gemessenen Haushaltsgene GAPDH und 18 S RNA hatte. Somit konnten die Versuche nicht normiert und auch nicht ausgewertet werden. Auch die Betrachtung der unnormierten Werte für die endogene hCAT-1-Expression zeigten kein eindeutiges Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

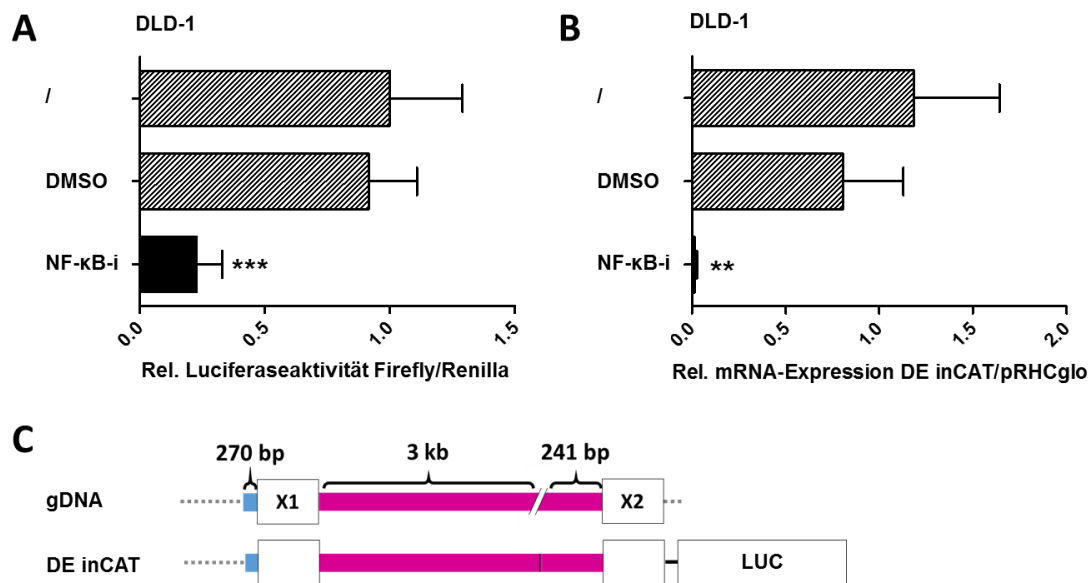


Abb. 42: NF-κB-Inhibition vermindert die Luciferaseaktivität und mRNA-Expression von *DE inCAT*.

DLD-1-Zellen wurden ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80% wachsen gelassen. Dann erfolgte eine Vorinkubation mit NF-κB-i (10 μM, gelöst in 0,083% DMSO). Nach 1 h wurden die Ansätze unter Anwesenheit von NF-κB-i mit *DE inCAT* und *pRL-EF1α* co-transfiziert und für 8 h inkubiert. Als Kontrollen dienten Zellen, die entweder unbehandelt blieben oder DMSO (0,083%) erhielten. **A** Nach Beendigung des Versuchszeitraums wurden die Proben über LUC-Analysen auf deren relative Luciferaseaktivität überprüft. Die Daten wurden durch den Mittelwert der unbehandelten Zellen der entsprechenden Versuchsreihe geteilt und sind gezeigt als Mittelwert + SD (n=9-12). Die interferenzstatistische Analyse (beidseitiger ungepaarter t-Test) wurde zwischen den Werten der DMSO-Kontrolle und denen der mit Inhibitor behandelten Zellen durchgeführt (***) ($p < 0,001$). **B** Nach Abstoppen der Proben wurden die mRNA-Expression der Firefly-Luciferase über qRT-PCR-Analysen überprüft. Dabei wurde auf *pRHCglo* normiert. Die Daten wurden durch den Mittelwert der unbehandelten Zellen geteilt und sind gezeigt als Mittelwert + SD (n=3-5). Die interferenzstatistische Analyse (beidseitiger ungepaarter t-Test) wurde zwischen den Werten der DMSO-Kontrolle und denen der mit Inhibitor behandelten Zellen durchgeführt (** $p < 0,01$). **C** stellt das Plasmid dar, welches zusammen mit dem jeweiligen Kontrollplasmid co-transfiziert wurde.

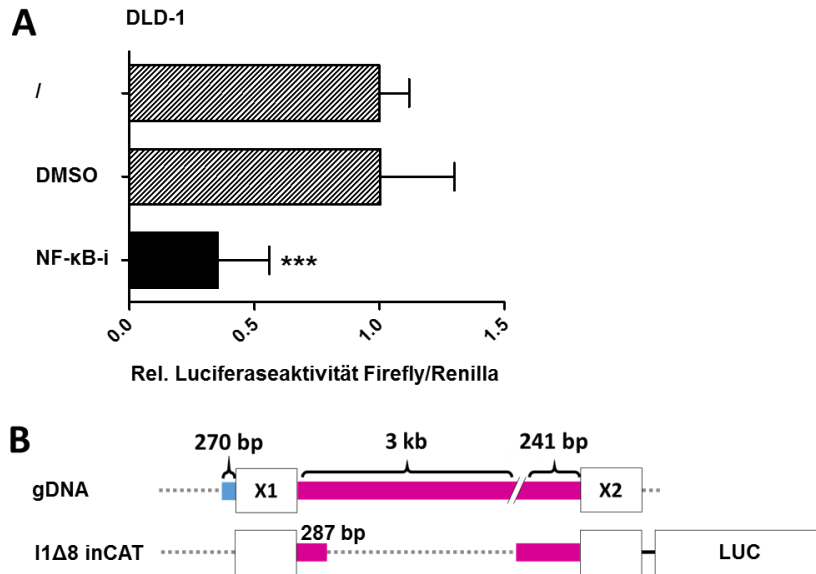


Abb. 43: NF-κB-Inhibitor vermindert die Luciferaseaktivität in *I1Δ8 inCAT*.

DLD-1-Zellen wurden ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80% wachsen gelassen. Dann erfolgte eine Vorinkubation mit NF-κB-i (10 μM, gelöst in 0,083% DMSO). Nach 1 h wurden die Ansätze unter Anwesenheit von NF-κB-i mit *I1Δ8 inCAT* und *pRL-EF1α* co-transfiziert und für 24 h inkubiert. Als Kontrollen dienten Zellen, die entweder unbehandelt blieben oder DMSO (0,083%) erhielten. **A** Nach Beendigung des Versuchszeitraums wurden die Proben über LUC-Analysen auf deren relative Luciferaseaktivität überprüft. Die Daten wurden durch den Mittelwert der unbehandelten Zellen der entsprechenden Versuchsreihe geteilt und sind gezeigt als Mittelwert + SD (n=8). Die interferenzstatistische Analyse (beidseitiger ungepaarter t-Test) wurde zwischen den Werten der DMSO-Kontrolle und denen der mit Inhibitor behandelten Zellen durchgeführt (***) $p < 0,001$. **B** stellt das Plasmid dar, welches zusammen mit dem Kontrollplasmid co-transfiziert wurde.

6.4.7 Aufspüren von NF-κB-Bindestellen im hCAT-1-Gen

Nachdem die Hemmung des Transkriptionsfaktors NF-κB in T-Zellen Einfluss auf die Expression des endogenen hCAT-1 zeigte (Abb. 41) und auch die Luciferaseaktivität bei dem Promotorkonstrukt *DE inCAT* in DLD-1-Zellen herunterreguliert wurde (Abb. 42 A und B), ist es möglich, dass NF-κB als direkter Aktivator die hCAT-1-Expression beeinflusst. Um den genauen Mechanismus aufzuklären, wurde nach möglichen Bindestellen für den Transkriptionsfaktor gesucht. Diese sollten dann mutiert werden, sodass ein Binden von NF-κB verhindert werden würde. Sollte es dann in den mutierten Promotorkonstrukten zu einer Verminderung der Luciferaseaktivität kommen, spräche das für eine direkte Aktivierung der hCAT-1-Expression durch NF-κB.

6.4.7.1 Keine Bindestellen im Bereich des Kernpromotors über Analyse mit Konsensussequenz von NF-κB aufspürbar

Eine Möglichkeit, nach putativen Bindestellen für einen bestimmten Transkriptionsfaktor zu suchen, ist die Sichtung der Gensequenz nach der Konsensussequenz. Diese ist für NF-κB GGGRNNYYCC (Chen et al. 1998). Hierbei steht ein „R“ für die Basen Adenin oder Guanin, „Y“ kennzeichnet entweder Cytosin oder Thymin und ein „N“ kann jeder der vier Basen Adenin, Thymin, Cytosin oder Guanin entsprechen.

Bei der Eingrenzung des Promotors von der 3'-Seite aus (Kapitel 6.4.2.9) stellte sich heraus, dass das Konstrukt *I1Δ9 inCAT* mit einer Intronlänge von 164 bp kaum noch Luciferaseaktivität zeigte, wohingegen *I1Δ8 inCAT* mit 287 bp Intronsequenz immer noch stark aktiv war. Zudem führte die Inhibition von NF-κB in *I1Δ8 inCAT* zu einer Reduktion der Luciferaseaktivität (Abb. 43). Daher war zu vermuten, dass ein wichtiges Element des Promotors und damit vielleicht auch eine Bindestelle von NF-κB zwischen 164 und 287 bp im Intron 1 liegt. Bei der Suche nach einer NF-κB-Konsensussequenz konnten insgesamt 18 verschiedene putative NF-κB-Bindestellen innerhalb des hCAT-1-Gens ausgemacht werden (Abb. 44). Innerhalb dieses Bereichs zwischen 164 und 287 bp im Intron 1 gab es jedoch keine putative NF-κB-Bindestelle, die über die Konsensussequenz auszumachen war.

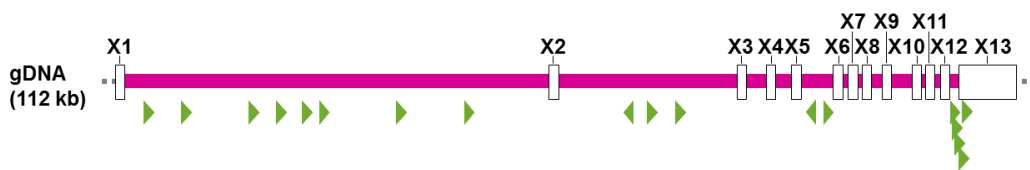


Abb. 44: Analyse des hCAT-1-Gens auf putative NF-κB-Bindestellen.

Die DNA-Sequenz des hCAT-1-Gens wurde nach der Konsensussequenz GGGRNNYYCC (Chen et al. 1998) zur Bindung von NF-κB untersucht. Dabei wurden insgesamt 18 mögliche Bindestellen, hier markiert mit grünen Pfeilen, innerhalb des Gens identifiziert. Die Richtung des Pfeils gibt die Orientierung der Bindestelle an.

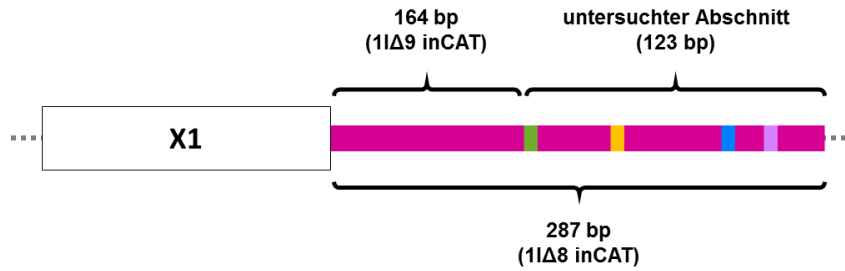
6.4.7.2 Sequenzanalyse durch P-Match zeigt mehrere mögliche Bindestellen für NF-κB

Da in dem Bereich zwischen 164 und 287 bp im Intron 1 keine mögliche Bindestelle für NF-κB mit Hilfe der Konsensussequenz auffindbar war, wurde eine andere Methode zur Detektion angewandt. Dabei handelt es sich um das Programm P-Match (Chekmenev et al. 2005), welches einen Algorithmus benutzt, der die Wahrscheinlichkeit der Bindung eines bestimmten Transkriptionsfaktors an die DNA berechnet, wobei bis zu einem gewissen Grad auch Nicht-Übereinstimmungen zugelassen werden.

In den Einstellungen wurde die Matrixähnlichkeit, welche ein Maß für die Übereinstimmung zwischen der Sequenz und der Konsensussequenz ist, auf 0,95 gesetzt. Dieser Wert wurde auch bei der Kernähnlichkeit eingesetzt. Die Kernähnlichkeit ist ein Maß für die Übereinstimmung zwischen der Sequenz und der Kernsequenz einer Konsensussequenz, die aus den fünf am stärksten konservierten aufeinanderfolgenden Positionen in einer Konsensussequenz besteht.

P-Match fand innerhalb des untersuchten Abschnitts vier putative Bindestellen für NF-κB-Isoformen (Abb. 45). 236-245 bp von Exon 1 entfernt befand sich die Bindestelle mit der höchsten Kern- und Matrixähnlichkeit. Daher war es am wahrscheinlichsten, dass diese auch einer realen Bindestelle für NF-κB entspricht. Innerhalb der gleichen Analyse wurden noch weitere mögliche Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren E2-alpha, HLF (*hepatic leukemia factor*)

und Evi-1 (*ecotropic virus integration site 1*) identifiziert. Diese wurden jedoch nicht weiter untersucht.



Bindestelle für NF-κB-Isoform	Matrixähnlichkeit	Kernähnlichkeit	Lokalisation (Entfernung zu X1)
NF-κB (■)	0,951	0,986	165-174 bp
c-Rel (■)	0,954	0,963	194-203 bp
c-Rel (■)	0,972	1	236-245 bp
c-Rel (■)	0,964	0,968	253-262 bp

Abb. 45: P-Match-Analyse von putativen NF-κB-Bindestellen.

Mit Hilfe des Programms P-Match (Chekmenev et al. 2005) wurde, unter Einstellung der Parameter Matrix- und Kernähnlichkeit auf einen *cut-off* von 0,95, die Sequenz im Bereich von 165-287 bp stromaufwärts vom Exon 1 untersucht. Dabei wurden vier verschiedene NF-κB-Bindestellen gefunden (markiert in grün, orange, blau oder violett). Die Matrixähnlichkeit ist ein Maß für die Übereinstimmung zwischen der Sequenz und der Konsensussequenz. Die Kernähnlichkeit ist ein Maß für die Übereinstimmung zwischen der Sequenz und der Kernsequenz einer Konsensussequenz, die aus den fünf am stärksten konservierten aufeinanderfolgenden Positionen in einer Konsensussequenz besteht.

6.4.7.3 Mutation von putativer NF-κB-Bindestelle reduziert die Luciferaseaktivität und mRNA-Expression in DLD-1-Zellen

Um die über P-Match gefundene Bindestelle mit der höchsten Kern- und Matrixähnlichkeit zu zerstören, wurde daraus über die Mutation von fünf Basen eine NotI-Schnittstelle in *11Δ8 inCAT* hergestellt (Abb. 46), sodass das Promotorkonstrukt *mNF-κB inCAT* entstand. Der Austausch bewirkte, dass die putative NF-κB-Bindestelle somit nicht mehr in P-Match auffindbar war. Die genaue Herstellung und eine Beschreibung des Plasmids ist Anhang B zu entnehmen.

Bindestelle vor Mutation: C C T G A A A C
 Bindestelle nach Mutation: G C G G C C G C

Abb. 46: Mutation von putativer NF-κB-Bindestelle in eine NotI-Schnittstelle.

Dargestellt ist die durchgeführte Mutation einer durch P-Match identifizierten putativen NF-κB-Bindestelle in eine Schnittstelle für NotI (rote Umrahmung). Diese Bindestelle zeigte die höchste Kern- und Matrixähnlichkeit. Hierfür wurden fünf einzelne Basen (blau) ausgetauscht. Dieser Austausch bewirkte, dass die putative NF-κB-Bindestelle somit nicht mehr in P-Match auffindbar war.

In den LUC-Analysen führte die Mutation der möglichen NF-κB-Bindestelle zu einer Halbierung der Luciferaseaktivität, sodass sie nun mit der Aktivität der Positivkontrolle *pGL3 control inglo ASV40* vergleichbar war (Abb. 47). Die Dezimierung der hCAT-1-Expression konnte auch auf mRNA-Ebene beobachtet werden (Abb. 48). Hierbei kam es sogar zu einer Reduktion auf ein

Drittel der ursprünglichen Aktivität ohne Mutation. Aufgrund der geringen n-Zahl für das Promotorkonstrukt *mNF-κB inCAT* konnte jedoch keine interferenzstatistische Analyse durchgeführt werden.

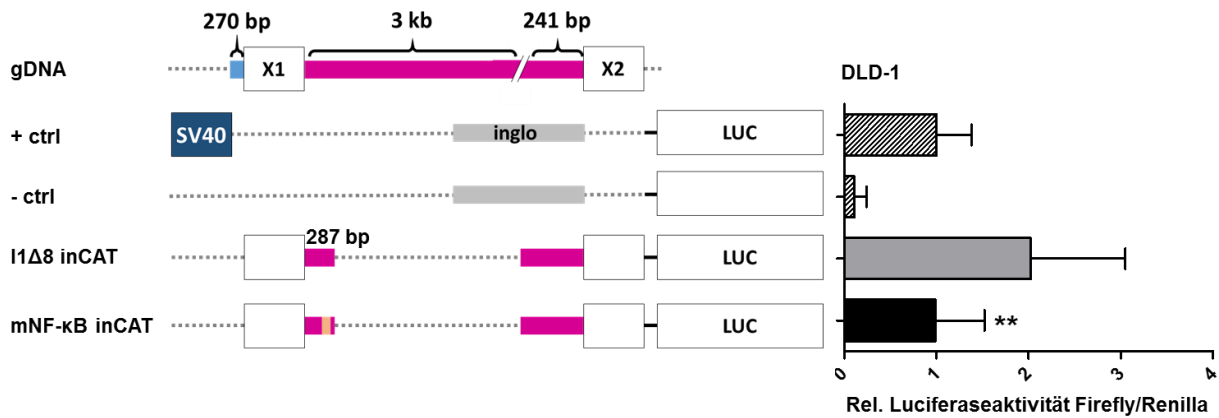


Abb. 47: Mutation der Bindestelle von NF-κB mit der höchsten Kern- und Matrixähnlichkeit in *I1Δ8 inCAT* führt zur Reduktion der Luciferaseaktivität.

DLD-1-Zellen wurden ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80% wachsen gelassen. Danach wurden die Ansätze mit dem zu analysierenden Plasmid zusammen mit *pRL-EF1α* co-transfiziert und für 24 h inkubiert. Nach Beendigung des Versuchszeitraums wurden die Proben über LUC-Analysen auf deren relative Luciferaseaktivität überprüft. Als Positivkontrolle (+ ctrl) diente *pGL3 control inglo ASV40* und für die Negativkontrolle (- ctrl) wurde *pGL3 basic inglo* eingesetzt. Die Daten wurden durch den Mittelwert von + ctrl der entsprechenden Versuchsreihe geteilt und sind gezeigt als Mittelwert + SD (n=12). Die interferenzstatistische Analyse (beidseitiger ungepaarter t-Test) wurde zwischen *I1Δ8 inCAT* und *mNF-κB inCAT* durchgeführt (** p < 0,01).

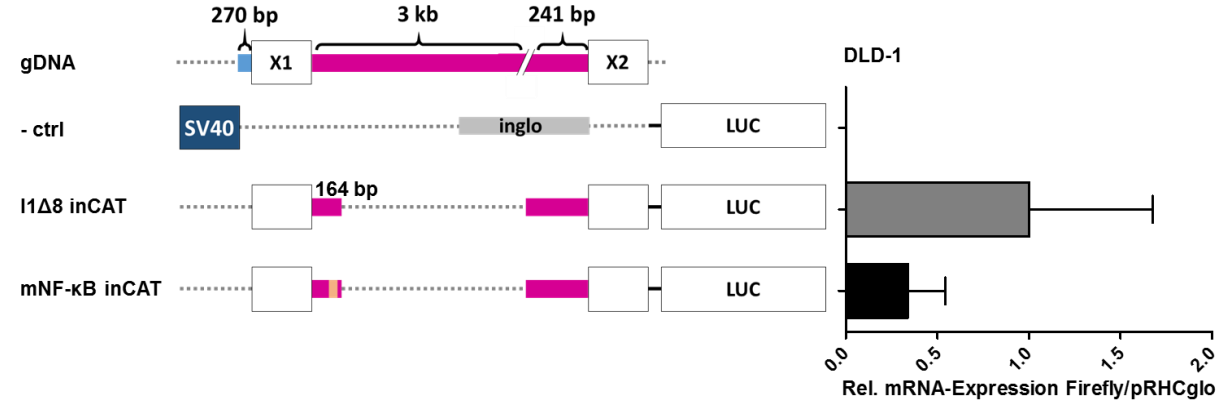


Abb. 48: Mutation der Bindestelle von NF-κB mit der höchsten Kern- und Matrixähnlichkeit in *I1Δ8 inCAT* führt zur Reduktion der mRNA.

DLD-1-Zellen wurden ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80% wachsen gelassen. Danach wurden die Ansätze mit dem zu analysierenden Plasmid zusammen mit *pRHCglo* co-transfiziert und für 24 h inkubiert. Nach Beendigung des Versuchszeitraums wurden die Proben über qRT-PCR-Analysen auf deren relative mRNA-Expression der Firefly-Luciferase überprüft. Dabei wurde auf die jeweiligen *pRHCglo*-Werte normiert. Als Kontaminationskontrolle (- ctrl) diente *pGL3 control inglo ASV40*. Die Daten wurden durch den Mittelwert von *I1Δ8 inCAT* der entsprechenden Versuchsreihe geteilt und sind gezeigt als Mittelwert + SD (n=2-6).

6.4.8 Translationsinhibition in primären humanen T-Zellen vermindert stark die mRNA-Expression von hCAT-1

Bei der Eingrenzung möglicher positiver oder negativer Regulatoren von hCAT-1 in T-Zellen ist es hilfreich zu wissen, ob diese zuerst neu synthetisiert werden müssen bevor sie hCAT-1

beeinflussen können, oder ob sie schon in der Zelle vorhanden sind und nur auf ein Signal „warten“, welches sie aktiviert. Um das herauszufinden, wurde der Translationshemmer Cycloheximid (CHX) eingesetzt. Dieser Wirkstoff hemmt die Proteinbiosynthese an den Ribosomen, sodass die Entstehung neuer Proteine unterbunden wird.

In den Versuchen wurden pro Ansatz 5×10^6 primäre humane T-Zellen in 96-Rundboden-Loch-Platten mit RPMI-Medium ausgesät. Diese wurden für 1 h mit $10 \mu\text{g/ml}$ CHX (0,001% DMSO) vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen in Anwesenheit von CHX für 3 h mit an Metallkügelchen gekoppelte CD3/CD28-Antikörper stimuliert (Kapitel 5.3.7). Als Kontrollen dienten stimulierte Zellen, die entweder unbehandelt blieben oder 0,001% DMSO als Zugabe erhielten. Zur Analyse der hCAT-1-mRNA wurde aus den Proben Gesamt-RNA isoliert (Kapitel 5.5.15), in cDNA umgeschrieben (Kapitel 5.5.16) und mittels qRT-PCR (Kapitel 5.5.17) bestimmt. Hierfür diente B2M der Normierung.

Die Inhibition der Translation in T-Zellen durch CHX hatte einen starken Einfluss auf die hCAT-1-Expression. Hierbei wurde die mRNA um etwa 90% reduziert.

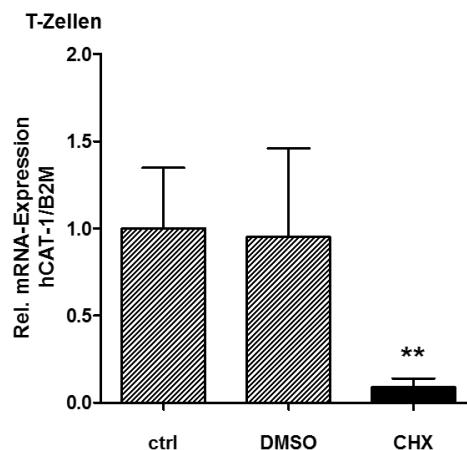


Abb. 49: Translationsinhibition vermindert mRNA-Expression von hCAT-1 in primären humanen T-Zellen. Primäre humane T-Zellen wurden in RPMI für 30 min mit CHX ($10 \mu\text{g/ml}$, 0,001% DMSO) vorinkubiert. Danach erfolgte eine Stimulation über 3 h mit an Metallkügelchen gekoppelte CD3/CD28-Antikörper. Als Kontrollen dienten unbehandelte stimulierte Zellen sowie Zellen, die mit 0,001% DMSO behandelt wurden. Die Bestimmung der mRNA von hCAT-1 erfolgte mittels qRT-PCR und wurde durch den jeweiligen B2M-Wert geteilt. Die Daten werden gezeigt als Mittelwert + SD ($n=6$). Die interferenzstatistische Analyse (beidseitiger ungepaarter t-Test) wurde zwischen den Werten der DMSO-Kontrolle und denen der mit Inhibitor behandelten Zellen durchgeführt (** $p < 0,01$).

6.5 Mutation des μ ORFs hat keine Auswirkung auf die Luciferaseaktivität und mRNA-Expression in DLD-1-Zellen

Bisher wurde sich in dieser Arbeit nur mit der transkriptionellen Regulation von hCAT-1 beschäftigt. Im Promotorkonstrukt *DE inCAT* und allen anderen Konstrukten, die daraus hervorgingen, befand sich auch der vollständige μ ORF. Der μ ORF ist in Ratten vermutlich essentiell

für die Bildung einer IRES, welche zur Initiation der Translation des rCAT-1 unter Aminosäuremangel benötigt wird (Fernandez et al. 2002b; Komar und Hatzoglou 2011). Daher könnte auch der μ ORF in hCAT-1 bei der Translation des Proteins eine Rolle spielen. Um dies zu untersuchen, wurde das Startcodon des μ ORFs zerstört, indem es in eine BlnI-Schnittstelle mutiert wurde (Abb. 50). Hierbei entstanden die Konstrukte *m μ ORF I1 Δ 6 inCAT* und *m μ ORF I1 Δ 8 inCAT*. Die genaue Herstellung und eine Beschreibung der Plasmide ist Anhang B zu entnehmen.

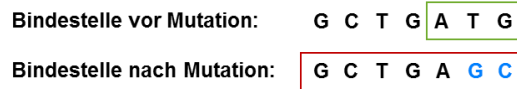


Abb. 50: Mutation des μ ORF-Startcodons.

Dargestellt ist die durchgeführte Mutation des μ ORF-Startcodons (grüner Rahmen) in eine Schnittstelle für BlnI (rote Umrahmung). Hierfür wurden zwei Basen (blau) ausgetauscht.

Um die Promotorkonstrukte zu untersuchen, wurden 8×10^5 DLD-1-Zellen mit 500 μ l DMEM-Normalmedium in 24-Loch-Platten ausgesät. Nach ca. 24 h und einer Konfluenz von 80% erfolgte die Transfektion mit dem zu untersuchenden Plasmid und einem weiteren Kontroll-Plasmid zur Normierung (Kapitel 5.5.19). Nach weiteren 24 h wurden die Zellen lysiert und in Luciferase-Reportergen-Analysen (Kapitel 5.5.21) deren Luciferaseaktivität bestimmt.

Die Mutation des μ ORF-Startcodons in *I1 Δ 6 inCAT* löste weder eine signifikante Ab- noch Zunahme der Luciferaseaktivität aus (Abb. 51). Auch bei dem kürzeren Konstrukt *m μ ORF I1 Δ 8 inCAT* konnte, trotz leichter Abnahme im Mittelwert, keine signifikante Änderung gegenüber dem unmutierten Konstrukt *I1 Δ 8 inCAT* in der Luciferaseaktivität gemessen werden (Abb. 52).

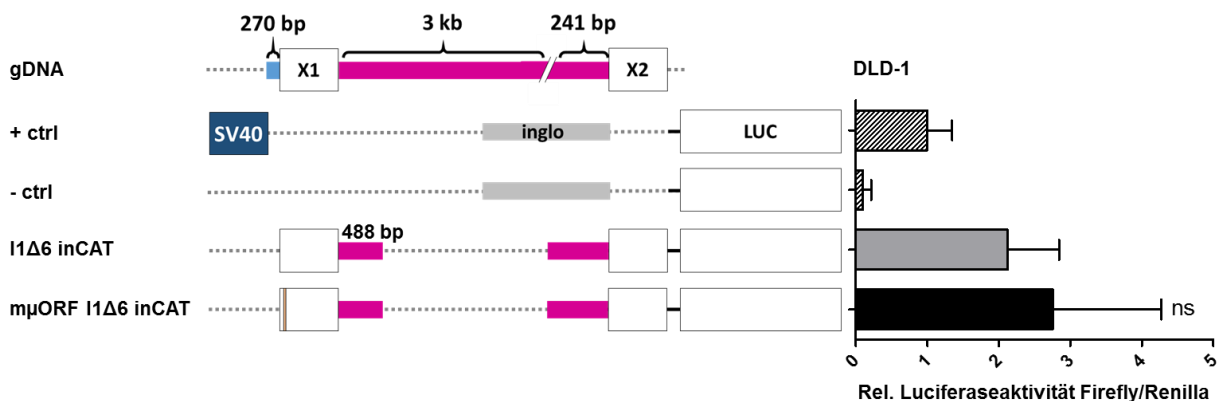


Abb. 51: Mutation des μ ORFs in *I1 Δ 6 inCAT* hat keinen Einfluss auf die Luciferaseaktivität.

DLD-1-Zellen wurden ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80% wachsen gelassen. Danach wurden die Ansätze mit dem zu analysierenden Plasmid zusammen mit *pRL-EF1 α* co-transfiziert und für 24 h inkubiert. Nach Beendigung des Versuchszeitraums wurden die Proben über LUC-Analysen auf deren relative Luciferaseaktivität überprüft. Als Positivkontrolle (+ ctrl) diente *pGL3 control inglo ASV40* und für die Negativkontrolle (- ctrl) wurde *pGL3 basic inglo* eingesetzt. Die Daten wurden durch den Mittelwert von + ctrl der entsprechenden Versuchsreihe geteilt und sind gezeigt als Mittelwert + SD (n=20-40). Die interferenzstatistische Analyse (beidseitiger ungepaarter t-Test) erfolgte zwischen *I1 Δ 6 inCAT* und *m μ ORF I1 Δ 6 inCAT* (ns p > 0,05).

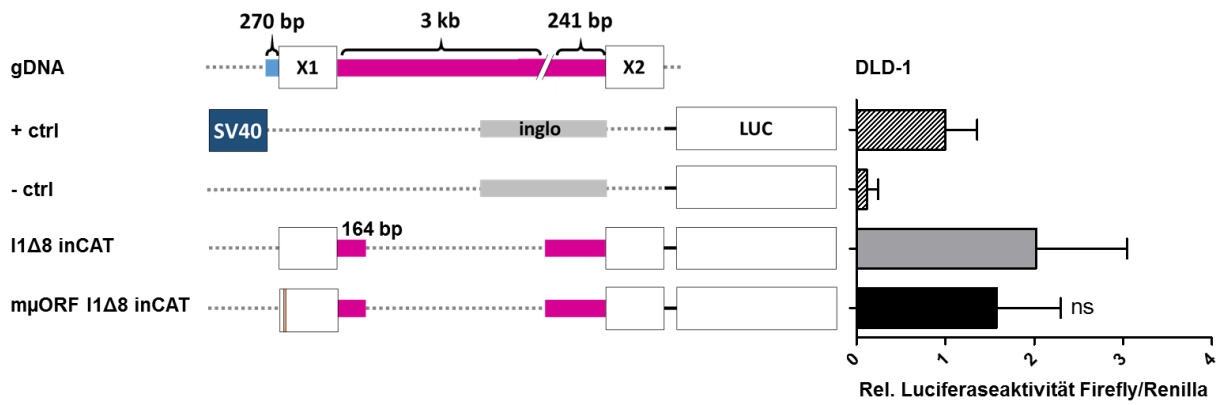


Abb. 52: Mutation des μ ORFs in *I1Δ8 inCAT* hat auch keinen Einfluss auf die Luciferaseaktivität.

DLD-1-Zellen wurden ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80% wachsen gelassen. Danach wurden die Ansätze mit dem zu analysierenden Plasmid zusammen mit *pRL-EF1 α* co-transfiziert und für 24 h inkubiert. Nach Beendigung des Versuchszeitraums wurden die Proben über LUC-Analysen auf deren relative Luciferaseaktivität überprüft. Als Positivkontrolle (+ ctrl) diente *pGL3 control inglo ASV40* und für die Kontaminationskontrolle (- ctrl) wurde *pGL3 basic inglo* eingesetzt. Die Daten wurden durch den Mittelwert von + ctrl der entsprechenden Versuchsreihe geteilt und sind gezeigt als Mittelwert + SD (n=8-28). Die interferenzstatistische Analyse (beidseitiger ungepaarter t-Test) wurde zwischen *I1Δ8 inCAT* und *mμORF I1Δ8 inCAT* durchgeführt (ns $p > 0,05$).

7 Diskussion

Proliferation, Zytokinproduktion und folglich die effiziente Funktion von stimulierten T-Zellen sind stark abhängig von der kationischen Aminosäure L-Arginin. Diese semi-essentielle Aminosäure gelangt hauptsächlich über den kationischen Aminosäuretransporter hCAT-1 in diese Zellen. Sowohl die mRNA- als auch die Proteinexpression des Transporters werden unter Stimulation in den Immunzellen massiv induziert. Aufgrund der Wichtigkeit von hCAT-1 für T-Zellen und damit für das Immunsystem war das Ziel dieser Arbeit herauszufinden, wie diese Induktion gesteuert wird und welche Faktoren daran beteiligt sind. Da bisher nicht viel über die Expressionsregulation von hCAT-1 bekannt war, wurde die transkriptionelle Regulation des Transporters untersucht. Hierbei wurde der Promotor von hCAT-1 unter Verwendung eines geeigneten Zellmodells lokalisiert. Zudem wurde untersucht, welche regulatorischen Elemente an der Expressionsinduktion des Transporters in stimulierten primären humanen T-Lymphozyten beteiligt sind.

7.1 Die Induktion der hCAT-1-Expression unter Aminosäuremangel benötigt Transkription

In den ersten Schritten wurde versucht ein geeignetes Zellmodell zu finden, um darin den Promotor von hCAT-1 zu studieren, da T-Zellen in ihrer Aufreinigung und der Handhabung sehr aufwändig sind. Aus diesem Grund wurde die Induktion von hCAT-1 in EA.hy926-Endothelzellen unter PMA (Abb. 12) und Aminosäuremangel (Abb. 8) sowie in DLD-1-Kolonkarzinomzellen unter Zytokinstimulation (Abb. 13) analysiert. Dabei erfolgte bei allen Behandlungen eine signifikante Induktion der hCAT-1-mRNA. Wurden EA.hy926-Endothelzellen unter Anwesenheit von DRB inkubiert, konnte dahingegen kein signifikanter Unterschied mehr zwischen Aminosäuremangel und -anwesenheit verzeichnet werden (Abb. 14), was darauf hindeutet, dass für die hCAT-1-Induktion Transkription benötigt wird. Zusätzlich wurde analysiert, ob die mRNA-Stabilität unter Aminosäuremangel zunimmt. Hierbei ergab sich kein Hinweis auf eine veränderte Halbwertszeit der mRNA (Abb. 16).

Vermutlich hängen die starken Schwankungen des gemessenen hCAT-1-mRNA-Gehalts in den Versuchen mit Stress zusammen, dem die Zellen ausgesetzt waren, verursacht z.B. durch einen Mediumswechsel, welcher eine CAT-1-Expression in Rattenzellen stimulieren kann (Aulak et al. 1999). Aber auch die Normierung auf GAPDH ist kritisch zu betrachten, da die mRNA des Haushaltgens unter DRB eine Halbwertszeit von 6,5 h, gemessen in HepG2-Zellen, aufweist (Neth 2001). Aus diesem Grund wäre es für weitere Versuche sinnvoller ein anderes Haushaltsgen zu verwenden, welches eine deutlich längere Halbwertszeit besitzt und somit in einem Versuchszeitraum von 7 h kaum beeinflusst wird. Dies könnte z.B. die 18S RNA, mit

einer Halbwertszeit in Säugetierzellen von 3-7 Tagen (Defoiche et al. 2009; Gillery et al. 1995; Halle et al. 1997), sein.

7.2 Der Kernpromotor von hCAT-1

7.2.1 Identifizierung des Transkriptionsstarts von hCAT-1

In dieser Arbeit konnte anhand von Versuchen in DRB-behandelten EA.hy926-Zellen gezeigt werden, dass die Induktion der hCAT-1-mRNA-Expression mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine transkriptionelle Regulation bzw. Promotorregulation zurückzuführen ist (Abb. 14). Da der Promotor des hCAT-1-Gens stromaufwärts von Exon 1 vermutet wurde, sollte der Transkriptionsstart identifiziert werden. Eine Analyse der Sequenz mit dem Programm Gene2Promoter zeigte zwei putative Transkriptionsstarts (TSS1 und TSS2) auf, welche anhand von experimentell ermittelten Daten erfasst wurden (Abb. 17). Diese sind 27 bp voneinander entfernt und befinden sich innerhalb einer sehr GC-reichen Region. Im Falle von TSS1 wäre das Exon 1 somit 300 bp groß und mit TSS2 hätte es eine Länge von 273 bp. Um mehr Informationen über die putativen Transkriptionsstarts zu erhalten, erfolgte zusätzlich eine Untersuchung der Region, in der TSS1 und TSS2 liegen, mit dem UCSC Genome Browser. Auch diese Datenbank basiert auf experimentell ermittelten Daten – in diesem Fall durch RNA-Seq-Analysen (Wang et al. 2009) in neun verschiedenen humanen Zelllinien. Die Untersuchung ergab, dass zwar TSS2 etwas häufiger in den sequenzierten mRNA-Fragmenten vorkam als TSS1, jedoch beide sehr oft vertreten sind (Abb. 18). Außerdem sind auch noch Transkripte zu finden, die über den TSS1 hinausgehen, d.h. deren Ende stromaufwärts von TSS1 liegt. Hinzu kommt, dass die Ergebnisse der RNA-Seq kritisch zu bewerten sind, da TSS1 und TSS2 innerhalb einer besonders GC-reichen Region liegen, was die Sequenzierungseffizienz beeinträchtigt. Daher sind RNA-Seq-Daten vielmehr als Anhaltspunkt dafür zu betrachten, ob ein gewisser Bereich, in dem Fall TSS1 und/oder TSS2, in der mRNA vorhanden ist oder nicht. Zusammenfassend kann daher nur gesagt werden, dass TSS2 und auch TSS1 in mRNA-Transkripten von hCAT-1 vorkommen. Zudem gibt es auch noch Transkripte, deren Start 43 bp stromaufwärts von TSS1 liegen. Wo jedoch der reelle Transkriptionsstart von hCAT-1 liegt und ob es eventuell auch mehrere gibt, bleibt damit unbeantwortet.

Zur weiteren Aufklärung des Transkriptionsstarts wurden RNase-Verdauungsschutz-Analysen mit einer Sonde durchgeführt, die die Detektion sowohl von TSS1 und TSS2 (Abb. 19), als auch von dem Transkriptionsstart des längsten Transkripts, welches im UCSC Genome Browser von hCAT-1 annotiert ist (Abb. 53), ermöglicht. Während die zur Kontrolle und Größenorientierung eingesetzten Sonden für mCAT-2A (getestet an RNA aus einer Mausleber) und hCAT-1 (bindet im kodierenden Bereich von hCAT-1, getestet an RNA aus DLD-1-Zellen) ein erwartetes Ergebnis lieferten, gelang der Nachweis des Transkriptionsstarts von hCAT-1 mit

der Sonde TSS1/2 nicht. Statt einer definierten Bande, die in ihrer Größe entweder TSS1 oder TSS2 entsprechen sollte oder auch einem ganz anderen Locus, konnte nur ein undefinierter Schmier detektiert werden. Dieses Resultat kann aufgrund der eingesetzten Methode mehrere Gründe haben: ein geringer Hybridisierungserfolg und/oder ein zu schwaches Signal der Sonde. Hierzu wurden verschiedene Optimierungsversuche durchgeführt (Tab. 24), die alle dennoch nicht den gewünschten Erfolg brachten. Im dem Fall, dass der Transkriptionsstart noch 236 bp vor TSS1 läge, hätte dies mit der Sonde nachgewiesen werden können. Da aber keine definierte Bande detektiert werden konnte, könnte es sein, dass er ab 104 bp stromabwärts von TSS2 liegt. Dagegen sprechen jedoch die Daten aus dem UCSC Genome Browser (Abb. 18) und dass der Bereich ab TSS2 bis Exon 3 zusammenhängend in der mRNA von hCAT-1 vorkommt, was über eine PCR mit darauffolgender Sequenzierung mehrfach nachgewiesen werden konnte (Abb. 20 und Abb. 21). Allerdings kann dennoch nicht eindeutig gesagt werden, ob TSS2 damit den Haupttranskriptionsstart darstellt oder ob er nur ein Nebenprodukt ist. Die PCR diente hier lediglich als qualitativer Nachweis, der keine Aussage über die Häufigkeit der eingesetzten Anzahl von mRNA-Transkripten zulässt. Am wahrscheinlichsten für das Ausbleiben einer eindeutigen Zuordnung von TSS1 oder TSS2 ist, dass hCAT-1 mehrere Transkriptionsstarts besitzt. Dies wird in Kapitel 7.2.5 weiter diskutiert.

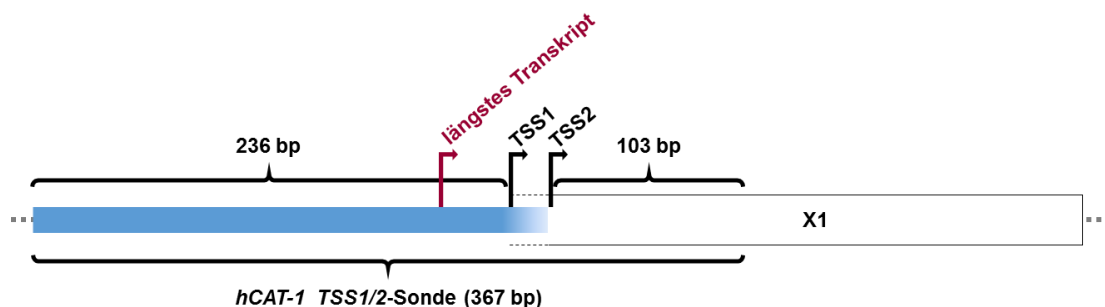


Abb. 53: Nachweisbarer Bereich mit der Sonde TSS1/2.

Schematische Darstellung des mit der Sonde TSS1/2 nachweisbaren Bereichs in der mRNA von hCAT-1. X1: Exon 1, blauer Bereich: 5'-flankierende genomische Region. In Rot eingezeichnet ist der Beginn (43 bp stromaufwärts von TSS1) des längsten Transkripts, welches in der Datenbank UCSC Genome Browser über RNA-Seq annotiert wurde. In dieser Abbildung ist der Beginn von Exon 1 mit TSS2 definiert.

Das Problem des Nachweises könnte eventuell mit der qRT-PCR gelöst werden. Hierfür müssten zwei verschiedene Oligonukleotid- und Sondensysteme entworfen werden. Eines davon sollte an einem Exon-Exon-Übergang im ORF von hCAT-1 binden können und das andere würde dem Nachweis des Transkriptionsstarts dienen. Dabei könnte man ebenfalls feststellen, ob der gefundene Transkriptionsstart annähernd so oft vorkommt wie der ORF. Ein mögliches Beispiel für dieses Sondensysteme ist in Abb. 54 dargestellt. Sollte TSS1 oder TSS2 der Haupttranskriptionsstart sein, müssten die dafür gemessenen mRNA-Expressionsraten mit der aus dem ORF vergleichbar sein. Allerdings kann der hohe GC-Gehalt im Bereich um die putativen Transkriptionsstarts die Methode ebenfalls beeinträchtigen. Da ein schwacher Nachweis von TSS2 über PCRs dennoch gelang, könnte die Effizienz durch Optimierung der Puffer

in der Reaktion und des verwendeten PCR-Programms weiter verstärkt werden. Zudem müssten die beiden Oligonukleotid- und Sondensysteme so designt werden, dass sie in ihren Eigenschaften, wie GC-Gehalt, Länge der Oligonukleotide und Sonden, Schmelztemperatur und PCR-Produktlänge so ähnlich wie möglich sind. Zusätzlich sollte trotzdem die Bindeeffizienz der Oligonukleotide gemessen werden. Hierfür müssten unterschiedliche Verdünnungen des Plasmids, an welches die Oligonukleotide binden können, erstellt und in einer PCR eingesetzt werden. Darüber kann die Effizienz berechnet und verschiedene Proben, die mit unterschiedlichen Oligonukleotiden gemessen wurden, miteinander verglichen werden. Aber auch andere Methoden wie 5'-RACE (Frohman et al. 1988) oder CAGE (Shiraki et al. 2003) könnten einen Nachweis über den Transkriptionsstart von hCAT-1 erbringen. Um den Transkriptionsstart über eine 5'-RACE zu determinieren, wird z.B. eine reverse Transkription mit einem *antisense*-Oligonukleotid durchgeführt, welches an eine bekannte Sequenz in der mRNA des zu untersuchenden Gens bindet. In einem zweiten Schritt wird über eine terminale Nukleotidtransferase ein Poly-A-Schwanz an das 3'-Ende der zuvor synthetisierten cDNA angehängt. Nun muss die RNA denaturiert werden. Danach erfolgt eine PCR mit dem vorher eingesetzten *antisense*-Oligonukleotid und einem *sense*-Oligonukleotid mit einer Oligo (dT)-Sequenz, mit dem eine Anker-Sequenz an die DNA angefügt wird. In einer weiteren PCR wird ein *antisense*-Oligonukleotid, welches weiter innerhalb des vorherigen PCR-Produkts bindet („*nested*“), in Kombination mit einem *sense*-Oligonukleotid eingesetzt, welches an die Anker-Sequenz bindet. Im Anschluss kann das Produkt sequenziert werden, womit das 5'-Ende festgelegt werden kann. Bei der CAGE-Analyse wird eine „Momentaufnahme“ aller mRNAs eines Gens in der Zelle gemacht, deren Synthese gerade begonnen hat. Diese Transkripte sind in der Regel nicht mehr als 27 bp lang. Dabei werden diese kurzen Fragmente isoliert, über eine cDNA-Synthese in DNA umgewandelt und anschließend sequenziert, wodurch man eine Übersicht über den Transkriptionsstart eines Gens erhält. Da der Promotor von hCAT-1 sehr wahrscheinlich mehrere Transkriptionsstarts besitzt (wird in Kapitel 7.2.5 diskutiert), erschwert dies die Determination eines einzelnen Transkriptionsstarts, da mit den in diesem Abschnitt genannten Methoden mit großer Wahrscheinlichkeit nur der dominanteste detektiert wird.

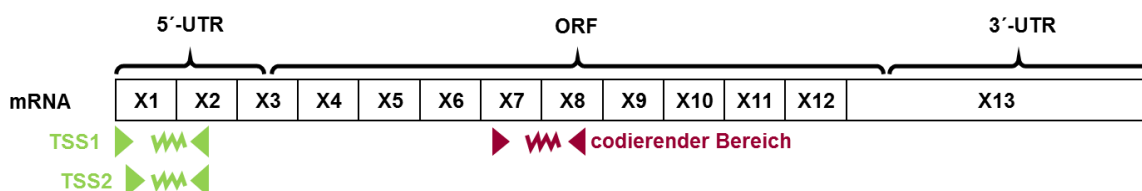


Abb. 54: Beispiel für Oligonukleotid- und Sondensysteme zum quantitativen Nachweis von TSS1 und/oder TSS2.

Schematische Darstellung für ein Beispiel von Oligonukleotid- und Sondensystemen, die den quantitativen Nachweis von TSS1 und/oder TSS2 über qRT-PCR ermöglichen könnten. X1-13: Exons, Oligonukleotide: Pfeile (Richtung zeigt die Orientierung der Oligonukleotide); Sonde: gezackte Linie.

7.2.2 Der für hCAT-1 publizierte Kernpromotor konnte nicht detektiert werden

Gonzalez et al. (2011) detektierten Promotoraktivität in einem Bereich zwischen dem Transkriptionsstart des hCAT-1-Gens und 650 bp stromaufwärts davon. Aus der gleichen Arbeitsgruppe stammte ein Jahr später eine weitere Publikation, die auf diesen Ergebnissen aufbaute (Guzman-Gutierrez et al. 2012). Da die Luciferaseaktivität mit der Aktivität des Promotors in Verbindung gebracht wird, wird im Folgenden nur noch von Promotoraktivität gesprochen. Die gezeigten Promotoraktivitäten sind recht schwach und variieren im Verhältnis zu den mitgeführten Kontrollen im Vergleich beider Veröffentlichungen. Aus diesem Grund sind sie nicht überzeugend. 2011 wird für den hCAT-1-Promotor lediglich eine geringe Promotoraktivität, die etwa doppelt so hoch ist wie die Negativkontrolle ohne Promotor und nur ein Drittel der Aktivität von der Positivkontrolle mit SV40-Promotor und *Enhancer* entspricht, gezeigt. In der Publikation von 2012 ist die Promotoraktivität von hCAT-1, obwohl die gleichen Konstrukte verwendet wurden, etwa das Vierfache der Negativkontrolle. Die Promotoraktivität der Positivkontrolle ist hierbei nur noch 2,5-mal so stark wie in der ersten Publikation. Zudem machen beide Publikationen keine Angaben über die Lokalisation des Transkriptionsstarts. Dieser wird vermutlich dem TSS2 entsprechen, welcher bei NCBI als Transkriptionsstart annotiert ist (*Sequence Accession ID*: NM_003045, Stand: 15.12.2016). Eine Anfrage diesbezüglich an die Autoren blieb unbeantwortet. Um den Promotor daher selbst zu untersuchen, wurden verschiedene große Abschnitte mit einer Länge von bis zu 5 kb stromaufwärts des TSS2 und teilweise in Kombination mit Exon 1 in den gleichen Reportervektor, welcher auch von Gonzalez et al. und Guzman-Gutierrez et al. verwendet wurde, kloniert und auf deren Promotoraktivität untersucht. Zur besseren Vergleichbarkeit mit den bereits publizierten Daten von Gonzalez et al. (2011) sowie Guzman-Gutierrez et al. (2012) und weil bisher nur TSS2 über PCRs nachweisbar war, wurde TSS2 in den folgenden Versuchen sowie Promotorkonstrukten in den Schemata als Transkriptionsstart und somit Beginn von Exon 1 definiert. Keines der in DLD-1-Kolonkarzinomzellen getesteten Konstrukte hatte eine Promotoraktivität, die signifikant höher war als die der Negativkontrolle (Abb. 25), was bedeutet, dass diese Abschnitte auch keine Promotoraktivität induzieren. Darunter befand sich auch ein Konstrukt, welches 1 kb der 5'-flankierenden genomischen DNA stromaufwärts vom Transkriptionsstart beinhaltet (*C basic*) und damit den von Gonzalez et al. (2011) und Guzman-Gutierrez et al. (2012) publizierten Promotorbereich enthält. Auch das Hinzufügen von Exon 1 brachte keine zusätzliche Aktivität. Da Gonzalez et al. (2011) und Guzman-Gutierrez et al. (2012) den hCAT-1-Promotor in HUVEC-Zellen (humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen) publizierten, die innerhalb dieser Arbeit bis dahin gezeigten Versuche jedoch in DLD-1-Kolonkarzinomzellen erfolgten, wäre es möglich, dass unterschiedliche Zelltypen auch unterschiedliche Promotoren verwenden. LUC-Analysen mit EA.hy926-Endothelzellen (von HUVEC-Zellen abgeleitete Zelllinie) zeigten jedoch auch keine

Promotoraktivität innerhalb des Konstrukts *C basic* (Daten nicht gezeigt). Daraus ist zu schließen, dass sich der in den untersuchten Zellen aktive Promotor von hCAT-1 nicht oder nicht vollständig in dem Bereich von Exon 1 und 5 kb stromaufwärts davon befindet. Dieses Ergebnis muss jedoch nicht zwangsweise auch auf HUVEC-Zellen anwendbar sein, da sich deren hCAT-1-Promotor an einer anderen Position in der gDNA befinden kann.

7.2.3 Promotoraktivität in einem Bereich, beginnend von 270 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts bis einschließlich der ersten 3 kb von Intron 1

Da die untersuchten Promotorkonstrukte mit Abschnitten aus Exon 1 und 5 kb stromaufwärts davon in LUC-Analysen keine Promotoraktivität zeigten, stehen die Daten somit im Widerspruch zu den Veröffentlichungen von Gonzalez et al. (2011) und Guzman-Gutierrez et al. (2012). Um mehr Informationen über die mögliche Lokalisation des Promotors zu erhalten, wurde das hCAT-1-Gen mit Hilfe des UCSC Genome Browsers untersucht. Die Daten zu untersuchten Histonmodifikationen, CpG-Inseln, Transkriptionsfaktorbindestellen und DNase Cluster ließen vermuten, dass sich der hCAT-1-Promotor im Bereich von Exon 1 und Intron 1 befindet (Abb. 26). Um diesen Bereich auch in LUC-Analysen zu untersuchen, wurde ein DNA-Fragment, bestehend aus den 270 bp stromaufwärts von Exon 1, Exon 1 und ca. 3 kb stromabwärts von Exon 1, aus hCAT-1 in den Vektor *pGL3 control inglo ASV40* kloniert, sodass der SV40-Promotor durch das neue Insert ersetzt wurde. Das Promotorkonstrukt enthielt somit 5'-flankierende Sequenz, Exon 1 und den Beginn von Intron 1. In der LUC-Analyse zeigte sich, dass dieser Bereich eine sehr starke Promotoraktivität induzierte und daher mit sehr großer Wahrscheinlichkeit den hCAT-1-Promotor enthält (Abb. 27). Da diese Aktivität sogar um einiges stärker war als die des SV40-Promotors der Positivkontrolle, ist davon auszugehen, dass sich in diesem Abschnitt, neben dem Kernpromotor, weitere positiv regulierende Elemente, also *Enhancer*, befinden, die zusätzlich zur basalen Expression eine Steigerung der Transkription bewirken.

Um die im hCAT-1-Gen vorherrschenden Strukturen besser abzubilden, erfolgte ein Austausch der 3'-Spleiß-Akzeptorstelle aus dem β -Globin gegen die letzten 241 bp aus dem hCAT-1-Intron 1. Zusätzlich wurde entweder das komplette Exon 2 hineinkloniert, um somit den gesamten μ ORF zu erhalten (Konstrukt *DE inCAT*), oder nur die ersten 46 bp (Konstrukt *DE inCAT_B*), wodurch auch das Stoppcodon des μ ORFs fehlte. Im Vergleich der beiden Konstrukte *DE inCAT* und *DE inCAT_B* mit dem *inglo*-Konstrukt, welches die 3'-Spleiß-Akzeptorstelle aus einem β -Globin-Intron innehatte, konnte in LUC-Analysen eine deutliche Zunahme in der Promotoraktivität gemessen werden (Abb. 31). Dies wurde vermutlich hervorgerufen durch ein effektiveres Spleißen aufgrund der 5'-Spleiß-Donor- und 3'-Spleiß-Akzeptorstelle, welche beide aus hCAT-1 stammen. Jedoch konnte auch beobachtet werden, dass das Konstrukt mit dem vollen μ ORF eine höhere Promotoraktivität bewirkte, als das Konstrukt dem das

Stoppcodon des μ ORFs und Teile von Exon 2 fehlte. Auf mRNA-Ebene ergaben beide Konstrukte eine ähnliche Expression (Abb. 32), sodass der Unterschied in der Promotoraktivität mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine unterschiedliche posttranskriptionelle Regulation oder Translationseffizienz zurückzuführen ist. Denkbar wäre dabei ebenfalls ein Einfluss des μ ORFs. Dieser könnte wie in der Ratte (Fernandez et al. 2005; Fernandez et al. 2001) durch Stress, hier möglicherweise hervorgerufen durch die Transfektion der Zellen mit den Promotorkonstrukten, aktiviert worden sein, was somit die höhere Aktivität von *DE inCAT* gegenüber *DE inCAT_B* begründen könnte. Es ist aber auch möglich, dass der μ ORF nicht erst durch Stress aktiviert wird, sondern auch im ungestressten Zustand Einfluss auf die Expression nimmt. Ob der μ ORF bei hCAT-1 wirklich Einfluss auf die Translation hat, wird in Kapitel 7.4 behandelt. Des Weiteren liegt das Startcodon des μ ORFs in dem Konstrukt mit nur den ersten 46 bp aus Exon 2 im gleichen Leserahmen mit dem Luciferase-ORF. Durch das Fehlen des μ ORF-Stoppcodons ist es nicht auszuschließen, dass die Luciferase zusammen mit dem μ ORF translatiert wurde, was eine verminderte Luciferaseaktivität zur Folge haben könnte. Dies kann über einen Western Blot und anschließender Luciferasedetektion mit einem spezifischen Antikörper gegen das Protein untersucht werden. Somit konnte bereits schon für rCAT-1, bei Mutation des Stoppcodons vom μ ORF, eine Fusion des μ ORFs mit dem ORF der Luciferase in der mRNA beobachtet werden (Fernandez et al. 2002b). Da das Konstrukt mit dem vollen μ ORF die stärkste Promotoraktivität aufwies und zudem den vollständigen μ ORF innehat, wurde weiterhin mit diesem Konstrukt gearbeitet.

7.2.4 Bereich, in dem der Kernpromotor von hCAT-1 lokalisiert ist, konnte auf 365 bp im Exon 1 und Intron 1 eingegrenzt werden

Um nun den möglichst kleinsten Bereich zu bestimmen, in dem sich der Kernpromotor befindet, wurden die beiden Ausgangskonstrukte *DE inglo* und *DE inCAT* in weiteren Schritten verkürzt. Dabei wurde in *DE inglo* zunächst der 5'-flankierende Bereich des hCAT-1-Gens herausgeschnitten (Entstehung des Konstrukts *DE-5' inglo*), was keine signifikante Auswirkung auf die Promotoraktivität hatte (Abb. 28). Nun hätte vermutet werden können, dass der aus dem Plasmid nachrückende Bereich durch hohe Ähnlichkeit in der DNA-Sequenz einen Ersatz für den deletierten Bereich bilden könnte. Ein Vergleich zwischen dem 5'-flankierenden Bereich und der bei Deletion nachrückenden Sequenz aus dem Vektor ergab jedoch nur eine geringe Übereinstimmung von 23,3% (Abb. 29), welche wohl eher dem Zufall entspricht. Zusätzlich waren die übereinstimmenden Bereiche recht homogen verteilt und nicht in einzelnen Clustern aggregiert, sodass davon auszugehen ist, dass der nachrückende Bereich keine Rolle für die Transkription bzw. Luciferaseexpression spielte. Bei der Deletion des 5'-flankierenden Bereichs in dem inCAT-Konstrukt (Entstehung des Konstrukts *DE-5' inCAT*) kam es, im Gegensatz zu dem entsprechenden inglo-Konstrukt, zu einer signifikanten Verminderung

der Promotoraktivität (Abb. 33). Das Signal war allerdings immer noch deutlich höher als das der Positivkontrolle mit SV40-Promotor. Dieses Ergebnis konnte auch auf mRNA-Ebene bestätigt werden (Abb. 34), was es sehr wahrscheinlich macht, dass der Auslöser in einer Veränderung in der Transkription lag. Da die Promotoraktivität nur reduziert, aber nicht ausgelöscht wurde, ist davon auszugehen, dass der Kernpromotor nicht betroffen wurde. Viel eher spricht das Ergebnis für einen in diesem Bereich liegenden *Enhancer*, der die basale Transkription verstärkt.

Daraufhin erfolgte eine nahezu komplette Entfernung (bis auf 33 bp) des Exons 1 im inglo-Konstrukt (Entstehung des Konstrukts *E inglo*), was zu einer vollständigen Auslöschung der Promotoraktivität führte, sodass diese eine geringere Aktivität als die Negativkontrolle ohne Promotor hatte (Abb. 30). Sollten Teile des Kernpromotors in dem deletierten Abschnitt lokalisiert sein, ist das ein Grund für die Auslöschung der Promotoraktivität. Solch ein Ergebnis wäre aber auch zu erwarten, wenn die für den Transkriptionsstart benötigte DNA-Sequenz im Promotorkonstrukt mit entfernt worden wäre. Was die genaue Ursache für die drastische Reduktion der Promotoraktivität war, kann mit diesem Deletionskonstrukt nicht eindeutig beantwortet werden. Die Promotoraktivität des inCAT-Konstrukts *E inCAT* wurde zwar wie auch im entsprechenden inglo-Konstrukt drastisch reduziert, dennoch hatte das Konstrukt nach wie vor eine Promotoraktivität, die zwei- bis dreifach über der der Negativkontrolle lag und ein Drittel der Positivkontrolle ausmachte (Abb. 35). Dies würde eigentlich beweisen, dass der Kernpromotor nicht von der Deletion betroffen war. Bei Betrachtung der mRNA-Expression des Konstrukts stellt sich allerdings die Frage, wie die Promotoraktivität zustande kam, da keine nennenswerte Transkription stattfand (Abb. 36). Dies liegt wahrscheinlich jedoch an der höheren Sensitivität der LUC-Analyse gegenüber der qRT-PCR. Um jedoch genaue Aussagen über die Ergebnisse machen zu können, sollte durch weitere Versuche die n-Zahl bei der Messung der Promotorkonstrukt-mRNA (Abb. 36) erhöht werden, um zu sehen ob das Ergebnis auch bei einer höheren Replikatanzahl weiterhin reproduzierbar ist. Diese lag für das Konstrukt *E inCAT* nur bei n=2.

In darauffolgenden Schritten erfolgte eine zunehmende Eingrenzung durch weitere 5'-Deletionen in Exon 1. Bei der Entfernung der ersten 121 bp von Exon 1 stieg die Luciferaseaktivität sogar an, statt wie erwartet abzufallen oder unverändert zu bleiben (Abb. 38). In diesem Abschnitt könnte daher ein *Silencer* liegen, der eine Repression der Transkription bewirkt. Denkbar wäre auch eine Erhöhung der mRNA-Stabilität. Die Verkürzung des Exons 1 auf 78 bp resultierte in einem starken Abfall der Promotoraktivität (Abb. 38). Diese war schwächer als die der Positivkontrolle. Dennoch zeigte das Konstrukt im Vergleich zur Kontrolle ohne Promotor weiterhin eine deutliche Aktivität. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass zwar ein eventueller *Enhancer* eliminiert wurde, jedoch der Kernpromotor weiterhin vollständig war. Mit

dem Ergebnis dieser beiden Promotorkonstrukte kann zudem ausgeschlossen werden, dass die Auslöschung der Luciferaseaktivität nicht auf einen Verlust eines bestimmten Transkriptionsstarts beruht, da bei der Deletion von Teilen von Exon 1, welche definitiv in hCAT-1-Transkripten zu finden sind (Abb. 18, Abb. 20 und Abb. 21), weiterhin Transkription stattfindet. Dennoch kann es sein, dass, sollte eine Sequenz entfernt werden die als Transkriptionsstart verwendet wird, der Promotor einen Ersatztranskriptionsstart nutzt. Dies würde zeigen, dass der Promotor den Transkriptionsstart sequenzunabhängig wählt.

Nachdem die 5'-Eingrenzung des Kernpromotors von hCAT-1 gelungen war, wurden verschiedene Deletionen am 3'-Ende der ersten 3 kb aus dem Intron 1 durchgeführt (Abb. 37). Verkürzungen auf 1620 und 888 bp brachte eine leichte Steigerung der Promotoraktivität. Dies ist vermutlich wieder zurückzuführen auf den Verlust eines schwachen *Silencer*-Elements. Die schrittweise Reduktion auf bis zu 287 bp zeigte keine signifikante Veränderung im Vergleich zum Ausgangskonstrukt (*DE-5' inCAT*; besitzt kompletten μ ORF, aber keine 5'-flankierende genomische Sequenzen). Erst eine Verkürzung des Introns auf 164 und 45 bp brachte eine starke Minderung in der Aktivität, die aber trotzdem noch signifikant erhöht war gegenüber der Negativkontrolle. Auch hierfür könnte die Eliminierung eines *Enhancers* grundlegend sein. Ein solches *Enhancer*-Element könnte in diesem Fall das *cis*-regulatorische DNA-Element INE (Abb. 39) sein, welches in Ratte in einem Bereich 259-267 bp nach dem Exon 1 liegt und durch Bindung des Transkriptionsfaktors Pur- α für eine starke Hochregulation der basalen Transkription in ungestressten oder kurzzeitig gestressten Zellen verantwortlich ist (Huang et al. 2009). Naheliegender ist jedoch, dass die massive Reduktion der Promotoraktivität auf eine Deletion des Hauptpromotors zurückzuführen ist.

Durch die schrittweisen Deletionen am 5'- und 3'-Ende des hCAT-1-Inserts in den Promotorkonstrukten, konnte der Abschnitt in dem sich der Kernpromotor befindet auf einen Bereich von 365 bp, beginnend in den letzten 78 bp von Exon 1 und endend nach den ersten 287 bp von Intron 1, eingegrenzt werden (Abb. 39). Dieser wird im Folgenden als Kernpromotorbereich bezeichnet. Um sicher zu gehen, dass der Promotor in Promotorkonstrukten mit einem kleineren Abschnitt aus hCAT-1 nicht doch schon teilweise verkürzt wurde, wurde somit das 5'-Ende über das Konstrukt, welches nur noch 78 bp aus Exon 1 enthielt (*X1 Δ 3 inCAT*, Abb. 38), definiert. Hier lag noch eine deutliche Promotoraktivität vor, verglichen mit dem Konstrukt, welches nur noch die letzten 33 bp aus Exon 1 aufwies (*E inCAT*) und auf mRNA-Ebene kaum noch exprimiert wurde (Abb. 36). Aus demselben Grund wurde auch das 3'-Ende über das Konstrukt *I1 Δ 8 inCAT* (Abb. 37) bestimmt, in dem noch die ersten 287 bp aus Exon 1 vorhanden waren.

7.2.5 Charakterisierung des hCAT-1-Promotors

Der in dieser Arbeit eingegrenzte Kernpromotorbereich weist mehrere putative *cis*-regulatorische Elemente auf (Abb. 39). Unter diesen befinden sich jedoch nur die zwei Kernpromotorelemente Inr und BRE^d. Die Inr-Sequenz wird von den Untereinheiten *transcription initiation factor TFIID subunit 1* (TAF1) und *transcription initiation factor TFIID subunit 2* (TAF2) aus dem TFIID-Komplex (Transkriptionsfaktor IID-Komplex) erkannt und gebunden, wodurch der Transkriptionsinitiationskomplex rekrutiert wird (Chalkley und Verrijzer 1999; Kaufmann und Smale 1994; Verrijzer et al. 1995; Wu et al. 2001; Roy und Singer 2015). Inr-Elemente kommen vor allem in Kernpromotoren von ubiquitär exprimierten Genen vor und sind über einen Bereich von 150 bp im Promotor verteilt (Sandelin et al. 2007; Lenhard et al. 2012). So sind auch die drei, im Kernpromotorbereich von hCAT-1 ausfindig gemachten, putativen Inr-Elemente innerhalb eines Bereichs von etwa 150 bp zu finden. BRE^d agiert ,wie auch BRE^u, in Verbindung mit der TATA-Box (Juven-Gershon und Kadonaga 2010; Kadonaga 2012) und kann positive aber auch negative Effekte auf die basale Transkription haben (Deng und Roberts 2005; Evans et al. 2001; Juven-Gershon et al. 2008; Lagrange et al. 1998). Im Kernpromotorbereich von hCAT-1 befindet sich jedoch keine offensichtliche TATA-Box, welche alternativ zum Initiator die Transkription über den TFIID-Komplex einleiten könnte (Butler und Kadonaga 2002; Kadonaga 2012; Muller und Tora 2014). Weiterhin fehlen auch DPE und MTE. DPE ist eine Erkennungssequenz für TFIID, welche im Mensch und *Drosophila* konserviert ist, etwa 30 bp stromabwärts des Transkriptionsstarts in TATA-Box-losen Promotoren liegt (Burke und Kadonaga 1997; Zhou und Chiang 2001) und zusammen mit dem Inr für die Bindung von TFIID benötigt wird (Burke und Kadonaga 1996; Kutach und Kadonaga 2000). MTE ist ein weiteres Element von Kernpromotoren und befindet sich stromaufwärts von DPE (Ohler et al. 2002), wobei es in seiner Funktion aber unabhängig davon ist (Lim et al. 2004; Theisen et al. 2010). MTE und DPE sind hingegen abhängig von einem funktionellen Inr und kommen vermehrt in TATA-Box-losen Promotoren vor (Danino et al. 2015). Des Weiteren konnte auch das proximale Kernpromotor-Element CAT-Box nicht detektiert werden, welches eine Bindestelle für allgemeine Transkriptionsfaktoren ist. Auch putative Bindestellen für den Transkriptionsfaktor SP1 kommen nicht im Kernpromotorbereich vor. Dahingegen konnte eine putative Bindestelle für den Transkriptionsfaktor AP2, welcher in Vertebraten bei der Entwicklung, Zellzykluskontrolle und Apoptosis eine Rolle spielt (Hilger-Eversheim et al. 2000), detektiert werden. Ebenfalls konnten zwei GC-Boxen, an die viele Transkriptionsfaktoren binden, ausgemacht werden sowie eine putative INE-Sequenz zur Bindung des Transkriptionsfaktors Pur- α , der bei der basalen Transkription vom rCAT-1 eine Rolle spielt (Huang et al. 2009).

Kernpromotoren können aufgrund ihrer enthaltenen Elemente nach Danino et al. (2015) in drei Klassen unterteilt werden: fokussierter Promotor, verteilter Promotor und gemischter Promo-

tor. Der fokussierte Promotor liegt in einem Bereich zwischen 40 bp stromaufwärts und -abwärts vom Transkriptionsstart (Danino et al. 2015) und wird assoziiert mit räumlich-zeitlich regulierten gewebespezifischen Genen (Carninci et al. 2006). Diese Promotorklasse besitzt entweder einen einzigen predominanten Transkriptionsstart oder mehrere, innerhalb eines engen Bereichs von nur wenigen Nukleotiden (Juven-Gershon und Kadonaga 2010). Zudem weist solch ein Promotor meistens Elemente wie TATA-Box, Inr, MTE und DPE auf (Rach et al. 2009). Von diesen Elementen konnte nur eine putative Inr-Sequenz im Kernpromotorbereich von hCAT-1 ausgemacht werden. Der verteilte Promotor hat viele schwache Transkriptionsstarts, zerstreut über einen Bereich von 50-100 bp in der Promotorregion (Juven-Gershon und Kadonaga 2010; Lenhard et al. 2012). Zudem sind in ihm oft CpG-Inseln sowie SP1- und NFY-Bindestellen zu finden (Bajic et al. 2006; Juven-Gershon und Kadonaga 2010; Kadonaga 2012). Diese Promotorart kommt überwiegend bei konstitutiv exprimierten Genen vor (Danino et al. 2015) und ist häufiger bei höheren Eukaryoten anzutreffen (Carninci et al. 2006; Juven-Gershon und Kadonaga 2010). Mehr als 70% der Vertebratengene haben einen verteilten Promotor (Bajic et al. 2006; Baumann et al. 2010; Cooper et al. 2006; Kim et al. 2005). Der gemischte Promotor zeigt mehrere verteilte Transkriptionsstarts mit jedoch nur einer einzigen starken Transkriptionsstartstelle (Kadonaga 2012; Stamatoyannopoulos 2010). In der Literatur gibt es dennoch viele weitere Ansätze zur Klassifizierung von Kernpromotoren. Kim et al. (2005) nahmen eine Unterteilung durch genomweite ChIP-Seq-Analysen für die RNA Polymerase II, TFIID und die Histonmarkklassen H3Ac und H3K4Me, unabhängig von fokussierten oder verteilten Transkriptionsinitiationsmustern, vor. Eine Einteilung in vier Promotortypen nach Verteilung der initiierenden Dinukleotide (die beiden Nukleotide -1 und +1 relativ gesehen zum Transkriptionsstart), CpG-Inseln und TATA-Boxen wurde von Bajic et al. (2006) vorgenommen. Carninci et al. (2006) teilte Kernpromotoren basierend auf CAGE-Analysen (Shiraki et al. 2003) in vier Klassen ein: *single peak*, *broad shape peak*, *bimodal/multimodal peak* und *broad with dominant peak*. Eine zu Danino et al. (2015) sehr ähnliche Gruppierung in drei Promotortypen erfolgte durch Lenhard et al. (2012).

Die im vorherigen Absatz aufgeführten Promotor-Definitionen beruhen, bis auf die von Danino et al. (2015) auf bioinformatischen Daten, die in dieser Form von hCAT-1 noch nicht vorliegen, weshalb eine Eingruppierung des hCAT-1-Promotors nach den genannten Definitionen noch nicht möglich ist. Bleibt man bei der Definition von Danino et al. (2015) (Einteilung in fokussierter Promotor, verteilter Promotor und gemischter Promotor) entspricht der hCAT-1-Kernpromotorbereich aufgrund des Fehlens einer TATA-Box, dem DPE und MTE, der Anwesenheit von einigen putativen Inr-Elementen und CpG-Inseln (Abb. 26) sowie der konstitutiven Expression am ehesten einem verteilten Promotor. Dies würde zusätzlich zu Daten aus dem USCS Genome Browser (Abb. 18) auch erklären, warum sich der Nachweis des genauen Transkriptionsstarts so schwierig gestaltet. Da die Literatur aktuell in der Kernpromotor-Definition stark

variiert und die im Kernpromotor von hCAT-1 putativen Elemente noch nicht, z.B. durch LUC-Analysen von Mutationen in der DNA-Elementsequenz, verifiziert worden sind, kann zum jetzigen Zeitpunkt noch keine genaue Definition des Kernpromotors vorgenommen werden. Hinzu kommt, dass man die ausgemachten Elemente weiterhin auch in anderen Zelllinien sowie endogen untersuchen muss, um herauszufinden, welche Elemente gewebespezifisch Einfluss auf die Transkription nehmen, welche die basale Expression steuern und ob dies jeweils auch mit der endogenen hCAT-1-Expression übereinstimmt. Außerdem können Elemente, deren Konsensussequenz im Kernpromotorbereich nicht gefunden werden konnte, dennoch in der DNA mit einer bisher unbekanntem Sequenz vorliegen. Dies könnte über Datenbankenanalysen und anschließender Mutationen der putativen Sequenz in LUC-Analysen herausgefunden werden. Ein weiterer Punkt, der die Kernpromotor-Definition erschwert ist, dass der hCAT-1-Kernpromotor vermutlich ein äußerst selten vorkommender geninterner Promotor ist, da dieser weder die 5'-flankierende genomische DNA-Sequenz (Abb. 28 und Abb. 33) noch den Beginn von Exon 1 benötigt (Abb. 38). Ein bekannter Vertreter für einen geninternen Promotor ist z.B. das Herzprotein Titin (Zou et al. 2015). Titin, oder auch Connectin genannt, dient der akkuraten Positionierung der Myosinköpfe zwischen den Aktinfilamenten und der Zurückstellung des kontraktiven Apparates nach der Muskelkontraktion. Der Promotor von Titin befindet sich am C-terminalen Ende des Gens und unterscheidet sich daher in der Lokalisation von dem Promotor von hCAT-1. Zurzeit gibt es kein untersuchtes Gen dessen Promotor mit dem von hCAT-1 in der Lokalisation des Promotors vergleichbar wäre.

7.3 Regulation der mRNA-Expression von hCAT-1

7.3.1 NF- κ B ist ein positiver Regulator von hCAT-1

Zur Untersuchung der Regulation der mRNA-Expression von hCAT-1 in primären humanen T-Zellen wurden diese mit speziellen Inhibitoren für bedeutende Signalwege der T-Zell-Rezeptoraktivierung behandelt, um so herauszufinden, welche Signalkaskade für das Anschalten der hCAT-1-Transkription notwendig ist (Abb. 41). Die Inhibitionen der PKC sowie der Phosphatase Calcineurin hatten keine Auswirkungen auf die frühe (bis zu 3 h nach T-Zell-Stimulation) hCAT-1-mRNA-Induktion. Auch die Hemmung von AKT änderte nichts an der hCAT-1-Expression. Im Gegensatz dazu fand Eva Amann (zu der Zeit Masterandin innerhalb der AG Munder, III. Medizinische Klinik und Poliklinik für Hämatologie, Internistische Onkologie und Pneumologie an der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz) in stimulierten primären humanen T-Zellen eine Involvierung der AKT an der mRNA- und Protein-Expression von hCAT-1 nach 48 h (unveröffentlicht). In Verbindung mit den in dieser Arbeit erhobenen Daten spricht dies für eine Beteiligung der AKT an der Aufrechterhaltung der hCAT-1-Expression, nicht aber an der initialen Induktion von hCAT-1 nach T-Zell-Stimulation. Dahingegen

konnte NF- κ B als positiver Regulator der hCAT-1-Transkription in primären humane T-Lymphozyten ausgemacht werden, da die gezielte Inhibition des Transkriptionsfaktors zu einer starken Hemmung der mRNA-Expression von hCAT-1 führte (Abb. 41). Da diese jedoch nicht vollständig ausgelöscht war ist davon auszugehen, dass NF- κ B nicht alleine die Aktivierung der hCAT-1-Expression reguliert. Die NF- κ B-Inhibition führte auch nach Transfektion der Promotorkonstrukte in DLD-1-Zellen zu einer deutlichen Reduktion der Promotoraktivität, gemessen in LUC- und qRT-PCR-Analysen (Abb. 42 und Abb. 43). Dass eine Inhibition der Promotoraktivität auch in T-Zellen vorliegt, konnte bereits in einem ersten Versuch gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Um die n-Zahl zu erhöhen und so dem Ergebnis eine stärkere Aussage zu verleihen, sollten hierzu jedoch weitere Versuche durchgeführt werden.

NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der durch seinen Einfluss auf die Genexpression große Auswirkungen auf das Immunsystem, das Überleben, die Differenzierung und die Proliferation von Zellen in allen Geweben hat (Hayden und Ghosh 2012). Zu der NF- κ B-Familie werden in Säugetieren fünf verschiedene Mitglieder gezählt, welche in zwei Klassen unterteilt werden. Die Klasse I besteht aus den Proteinen p50 (NF- κ B1) und p52 (NF- κ B2) und die Klasse II beinhaltet RelA/p65, RelB und c-Rel (Hayden und Ghosh 2012; Nabel und Verma 1993). In unstimulierten Zellen liegt NF- κ B als Dimer im Zytoplasma vor und wird durch die inhibitorische Untereinheit I κ B daran gehindert, in den Zellkern zu gelangen. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors wird durch Phosphorylierung, Ubiquitinylierung und schließlich Abbau von I κ B erreicht. Dadurch ist es dem NF- κ B-Dimer dann möglich in den Zellkern zu gelangen, um dort an eine spezifische DNA-Sequenz eines Gens zu binden und somit die Transkription zu beeinflussen (Hayden und Ghosh 2012). Während p50 (NF- κ B1) und RelA/p65 an der Stimulation von T-Zellen beteiligt sind (Molitor et al. 1990), sind RelA/p65 und c-Rel bei der Proliferation von T-Lymphozyten involviert (Grumont et al. 2004).

Ob NF- κ B die hCAT-1-Expression direkt beeinflusst, oder ob ein oder mehrere Proteine dazwischengeschaltet sind, kann an dieser Stelle nicht gesagt werden. A. Werner zeigte bereits 2 h nach Stimulation eine starke Zunahme der hCAT-1-mRNA in T-Zellen (unveröffentlicht), sodass die Aktivierung deutlich davor stattgefunden haben muss. Damit ist eine lange und zeitintensive Signalkaskade mit vielen einzelnen Aktivierungsschritten wahrscheinlich auszuschließen. Da die Inhibition der Translation zu einer Unterbindung der hCAT-1-mRNA-Expression in T-Zellen führte (Abb. 49), erfolgt vermutlich in einem dieser Aktivierungsschritte die Proteinneusynthese eines an der Aktivierung beteiligten Proteins. Da NF- κ B mit großer Wahrscheinlichkeit nicht alleine die Aktivierung der hCAT-1-Expression reguliert, kann es aber auch sein, dass das Element, welches ebenfalls zur Aktivierung benötigt wird, neu synthetisiert werden muss. Dieses Element könnte z.B. eines der im Kernpromotorbereich durch P-Match detektierten Transkriptionsfaktoren E2-alpha, HLF oder Evi-1 (Kapitel 6.4.7.2) sein.

7.3.2 Aktivierung der Transkription von hCAT-1 erfolgt wahrscheinlich nicht über eine einzelne NF- κ B-Bindestelle

Ein Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung der Aktivierungskaskade der hCAT-1-Expression in T-Zellen. Da in T-Lymphozyten, die mit dem Promotorkonstrukt *DE inCAT* transfiziert wurden, ebenfalls eine starke Promotoraktivität gemessen werden konnte (Abb. 40), wie auch bereits in DLD-1-Zellen (Abb. 31), wurden die Kolonkarzinomzellen, aufgrund der einfacheren Versuchsdurchführung, auch wieder für die Analysen zur hCAT-1-Aktivierung durch NF- κ B verwendet.

Von dem Konstrukt mit nur noch den ersten 287 bp aus Intron 1 (*I1 Δ 8 inCAT*) zu dem Konstrukt mit 164 bp (*I1 Δ 9 inCAT*) lag eine starke Reduktion der Promotoraktivität vor (Abb. 37). In dem Bereich in dem sich die beiden Konstrukte unterschieden (beginnend nach den ersten 164 bp bis 287 bp nach Start des Introns 1 (Abb. 45)), ist ein putatives INE-Element zu finden (bereits diskutiert in Kapitel 7.2.4), welches eine Erklärung für den Aktivitätsverlust sein könnte. Allerdings könnte auch NF- κ B (zusätzlich) in diesem Abschnitt an die DNA binden. Bei Eliminierung dieses Bereichs würde dann auch die Aktivierung durch NF- κ B wegfallen. Um nun herauszufinden, ob NF- κ B direkt an der Regulation von hCAT-1 beteiligt ist wurde nach putativen Bindestellen in diesem Bereich gesucht. Da die Konsensussequenz für NF- κ B hierin nicht zu finden war (Abb. 44), wurde eine weitere Analyse mit dem Programm P-Match durchgeführt. Hierbei berechnete das Programm die Wahrscheinlichkeit der Bindung von verschiedenen Transkriptionsfaktoren im untersuchten DNA-Abschnitt anhand ihrer Konsensussequenz. Dadurch konnten insgesamt vier putative Bindestellen für NF- κ B-Isoformen gefunden werden (Abb. 45). Die Mutation der Bindestelle (befindet sich 236-245 bp nach Exon 1) mit der höchsten Ähnlichkeit zur Konsensussequenz (Abb. 46) führte zur Halbierung der Luciferaseaktivität (Abb. 47) und der mRNA-Expression (Abb. 48), was stark darauf hindeutet, dass NF- κ B direkt an den Promotor von hCAT-1 bindet und so die Transkription aktiviert. Da das Signal jedoch nicht vollkommen ausgelöscht wurde, liegt die Vermutung nahe, dass NF- κ B entweder an mehreren Stellen (weiterhin bezeichnet als gleichartige Kooperation) binden muss, um so die volle Aktivierung zu initiieren oder in Kooperation mit weiteren Transkriptionsfaktoren (weiterhin bezeichnet als verschiedenartige Kooperation) wie z.B. E2-alpha, HLF und/oder Evi-1 bindet. Putative Bindestellen für diese Transkriptionsfaktoren wurden ebenfalls in dem untersuchten Abschnitt gefunden (Kapitel 6.4.7.2) und sollten daher auch untersucht werden. Für die verschiedenartige Kooperation spricht, dass die Inhibition durch NF- κ B auch in T-Zellen nicht zu einem kompletten Erliegen der endogenen hCAT-1-mRNA-Expression führte (Abb. 41).

Um herauszufinden, ob eine gleich- oder verschiedenartige Kooperation vorliegt, könnte die LUC-Analyse des Promotorkonstrukts mit der mutierten NF- κ B-Bindestelle in Anwesenheit des NF- κ B-Inhibitors wiederholt werden. Sollte das Signal dadurch weiter vermindert werden, liegt

eine gleichartige Kooperation von NF- κ B vor. Findet keine Verminderung statt, ist es wahrscheinlich, dass weitere Transkriptionsfaktoren in diesem Bereich an der Regulation beteiligt sind. Zudem wäre durchaus zu erwarten, dass in dem restlichen Teil des Kernpromotors (entspricht den letzten 78 bp von Exon 1) weitere Bindestellen für entweder NF- κ B oder andere Transkriptionsfaktoren zu finden sind, sodass dieser ebenfalls analysiert werden müsste. Da wahrscheinlich ist, dass weitere Transkriptionsfaktoren die Aktivierung der hCAT-1-Expression modulieren, könnten an den Kernpromotorbereich gebundene Transkriptionsfaktoren über Massenspektrometrie analysiert werden. Hierbei würde es sich anbieten, den Kernpromotorbereich einmal mit Kernextrakten von unstimulierten und einmal von stimulierten primären humanen T-Zellen zu inkubieren. Durch die massenspektrometrische Analyse könnte dann im Vergleich beider Ansätze herausgefunden werden, welche Transkriptionsfaktoren bei Aktivierung der Immunzellen, aber auch im inaktiven Zustand, an den hCAT-1-Promotor binden. Deren Bindestellen könnten ebenfalls mutiert und in LUC-Analysen, wie auch schon für NF- κ B, untersucht werden.

7.3.3 hCAT-1-regulierender Faktor wird bei Stimulation in T-Zellen neu gebildet

Um weitere Informationen über den Mechanismus zu erlangen, der die Aktivierung der hCAT-1-Transkription in einem Zeitfenster von 1-2 h initiiert wurde untersucht, ob die dabei involvierten Moleküle vor der Aktivierung in der Zelle bereits vorhanden sind oder erst neu synthetisiert werden müssen. Hierfür wurden T-Zellen in Anwesenheit des Translationshemmers Cycloheximid stimuliert und nach 3 h deren hCAT-1-mRNA bestimmt (Abb. 49). Dabei zeigte sich, dass mindestens ein Schritt der hCAT-1-Aktivierungskaskade von der Neusynthese eines Proteins abhängig ist, da unter CHX-Anwesenheit die hCAT-1-mRNA-Expression ausgelöscht wurde. Das Ergebnis verdeutlicht, dass NF- κ B alleine nicht für die Aktivierung von hCAT-1 zuständig sein kann, da der Transkriptionsfaktor, wie z.B. auch das Protoonkogen c-Jun, zu den „*rapid-acting*“ Transkriptionsfaktoren gehört (Ishise et al. 2015; Metelev et al. 2011; Vasu et al. 2015; Kotiadis et al. 2014). Diese schnellwirkenden Proteine liegen in ruhenden Zellen bereits in einem inaktiven Zustand vor, sodass sie bei Eintritt eines bestimmten Signals aktiviert werden können, ohne dass eine Proteinneusynthese notwendig wäre.

7.3.4 Untersuchung der transkriptionellen Regulation von hCAT-1 in T-Zellen

Im Verlauf der Versuche mit T-Zellen stellte sich heraus, dass diese vor der Transfektion vorstimuliert werden müssen, damit sie das Plasmid in ausreichendem Maß aufnehmen. Daraus resultiert, dass die Immunzellen zum Zeitpunkt der Transfektion bereits aktiviert vorliegen, sodass eine Restimulation nach Transfektion zur Untersuchung der Induktion der hCAT-1-Expression schwierig wird. Hierfür müsste nach der Transfektion einige Tage gewartet werden, damit die Zellen wieder in einen Ruhezustand kommen, um sie dann erneut stimulieren zu

können. Um dies auszutesten, wurden T-Zellen bereits bis zu 168 h (7 Tage) nach der Transfektion ruhen gelassen. Jedoch konnte auch nach diesem Zeitraum immer noch kein Unterschied in der Luciferaseaktivität zwischen Zellen, die restimuliert wurden, und Zellen, die nicht restimuliert wurden, gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Zudem waren auch die gemessenen Firefly- und Renillaaktivitäten sehr gering, sodass davon auszugehen ist, dass ein Großteil der Plasmide aus den Zellen verschwunden ist. Hinzu kommt, dass primäre humane T-Zellen nicht lange in Kultur gehalten werden können, da sie, bedingt durch die Elektroporation, nach etwa 4 Tagen in Apoptose übergehen (Erfahrungswerte von Eva Amann, derzeit Doktorandin der AG Theobald, III. Medizinische Klinik und Poliklinik für Hämatologie, Internistische Onkologie und Pneumologie an der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz) wodurch ebenfalls die gemessene Luciferaseaktivität sinken kann. Zusammen mit den durch die Transfektion eliminierten Zellen führt dies zu einem zu großen Verlust an Zellmaterial. All diese Faktoren machen es nahezu unmöglich die Expressionsregulation nach T-Zell-Stimulation zu untersuchen.

7.4 Regulation der Translation von hCAT-1 über einen μ ORF bleibt weiterhin offen

Ein in der mRNA stromaufwärts vom ORF liegender μ ORF ist ein wichtiges regulatorisches Element und kommt in 49% aller humanen Transkripte vor (Barbosa et al. 2013). Die Anwesenheit eines solchen μ ORFs in der 5'-UTR einer mRNA kann unterschiedliche Auswirkungen auf die Regulation der Translation haben. Befinden sich Zellen in einem ungestressten Zustand, so kann ein μ ORF die Translationsinitiationseffizienz des ORFs herabsetzen (Morris und Geballe 2000; Calvo et al. 2009) oder sogar über den sogenannten „*nonsense-mediated mRNA decay*“ (NMD)-Kontrollmechanismus zum Abbau der mRNA, durch das Erkennen eines frühzeitigen Stoppcodons, führen (Mendell et al. 2004; Wittmann et al. 2006; Yepiskoposyan et al. 2011). Dahingegen kann ein μ ORF unter Stressbedingungen in der Zelle eine verstärkte Expression der mRNA bewirken (Spriggs et al. 2010).

Bei der 5'-Kappen-abhängigen Translation sucht der Translationsinitiationskomplex die mRNA ab, bis er auf ein Startcodon trifft, wodurch die Translation eingeleitet wird. Sobald der Komplex auf ein Stoppcodon trifft, stoppt er die Translation und löst sich von der mRNA. Sollte die Translation der hCAT-1-mRNA rein 5'-Kappen-abhängig verlaufen, dürfte das hCAT-1-Protein niemals exprimiert werden, da sich in der 5'-UTR des Transporters ein μ ORF befindet. Nun stellt sich die Frage, wie der ORF dennoch translatiert wird. Im rCAT-1 wurde bereits der Einfluss des μ ORFs auf die Bildung einer IRES untersucht, welche die Translation der mRNA unter Stressbedingungen, verursacht durch Aminosäuremangel, in der Zelle aufrechterhält (Fernandez et al. 2001; Fernandez et al. 2002a; Fernandez et al. 2005; Fernandez et al.

2002b; Fernandez et al. 2002c; Komar und Hatzoglou 2011). Dabei postulierte die Arbeitsgruppe um Hatzoglou, dass die Bildung der IRES bei der Translation erst durch das langsame Ablesen des μ ORFs zustande käme. Um nun herauszufinden, ob dieser Mechanismus auch im humanen CAT-1 vorliegt, wurde das Start-ATG des μ ORFs in einem Promotorkonstrukt, welches den kompletten μ ORF aufwies, mutiert (Abb. 50). Die Analyse ergab, dass die Mutation keine Auswirkungen auf die Promotoraktivität hatte (Abb. 51 und Abb. 52) und somit wahrscheinlich auch nicht auf die Translation. Zusammen mit den Ergebnissen der 5'-Deletionen im Exon 1 (Abb. 35 und Abb. 38), wo Teile des μ ORFs entfernt wurden, wird deutlich, dass der hCAT-1- μ ORF in den Promotorkonstrukten entweder, wie in manch anderen mRNAs (Lammich et al. 2004; Rogers, JR et al. 2004), funktionslos ist oder unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht benötigt wird. Zwar waren die Zellen mit großer Sicherheit durch die Transfektion gestresst, dennoch kann die 5'-Kappen-abhängige Translation weiterhin stattgefunden haben. Da das untersuchte Promotorkonstrukt nur Exon 1 und 2 enthielt und daher nicht die komplette 5'-UTR, kann es jedoch auch möglich sein, dass die IRES nicht komplett enthalten war, wodurch ihre Funktion eventuell gestört wurde. Ebenfalls könnte auch die starke Kozak-Sequenz der Firefly-Luciferase in den Promotorkonstrukten für das Ausbleiben eines Signalverlusts bei einer Mutation des μ ORF-Start-ATGs verantwortlich sein (Tab. 25). Denn ist das erste ATG, wie in diesem Fall das des hCAT-1- μ ORFs, schwach (d.h. kein G auf Position +4 und keine Purin-Base auf Position -3), kann es bei der 5'-Kappen-abhängigen Translation zu einem kontextabhängigen „leaky scanning“ kommen (Kozak 2002). Dabei initiiert der Großteil der Ribosomen die Translation nicht am ersten ATG, sondern am nächsten stärkeren ATG, in dem Fall dem der Firefly-Luciferase, stromabwärts (*ibid.*). Da im endogenen hCAT-1 ebenfalls eine Überlegenheit des ORFs gegenüber dem μ ORF in der Kozak-Sequenz vorliegt, scheint es als wäre der μ ORF irrelevant für die Translation. Um dies jedoch genauer zu untersuchen, müsste in den Promotorkonstrukten die Kozak-Sequenz der Luciferase durch die endogene Kozak-Sequenz von hCAT-1 ersetzt werden sowie die gesamte hCAT-1-5'-UTR in das Konstrukt hineingebracht und erneut in LUC- und qRT-PCR-Analysen untersucht werden.

Tab. 25: Vergleich der Kozak-Sequenzen aus hCAT-1 und Firefly-Luciferase mit der Konsensussequenz. Übereinstimmungen mit der Konsensussequenz sind rot markiert. Großbuchstaben stellen wichtige Basen dar. A/a: Adenin, T/t: Thymin, G/g: Guanin, C/c: Cytosin, R: Adenin oder Guanin.

Herkunft	Kozak-Sequenz
Konsensussequenz (Vertebraten), (Kozak 1987)	gccRccATGG
hCAT-1 ORF	agcAacATGG
hCAT-1 μ ORF	ctgCtgATGA
Firefly-LUC ORF	gccAccATGG

EA.926-Endothelzellen zeigen, wie auch schon die zur rCAT-1-Untersuchung verwendeten C6-Rattengliomazellen (Fernandez et al. 2003), unter Arginin- und Lysinmangel eine gesteigerte CAT-1-Expression (Abb. 8, Abb. 9 und Abb. 10). Für eine weitere Analyse des μ ORFs könnten die Endothelzellen mit einem Promotorkonstrukt mit der vollen 5'-UTR von hCAT-1, in der das Startcodon des μ ORFs mutiert ist, unter Arginin- und Lysinmangel transfiziert werden. Sollte hierbei ein Unterschied in der Luciferaseaktivität zwischen mit und ohne Arginin und Lysin kultivierten Zellen zu sehen sein, würde das ein Hinweis für den Einfluss des μ ORFs auf die IRES und somit die Translation von hCAT-1 unter Aminosäuremangelbedingungen sein. Um herauszufinden, ob es eine IRES in hCAT-1 gibt und ob der μ ORF darauf Einfluss nimmt, könnte eine Klonierung dieser Elemente bzw. der gesamten hCAT-1-5'-UTR zwischen zwei unterschiedliche Reportergene in einen bicistronischen Vektor mit Promotor (Abb. 55) und nachfolgender Transfektion unter Aminosäuremangel Aufklärung bringen. Sollte in der LUC-Analyse eine deutliche Firefly-Aktivität messbar sein, spräche dies für eine Aktivierung der IRES über die 5'-UTR bei der Translation unter Zellstress. Als Positivkontrolle könnte die IRES des Encephalomyocarditis-Virus (EMCV) dienen (Jang et al. 1988; Pelletier und Sonenberg 1988), welche aber auch schon ohne Stress in Zellen aktiv ist.

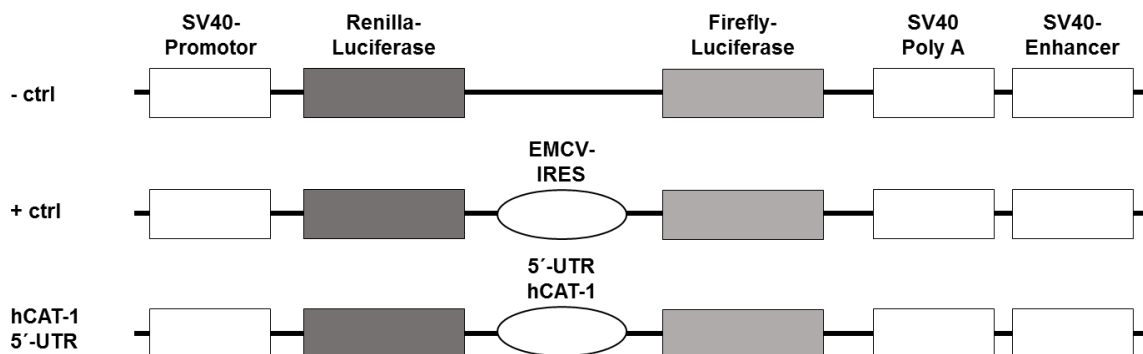


Abb. 55: Überprüfung des Einflusses vom μ ORF auf eine mögliche IRES in hCAT-1.

Schematische Darstellung möglicher bicistronischer Konstrukte zur Überprüfung des Einflusses vom μ ORF auf eine mögliche IRES von hCAT-1 über LUC-Analysen.

Ein μ ORF kann die Expression des ORFs aber auch noch auf andere Weise beeinflussen, indem das durch den μ ORF gebildete Peptid mit der Translationsmaschinerie interagiert (Morris und Geballe 2000). Über eine Leserastermutation im μ ORF vom rCAT-1 wurde nachgewiesen, dass unter Aminosäuremangel das aus dem μ ORF entstehende und 48 Aminosäuren lange Peptid keinerlei Einfluss auf die Translation des ORFs hat (Yaman et al. 2003). Dies gilt sehr wahrscheinlich auch für hCAT-1, da eine Mutation des μ ORF-Startcodons keinen Einfluss auf die Luciferaseaktivität in der LUC-Analyse hatte (Abb. 51 und Abb. 52). Ein weiterer Regulationsmechanismus über einen μ ORF beschreibt die Translationsreinitiation. Hierbei verbleibt die 40S ribosomale Untereinheit nach der Translation des μ ORFs an der DNA und sucht diese nach einem weiteren Startcodon ab. Dies ist jedoch ein äußerst ineffizienter Mechanis-

mus (Barbosa et al. 2013), welcher nur bei sehr kurzen μ ORFs mit einer hohen Translationsrate vorkommt (Meijer und Thomas 2002). Da der μ ORF von hCAT-1 mit 333 Nukleotiden vergleichsweise groß ist, ist eine Translationsreinitiation eher unwahrscheinlich.

8 Literaturverzeichnis

- Albina, J. E.; Mills, C. D.; Barbul, A.; Thirkill, C. E.; Henry, W. L., JR; Mastrofrancesco, B.; Caldwell, M. D. (1988): Arginine metabolism in wounds. In: *The American journal of physiology* 254 (4 Pt 1), E459-67.
- Albina, J. E.; Mills, C. D.; Henry, W. L., JR; Caldwell, M. D. (1989): Regulation of macrophage physiology by L-arginine: role of the oxidative L-arginine deiminase pathway. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 143 (11), S. 3641–3646. DOI: 10.1084/jem.169.3.1021.
- Albritton, L. M.; Tseng, L.; Scadden, D.; Cunningham, J. M. (1989): A putative murine ecotropic retrovirus receptor gene encodes a multiple membrane-spanning protein and confers susceptibility to virus infection. In: *Cell* 57 (4), S. 659–666.
- Albritton, Lorraine M.; Bowcock, Anne M.; Eddy, Roger L.; Morton, Cynthia C.; Tseng, Lena; Farrer, Lindsay A. et al. (1992): The human cationic amino acid transporter (ATRC1). Physical and genetic mapping to 13q12–q14. In: *Genomics* 12 (3), S. 430–434. DOI: 10.1016/0888-7543(92)90431-Q.
- Aulak, K. S.; Liu, J.; Wu, J.; Hyatt, S. L.; Puppi, M.; Henning, S. J.; Hatzoglou, M. (1996): Molecular sites of regulation of expression of the rat cationic amino acid transporter gene. In: *The Journal of biological chemistry* 271 (47), S. 29799–29806.
- Aulak, K. S.; Mishra, R.; Zhou, L.; Hyatt, S. L.; Jonge, W. de; Lamers, W. et al. (1999): Post-transcriptional Regulation of the Arginine Transporter Cat-1 by Amino Acid Availability. In: *Journal of Biological Chemistry* 274 (43), S. 30424–30432. DOI: 10.1074/jbc.274.43.30424.
- Bajic, Vladimir B.; Tan, Sin Lam; Christoffels, Alan; Schonbach, Christian; Lipovich, Leonard; Yang, Liang et al. (2006): Mice and men: their promoter properties. In: *PLoS genetics* 2 (4), e54. DOI: 10.1371/journal.pgen.0020054.
- Barbosa, Cristina; Peixeiro, Isabel; Romao, Luisa (2013): Gene expression regulation by upstream open reading frames and human disease. In: *PLoS genetics* 9 (8), e1003529. DOI: 10.1371/journal.pgen.1003529.
- Baumann, Martina; Pontiller, Jens; Ernst, Wolfgang (2010): Structure and basal transcription complex of RNA polymerase II core promoters in the mammalian genome: an overview. In: *Molecular biotechnology* 45 (3), S. 241–247. DOI: 10.1007/s12033-010-9265-6.
- Benjamini, Yuval; Speed, Terence P. (2012): Summarizing and correcting the GC content bias in high-throughput sequencing. In: *Nucleic acids research* 40 (10), e72. DOI: 10.1093/nar/gks001.

- Bhattacharyya, Suwendra N.; Habermacher, Regula; Martine, Ursula; Closs, Ellen I.; Filipowicz, Witold (2006): Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. In: *Cell* 125 (6), S. 1111–1124. DOI: 10.1016/j.cell.2006.04.031.
- Birney, Ewan; Stamatoyannopoulos, John A.; Dutta, Anindya; Guigo, Roderic; Gingeras, Thomas R.; Margulies, Elliott H. et al. (2007): Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. In: *Nature* 447 (7146), S. 799–816. DOI: 10.1038/nature05874.
- Brennan, C. M.; Steitz, J. A. (2001): HuR and mRNA stability. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 58 (2), S. 266–277. DOI: 10.1007/PL00000854.
- Bronte, Vincenzo; Zanovello, Paola (2005): Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. In: *Nature reviews. Immunology* 5 (8), S. 641–654. DOI: 10.1038/nri1668.
- Bruhat, A.; Jousse, C.; Carraro, V.; Reimold, A. M.; Ferrara, M.; Fafournoux, P. (2000): Amino Acids Control Mammalian Gene Transcription. Activating Transcription Factor 2 Is Essential for the Amino Acid Responsiveness of the CHOP Promoter. In: *Molecular and Cellular Biology* 20 (19), S. 7192–7204. DOI: 10.1128/MCB.20.19.7192-7204.2000.
- Bruhat, Alain; Averous, Julien; Carraro, Valerie; Zhong, Can; Reimold, Andreas M.; Kilberg, Michael S.; Fafournoux, Pierre (2002): Differences in the molecular mechanisms involved in the transcriptional activation of the CHOP and asparagine synthetase genes in response to amino acid deprivation or activation of the unfolded protein response. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (50), S. 48107–48114. DOI: 10.1074/jbc.M206149200.
- Burke, T. W.; Kadonaga, J. T. (1996): Drosophila TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters. In: *Genes & Development* 10 (6), S. 711–724. DOI: 10.1101/gad.10.6.711.
- Burke, T. W.; Kadonaga, J. T. (1997): The downstream core promoter element, DPE, is conserved from Drosophila to humans and is recognized by TAFII60 of Drosophila. In: *Genes & Development* 11 (22), S. 3020–3031.
- Bussolati, O.; Laris, P. C.; Nucci, F. A.; Dall'Asta, V.; Longo, N.; Guidotti, G. G.; Gazzola, G. C. (1987): Dependence of L-arginine accumulation on membrane potential in cultured human fibroblasts. In: *The American journal of physiology* 253 (3 Pt 1), C391-7.
- Butler, Jennifer E. F.; Kadonaga, James T. (2002): The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. In: *Genes & Development* 16 (20), S. 2583–2592. DOI: 10.1101/gad.1026202.

- Calvo, Sarah E.; Pagliarini, David J.; Mootha, Vamsi K. (2009): Upstream open reading frames cause widespread reduction of protein expression and are polymorphic among humans. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (18), S. 7507–7512. DOI: 10.1073/pnas.0810916106.
- Carninci, Piero; Sandelin, Albin; Lenhard, Boris; Katayama, Shintaro; Shimokawa, Kazuro; Ponjavic, Jasmina et al. (2006): Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution. In: *Nature genetics* 38 (6), S. 626–635. DOI: 10.1038/ng1789.
- Chalkley, G. E.; Verrijzer, C. P. (1999): DNA binding site selection by RNA polymerase II TAFs: a TAF(II)250-TAF(II)150 complex recognizes the initiator. In: *The EMBO journal* 18 (17), S. 4835–4845. DOI: 10.1093/emboj/18.17.4835.
- Chang, Jinhong; Nicolas, Emmanuelle; Marks, Debora; Sander, Chris; Lerro, Anthony; Buendia, Marie Annick et al. (2004): miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1. In: *RNA biology* 1 (2), S. 106–113.
- Chekmenev, D. S.; Haid, C.; Kel, A. E. (2005): P-Match: transcription factor binding site search by combining patterns and weight matrices. In: *Nucleic acids research* 33 (Web Server issue), W432-7. DOI: 10.1093/nar/gki441.
- Chen, F. E.; Huang, D. B.; Chen, Y. Q.; Ghosh, G. (1998): Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF-kappaB bound to DNA. In: *Nature* 391 (6665), S. 410–413. DOI: 10.1038/34956.
- Closs, E. I.; Albritton, L. M.; Kim, J. W.; Cunningham, J. M. (1993): Identification of a low affinity, high capacity transporter of cationic amino acids in mouse liver. In: *The Journal of biological chemistry* 268 (10), S. 7538–7544.
- Closs, E. I.; Boissel, J-P; Habermeier, A.; Rotmann, A. (2006): Structure and function of cationic amino acid transporters (CATs). In: *The Journal of membrane biology* 213 (2), S. 67–77. DOI: 10.1007/s00232-006-0875-7.
- Closs, Ellen I. (2002): Expression, regulation and function of carrier proteins for cationic amino acids. In: *Current opinion in nephrology and hypertension* 11 (1), S. 99–107.
- Coffer, P. J.; Jin, J.; Woodgett, J. R. (1998): Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. In: *The Biochemical journal* 335 (Pt 1), S. 1–13.
- Conne, B.; Stutz, A.; Vassalli, J. D. (2000): The 3' untranslated region of messenger RNA: A molecular 'hotspot' for pathology? In: *Nature medicine* 6 (6), S. 637–641. DOI: 10.1038/76211.

- Cooper, Sara J.; Trinklein, Nathan D.; Anton, Elizabeth D.; Nguyen, Loan; Myers, Richard M. (2006): Comprehensive analysis of transcriptional promoter structure and function in 1% of the human genome. In: *Genome Research* 16 (1), S. 1–10. DOI: 10.1101/gr.4222606.
- Danino, Yehuda M.; Even, Dan; Ideses, Diana; Juven-Gershon, Tamar (2015): The core promoter: At the heart of gene expression. In: *Biochimica et biophysica acta* 1849 (8), S. 1116–1131. DOI: 10.1016/j.bbtagrm.2015.04.003.
- Defoiche, Julien; Zhang, Yan; Lagneaux, Laurence; Pettengell, Ruth; Hegedus, Andrea; Willems, Luc; Macallan, Derek C. (2009): Measurement of ribosomal RNA turnover in vivo by use of deuterium-labeled glucose. In: *Clinical chemistry* 55 (10), S. 1824–1833. DOI: 10.1373/clinchem.2008.119446.
- Deng, Wensheng; Roberts, Stefan G. E. (2005): A core promoter element downstream of the TATA box that is recognized by TFIIB. In: *Genes & Development* 19 (20), S. 2418–2423. DOI: 10.1101/gad.342405.
- Devés, R.; Boyd, C. A. (1998): Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function. In: *Physiological reviews* 78 (2), S. 487–545.
- Evans, R.; Fairley, J. A.; Roberts, S. G. (2001): Activator-mediated disruption of sequence-specific DNA contacts by the general transcription factor TFIIB. In: *Genes & Development* 15 (22), S. 2945–2949. DOI: 10.1101/gad.206901.
- Feldmeyer, Nadja; Wabnitz, Guido; Leicht, Stefan; Luckner-Minden, Claudia; Schiller, Martin; Franz, Thomas et al. (2012): Arginine deficiency leads to impaired cofilin dephosphorylation in activated human T lymphocytes. In: *International immunology* 24 (5), S. 303–313. DOI: 10.1093/intimm/dxs004.
- Fernandez, J.; Yaman, I.; Mishra, R.; Merrick, W. C.; Snider, M. D.; Lamers, W. H.; Hatzoglou, M. (2001): Internal ribosome entry site-mediated translation of a mammalian mRNA is regulated by amino acid availability. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (15), S. 12285–12291. DOI: 10.1074/jbc.M009714200.
- Fernandez, James; Bode, Barry; Koromilas, Antonis; Diehl, J. Alan; Krukovets, Irene; Snider, Martin D.; Hatzoglou, Maria (2002a): Translation mediated by the internal ribosome entry site of the cat-1 mRNA is regulated by glucose availability in a PERK kinase-dependent manner. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (14), S. 11780–11787. DOI: 10.1074/jbc.M110778200.
- Fernandez, James; Lopez, Alex B.; Wang, Chuanping; Mishra, Rangnath; Zhou, Lingyin; Yaman, Ibrahim et al. (2003): Transcriptional control of the arginine/lysine transporter,

- cat-1, by physiological stress. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (50), S. 50000–50009. DOI: 10.1074/jbc.M305903200.
- Fernandez, James; Yaman, Ibrahim; Huang, Charles; Liu, Haiyan; Lopez, Alex B.; Komar, Anton A. et al. (2005): Ribosome stalling regulates IRES-mediated translation in eukaryotes, a parallel to prokaryotic attenuation. In: *Molecular cell* 17 (3), S. 405–416. DOI: 10.1016/j.molcel.2004.12.024.
- Fernandez, James; Yaman, Ibrahim; Merrick, William C.; Koromilas, Antonis; Wek, Ronald C.; Sood, Rushira et al. (2002b): Regulation of internal ribosome entry site-mediated translation by eukaryotic initiation factor-2alpha phosphorylation and translation of a small upstream open reading frame. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (3), S. 2050–2058. DOI: 10.1074/jbc.M109199200.
- Fernandez, James; Yaman, Ibrahim; Sarnow, Peter; Snider, Martin D.; Hatzoglou, Maria (2002c): Regulation of internal ribosomal entry site-mediated translation by phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (21), S. 19198–19205. DOI: 10.1074/jbc.M201052200.
- Frohman, M. A.; Dush, M. K.; Martin, G. R. (1988): Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (23), S. 8998–9002.
- Furey, Terrence S. (2012): ChIP-seq and beyond: new and improved methodologies to detect and characterize protein-DNA interactions. In: *Nature reviews. Genetics* 13 (12), S. 840–852. DOI: 10.1038/nrg3306.
- Gabrilovich, Dmitry I.; Hurrwitz, Arthur A. (Hg.) (2008): Tumor-Induced Immune Suppression. Mechanisms and Therapeutic Reversal. 1. Aufl. s.l.: Springer-Verlag.
- Geiger, Roger; Rieckmann, Jan C.; Wolf, Tobias; Basso, Camilla; Feng, Yuehan; Fuhrer, Tobias et al. (2016): L-Arginine Modulates T Cell Metabolism and Enhances Survival and Anti-tumor Activity. In: *Cell* 167 (3), 829-842.e13. DOI: 10.1016/j.cell.2016.09.031.
- Gillery, P.; Georges, N.; Wegrowski, J.; Randoux, A.; Borel, J. P. (1995): Protein synthesis in collagen lattice-cultured fibroblasts is controlled at the ribosomal level. In: *FEBS letters* 357 (3), S. 287–289.
- Gonzalez, Marcelo; Gallardo, Victoria; Rodriguez, Natalia; Salomon, Carlos; Westermeier, Francisco; Guzman-Gutierrez, Enrique et al. (2011): Insulin-stimulated L-arginine transport requires SLC7A1 gene expression and is associated with human umbilical

- vein relaxation. In: *Journal of cellular physiology* 226 (11), S. 2916–2924. DOI: 10.1002/jcp.22635.
- Gräf, P. (1998): Charakterisierung der Transportproteine für basische Aminosäuren: CAT-1, CAT-2A und CAT-2B. Dissertation. Unimedizin der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz. Institut für Pharmakologie.
- Gräf, P.; Forstermann, U.; Closs, E. I. (2001): The transport activity of the human cationic amino acid transporter hCAT-1 is downregulated by activation of protein kinase C. In: *British journal of pharmacology* 132 (6), S. 1193–1200. DOI: 10.1038/sj.bjp.0703921.
- Gross, Petra; Oelgeschlager, Thomas (2006): Core promoter-selective RNA polymerase II transcription. In: *Biochemical Society symposium* (73), S. 225–236.
- Grumont, Raelene; Lock, Peter; Mollinari, Michael; Shannon, Frances M.; Moore, Anna; Geronidakis, Steve (2004): The mitogen-induced increase in T cell size involves PKC and NFAT activation of Rel/NF-kappaB-dependent c-myc expression. In: *Immunity* 21 (1), S. 19–30. DOI: 10.1016/j.immuni.2004.06.004.
- Guzman-Gutierrez, Enrique; Westermeier, Francisco; Salomon, Carlos; Gonzalez, Marcelo; Pardo, Fabian; Leiva, Andrea; Sobrevia, Luis (2012): Insulin-increased L-arginine transport requires A(2A) adenosine receptors activation in human umbilical vein endothelium. In: *PloS one* 7 (7), e41705. DOI: 10.1371/journal.pone.0041705.
- Halle, J. P.; Muller, S.; Simm, A.; Adam, G. (1997): Copy number, epigenetic state and expression of the rRNA genes in young and senescent rat embryo fibroblasts. In: *European journal of cell biology* 74 (3), S. 281–288.
- Hammermann, R.; Brunn, G.; Racke, K. (2001): Analysis of the genomic organization of the human cationic amino acid transporters CAT-1, CAT-2 and CAT-4. In: *Amino acids* 21 (2), S. 211–219.
- Hatzoglou, Maria; Fernandez, James; Yaman, Ibrahim; Closs, Ellen (2004): Regulation of cationic amino acid transport: the story of the CAT-1 transporter. In: *Annual review of nutrition* 24, S. 377–399. DOI: 10.1146/annurev.nutr.23.011702.073120.
- Hayden, Matthew S.; Ghosh, Sankar (2012): NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. In: *Genes & Development* 26 (3), S. 203–234. DOI: 10.1101/gad.183434.111.
- Hediger, Matthias A.; Clemencon, Benjamin; Burrier, Robert E.; Bruford, Elspeth A. (2013): The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): introduction. In: *Molecular aspects of medicine* 34 (2-3), S. 95–107. DOI: 10.1016/j.mam.2012.12.009.

- Hediger, Matthias A.; Romero, Michael F.; Peng, Ji-Bin; Rolfs, Andreas; Takanaga, Hitomi; Bruford, Elspeth A. (2004): The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins Introduction. In: *Pflügers Archiv: European journal of physiology* 447 (5), S. 465–468. DOI: 10.1007/s00424-003-1192-y.
- Hilger-Eversheim, Kristina; Moser, Markus; Schorle, Hubert; Buettner, Reinhard (2000): Regulatory roles of AP-2 transcription factors in vertebrate development, apoptosis and cell-cycle control. In: *Gene* 260 (1-2), S. 1–12. DOI: 10.1016/S0378-1119(00)00454-6.
- Hosokawa, H.; Sawamura, T.; Kobayashi, S.; Ninomiya, H.; Miwa, S.; Masaki, T. (1997): Cloning and Characterization of a Brain-specific Cationic Amino Acid Transporter. In: *Journal of Biological Chemistry* 272 (13), S. 8717–8722. DOI: 10.1074/jbc.272.13.8717.
- Huang, Charlie C.; Chiribau, Calin-Bogdan; Majumder, Mithu; Chiang, Cheng-Ming; Wek, Ronald C.; Kelm, Robert J., JR et al. (2009): A bifunctional intronic element regulates the expression of the arginine/lysine transporter Cat-1 via mechanisms involving the purine-rich element binding protein A (Pur alpha). In: *The Journal of biological chemistry* 284 (47), S. 32312–32320. DOI: 10.1074/jbc.M109.024471.
- Huang, Charlie C.; Li, Yi; Lopez, Alex B.; Chiang, Cheng-Ming; Kaufman, Randal J.; Snider, Martin D.; Hatzoglou, Maria (2010): Temporal regulation of Cat-1 (cationic amino acid transporter-1) gene transcription during endoplasmic reticulum stress. In: *The Biochemical journal* 429 (1), S. 215–224. DOI: 10.1042/BJ20100286.
- Huse, Morgan (2009): The T-cell-receptor signaling network. In: *Journal of cell science* 122 (Pt 9), S. 1269–1273. DOI: 10.1242/jcs.042762.
- Hyatt, S. L.; Aulak, K. S.; Malandro, M.; Kilberg, M. S.; Hatzoglou, M. (1997): Adaptive regulation of the cationic amino acid transporter-1 (Cat-1) in Fao cells. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (32), S. 19951–19957.
- Ishise, Hisako; Larson, Barrett; Hirata, Yutaka; Fujiwara, Toshihiro; Nishimoto, Soh; Kubo, Tateki et al. (2015): Hypertrophic scar contracture is mediated by the TRPC3 mechanical force transducer via NFkB activation. In: *Scientific reports* 5, S. 11620. DOI: 10.1038/srep11620.
- Ito, K.; Groudine, M. (1997): A new member of the cationic amino acid transporter family is preferentially expressed in adult mouse brain. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (42), S. 26780–26786.
- Jager, Kristin; Bonisch, Ulrike; Risch, Michaela; Worlitzsch, Dieter; Paulsen, Friedrich (2009): Detection and regulation of cationic amino acid transporters in healthy and diseased

- ocular surface. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 50 (3), S. 1112–1121. DOI: 10.1167/iovs.08-2368.
- Jang, S. K.; Krausslich, H. G.; Nicklin, M. J.; Duke, G. M.; Palmenberg, A. C.; Wimmer, E. (1988): A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. In: *Journal of virology* 62 (8), S. 2636–2643.
- Juven-Gershon, Tamar; Hsu, Jer-Yuan; Kadonaga, James T. (2008): Caudal, a key developmental regulator, is a DPE-specific transcriptional factor. In: *Genes & Development* 22 (20), S. 2823–2830. DOI: 10.1101/gad.1698108.
- Juven-Gershon, Tamar; Kadonaga, James T. (2010): Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery. In: *Developmental biology* 339 (2), S. 225–229. DOI: 10.1016/j.ydbio.2009.08.009.
- Kadonaga, James T. (2012): Perspectives on the RNA polymerase II core promoter. In: *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology* 1 (1), S. 40–51. DOI: 10.1002/wdev.21.
- Kaufmann, J.; Smale, S. T. (1994): Direct recognition of initiator elements by a component of the transcription factor IID complex. In: *Genes & Development* 8 (7), S. 821–829. DOI: 10.1101/gad.8.7.821.
- Kavanaugh, M. P. (1993): Voltage dependence of facilitated arginine flux mediated by the system y⁺ basic amino acid transporter. In: *Biochemistry* 32 (22), S. 5781–5785.
- Kent, W. J.; Sugnet, C. W.; Furey, T. S.; Roskin, K. M.; Pringle, T. H.; Zahler, A. M.; Haussler, a. D. (2002): The Human Genome Browser at UCSC. In: *Genome Research* 12 (6), S. 996–1006. DOI: 10.1101/gr.229102.
- Kilberg, Michael S.; Barbosa-Tessmann, Ione P. (2002): Genomic sequences necessary for transcriptional activation by amino acid deprivation of mammalian cells. In: *The Journal of nutrition* 132 (7), S. 1801–1804.
- Kim, J. W.; Closs, E. I.; Albritton, L. M.; Cunningham, J. M. (1991): Transport of cationic amino acids by the mouse ecotropic retrovirus receptor. In: *Nature* 352 (6337), S. 725–728. DOI: 10.1038/352725a0.
- Kim, Tae Hoon; Barrera, Leah O.; Zheng, Ming; Qu, Chunxu; Singer, Michael A.; Richmond, Todd A. et al. (2005): A high-resolution map of active promoters in the human genome. In: *Nature* 436 (7052), S. 876–880. DOI: 10.1038/nature03877.
- Kimball, Scot R. (2002): Regulation of global and specific mRNA translation by amino acids. In: *The Journal of nutrition* 132 (5), S. 883–886.

- Kleinert, H.; Wallerath, T.; Fritz, G.; Ihrig-Biedert, I.; Rodriguez-Pascual, F.; Geller, D. A.; Forstermann, U. (1998): Cytokine induction of NO synthase II in human DLD-1 cells: roles of the JAK-STAT, AP-1 and NF-kappaB-signaling pathways. In: *British journal of pharmacology* 125 (1), S. 193–201. DOI: 10.1038/sj.bjp.0702039.
- Komar, Anton A.; Hatzoglou, Maria (2011): Cellular IRES-mediated translation: the war of ITAFs in pathophysiological states. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 10 (2), S. 229–240. DOI: 10.4161/cc.10.2.14472.
- Kotiadis, Vassilios N.; Duchen, Michael R.; Osellame, Laura D. (2014): Mitochondrial quality control and communications with the nucleus are important in maintaining mitochondrial function and cell health. In: *Biochimica et biophysica acta* 1840 (4), S. 1254–1265. DOI: 10.1016/j.bbagen.2013.10.041.
- Kozak, Marilyn (1987): An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. In: *Nucl Acids Res* 15 (20), S. 8125–8148. DOI: 10.1093/nar/15.20.8125.
- Kozak, Marilyn (2002): Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. In: *Gene* 299 (1-2), S. 1–34. DOI: 10.1016/S0378-1119(02)01056-9.
- Kozak, Marilyn (2005): A second look at cellular mRNA sequences said to function as internal ribosome entry sites. In: *Nucleic acids research* 33 (20), S. 6593–6602. DOI: 10.1093/nar/gki958.
- Kutach, A. K.; Kadonaga, J. T. (2000): The downstream promoter element DPE appears to be as widely used as the TATA box in Drosophila core promoters. In: *Molecular and Cellular Biology* 20 (13), S. 4754–4764.
- Lagrange, T.; Kapanidis, A. N.; Tang, H.; Reinberg, D.; Ebright, R. H. (1998): New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription. Sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. In: *Genes & Development* 12 (1), S. 34–44. DOI: 10.1101/gad.12.1.34.
- Lammich, Sven; Schobel, Susanne; Zimmer, Ann-Katrin; Lichtenthaler, Stefan F.; Haass, Christian (2004): Expression of the Alzheimer protease BACE1 is suppressed via its 5'-untranslated region. In: *EMBO reports* 5 (6), S. 620–625. DOI: 10.1038/sj.embor.7400166.
- Lenhard, Boris; Sandelin, Albin; Carninci, Piero (2012): Metazoan promoters: emerging characteristics and insights into transcriptional regulation. In: *Nature reviews. Genetics* 13 (4), S. 233–245. DOI: 10.1038/nrg3163.

- Lim, Chin Yan; Santoso, Buyung; Boulay, Thomas; Dong, Emily; Ohler, Uwe; Kadonaga, James T. (2004): The MTE, a new core promoter element for transcription by RNA polymerase II. In: *Genes & Development* 18 (13), S. 1606–1617. DOI: 10.1101/gad.1193404.
- Lopez, Alex B.; Wang, Chuanping; Huang, Charlie C.; Yaman, Ibrahim; Li, Yi; Chakravarty, Kaushik et al. (2007): A feedback transcriptional mechanism controls the level of the arginine/lysine transporter cat-1 during amino acid starvation. In: *The Biochemical journal* 402 (1), S. 163–173. DOI: 10.1042/BJ20060941.
- Ma, Yanjun; Brewer, Joseph W.; Diehl, J. Alan; Hendershot, Linda M. (2002): Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. In: *Journal of molecular biology* 318 (5), S. 1351–1365.
- MacLeod, C. L.; Finley, K.; Kakuda, D.; Kozak, C. A.; Wilkinson, M. F. (1990): Activated T cells express a novel gene on chromosome 8 that is closely related to the murine ecotropic retroviral receptor. In: *Molecular and Cellular Biology* 10 (7), S. 3663–3674.
- Maher, Brendan (2012): ENCODE. The human encyclopaedia (7414).
- Marvel, Douglas; Gabrilovich, Dmitry I. (2015): Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected. In: *The Journal of clinical investigation* 125 (9), S. 3356–3364. DOI: 10.1172/JCI80005.
- Matoulkova, Eva; Michalova, Eva; Vojtesek, Borivoj; Hrstka, Roman (2012): The role of the 3' untranslated region in post-transcriptional regulation of protein expression in mammalian cells. In: *RNA biology* 9 (5), S. 563–576. DOI: 10.4161/rna.20231.
- Meijer, Hedda A.; Thomas, Adri A. M. (2002): Control of eukaryotic protein synthesis by upstream open reading frames in the 5'-untranslated region of an mRNA. In: *The Biochemical journal* 367 (Pt 1), S. 1–11. DOI: 10.1042/BJ20011706.
- Mendell, Joshua T.; Sharifi, Neda A.; Meyers, Jennifer L.; Martinez-Murillo, Francisco; Dietz, Harry C. (2004): Nonsense surveillance regulates expression of diverse classes of mammalian transcripts and mutes genomic noise. In: *Nature genetics* 36 (10), S. 1073–1078. DOI: 10.1038/ng1429.
- Meteliev, Valeri; Zhang, Surong; Tabatadze, David; Bogdanov, Alexei (2011): Hairpin-like fluorescent probe for imaging of NF-kappaB transcription factor activity. In: *Bioconjugate chemistry* 22 (4), S. 759–765. DOI: 10.1021/bc100553e.
- Molitor, J. A.; Walker, W. H.; Doerre, S.; Ballard, D. W.; Greene, W. C. (1990): NF-kappa B: a family of inducible and differentially expressed enhancer-binding proteins in human T

- cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (24), S. 10028–10032.
- Morris, D. R.; Geballe, A. P. (2000): Upstream Open Reading Frames as Regulators of mRNA Translation. In: *Molecular and Cellular Biology* 20 (23), S. 8635–8642. DOI: 10.1128/MCB.20.23.8635-8642.2000.
- Muller, Ferenc; Tora, Laszlo (2014): Chromatin and DNA sequences in defining promoters for transcription initiation. In: *Biochimica et biophysica acta* 1839 (3), S. 118–128. DOI: 10.1016/j.bbagr.2013.11.003.
- Munder, Markus; Schneider, Henriette; Luckner, Claudia; Giese, Thomas; Langhans, Claus-Dieter; Fuentes, Jose M. et al. (2006): Suppression of T-cell functions by human granulocyte arginase. In: *Blood* 108 (5), S. 1627–1634. DOI: 10.1182/blood-2006-11-010389.
- Nabel, G. J.; Verma, I. M. (1993): Proposed NF- B/I B family nomenclature. In: *Genes & Development* 7 (11), S. 2063. DOI: 10.1101/gad.7.11.2063.
- Neth, P. (2001): Molekulare Analyse der mRNA-Expression von Plasma-Prokallikrein: Expressionsprofil in humanen Geweben und Mechanismen der Transkriptionsregulation. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität München, München. Fakultät für Biologie. Online verfügbar unter <https://edoc.ub.uni-muenchen.de/57/>.
- Ohler, Uwe; Liao, Guo-chun; Niemann, Heinrich; Rubin, Gerald M. (2002): Computational analysis of core promoters in the Drosophila genome. In: *Genome biology* 3 (12), RESEARCH0087.
- Ovcharenko, Ivan; Nobrega, Marcelo A.; Loots, Gabriela G.; Stubbs, Lisa (2004): ECR Browser: a tool for visualizing and accessing data from comparisons of multiple vertebrate genomes. In: *Nucleic acids research* 32 (Web Server issue), W280-6. DOI: 10.1093/nar/gkh355.
- Pelletier, J.; Sonenberg, N. (1988): Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. In: *Nature* 334 (6180), S. 320–325. DOI: 10.1038/334320a0.
- Perkins, C. P.; Mar, V.; Shutter, J. R.; del Castillo, J.; Danilenko, D. M.; Medlock, E. S. et al. (1997): Anemia and perinatal death result from loss of the murine ecotropic retrovirus receptor mCAT-1. In: *Genes & Development* 11 (7), S. 914–925. DOI: 10.1101/gad.11.7.914.

- Rach, Elizabeth A.; Yuan, Hsiang-Yu; Majoros, William H.; Tomancak, Pavel; Ohler, Uwe (2009): Motif composition, conservation and condition-specificity of single and alternative transcription start sites in the Drosophila genome. In: *Genome biology* 10 (7), R73. DOI: 10.1186/gb-2009-10-7-r73.
- Rath, Meera; Muller, Ingrid; Kropf, Pascale; Closs, Ellen I.; Munder, Markus (2014): Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. In: *Frontiers in immunology* 5, S. 532. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00532.
- Rodriguez, Paulo C.; Ochoa, Augusto C. (2008): Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. In: *Immunological reviews* 222, S. 180–191. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2008.00608.x.
- Rodriguez, Paulo C.; Quiceno, David G.; Ochoa, Augusto C. (2007): L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. In: *Blood* 109 (4), S. 1568–1573. DOI: 10.1182/blood-2006-06-031856.
- Rodriguez, Paulo C.; Zea, Arnold H.; Culotta, Kirk S.; Zabaleta, Jovanny; Ochoa, Juan B.; Ochoa, Augusto C. (2002): Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (24), S. 21123–21129. DOI: 10.1074/jbc.M110675200.
- Rogers, George W., JR; Edelman, Gerald M.; Mauro, Vincent P. (2004): Differential utilization of upstream AUGs in the beta-secretase mRNA suggests that a shunting mechanism regulates translation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (9), S. 2794–2799. DOI: 10.1073/pnas.0308576101.
- Rotmann, Alexander; Strand, Dennis; Martine, Ursula; Closs, Ellen I. (2004): Protein kinase C activation promotes the internalization of the human cationic amino acid transporter hCAT-1. A new regulatory mechanism for hCAT-1 activity. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (52), S. 54185–54192. DOI: 10.1074/jbc.M409556200.
- Roy, Ananda L.; Singer, Dinah S. (2015): Core promoters in transcription: old problem, new insights. In: *Trends in biochemical sciences* 40 (3), S. 165–171. DOI: 10.1016/j.tibs.2015.01.007.
- Sandelin, Albin; Carninci, Piero; Lenhard, Boris; Ponjavic, Jasmina; Hayashizaki, Yoshihide; Hume, David A. (2007): Mammalian RNA polymerase II core promoters: insights from genome-wide studies. In: *Nature reviews. Genetics* 8 (6), S. 424–436. DOI: 10.1038/nrg2026.
- Shiraki, Toshiyuki; Kondo, Shinji; Katayama, Shintaro; Waki, Kazunori; Kasukawa, Takeya; Kawaji, Hideya et al. (2003): Cap analysis gene expression for high-throughput analysis

- of transcriptional starting point and identification of promoter usage. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (26), S. 15776–15781. DOI: 10.1073/pnas.2136655100.
- Simmons, W. W.; Closs, E. I.; Cunningham, J. M.; Smith, T. W.; Kelly, R. A. (1996): 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. In: *The Journal of biological chemistry* 271 (20), S. 11694–11702.
- Singh, Gopal; Cooper, Thomas (2006): Minigene reporter for identification and analysis of cis elements and trans factors affecting pre-mRNA splicing. In: *Biotech.* 41 (2), S. 177–181. DOI: 10.2144/000112208.
- Sperandeo, M. P.; Borsani, G.; Incerti, B.; Zollo, M.; Rossi, E.; Zuffardi, O. et al. (1998): The gene encoding a cationic amino acid transporter (SLC7A4) maps to the region deleted in the velocardiofacial syndrome. In: *Genomics* 49 (2), S. 230–236. DOI: 10.1006/geno.1998.5252.
- Spriggs, Keith A.; Bushell, Martin; Willis, Anne E. (2010): Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress. In: *Molecular cell* 40 (2), S. 228–237. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.09.028.
- Stamatoyannopoulos, John A. (2010): Illuminating eukaryotic transcription start sites. In: *Nature methods* 7 (7), S. 501–503. DOI: 10.1038/nmeth0710-501.
- Taheri, F.; Ochoa, J. B.; Faghiri, Z.; Culotta, K.; Park, H. J.; Lan, M. S. et al. (2001): L-Arginine regulates the expression of the T-cell receptor zeta chain (CD3zeta) in Jurkat cells. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 7 (3 Suppl), 958s-965s.
- Theisen, Joshua W. M.; Lim, Chin Yan; Kadonaga, James T. (2010): Three key subregions contribute to the function of the downstream RNA polymerase II core promoter. In: *Molecular and Cellular Biology* 30 (14), S. 3471–3479. DOI: 10.1128/MCB.00053-10.
- Thomas, Mary C.; Chiang, Cheng-Ming (2006): The general transcription machinery and general cofactors. In: *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 41 (3), S. 105–178. DOI: 10.1080/10409230600648736.
- Vasu, Srividya; Moffett, R. Charlotte; McClenaghan, Neville H.; Flatt, Peter R. (2015): Responses of GLP1-secreting L-cells to cytotoxicity resemble pancreatic beta-cells but not alpha-cells. In: *Journal of molecular endocrinology* 54 (1), S. 91–104. DOI: 10.1530/JME-14-0214.

- Vekony, N.; Wolf, S.; Boissel, J. P.; Gnauert, K.; Closs, E. I. (2001): Human cationic amino acid transporter hCAT-3 is preferentially expressed in peripheral tissues. In: *Biochemistry* 40 (41), S. 12387–12394.
- Verrey, Francois; Closs, Ellen I.; Wagner, Carsten A.; Palacin, Manuel; Endou, Hitoshi; Kanai, Yoshikatsu (2004): CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. In: *Pflugers Archiv: European journal of physiology* 447 (5), S. 532–542. DOI: 10.1007/s00424-003-1086-z.
- Verrijzer, C. Peter; Chen, Jin-Long; Yokomori, Kyoko; Tjian, Robert (1995): Binding of TAFs to core elements directs promoter selectivity by RNA polymerase II. In: *Cell* 81 (7), S. 1115–1125. DOI: 10.1016/S0092-8674(05)80016-9.
- Wang, Zhong; Gerstein, Mark; Snyder, Michael (2009): RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. In: *Nature reviews. Genetics* 10 (1), S. 57–63. DOI: 10.1038/nrg2484.
- Werner, Anke; Amann, Eva; Schnitzius, Vanessa; Habermeier, Alice; Luckner-Minden, Claudia; Leuchtner, Nadine et al. (2016): Induced arginine transport via cationic amino acid transporter-1 is necessary for human T-cell proliferation. In: *European journal of immunology* 46 (1), S. 92–103. DOI: 10.1002/eji.201546047.
- Wittmann, Jurgen; Hol, Elly M.; Jack, Hans-Martin (2006): hUPF2 silencing identifies physiologic substrates of mammalian nonsense-mediated mRNA decay. In: *Molecular and Cellular Biology* 26 (4), S. 1272–1287. DOI: 10.1128/MCB.26.4.1272-1287.2006.
- Wolf, Sabine; Janzen, Annette; Vekony, Nicole; Martine, Ursula; Strand, Dennis; Closs, Ellen I. (2002): Expression of solute carrier 7A4 (SLC7A4) in the plasma membrane is not sufficient to mediate amino acid transport activity. In: *The Biochemical journal* 364 (Pt 3), S. 767–775. DOI: 10.1042/BJ20020084.
- Wu, C. H.; Madabusi, L.; Nishioka, H.; Emanuel, P.; Sypes, M.; Arkhipova, I.; Gilmour, D. S. (2001): Analysis of core promoter sequences located downstream from the TATA element in the hsp70 promoter from *Drosophila melanogaster*. In: *Molecular and Cellular Biology* 21 (5), S. 1593–1602. DOI: 10.1128/MCB.21.5.1593-1602.2001.
- Wu, G.; Morris, S. M. (1998): Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. In: *The Biochemical journal* 336 (Pt 1), S. 1–17.
- Yaman, Ibrahim; Fernandez, James; Liu, Haiyan; Caprara, Mark; Komar, Anton A.; Koromilas, Antonis E. et al. (2003): The Zipper Model of Translational Control: A Small Upstream ORF Is the Switch that Controls Structural Remodeling of an mRNA Leader. In: *Cell* 113 (4), S. 519–531. DOI: 10.1016/S0092-8674(03)00345-3.

- Yaman, Ibrahim; Fernandez, James; Sarkar, Bedabrata; Schneider, Robert J.; Snider, Martin D.; Nagy, Laura E.; Hatzoglou, Maria (2002): Nutritional control of mRNA stability is mediated by a conserved AU-rich element that binds the cytoplasmic shuttling protein HuR. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (44), S. 41539–41546. DOI: 10.1074/jbc.M204850200.
- Yang, Chuhu; Bolotin, Eugene; Jiang, Tao; Sladek, Frances M.; Martinez, Ernest (2007): Prevalence of the initiator over the TATA box in human and yeast genes and identification of DNA motifs enriched in human TATA-less core promoters. In: *Gene* 389 (1), S. 52–65. DOI: 10.1016/j.gene.2006.09.029.
- Yepiskoposyan, Hasmik; Aeschmann, Florian; Nilsson, Daniel; Okoniewski, Michal; Muhlemann, Oliver (2011): Autoregulation of the nonsense-mediated mRNA decay pathway in human cells. In: *RNA (New York, N.Y.)* 17 (12), S. 2108–2118. DOI: 10.1261/rna.030247.111.
- Yoshimoto, T.; Yoshimoto, E.; Meruelo, D. (1991): Molecular cloning and characterization of a novel human gene homologous to the murine ecotropic retroviral receptor. In: *Virology* 185 (1), S. 10–17.
- Zhou, T.; Chiang, C. M. (2001): The intronless and TATA-less human TAF(II)55 gene contains a functional initiator and a downstream promoter element. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (27), S. 25503–25511. DOI: 10.1074/jbc.M102875200.
- Zou, Jun; Tran, Diana; Baalbaki, Mai; Tang, Ling Fung; Poon, Annie; Pelonero, Angelo et al. (2015): An internal promoter underlies the difference in disease severity between N- and C-terminal truncation mutations of Titin in zebrafish. In: *eLife* 4, e09406. DOI: 10.7554/eLife.09406.

Anhang

A Oligonukleotide und TaqMan-Sonden

Name	Sequenz (5'-3'-Richtung)	Art	Herkunft
18 S RNA.for	CGGCTACCACATCCAAGGAA	for-Oligo	AG Kleinert
18 S RNA.rev	GCTGGAATTACCGCGGCT	rev-Oligo	AG Kleinert
18 S RNA.taq	TGCTGGCACCAGACTTGCCCT C	Sonde	AG Kleinert
5'X1.for	GGAGCTACTGAGAAGGCGAG	for-Oligo	AG Closs
5'X1_Kpnl.for	ccggtaccGGAGCTACTGAGAAGGCGAG	for-Oligo	AG Closs
5kb_A.as	TGCACAGAATCAAAGCCAGGCAGATG	rev-Oligo	AG Closs
5kb_A.ss	taggtaccACTGTTTTGCCTTTTCCAGAACAT	for-Oligo	AG Closs
5kb_B.as	AGGTCCTTCTCAAATATCAGCTGCT	rev-Oligo	AG Closs
5kb_B.ss	CCAGCCATTAGAATTGTGAGCCA	for-Oligo	AG Closs
5kb_C.as	taagatctCGCCCGCCCCCGCCCTCGCGCT	rev-Oligo	AG Closs
5kb_C.ss	TTCCAGCCTGGGTGACAGAGTGAGACCCCTGTCTC	for-Oligo	AG Closs
B2M.for	AGCGTACTCCAAAGATTCAGGTT	for-Oligo	AG Closs
B2M.rev	ATGATGCTGCTTACATGTCTCGAT	rev-Oligo	AG Closs
B2M.taq	TCCATCCGACATTGAAGTTGACTTACT	Sonde	AG Closs
DE.taq	TTCTATCCGCTGGAAGATGGAACCG	Sonde	AG Closs
DE-5'.for	ATggtaccGCACTGCTGATGAAACCTGG	for-Oligo	AG Closs
DE-5'.rev	TTTCCTGAAGGCACATGTCTG	rev-Oligo	AG Closs
GAPDH.502ss	AGCCTCAAGATCATCAGCAATG	rev-Oligo	AG Closs
GAPDH.288as	CACGATACCAAAGTTGTCATGGA	for-Oligo	AG Closs
GL2	CTTTATGTTTTTGGCGTCTTCC	rev-Primer	StarSEQ GmbH
HC1.330ss	CTTCATCACCGGCTGGAACCT	for-Oligo	AG Closs
HC1.429as	GGGTCTGCCTATCAGCTCGT	rev-Oligo	AG Closs
HC1.Taq1	AATCCTCTCCTACATCATCGGTACTTCAAGCGT	Sonde	AG Closs
hGAPDHTaq1	CTGCACCACCAACTGCTTAGCACCC	Sonde	AG Closs
I1_AS_EcoRV.for	ATgatatcAAGCGGTGGAATCTCTGGTG	for-Oligo	AG Closs
I1_BgIII.rev	agatctAGAGGATGGCAGCGTTCC	rev-Oligo	AG Closs
inCAT_3.for	CGCCGCCGGCTTGGGA	for-Oligo	AG Closs
inCAT_d.for	CTTGGGCCCGGGTCATCA	for-Oligo	AG Closs
inCAT_d05_V.rev	ATgatatcTGTGGAGGGCTTGAGGAACC	rev-Oligo	AG Closs
inCAT_d06_V.rev	ATgatatcGGGACCCAGACGAGAGGTG	rev-Oligo	AG Closs
inCAT_d07_V.rev	ATgatatcGGATGGCAGCAGAGTCCCT	rev-Oligo	AG Closs
inCAT_d08_V.rev	ATgatatcATGACACATCCCCGGACCTC	rev-Oligo	AG Closs
inCAT_d09_V.rev	ATgatatcCCGTGTGCCTCCCAGTCT	rev-Oligo	AG Closs
inCAT_d10_V.rev	ATgatatcCCCACGCTTACTCACTCGGT	rev-Oligo	AG Closs
Intron1_3kb_neu.rev	ggcctcagcGCCTCTTCCCTCAGTCACAC	rev-Oligo	AG Closs
inX.rev	TCCAGGAACCAGGGCGTATCT	rev-Oligo	AG Closs
MμORF_2.for	TACCGCACTGCTGAGCAAACCTGGCGCCGG	for-Oligo	AG Closs
MμORF_2.rev	CCGGCGCCAGGTTTGCTCAGCAGTGCGGTA	rev-Oligo	AG Closs
M13 rev	CAGGAAACAGCTATGAC	rev-Oligo	StarSEQ GmbH

NFkB_509_Notl.for	CGGAGTCCATTTTGGCTCGCGGCCGCCGCGGCGTG GTGCATGA	for-Oligo	AG Closs
NFkB_509_Notl.rev	TCATGCACCACGCCGCGGCCGCCGAGCCAAAAT GGACTCCG	rev-Oligo	AG Closs
pRHCglo 3P1	CATTCACCACATTGGTGTGC	rev-Oligo	AG Kleinert
pRHCglo 5P1	GGAACCTACAAGATTGCTGGAG	for-Oligo	AG Kleinert
pRHCglo taq	AGCTCCGGACTCGGGATCCATCTAC	Sonde	AG Kleinert
RV3	CTAGCAAATAGGCTGTCCCC	for-Oligo	StarSEQ GmbH
T7 for	AATACGACTCACTATAGG	for-Oligo	StarSEQ GmbH
X1.for	CTAACCGCAGCCTCCACT	for-Oligo	AG Closs
X1.rev	CAGGATCGCGAACAGACAG	rev-Oligo	AG Closs
X1delta2.for	TAggtaccCTAACCGCAGCCTCCACTC	for-Oligo	AG Closs
X1delta3.for	TAggtaccGAGCGTCCGTTGGTCCTT	for-Oligo	AG Closs
X1TS1.for	GCGGAGCGCGAGGGGCGG	for-Oligo	AG Closs
X1TS2.for	GCACTGCTGATGAAACCTGG	for-Oligo	AG Closs
X2.for	GATTCTGAAACCTTCCTTGTATCCC	for-Oligo	AG Closs
X2.rev	AAGCCTCACCACCTTCTCAC	rev-Oligo	AG Closs
X2_HindIII_A.as	ATaagcttCTGGAATATGACGGGAAGCCTC	rev-Oligo	AG Closs
X3.for	CTCTGAACAGCAACATGGGG	for-Oligo	AG Closs
X3.rev	AAAAGTGTTTCAGGCAGCGAG	rev-Oligo	AG Closs

B Promotorkonstrukte

Bezeichnung	im Laborbuch zu finden unter	erstellt von	Klonierungsstrategie
A basic	A in pGL3 basic	S. Muther	PCR: 5kb_A.ss + 5kb_A.as mit pBeloBAC11, dann mit Acc65I + SacI in pGL3 basic, Ligation
AB basic	AB in pGL3 basic	S. Muther	Restriktion: A basic und B basic mit Acc65I + SacI, Ligation
ABC basic	ABC in pGL3 basic	S. Muther	Restriktion: AB basic und C basic mit NheI + BglI, Ligation
B basic	B in pGL3 basic	S. Muther	PCR: 5kb_B.ss + 5kb_B.as mit pBeloBAC11, dann mit SacI + NheI in pGL3 basic, Ligation
C basic	C in pGL3 basic	S. Muther	PCR: 5kb_C.ss + 5kb_C.as mit pBeloBAC11, dann mit NheI und BglI in pGL3 basic, Ligation
CD basic	CD in pGL3 basic	S. Muther	PCR: 5'X1.for + I1_BglI.rev mit pBeloBAC11, dann mit SfiI + BglI in pGL3 basic, Ligation
DE control inglo	DE in pGL3 control Inglo	S. Muther	PCR: 5'X1_KpnI.for + Intron1_3kb_neu.rev mit pBeloBAC11, dann in pCR TOPO, dann DE in TOPO mit Acc65I + EcoRI + BglI und pGL3 control inglo ASV40 mit Acc65I + NruI, CIAP-Behandlung, Ligation
DE inCAT	DE in pGL3 promoter inCAT_A	S. Muther	PCR: I1_AS_EcoRV.for + X2_HindIII_A.as mit pBeloBAC11, Restriktion von pGL3 promoter mit Acc65I + HindIII, DE in pCR TOPO2.1 mit BglI + Acc65I + EcoRV, PCR-Produkt A mit HindIII + EcoRV, Ligation

DE inCAT_B	DE in pGL3 promoter inCAT_B	S. Muther	PCR: I1_AS_EcoRV.for + X2_HindIII_A.as mit pBe-loBAC11, Restriktion von pGL3 promoter mit Acc65I + HindIII, DE in pCR TOPO2.1 mit BglII + Acc65I + EcoRV, PCR-Produkt B mit HindIII + EcoRV, Ligation
DE inglo	DE in pGL3 promoter inglo	S. Muther	Restriktion: DE in pGL3 control inglo ASV40 mit Afel + XbaI, Ligation
DE-5' inCAT	DE-5flank in pGL3 promoter inCAT_A	T. Rothenburger	PCR: DE-5'.for + DE-5'.rev mit DE inCAT, Restriktion von PCR-Produkt und DE inCAT mit Acc65I + PvuII, Ligation
DE-5' inglo	DE-5flank in pGL3 promoter inglo	S. Muther	PCR: DE-5'.for + DE-5'.rev mit DE inglo, Restriktion mit Acc65I + PvuII, auch bei DE inglo, Ligation
E inCAT	E in pGL3 promoter inCAT_A	T. Rothenburger	Restriktion: DE inCAT mit Acc65I + NruI, Klenow, Ligation
E inglo	E in pGL3 control Inglo	S. Muther	Restriktion: DE inglo mit Acc65I + NruI, Klenow, Ligation
I1Δ1 inCAT	DE-5flank in pGL3 promoter inCAT_A_Del 01	T. Rothenburger	Restriktion von DE -5' inCAT mit EcoRV + NdeI, Klenow, Ligation
I1Δ10 inCAT	DE-5flank in pGL3 promoter inCAT_A_Del 04	T. Rothenburger	Restriktion von DE -5' inCAT mit EcoRV + XmaI, Klenow, Ligation
I1Δ2 inCAT	DE-5flank in pGL3 promoter inCAT_A_Del 02	T. Rothenburger	Restriktion von DE -5' inCAT mit EcoRV + PvuII, Ligation
I1Δ3 inCAT	DE-5flank in pGL3 promoter inCAT_A_Del 05	T. Rothenburger	PCR: inCAT_d.for + inCAT_d05_V.rev mit DE-5' inCAT, Restriktion von PCR-Produkt und DE-5' inCAT mit EcoRV + SfiI, Ligation
I1Δ4 inCAT	DE-5flank in pGL3 promoter inCAT_A_Del 06	T. Rothenburger	PCR: inCAT_d.for + inCAT_d06_V.rev mit DE-5' inCAT, Restriktion von PCR-Produkt und DE-5' inCAT mit EcoRV + SfiI, Ligation
I1Δ5 inCAT	DE-5flank in pGL3 promoter inCAT_A_Del 07	T. Rothenburger	PCR: inCAT_d.for + inCAT_d07_V.rev mit DE-5' inCAT, Restriktion von PCR-Produkt und DE-5' inCAT mit EcoRV + SfiI, Ligation
I1Δ6 inCAT	DE-5flank in pGL3 promoter inCAT_A_Del 08	T. Rothenburger	PCR: inCAT_d.for + inCAT_d08_V.rev mit DE-5' inCAT, Restriktion von PCR-Produkt und DE-5' inCAT mit EcoRV + SfiI, Ligation
I1Δ7 inCAT	DE-5flank in pGL3 promoter inCAT_A_Del 09	T. Rothenburger	PCR: inCAT_d.for + inCAT_d09_V.rev mit DE-5' inCAT, Restriktion von PCR-Produkt und DE-5' inCAT mit EcoRV + SfiI, Ligation
I1Δ8 inCAT	DE-5flank in pGL3 promoter inCAT_A_Del 10	T. Rothenburger	PCR: inCAT_d.for + inCAT_d10_V.rev mit DE-5' inCAT, Restriktion von PCR-Produkt und DE-5' inCAT mit EcoRV + SfiI, Ligation

I1Δ9 inCAT	DE-5flank in pGL3 promoter inCAT_A_Del 03	T. Rothenburger	Restriktion von DE -5' inCAT mit EcoRV + Sfil, Klenow, Ligation
MNF-κB inCAT	NfκB.509.NotI inCAT	S. Muther	Mutagenese-PCR: MμORF I1Δ8 inCAT mit NFκB_509_NotI.for + NFκB_509_NotI.rev, DpnI-Verdau
MμORF I1Δ6 inCAT	DE-5flank_MuORF_ in pGL3 promoter inCAT_A_Del 8	T. Rothenburger	Restriktion: MμORF I1Δ8 inCAT (Vektor) und MμORF I1Δ6 inCAT (Insert) mit XmaI und EcoRV, Ligation
MμORF I1Δ8 inCAT	DE-5flank_MuORF_ in pGL3 promoter inCAT_A_Del 10	T. Rothenburger	Mutagenese-PCR: I1Δ8 inCAT mit MμORF_2.for und MμORF_2.rev, DpnI-Verdau
pGL3 basic	pGL3 basic	AG Kleinert	-
pGL3 basic inglo	pGL3 control inglo del. promoter	S. Muther	Restriktion: pGL3 control inglo ASV40 mit BglII und HindIII, Ligation
pGL3 control	pGL3 control	AG Kleinert	-
pGL3 control inglo ASV40	pGL3 control Inglo ASV40	AG Kleinert	-
pGL3 promoter	pGL3 promoter	AG Kleinert	-
pRHCglo	pRHCglo	AG Kleinert	-
pRL-EF1α	pRL-EF1α	AG Kleinert	-
X1Δ2 inCAT	DE-5' flank_X1Δ2_in pGL3 promoter inCAT_A_Del 8	T. Rothenburger	PCR: X1delta2.for + inCAT_d08_V.rev mit DE-5' inCAT, Restriktion von PCR-Produkt und DE-5' inCAT mit Acc65I + EcoRV, Ligation
X1Δ3 inCAT	DE-5' flank_X1Δ3_in pGL3 promoter inCAT_A_Del 8	T. Rothenburger	PCR: X1delta3.for + inCAT_d08_V.rev mit DE-5' inCAT, Restriktion von PCR-Produkt und DE-5' inCAT mit Acc65I + EcoRV, Ligation

C Übersicht über die Herkunft der n-Zahlen

Abbildung	Promotorkonstrukt	n-Zahl gesamt	eigene n-Zahl	n-Zahl von T. Rothenburger	Versuch
Abb. 27	<i>pGL3 control inglo ASV40</i>	28	28	0	5.6, 5.9, 5.13, 5.14, 5.15
	<i>pGL3 basic inglo</i>	23	23	0	5.6, 5.9, 5.13, 5.14, 5.15
	<i>DE inglo</i>	23	23	0	5.6, 5.9, 5.13, 5.14, 5.15
Abb. 28	<i>pGL3 control inglo ASV40</i>	20	20	0	5.15, 5.20, 5.22, 5.23, 5.24
	<i>pGL3 basic inglo</i>	20	20	0	5.15, 5.20, 5.22, 5.23, 5.24
	<i>DE inglo</i>	20	20	0	5.15, 5.20, 5.22, 5.23, 5.24
	<i>DE-5' inglo</i>	4	4	0	5.24
Abb. 30	<i>pGL3 control inglo ASV40</i>	32	32	0	5.6, 5.9, 5.13, 5.14, 5.15, 5.25
	<i>pGL3 basic inglo</i>	27	27	0	5.6, 5.9, 5.13, 5.14, 5.15, 5.25
	<i>DE inglo</i>	24	24	0	5.6, 5.9, 5.13, 5.14, 5.15
	<i>E inglo</i>	18	18	0	5.9, 5.13, 5.14, 5.25
Abb. 31	<i>pGL3 control inglo ASV40</i>	32	24	8	5.15, 5.20, 5.22, 5.23, 5.24, 5.35B, T1, T5
	<i>pGL3 basic inglo</i>	32	24	8	5.15, 5.20, 5.22, 5.23, 5.24, 5.35B, T1, T5
	<i>DE inglo</i>	20	20	0	5.15, 5.20, 5.22, 5.23, 5.24
	<i>DE inCAT</i>	24	12	12	5.20, 5.24, 5.35B, T1, T5
	<i>DE inCAT_B</i>	16	16	0	5.20, 5.22, 5.23, 5.24
Abb. 32	<i>pGL3 control inglo ASV40</i>	4	0	4	T1, T5
	<i>DE inCAT</i>	6	0	6	T1, T5
	<i>DE inCAT_B</i>	2	0	2	T1
Abb. 33	<i>pGL3 control inglo ASV40</i>	32	16	16	5.20, 5.24, 5.35, 5.35B, T1, T2, T3, T5
	<i>pGL3 basic inglo</i>	32	16	16	5.20, 5.24, 5.35, 5.35B, T1, T2, T3, T5
	<i>DE inCAT</i>	24	12	12	5.20, 5.24, 5.35B, T1
	<i>DE-5' inCAT</i>	20	4	16	5.35, T2, T3, T5
Abb. 34	<i>pGL3 control inglo ASV40</i>	4	0	4	T1, T5
	<i>DE inCAT</i>	6	0	6	T1, T5
	<i>DE-5' inCAT</i>	6	0	6	T1, T5
Abb. 35	<i>pGL3 control inglo ASV40</i>	28	12	16	5.20, 5.24, 5.35B, T1, T2, T3, T5
	<i>pGL3 basic inglo</i>	28	12	16	5.20, 5.24, 5.35B, T1, T2, T3, T5
	<i>DE inCAT</i>	24	12	12	5.20, 5.24, 5.35B, T1, T5
	<i>E inCAT</i>	12	0	12	T1, T2, T3
Abb. 36	<i>pGL3 control inglo ASV40</i>	4	0	4	T1, T5
	<i>DE inCAT</i>	6	0	6	T1, T5
	<i>E inCAT</i>	2	0	2	T1

Abb. 37	<i>pGL3 control inglo ASV40</i>	44	4	40	5.35, T2, T3, T4, T5, T6, T8, T9, T10, T11, T2
	<i>pGL3 basic inglo</i>	44	4	40	5.35, T2, T3, T4, T5, T6, T8, T9, T10, T11, T2
	<i>DE-5' inCAT</i>	20	4	16	5.35, T2, T3, T5
	<i>I1Δ1 inCAT</i>	12	0	12	T2, T3, T4
	<i>I1Δ2 inCAT</i>	12	0	12	T2, T3, T4
	<i>I1Δ3 inCAT</i>	12	0	12	T2, T3, T4
	<i>I1Δ4 inCAT</i>	12	0	12	T2, T3, T4
	<i>I1Δ5 inCAT</i>	12	0	12	T3, T4, T8, T9
	<i>I1Δ6 inCAT</i>	12	0	12	T3, T4, T6
	<i>I1Δ7 inCAT</i>	16	0	16	T3, T4, T6, T8
	<i>I1Δ8 inCAT</i>	20	0	20	T3, T4, T6, T11, T12
	<i>I1Δ9 inCAT</i>	16	0	16	T3, T4, T6, T8
<i>I1Δ10 inCAT</i>	20	0	20	T4, T6, T8, T10	
Abb. 38	<i>pGL3 control inglo ASV40</i>	28	0	28	T6, T8, T9, T12, T13, T15, T16
	<i>pGL3 basic inglo</i>	24	0	24	T6, T8, T9, T12, T15, T16
	<i>I1Δ6 inCAT</i>	20	0	20	T6, T8, T13, T15, T16
	<i>X1Δ2 inCAT</i>	4	0	4	T9
	<i>X1Δ3 inCAT</i>	16	0	16	T12, T13, T15, T16
Abb. 47	<i>pGL3 control inglo ASV40</i>	12	8	4	5.35, 5.35B, T9
	<i>pGL3 basic inglo</i>	12	8	4	5.35, 5.35B, T9
	<i>I1Δ8 inCAT</i>	8	4	4	5.35B, T9
	<i>mNF-κB inCAT</i>	16	12	0	5.35, 5.35B
Abb. 48	<i>pGL3 control inglo ASV40</i>	2	2	0	5.35
	<i>I1Δ8 inCAT</i>	2	2	0	5.35
	<i>mNF-κB inCAT</i>	6	6	0	5.35
Abb. 51	<i>pGL3 control inglo ASV40</i>	40	4	36	5.35B, T6, T8, T9, T10, T11, T12, T13, T15, T16
	<i>pGL3 basic inglo</i>	36	4	32	5.35B, T6, T8, T9, T10, T11, T12, T15, T16
	<i>I1Δ6 inCAT</i>	20	0	20	T6, T8, T13, T15, T16
	<i>mμORF I1Δ6 inCAT</i>	20	0	20	T11, T12, T13, T15, T16
Abb. 52	<i>pGL3 control inglo ASV40</i>	28	4	24	5.35B, T6, T8, T9, T10, T11, T12
	<i>pGL3 basic inglo</i>	28	4	24	5.35B, T6, T8, T9, T10, T11, T12
	<i>I1Δ8 inCAT</i>	8	4	4	5.35B, T9
	<i>mμORF I1Δ8 inCAT</i>	12	0	12	T9, T10

Teilveröffentlichungen der vorliegenden Arbeit

Publikationen

Susanne K. Muther, Tamara Rothenburger, Anke Werner, Markus Munder, Hartmut Kleinert, Ellen I. Closs

Arbeitstitel: Characterization of the Promoter for the human cationic amino acid transporter hCAT-1

Veröffentlichung in einer Fachzeitschrift, in Vorbereitung

Vorträge

Susanne K. Muther, Tamara Rothenburger, Anke Werner, Hartmut Kleinert, Markus Munder, Ellen I. Closs

Identification of the promoter for the human cationic amino acid transporter hCAT-1
Göttinger Transporttage der Universitätsmedizin Göttingen, 15.-16.10.2016

Ellen I. Closs, Anke Werner, Susanne Muther, Lara Kürzer, Markus Munder

Role of cationic amino acid transporters in human immune and tumor cells

9th SFB-Symposium 2016 of SFB 35 Transmembrane Transporters in Health and Disease, 31.08.-02.09.2016 in Wien (Österreich)

Poster

Susanne K. Muther, Anke Werner, Hartmut Kleinert and Ellen I. Closs

Gene internal promoter of the human cationic amino acid transporter hCAT-1

82. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, 29.02.-03.03.2016 in Berlin

Susanne K. Muther, Anke Werner, Eva Amann, Nadine Leuchtner, Markus Munder, Ellen I. Closs

Signaling via protein kinase B / AKT is involved in activation-induced expression of the cationic amino acid transporter hCAT-1 in human primary T lymphocytes

14th International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins, 03.-07.08.2015 in Wien (Österreich)

Susanne K. Muther, Anke Werner, Jean-Paul Boissel, Markus Munder, Ellen I. Closs

Regulation of gene expression of the human cationic amino acid transporter 1 (hCAT-1)

18th Barrier and Transporter Meeting, 26.-28.05.2014 in Bad Herrenalb

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig angefertigt und keine anderen, als die angegebenen, Hilfsmittel und Quellen in der Arbeit verwendet habe.

Mainz, den

Susanne Katharina Muther