

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

**Posttranslationale Regulation
der Transportaktivität
humaner kationischer Aminosäuretransporter
(human cationic aminoacid transporter: hCATs)**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

‘Doktor der Naturwissenschaften’

im Promotionsfach Chemie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie, Geografie und Geowissenschaften

der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

Julia Bender-Sigel

geb. in Studjonoje, Russland

Mainz, 2025

1. Berichtstatter:

2. Berichtstatter:

3. Berichtstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

meinem Vater

Danksagung

In erster Linie möchte ich meiner Doktormutter Prof. Dr. _____ für die Möglichkeit danken, in ihrer Arbeitsgruppe meine Doktorarbeit anzufertigen. Außerdem danke ich ihr für die stets kompetente Betreuung, für ein immer offenes Ohr, die Möglichkeit eine Familie zu gründen und vor allem für ihre Geduld.

Ein Dankeschön geht auch an Prof. Dr. _____, der sich bereit erklärt hat als Erstgutachter aus dem Fachbereich 09 zu fungieren und an Prof. Dr. _____ als Drittgutachter. An Prof. _____ aus Hannover ein Dankeschön für die Bereitstellung der Toxine.

Für die tatkräftige Unterstützung unserer Technische Assistenten _____ möchte ich mich herzlichst bedanken. Ohne sie würde das Laborleben nicht funktionieren.

Dr. _____ danke ich für die lockere Atmosphäre im Labor.

Meinen Mit-Doktoranden, _____ möchte ich für die tolle Zeit und die Motivation weiterzumachen, danken.

Meinen Eltern und Schwiegereltern möchte ich dafür danken, dass sie immer hinter mir standen und mich vor allem bei der Kinderbetreuung unterstützt haben.

Zum Schluss möchte ich noch meiner Familie dafür danken, dass sie mich zu Hause jederzeit unterstützt und es überhaupt möglich gemacht hat, dass ich diesen schwierigen Weg gehen konnte. Meinen Kindern _____, die während dieser Arbeit zur Welt gekommen sind, danke ich dafür, dass sie für den nötigen Ausgleich gesorgt haben.

Abstract

Cells depend on transporters for communication, interaction, and the selective uptake of nutrients and other molecules. Despite their importance, the intricate regulatory mechanisms that govern transporter activity and surface expression are not fully understood for many of these vital membrane proteins. This work investigated the post-translational regulation of human cationic amino acid transporters (hCATs) by protein kinase C (PKC) involving Rho-GTPases (Cdc42, Rac1, and RhoA) and other potentially involved proteins.

The central finding of the work is that both PKC and Rho-GTPases, especially Cdc42, play a crucial role in modulating the transport activity of all four hCAT isoforms. Activation of PKC leads to a significant reduction in arginine uptake by the hCATs. This effect was demonstrated in *Xenopus laevis* oocytes as a model system and various human cell lines. Interestingly, the reduced arginine uptake is caused by the altered membrane localization of the transporters (induced endocytosis).

An important aspect of this work is the investigation of the interplay of Rho-GTPases in regulating hCAT transporters showing the involvement of these GTPases in adapting transporter activity to meet cellular arginine demand. The results suggest that the simultaneous activation of PKC and Rho-GTPases could lead to complex regulation of hCAT transporters, involving a reduced localization of the transporters in the plasma membrane.

The importance of membrane localization for the function of hCAT transporters was particularly emphasized in this work. Understanding the mechanisms that regulate membrane proteins, especially transporter proteins, is of central importance, as they represent both targets and sensors for the cell's environment.

In summary, this research makes an important contribution to understanding the complex regulation of amino acid transporters, especially hCATs. The results show that PKC and Rho-GTPases play a crucial role in modulating transport activity and that membrane localization of the transporters is an important factor for their function. The interaction between PKC and Rho-GTPases could represent a finely tuned system that controls amino acid uptake as needed.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	IV
Abstract	V
Inhaltsverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	X
Abbildungsverzeichnis	XIV
Tabellenverzeichnis	XVIII
1 Einleitung	1
1.1 Humane Transporter für kationische Aminosäuren	2
1.1.1 Klassifikation der kationischen Aminosäuretransporter der SLC7-Familie	2
1.1.2 Eigenschaften und Funktion der humanen kationischen Aminosäuretransporter (hCAT).....	4
1.1.3 Physiologische Bedeutung der humanen hCAT-Transporter	5
1.2 Mechanismen der CAT-Regulation	6
1.2.1 Transkriptionale Regulation der CATs	6
1.2.2 Translationale und posttranslationale Regulation der CAT	7
1.3 Endozytose	13
1.3.1 Clathrin-abhängige Endozytose	14
1.3.2 Clathrin-unabhängige Endozytose	15
1.3.3 Constitutive Cycling (konstitutiver Membranprotein-Kreislauf)	19
1.3.4 Rho-GTPasen und ihre Rolle in der Endozytose	19
1.4 Regulationskaskade der hCATs	23
1.5 Fragestellung	25
2 Material	26
2.1 Material	26
2.1.1 Laborgeräte.....	26
2.1.2 Allgemeine Verbrauchsmaterialien.....	27
2.1.3 Chemikalien	28
2.1.4 Enzyme und Kits	30
2.1.5 Bakterien, Plasmide, Vektoren und siRNAs	30
2.1.6 Antikörper	32
2.1.7 Substanzen Aktivitäts-Essay	33

2.1.8	Puffer und Lösungen	33
2.1.9	Molekularbiologische Lösungen und Wachstumsmedien	36
2.1.10	Zellkultur – Lösungen und Inkubationsmedien	37
2.1.11	Tiere.....	37
3	Methoden.....	38
3.1	Molekularbiologische Methoden	38
3.1.1	Hitzeschocktransformation & Plasmid-Präparation aus <i>Escherichia coli</i>	38
3.1.2	Linearisierung & <i>in vitro</i> -Transkription	38
3.1.3	Isolation von Gesamt-RNA.....	39
3.1.4	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	40
3.2	Biochemische Methoden	40
3.2.1	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	40
3.2.2	Zelllysate.....	41
3.2.3	Biotinylierung.....	42
3.2.4	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	45
3.2.5	Western-Blot.....	47
3.3	Expressionsystem <i>Xenopus laevis</i>-Oozyten.....	50
3.3.1	Das Expressionssystem <i>Xenopus laevis</i>	50
3.3.2	Gewinnung der <i>X. laevis</i> Oozyten	52
3.3.3	Vereinzeln und Lagerung der <i>X. laevis</i> Oozyten	53
3.3.4	Synthese von cRNA durch <i>in vitro</i> -Transkription.....	53
3.3.5	Injektion der cRNA und Expression der Proteine in <i>X. laevis</i> Oozyten	54
3.3.6	Transportstudien in <i>X. laevis</i> Oozyten.....	55
3.4	Zellkultur	57
3.4.1	Zelllinien: Herkunft, Morphologie und Kultivierung	58
3.4.2	Mikroskopie	60
3.4.3	Behandlung mit siRNA.....	61
3.4.4	Transportstudien an humanen Zellen	62
3.4.5	Nachweis von aktiven Cdc42	63
4	Ergebnisse	65
4.1	Experimente in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten Expressionssystem	65
4.1.1	Beteiligung von Rho-GTPasen an der PKC-vermittelten Reduktion von in hCAT-Proteinen in der Plasmamembran.....	65
4.1.2	Aufhebung der Reduktion nach PKC-Aktivierung durch TcdB-Vorinkubation	65

4.1.3	Wirkung von konstitutiv aktiven Mutanten der Rho-GTPasen auf die Transportaktivität von hCAT-1 und hCAT-2A	67
4.1.4	Konstitutiv aktives Cdc42 reguliert die Transportaktivität aller vier hCAT Isoformen unterschiedlich stark.....	68
4.1.5	Konzentration- und Zeitabhängigkeit der Transportreduktion von hCAT-2A nach Cdc42V12-Überexpression.....	69
4.1.6	Reduktion der Zelloberflächenexpression des hCAT-2A nach Überexpression von Cdc42V12	71
4.1.7	Einfluss der Co-Expression der dominant negativen Mutanten Cdc42N17 und RacN17 auf den hCAT-2A-vermittelten Arginintransport	72
4.1.8	Toxine TcdB 1470 und TcdB 10463 heben die Reduktion des hCAT-2A-vermittelten Transportes durch Cdc42V12 auf	75
4.1.9	Der PKC-Inhibitor BIM II hebt nur den PKC-Effekt auf, nicht den von Cdc42V12	76
4.2	Experimente in humanen Zellen	78
4.2.1	Vergleich der endogenen Cdc42 in verschiedenen humanen Zelllinien.....	78
4.2.2	Suche nach geeigneter humanen Zelllinie	79
4.2.3	Vergleich der hCAT-2A-Expression in verschiedenen humanen Leberzelllinien	79
4.2.4	Generierung einer U373-Zelllinie, die ein Fusionsprotein aus hCAT-2A und dem grün fluoreszierenden Protein EGFP-stabil exprimiert.....	81
4.2.5	Experimente mit U373-Zelllinien, die ein Fusionsprotein aus hCAT-2A und grün fluoreszierendem Protein EGFP stabil exprimieren	83
4.2.6	Aktivierung des endogenen Cdc42	100
4.2.7	Transportverhalten nach EGF-Stimulation	102
4.2.8	Ein mögliches Adapterprotein für die hCATs.....	105
4.2.9	Untersuchung des Transportverhaltens von hCAT-1.....	109
5	Diskussion.....	117
5.1	Bisherige Erkenntnisse zur hCAT-Regulierung.....	117
5.2	Erkenntnisse aus dem <i>Xenopus laevis</i> Oozyten-Expressionssystem	120
5.3	Erkenntnisse aus humanen Zellsystemen	124
	Adapterprotein GRB2 hat einen erheblichen Einfluss auf die Transportaktivität von hCAT-1 und hCAT-2A.....	130
5.4	Methodische Limitierung.....	136
6	Fazit und Ausblick.....	138
7	Zusammenfassung.....	142

8	<i>Literaturverzeichnis</i>	143
9	<i>ANHANG</i>	159
9.1	<i>Lebenslauf</i>	159
10	<i>Eidesstattliche Erklärung / Affidavit</i>	162

Abkürzungsverzeichnis

ACK1	<i>Activated</i> CDC42 kinase 1
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ASL	Argininosuccinatlyase
AS	Aminosäure(n)
BAS	basische Aminosäuren
BIM I	Bisindolylmaleimid I (3-[1-Dimethyl-aminopropyl]indol-3-yl)-4-(indol-3-yl)maleimid
bp	Basenpaare
CAT	Transporter für kationische Aminosäuren (<i>cationic amino-acid transporter</i>)
CCV	<i>clathrin-coated-vesicles</i>
Cdc42	<i>cell division cycle 42</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CLSM	Konfokalmikroskop (<i>confocal laser scanning microscope</i>)
cpm	Zählrate pro Minute (<i>counts per minute</i>)
CME	<i>clathrin-mediated endocytosis</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dpm/DPM	Zerfälle pro Minute (<i>disintegrations per minute</i>)
E	Aktivitäts-Einheiten
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
EGFP	verstärkt grün fluoreszierendes Protein (<i>enhanced green fluorescent protein</i>)

FRS (FCS)	Fetales Rinderserum (<i>fetal calf serum</i>)
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GDI	<i>Guanine nucleotide dissociation inhibitor</i>
GDF	<i>GDI-displacement factor</i>
GDP	Guaninnukleotiddiphosphat
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
GLT	Glutamattransporter
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GTP	Guaninnukleotidtriphosphat
HAT	Heterodimere Aminosäuretransporter
HUGO	<i>Human Genome Organisation</i>
IPA 3	1,1'-Dithiodi-2-naphthol
K _m	Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit
LAT	System L-Aminosäuretransporter
MDC	Monodansylcadaverin
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MuLV	murines Leukämie-Virus
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase (n für neuronal, e für endothelial, i für induzierbar)
nt	Nukleotide
NTPs	Nukleosidtriphosphate
N-WASP	<i>neural Wiskott-Aldrich Syndrome Protein</i>
OCT	Ornithin-Carbamoyl-Transferase
OD	optische Dichte

ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
PAEC	Endothelzellen von Pulmonalarterien (<i>pulmonary artery endothelial cells</i>)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAK1	<i>p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PP	Proteinphosphatasen
PP2	4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine
PTM	Posttranslationale Modifikation
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
Rho	<i>Ras homologous</i>
ROCK	Rho-Kinase
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler (<i>standard error of mean</i>)
SLC	Solute-Carrier
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TGF- β_1	<i>transforming growth factor-β_1</i>
TM	Transmembrandomäne(n)

TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
UTR	untranslatierter Bereich (<i>untranslated Region</i>)
V _{max}	max. Transportgeschwindigkeit bei Sättigung des Transportsystems
WAVE	<i>Wiskott-Aldrich Syndrome Protein Family Verprolin-homologous Protein</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.	Integration der Signalübertragung durch Proteinkinase C (PKC).....	10
Abbildung 2.	Übersicht Endozytosewege	13
Abbildung 3.	Transportverhalten aller vier Isoformen der hCATs nach PMA-Stimulation in <i>X. laevis</i> Oozyten	23
Abbildung 4.	Auswirkung der Hemmung von endogenen Rho-GTPasen durch TcdB 10463 und TcdB 1470 auf die PKC-vermittelte Reduktion des Arginin-Transportes in hCAT-2A exprimiert in <i>X. laevis</i> Oozyten.....	66
Abbildung 5.	Einfluss von konstitutiv aktiven Mutanten verschiedener Rho-GTPasen auf den Arginin-Transport durch hCAT-1 und -2A	68
Abbildung 6.	Einfluss von Cdc42V12 auf die Transportaktivität aller hCAT-Isoformen	69
Abbildung 7.	Vergleich der hCAT-2A Transportaktivität von Arginin und Lysin in Bezug auf Cdc42V12 Co-Expression.....	70
Abbildung 8.	Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Transportreduktion des hCAT-2A nach Cdc42V12- Co-Expression in Oozyten	70
Abbildung 9.	Reduktion der Oberflächenexpression von hCAT-2A nach Cdc42V12 Co-Expression in <i>X. laevis</i> Oozyten	72
Abbildung 10.	Hemmung der Transportaktivität von hCAT-2A nach PKC-Aktivierung und -Co-Expression von aktiver und dominant negativer Cdc42 Mutante	73
Abbildung 11.	PMA-Effekt auf die Transportaktivität von hCAT-2A nach Co-Expression der dominant negativen Cdc42 N17, Rac1N17 Mutanten oder beiden Rho-Mutanten.....	75
Abbildung 12.	Cdc42V12-Wirkung auf die Transportaktivität des hCAT-2A nach Hemmung der Rho-GTPasen-Aktivität mit TcdB.....	75
Abbildung 13.	PKC- und Cdc42V12-Effekt auf hCAT-2A in Gegenwart des PKC-Inhibitors BIM II	76
Abbildung 14.	Endogenes Cdc42 in verschiedenen humanen Säugerzelllinien	79

Abbildung 15.	Vergleich der Proteinexpression von hCAT-2 und der mRNA-Expression aller hCAT-Isoformen in verschiedenen Zelllinien	80
Abbildung 16.	Vergleich der vier Klone 1 - 4 der generierten Zelllinie U373 hCAT-2A EGFP 82	
Abbildung 17.	Vergleich des Transportverhaltens der Klone 4 und JP der U373 hCAT-2A EGFP-Zellen	83
Abbildung 18.	Auswirkungen einer PKC-Aktivierung auf den hCAT-2A-vermittelten Transport in mit hCAT-2A-EGFP stabil transfizierten U373-Zellen	84
Abbildung 19.	Veränderte Aktinstrukturen nach PMA-Behandlung.....	86
Abbildung 20.	Auswirkung der TcdB 10463 und 1470 auf das Transportverhalten des hCAT-2A	88
Abbildung 21.	Herunterregulation von Cdc42 mit siRNA.....	89
Abbildung 22.	Herunterregulation von Rac1 und Cdc42 mit siRNA.....	90
Abbildung 23.	Effekt der Herunterregulation von RhoA auf die Transportaktivität von hCAT-2A ohne und mit PMA	92
Abbildung 24.	Effekt der Herunterregulation von RhoA auf die Oberflächenexpression von hCAT-2A ohne und mit PMA	93
Abbildung 25.	Auswirkungen der Herunterregulation der PKC- α auf die hCAT-2A Transportleistung	94
Abbildung 26.	Veränderungen der Oberflächenexpression von hCAT-2A nach Herunterregulation von PKC α und Cdc42.....	95
Abbildung 28.	Auswirkung von ACK1 auf die hCAT-2A Transportverhalten	99
Abbildung 29.	Lokalisation des hCAT-2A EGFP zusammen mit dem Aktingerüst von U373 hCAT-2A EGFP mit und ohne ACK1 und mit und ohne PMA-Behandlung.....	100
Abbildung 30.	Stimulation von endogenen Cdc42 durch EGF.....	101
Abbildung 31.	Auswirkungen der EGF-Stimulation auf den Transport von überexprimiertem hCAT-2A EGFP und endogen exprimiertem hCAT-3	102

Abbildung 32.	Aufhebung des EGF-Effektes auf den hCAT-2A-vermittelten Transport durch Herunterregulation von Cdc42 und PKC-Hemmung	103
Abbildung 33.	Aktivierbarkeit des endogenen Cdc42 nach PMA-Stimulation.....	105
Abbildung 34.	Transportverhalten des hCAT-1 mit und ohne GRB2 mit und ohne PKC-Aktivierung	106
Abbildung 35.	Veränderung der hCAT-1 EGFP-Oberflächenexpression mit und ohne GRB2	107
Abbildung 36.	Transportverhalten des hCAT-2A mit und ohne GRB2 sowie mit und ohne PKC-Aktivierung	108
Abbildung 37.	Veränderung der hCAT-2A Oberflächenexpression mit und ohne GRB2 ..	109
Abbildung 38.	Auswirkung der TcdB 10463 und 1470 auf das Transportverhalten von hCAT-1	110
Abbildung 39.	Transportverhalten von γ^+ und γ^L Transportsystemen in EA.hy 926-Zellen nach Cdc42 Herunterregulation und PKC-Aktivierung.....	113
Abbildung 40.	Transportverhalten von γ^+ und γ^L Transportsystemen in EA.hy 926-Zellen nach PKC α Herunterregulation mit und ohne PMA-Inkubation.....	114
Abbildung 41.	Transportverhalten von γ^+ und γ^L Transportsystemen in EA.hy 926-Zellen nach ACK1 Herunterregulation und PKC-Aktivierung.....	116
Abbildung 42.	Vereinfachte schematische Darstellung der Erkenntnisse aus <i>X. laevis</i> -Oozyten. PKC und Cdc42V12 / Rac1V12 verstärken die Internalisierung des hCAT-2A.....	124
Abbildung 43.	Vereinfachte schematische Darstellung der Erkenntnisse und Annahmen der Internalisierung in U373 hCAT-1 EGFP und -2A EGFP-Zellen nach Toxin-Behandlung und PKC-Aktivierung	126
Abbildung 44.	Vereinfachte schematische Darstellung der Erkenntnisse und Annahmen aus U373 hCAT-2A EGFP-Experimenten nach Herunterregulation von Cdc42 und Rac1 durch siRNA Transfektion	127
Abbildung 45.	Vereinfachte schematische Darstellung der Erkenntnisse aus U373 hCAT-2A EGFP-Experimenten nach Herunterregulation von RhoA durch siRNA Transfektion.....	128

- Abbildung 46. Vereinfachte Darstellung der Ergebnisse aus U373 hCAT-1 EGFP-Zellen zur Untersuchung des Einflusses von GBR2 an der Isoform hCAT-1 in Kombination mit PMA... 131
- Abbildung 47. Vereinfachte Darstellung der Ergebnisse aus U373 hCAT-2A EGFP zur Untersuchung des Einflusses von GBR2 an der Isoform hCAT-2A in Kombination mit PMA 132
- Abbildung 48. Vereinfachte schematische Darstellung der Erkenntnisse aus U373 hCAT-2A EGFP-Experimenten nach Herunterregulation von PAK1 durch siRNA Transfektion mit und ohne PKC-Aktivierung..... 134

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über Plasmamembrantransporter für kationische Aminosäuren (SLC7-Familie; Quelle: Dissertation).....	3
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Plasmide und Vektoren.....	31
Tabelle 3: Übersicht der verwendeten siRNAs	31
Tabelle 4: Übersicht der genutzten Antikörper	32
Tabelle 5: Übersicht sekundäre Antikörper	33
Tabelle 6: Übersicht Substanzen und jeweilige Lösemittel	33
Tabelle 7: LB-Medium:	36
Tabelle 8: SOB-Medium:	36
Tabelle 9: 50x TAE:	36
Tabelle 10: Zellkulturmedien und deren Zusammensetzung (übernommen aus Dissertation von A. Werner, 2020)	37
Tabelle 11: RIPA-Puffer (radioimmune precipitation assay-buffer):.....	41
Tabelle 12: PBS modifiziert	42
Tabelle 13: PBS mod. + CM	43
Tabelle 14: Waschpuffer I:	43
Tabelle 15: Waschpuffer II:	43
Tabelle 16: PBS.....	44
Tabelle 17: PBS + CM:	44
Tabelle 18: Quenching-Puffer:	44
Tabelle 19: 2x SDS-Probenpuffer:	46
Tabelle 20: Rezepte Trenngel)	46
Tabelle 21: Rezepte Sammelgel	47
Tabelle 22: SDS-Elektrophorese-Puffer (10x)	47

Tabelle 23:	Elektroblotting-Puffer:	48
Tabelle 24:	Ponceau S Lösung:.....	48
Tabelle 25:	Antikörperverdünnungspuffer	49
Tabelle 26:	Blotto	49
Tabelle 27:	1x TBS:	49
Tabelle 28:	Strip-Puffer	49
Tabelle 29:	1x Ca ²⁺ -freier Puffer.....	50
Tabelle 30:	Oozyten-Kulturmedium:.....	50
Tabelle 31:	1x Na ⁺ -Aufnahmepuffer:	50
Tabelle 32:	Farbstoff Texas Red-X-Phalloidin	61
Tabelle 33:	PBS+CM	61
Tabelle 34:	Standardansätze zur siRNA-Transfektion.....	62
Tabelle 35:	10x Locke's Lösung (LL)	62

1 Einleitung

Mehrzellige Organismen müssen die Problematik der Kommunikation und Versorgung jeder einzelnen Zelle und die Kommunikation aller Zellen miteinander und ihrer Umwelt lösen. Allein die bloße Anzahl von bis zu 36 Billionen und mehr Einzelzellen, je nach Körpergröße und Gewicht, im menschlichen Körper macht deutlich, wie komplex und fein reguliert alle diese Einzelprozesse im Gesamtablauf von Signaltransduktion und Stoffwechsel aufeinander abgestimmt sind. Eine schützende Phospholipid-Doppelschicht umgibt die einzelne Zelle, in ihr eingelagert sind zahlreiche Membranproteine, die die Versorgungsaufgabe und Kommunikation übernehmen.

Wasserlösliche Moleküle wie Zucker oder Aminosäuren können nur über spezielle Transportproteine in den Zellinnenraum gelangen. Kationische Aminosäuren (KAS) wie die Aminosäure Arginin sowie Lysin und Ornithin werden über kationische Aminosäuretransporter (CAT) in die Zelle transportiert. Je nach Bedarf kann die Anzahl dieser Transporter über Genexpression aber auch über posttranslationale Regulation verändert werden. Die Regulation beeinflusst die Anzahl der CATs in der Membran, was wiederum die Aufnahme von Aminosäuren in die Zelle erhöht oder verringert. (Closs, 2002; Gräf et al., 2001; Krotova et al., 2003; Rotmann et al., 2006, 2004)

Dysfunktionen der CAT-Transporter können die vaskulären Funktionen, Endothelfunktion oder auch Immunantwort negativ beeinflussen (Banjarnahor et al., 2020; Chin-Dusting et al., 2007; Closs et al., 2004; Martí I Líndez and Reith, 2021; Yahyaoui and Pérez-Frías, 2019).

Trotz ihrer zentralen Rolle in der Zellbiologie sind viele Aspekte der CAT-Proteine noch unzureichend verstanden. Speziell die posttranslationale Regulation dieser Transporter bietet ein großes Potenzial für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze (Xia et al., 2024).

Ziel zukünftiger Forschung ist es, Mechanismen zu identifizieren, die die Funktion und Lokalisation der kationischen Aminosäuretransporter beeinflussen. Ansätze zur Modulation der CAT-Aktivität könnten aufbauend auf die Erkenntnisse der Grundlagenforschung, ihre Anwendung in der Therapie von Tumoren und entzündlichen Erkrankungen finden.

1.1 Humane Transporter für kationische Aminosäuren

Die Versorgung der Zelle mit Aminosäuren wird durch spezifische Transportproteine vermittelt (Souba and Pacitti, 1992). Aminosäuren werden über die Bindung an den spezifischen Transporter, einer nachfolgenden Konformationsänderung und der dadurch erzeugten Verlagerung der Substratbindestelle auf die gegenüberliegende Seite der Plasmamembran in die Zelle transportiert. Aminosäuretransporter sind spezifisch für ihre Substrate und Gewebe (Palacín et al., 1998; Xia et al., 2024).

Kationischen Aminosäuretransporter (*cationic amino acid transporter*, CAT) übernehmen den Transfer von kationischen Aminosäuren wie Arginin, Lysin und Ornithin (Christensen and Antonioli, 1969). Sie dienen - neben der reinen Versorgerrolle - als Substratlieferanten für essenzielle Stoffwechselwege, darunter die Synthese von Proteinen, Polyaminen, Stickstoffmonoxid und Harnstoff (Closs et al., 1997; Vékony et al., 2001).

Die Familie der CAT-Proteine umfasst vier Isoformen: CAT-1, CAT-2A, CAT-2B und CAT-3, die sich in ihrer Gewebsspezifität, Substrataffinität und Regulation unterscheiden (Closs et al., 2006). Die Aktivität dieser Transporter ist ein zentraler Faktor für die Regulation der Geschwindigkeit der genannten Stoffwechselwege. Veränderungen in ihrer Expression oder Funktion werden in verschiedenen pathophysiologischen Zuständen beobachtet, darunter Entzündungen, metabolische Störungen und Krebs (Martí I Líndez and Reith, 2021).

Gleichwohl die Aminosäuretransporter eine so zentrale Rolle in zellulären Vorgängen spielen, sind viele Aspekte der CAT-Proteine noch unzureichend verstanden. Insbesondere die Vorgänge der posttranslationalen Regulation bieten ein großes Potenzial für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze, da diese in der Regel schneller, spezifischer und reversibel ist. Ziel zukünftiger Forschung ist es, Mechanismen zu identifizieren, die die Funktion, Regulation und Lokalisation der Arginin-Transporter beeinflussen. Ansätze zur Modulation der CAT-Aktivität könnten ihre Anwendung in der Therapie von Tumoren und entzündlichen Erkrankungen finden (Martí I Líndez and Reith, 2021; Xia et al., 2024).

1.1.1 Klassifikation der kationischen Aminosäuretransporter der SLC7-Familie

Zur SLC7-Genfamilie zählen neben den CATs die sogenannten leichten Ketten der heterodimeren Aminosäuretransporter (HAT), die mit einem Glykoprotein der SLC3-Familie assoziieren

(Torrents et al., 1998), um in die Plasmamembran eingelagert zu werden. Die Mitglieder dieser Gruppe zeigen eine selektive Affinität für kationische Aminosäuren (KAS) im Fall der CAT-Mitglieder, während die HAT-Mitglieder eine Affinität für kationische, anionische und neutrale Aminosäuren (NAS) aufweisen (Closs et al., 2004; Fotiadis et al., 2013; IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY, 2019). Im Gegensatz zu den Mitgliedern der CAT-Familie unterliegen die leichten Ketten der HATs keiner direkten Glykosylierung. Stattdessen gehen diese wie bereits erwähnt, durch Protein-Protein-Interaktionen eine Verbindung mit einem Glykoprotein der SLC3-Familie (der sogenannten schweren Kette) ein. Diese Kopplung, beispielsweise zwischen der leichten Kette γ^+ LAT1 und der schweren Kette 4F2hc, wird durch eine Disulfidbrücke stabilisiert und verleiht dieser Unterfamilie den alternativen Namen Glykoprotein-assoziierte Transporter (*glycoprotein-associated amino acid transporters*; gpaATs). Ohne das Vorhandensein schwerer Ketten verbleiben die leichten Ketten im endoplasmatischen Retikulum (Chillarón et al., 2001). Die CATs und die leichten Ketten die HATs unterscheiden sich auch in der Anzahl der Transmembrandomänen. Bei der Unterfamilie der CATs prognostizieren in Hydrophobizitätsanalysen 14 Transmembrandomänen (TMs), während bei den sogenannten leichten Ketten der heterodimeren Aminosäuretransporter (HATs) lediglich 12 TMs vermutet werden (Vanoaica et al., 2016; Verrey et al., 2004).

Tabelle 1: Übersicht über Plasmamembrantransporter für kationische Aminosäuren der SLC7-Familie (Quelle: Dissertation , 2012, Verrey et al., 2004); Zugehörigkeit der Transporter zur SLC-7-Familie und Transportspezifität für Aminosäuren.

Vertreter Kationische Aminosäuretransporter	System	Untergruppe	Assoziiertes Protein	KAS-Transport/ Na ⁺ -abhängig	NAS-Transport/ Na ⁺ -abhängig
CAT-1, -2B, -3	γ^+	CAT	nicht bekannt	Ja/Nein	-
CAT-2A	nicht definiert	CAT	nicht bekannt	Ja/Nein	-
γ^+ LAT1, 2	γ^+ L	HAT	4F2hc	Ja/Nein	Ja/Ja
B ^{0,+} AT	b ^{0,+}	HAT	rBAT	Ja/Nein	Ja/Ja

Vor der Klärung der molekularen Identität der erwähnten Transporter wurde deren Funktion durch Transportstudien mit radioaktiv markierten Aminosäuren genau charakterisiert. Dabei wurde die funktionelle Systeme wie System γ^+ , γ^+ L und b^{0,+} beschrieben und sukzessive konnte diesen Systemen spezifische Transporter auf molekularer Ebene zugeordnet werden (Devés

and Boyd, 1998, Verrey et al., 2004). Die HAT-Unterfamilie umfasst Transporter, so etwa das System γ^+L (siehe Tabelle 1). Zwei weitere Transporter (in Verbindung mit 4F2hc) erkennen spezifisch NAS. LAT1 befördert ausschließlich große neutrale Aminosäuren, während LAT2 auch kleinere NAS transportiert. (Bode, 2001; Bröer et al., 2001; Scalise et al., 2018). Die Transportsysteme γ^+L und $b^{0,+}$ besitzen die Fähigkeit, neutrale Aminosäuren zu transportieren. In humanen Zellen gibt es insgesamt vier gut charakterisierte Isoformen der CAT-Transporter: hCAT-1, hCAT-2A, hCAT-2B und hCAT-3, während die Funktion von zwei weiteren Proteinen, SLC7A4 und SLC7A14, bislang nicht vollständig entschlüsselt wurde. Diese beiden Transporter sind den CATs verwandter und enthalten vermutlich 14 TMs. SLC7A4 wurde auch schon als CAT4 beschrieben, jedoch weist dieser keine Transportaktivität für KAS. (Closs et al., 2006; Wolf et al., 2002; Vanoaica et al., 2016). Bei SLC7A14 wird angenommen, dass dieser Transporter in Lysosomen GABA-Transport katalysiert (Jiang et al., 2023).

1.1.2 Eigenschaften und Funktion der humanen kationischen Aminosäuretransporter (hCAT)

Die hCAT-Proteine transportieren kationische Aminosäuren über die Plasmamembran und sind somit für die Versorgung der Zellen mit wichtigen Substraten wie z.B. NOS verantwortlich. Insbesondere hCAT-1, ein 629 Aminosäuren umfassender, ausgenommen in der Leber ubiquitär vorkommender Transporter, vermittelt den Na^+ - und pH-unabhängigen Transport dieser Aminosäuren mit hoher Substrataffinität und starker Abhängigkeit von Trans-Substraten. Trans-Stimulation ist ein charakteristisches Merkmal vieler Transporter. Ist auf der gegenüberliegenden Seite der Membran ein Substrat verfügbar, so arbeiten Transportproteine meist effizienter (Closs et al., 2004, 1997; Vékony et al., 2001). Studien zeigen, dass die Transportaktivität von hCAT-1 spannungsabhängig ist, was bedeutet, dass die Hyperpolarisation der Zellmembran den Substrat-Einstrom steigert (Kavanaugh, 1993; Rotmann et al., 2004).

Die Isoform hCAT-2A (658 Aminosäuren; Expressionsort Leber), zeigt im Vergleich zu hCAT-1 im sauren Milieu eine geringere ausgeprägte Trans-Stimulation mit gleichzeitig reduzierter Affinität (Closs, 2002). Die Expression von hCAT-2B lässt sich durch Zytokine oder Lipopolysaccharide (LPS) induzieren, was eine Verbindung im Rahmen entzündlicher Prozesse vermuten lässt (Wolf et al., 2002). hCAT-2A und hCAT-2B werden über das SLC7A2-Gen codiert, wobei die beiden Isoformen sich durch einen 42 Aminosäuren langen Abschnitt in der funktionellen Domäne unterscheiden (Habermeier et al., 2003). Im Vergleich zu hCAT-1 und hCAT-2B weist

hCAT-2A nur eine geringe Affinität für kationische Aminosäuren auf und zeigt keine starke Abhängigkeit von Trans-Substraten. Diese Isoform wird vor allem in Leber, Pankreas und Skelettmuskel exprimiert (Closs et al., 1997).

hCAT-3, das hauptsächlich im Gehirn und Thymus exprimiert wird, ähnelt in seinen Eigenschaften hCAT-2B. Die Selektivität und Affinität für bestimmte Aminosäuren sind u.a. Grundlage für die unterschiedlichen physiologischen und pathophysiologischen Rollen der verschiedenen Isoformen (Vékony et al., 2001).

SLC7A4 codiert für ein Protein, das eine hohe Sequenzhomologie zu den anderen hCAT-Transportern aufweist. Es wird in verschiedenen Quellen als CAT-4 bezeichnet, eine Transportaktivität konnte für dieses Protein bisher jedoch nicht nachgewiesen werden (Wolf et al., 2002). Bei dem SLC7A14, das strukturell mit den CAT-Proteinen verwandt ist, handelt es sich um ein Protein, das sich größtenteils in den Lysosomen befindet. Aufgrund der Homologie wird das Protein den kationischen Aminosäuretransporten (CATs) der SLC7-Familie zugeordnet (Jaenecke et al., 2012).

Die erste Kristallstruktur eines bakteriellen CAT-Homologen aus dem thermophilen *Geobacillus Kaustophilus* (GkApcT) wurde 2018 veröffentlicht. Diese Ergebnisse liefern wichtige Einblicke in die Mechanismen der Substratbindung und des Transports, die für die Entwicklung pharmakologischer Modulatoren von Bedeutung sein könnten (Jeckelmann et al., 2022; Jungnickel et al., 2018).

Die Aktivität der hCAT-Transporter unterliegt einer posttranslationalen Regulation, die verschiedene Mechanismen umfasst. Insbesondere wird die Transporterfunktion durch die Aktivierung der Proteinkinase C moduliert (Gräf et al., 2001; Krotova et al., 2003; Rotmann et al., 2006). Entgegen der Erwartung erfolgt diese Regulation nicht durch direkte Phosphorylierung des Transporters, sondern durch eine Reduktion seiner Oberflächenexpression in der Plasmamembran.

1.1.3 Physiologische Bedeutung der humanen hCAT-Transporter

Durch den Transport der kationischen Aminosäuren (KAS) über den hCAT-Transporter werden zahlreichen metabolischen Prozessen ermöglicht. Die kationischen Aminosäuren Arginin und Lysin sind essenziell für die Prozesse der Proteinsynthese. Die Polyaminbiosynthese hängt von

Ornithin ab, das aus Arginin mit Hilfe von Arginase unter Abspaltung von Harnstoff gebildet wird. Im Rahmen der Stickstoffmonoxidsynthese stellt Arginin die Ausgangssubstanz für NO dar, welches als Signalgeber u.a. in der Vasodilatation und Immunregulation eine wichtige Rolle spielt (Closs et al., 2004; Förstermann and Kleinert, 1995; Morgan, 1994; Vékony et al., 2001).

Die Aminosäure Lysin übernimmt eine zentrale Rolle in der Kollagenbiosynthese und der Histon-Modifikation ein, letztere ist für die Genregulation wichtig. Ebenso ist Lysin Ausgangspunkt der Carnitin-Biosynthese, die für die Fettsäureoxidation entscheidend ist (Bremer, 1983; Zhao et al., 2010).

1.2 Mechanismen der CAT-Regulation

Transportproteine unterliegen sowohl einer transkriptionellen, translationalen als auch posttranslationalen Regulation. Sie werden intrazellulär synthetisiert und nachfolgend in die Zellmembran oder in intrazelluläre Vesikel eingebaut. Posttranslationale Modifikationen, wie beispielsweise Phosphorylierung, durch induzierte Signaltransduktion ermöglichen eine schnelle Veränderung der Lokalisation der Transporter und infolgedessen eine Veränderung der Membrandurchlässigkeit für wichtige Substrate, wie z.B. Aminosäuren. Die Reduktion der in die Membran eingebauten Transportproteine erfolgt über den Prozess der Endozytose, sodass diese ins Zellinnere gelangen (Grady et al., 1997).

Kationische Aminosäuretransporter unterliegen nach bisherigen Erkenntnissen Einflüssen aller Ebenen der Genregulation (transkriptionale, translationale und posttranslationale Regulation), wobei die detaillierten Regulationsmechanismen noch nicht vollständig verstanden sind (Closs et al., 2006, 2004).

1.2.1 Transkriptionale Regulation der CATs

Die Regulation von CAT-1 variiert je nach Zelltyp. Dabei zeigen schnell teilende Zellen im Allgemeinen eine höhere Expression des CAT-1-Gens als ruhenden Zellen. Faktoren wie Interleukin-1, Insulin, Glukokortikoide, Angiotensin II, *platelet-derived growth factor* (PDGF) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) erhöhen die Transkriptionsrate der Transporterproteine, indem die mRNA-Menge der jeweiligen Transporter erhöht wird (Closs et al., 2004). Auch der Wachstumsfaktor *Transforming Growth Factor*- β 1 (TGF- β 1) steigert die Transkription von hCAT-1 in glatten Gefäßmuskelzellen und in der Folge die Aufnahme von L-Arginin. Dies fördert die

Synthese von Polyaminen und Prolin und trägt zur Reparatur von Gefäßverletzungen bei (Durante et al., 2001).

Wird die Zelle einer Aminosäuremangel-Situationen ausgesetzt, greifen zelluläre Anpassungsmechanismen, die die Prozesse der allgemeinen Proteinbiosynthese hemmen und nur noch Proteine exprimieren, die helfen dem Mangel-Zustand entgegenwirken. Die Expression des kationischen Aminosäuretransporters CAT-1 wird in diesem Zustand durch transkriptionale und translationale Mechanismen induziert. Die vorübergehende Erhöhung der CAT-1-Transkription erfolgt im Rahmen einer Stressreaktionskaskade durch Phosphorylierung des eukaryontischen Initiationsfaktors eIF2 α und Aktivierung des Transkriptionsfaktors ATF4 (*activating transcription factor*) (Kelly and Pearce, 2020; Vanoaica et al., 2016).

Der kationische Aminosäuretransporter (rCAT-1) in C6-Gliomzellen der Ratte wird bei einem zellulären Mangel an Nährstoffen und Aminosäuren hochreguliert. So erfolgt nicht nur eine Erhöhung der Transkriptionsrate, sondern auch eine Verbesserung der Stabilität der mRNA. Ebenso wird deren Translation signifikant gesteigert (Hatzoglou et al., 2004).

Die Erkenntnis, dass eine erhöhte Transkription zu einer vermehrten Proteinexpression führt, ist nicht generell gültig. Die Stimulation der Proteinkinase C durch Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) führt zwar zu einer deutlichen Zunahme der CAT-1-mRNA, jedoch bleibt die Menge des CAT-1-Proteins unverändert (Gräf et al., 2001). Diese scheinbar paradoxe Situation deutet auf zusätzliche posttranslationale Regulationsmechanismen hin.

1.2.2 Translationale und posttranslationale Regulation der CAT

Ein alternativer Mechanismus der translationalen Regulation wurde für den humanen hCAT-1 in humanen Huh7-Leberzellkarzinomzellen beschrieben, die die leberspezifische microRNAs miRNA-122 exprimieren. MicroRNAs sind kurze RNA-Moleküle, die an mRNA binden und die Genexpression durch Regulation der mRNA-Stabilität und Translation kontrollieren. Unter normalen Stoffwechselbedingungen wird die Stabilität der hCAT-1-mRNA durch die Bindung von miRNA-122 an Erkennungssequenzen in der 3'UTR negativ beeinflusst und die Translation unterdrückt. In Stresssituationen kann jedoch durch die Bindung von HuR an die 3'UTR der mRNA diese miRNA-122-vermittelte negative Wirkung aufgehoben werden, was zur Freisetzung der mRNA aus zytoplasmatischen *Processing Bodies (P-Bodies)* führt (Bhattacharyya et

al., 2006). *Processing Bodies (P-Bodies)* sind membranlose, zytoplasmatische Anhäufung von Proteinen und mRNA, die eine zentrale Rolle im mRNA-Stoffwechsel spielen.

Zellulärer Stress durch Nährstoffmangel, forciert eine schnelle Abnahme der Translations-Suppression bzw. eine Hochregulierung der Translation, um wichtige zelluläre Funktionen aufrechtzuerhalten. Die so synthetisierten CAT-1-Transportproteine können dann bei späterer Wiederverfügbarkeit von Aminosäuren ein schnelles Auffüllen der intrazellulären Speicher ermöglichen (Closs et al., 2006; Morris, 2009, Morris, 2016).

Ein weiterer komplexer Mechanismus der Translationsregulation wurde beim murinen CAT-2 beobachtet: Prasanth et al. zeigten, dass etwa 8 kb große CTN-RNA-Transkripte (CAT-2-*transcribed nuclear RNA*) im Nukleus von C127I-Zellen (Mamma-Tumorzellen der Maus) zurückgehalten werden und dass die 3'UTR dieses langen Transkripts dafür verantwortlich ist. Zellulärer Stress bewirkt eine translationale Verkürzung der CTN-RNA an der 3'UTR und führt zur Ausschleusung und Translation der dann kleineren mCAT-2-mRNA. Dieser Mechanismus ermöglicht in Stresssituationen durch die schnelle Freisetzung einer größeren Anzahl an mRNA eine sehr effiziente Steigerung der Synthese von Transportproteinen und damit eine verstärkte zelluläre Aufnahme von L-Arginin für die Produktion von NO (Prasanth et al., 2005).

Posttranslationale Modifikationen

Posttranslationale Modifikationen (PTM) sind entscheidende Mechanismen, die die Aktivität, Funktion und Lokalisation von Proteinen nach deren Synthese beeinflussen. Zu den häufigsten PTMs zählen Glykosylierung, Phosphorylierung und Ubiquitinylierung. Diese Modifikationen können durch Veränderungen der Tertiärstruktur, Konformation und Oberflächenladungen zu einer veränderten Struktur und Funktionalität der Proteine führen. Auch für die Familie der CAT-Proteine gibt es zahlreiche Hinweise auf Regulationsmechanismen durch PTMs, besitzen die CAT-Proteine doch putative Glykosylierungsstellen. Diese befinden sich in der dritten extrazellulären Schleife (gemäß dem 14-TM-Modell). CAT-1 und beide Spleißvarianten von CAT-2 weisen im Gegensatz zu CAT-3 zwei Glykosylierungsstellen auf. CAT-2A und CAT-2B haben zudem eine weitere potenzielle Glykosylierungsstelle in der zweiten extrazellulären Schleife an Position 157 (Closs et al., 2006). Eine Regulation der Aktivität und zellulären Lokalisation der kationischen Aminosäuretransporter durch posttranslationale Glykosylierung wurde jedoch bisher nicht nachgewiesen.

Zu den Faktoren, die die Transportaktivität beeinflussen, gehört eine anhaltende Hypoxie. Diese vermindert die Aufnahme von L-Arginin in Endothelzellen der Pulmonalarterien, ohne die Proteinexpression von CAT-1 zu reduzieren (Zharikov und Block, 2000). Ebenso wurde gezeigt, dass das Aktin-stabilisierende Toxin Jasplanolid die Aufnahme von L-Arginin in diesem Zelltyp erhöht. Im Gegensatz dazu reduziert Swinholid, ein zytotoxischer Metabolit aus marinen Schwämmen und Inhibitor des Aktin-Zytoskeletts, die Transportaktivität, ohne die CAT-1-Expression zu beeinflussen. Diese Untersuchungen deuten auf die Beteiligung von Zytoskelett-Proteinen bei der Regulation der CAT-Carrier hin (Zharikov et al., 2001).

Es wird vermutet, dass eine weitere posttranslationale Modifikation des CAT-1-Proteins in neuronalen Gliazellen auftritt. Beobachtungen zeigen, dass eine mögliche Nitration des CAT-1-Proteins mit einem erhöhten Arginin-Efflux verbunden ist, was die Gliazellen vor anhaltender NO-Synthese schützt und gleichzeitig L-Arginin für benachbarte Zellen bereitstellt (Vega-Agapito et al., 2002).

Posttranslationale Modulation der hCAT-Aktivität durch Proteinkinase C

Die posttranslationale Phosphorylierung von Proteinen stellt einen der zentralen Mechanismen der Regulation in höheren Zellen dar. Sie beeinflusst nahezu alle biologischen Prozesse, darunter den Glucose- und Fettstoffwechsel, die Weiterleitung und Verarbeitung hormoneller Signale, die Regulation der Genexpression, die Wachstumskontrolle sowie die neuronale Informationsverarbeitung (Cohen, 2000; Hunter, 2014, 2000). Ein charakteristisches Merkmal dieses Regulationsmechanismus ist dessen Reversibilität: Durch den Wechsel zwischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung können Proteine zwischen verschiedenen funktionellen Zuständen wechseln, wodurch eine dynamische Anpassung an wechselnde zelluläre Anforderungen ermöglicht wird (Hucho and Buchner, 1997; Scott and Pawson, 2009; Seok, 2021).

Aufgrund dieser Vielseitigkeit existiert eine bemerkenswerte Diversität an Proteinkinasen, die diese Prozesse präzise regulieren. Das menschliche Genom kodiert für etwa 530 verschiedene Kinasen, wobei die Serin/Threonin-spezifischen Proteinkinasen, wie die Proteinkinasen A (PKA) und C (PKC), besonders intensiv untersucht wurden (Manning et al., 2002; Toker, 1998).

Die PKC-Superfamilie umfasst insgesamt 15 verschiedene Isoformen, die auf Grundlage ihrer Primärstruktur und funktionellen Eigenschaften in drei Klassen unterteilt werden können: die klassischen (cPKC), die neuen (nPKC) und die atypischen Isoformen (aPKC). Trotz ihrer Gemeinsamkeiten weisen diese Klassen charakteristische Unterschiede in ihrer Regulation und Aktivierung auf (Mellor and Parker, 1998; Newton, 2001; Newton, 2010; Nishizuka, 1995).

Allen PKC-Isoformen gemeinsam ist ein regulatives C1-Motiv sowie eine katalytische Domäne, die für die Serin/Threonin-Kinase-Aktivität verantwortlich ist. Die aPKC-Isoformen unterscheiden sich von den klassischen und neuen Isoformen dadurch, dass sie weder durch Phorbol ester noch durch Diacylglycerin (DAG) aktiviert werden können. Die nPKC-Isoformen sind unabhängig von Calcium (Ca^{2+}), weisen jedoch eine ähnliche Struktur und Funktion wie die klassischen PKC-Isoformen auf. Damit können diese auf die gleiche Art und Weise z.B. durch Phorbol ester aktiviert werden. (Steinberg, 2008; Toker, 1998).

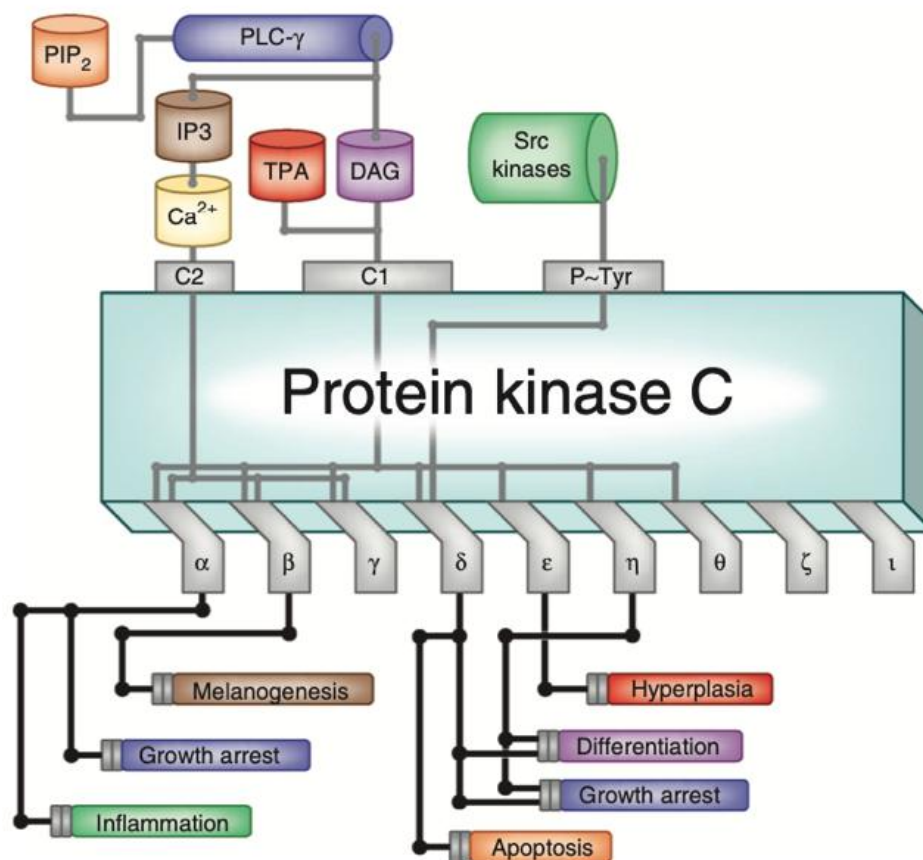


Abbildung 1. Integration der Signalübertragung durch Proteinkinase C (PKC).

Einige PKC-Isoformen können durch die sekundären Botenstoffe Calcium (Ca^{2+}) und Diacylglycerol (DAG), die durch die Aktivität der Phospholipase C (PLC) z.B. der PLC γ erzeugt werden, aktiviert werden. Intrazelluläres Calcium aktiviert PKC α , β und γ über ihre C2-Domänen, während DAG und 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) PKC α , β , γ , δ , ϵ , ζ und η über C1-Domänen aktivieren. Src-Familienkinasen können auch PKC δ tyrosinphosphorylieren und deren Expression verändern. Die Ergebnisse der PKC-Signalübertragung sind isoformabhängig. (übernommen aus Mascia et al., 2012)

Die Substrat- und ATP-Bindungsstelle befindet sich in allen PKC-Isoformen in der katalytischen Domäne. Die regulatorische Einheit umfasst außer bei den aPKC-Isoformen zwei C1-Domänen, die durch Zn^{2+} -Ionen stabilisiert werden und die Fähigkeit besitzen, DAG als physiologischen Aktivator zu binden (Newton, 2001). Die regulatorische Domäne der cPKC- und aPKC-Isoformen enthält eine C2-Domäne, die mit basischen Membranphospholipiden (z. B. Phosphatidylserin) interagiert und für die Calcium-abhängige Membranrekrutierung wichtig ist (Abbildung 1; aus Mascia et al., 2012).

Die Bindung an Membranphospholipide führt nach Aktivierung zur Verankerung der PKC in der Plasmamembran (Nishizuka, 1995). Ein weiteres charakteristisches Merkmal ist die N-terminale Pseudosubstratregion, die eine autoinhibitorische Funktion besitzt. Diese Region der PKC blockiert das aktive Zentrum der Kinase in ihrer inaktiven Konformation. Bei den cPKC- und nPKC-Isoformen wird erst durch die Bindung von DAG und eine darauffolgende Konformationsänderung, das aktive Zentrum freigelegt, wodurch die Kinase aktiviert wird. DAG und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3) entstehen durch die Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) durch die Phospholipase C (PLC) (Manning et al., 2002). Während DAG die PKC-Aktivierung an der Membran vermittelt, diffundiert IP3 ins Zytosol und stimuliert am endoplasmatischen Retikulum (ER) die Freisetzung von Ca^{2+} , was wiederum die Aktivierung klassischer PKC-Isoformen unterstützt (Pawson and Scott, 2005; Scott and Newton, 2012; Scott and Pawson, 2009).

Neben DAG existieren synthetische Tumorpromotoren, wie beispielsweise Phorbolster, die die Funktion von DAG nachahmen können. Diese Substanzen binden irreversibel an die C1-Domänen der PKC und führen zu deren permanenten Aktivierung. Ein prominentes Beispiel hierfür ist Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), das in dieser Arbeit zur PKC-Aktivierung verwendet wird (Rozenfurt, 2007; Toker, 1998). PKC wird durch DAG auf direktem Weg aktiviert, IP3 hingegen aktiviert die PKC indirekt über die Mobilisierung der Ca^{2+} -Speicher der Zelle (Markl et al., 2011).

Proteinkinase C kann durch sowohl aktiviert als auch inhibiert werden, ganz in Abhängigkeit der gewählten Bedingungen und Inkubationszeiten. Bei längeren Inkubationszeiten (> 8 Stunden) mit Phorbolestern wie PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) wird PKC gehemmt. Dieser Effekt geht vermutlich auf eine proteasomale Degradation oder funktionelle Desensibilisierung zurück (Hepler et al., 1988; Krotova et al., 2003). Neben Aktivatoren sind auch spezifische Inhibitoren bekannt, darunter der weit verbreitete PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimid (BIM), der in verschiedenen Derivaten verfügbar ist. BIM hemmt PKC kompetitiv über die ATP-Bindestelle im aktiven Zentrum, ohne an die Diacylglycerol (DAG)-Bindungsstelle zu binden. BIM I und BIM II hemmen bevorzugt klassische PKC-Isoformen, welche unter anderem die Transportaktivität kationischer Aminosäuretransporter (hCATs) modulieren können (Komander et al., 2004).

Darüber hinaus spielt die Tyrosinphosphorylierung durch Src-Kinasen eine wichtige Rolle bei der Regulation spezifischer PKC-Isoformen wie PKC δ . Src-Kinasen selbst können durch PMA aktivierte PKC aktiviert werden, wodurch potenziell eine gegenseitige Regulation von PKC-Isoformen erfolgt (Benes and Soltoff, 2001; Nomura et al., 2007b).

PKC ist an zahlreichen zellulären Prozessen beteiligt, darunter hormonelle Signalweitergabe, Zellwachstum, Differenzierung und Karzinogenese. Die Aktivierung von PKC durch Wachstumsfaktoren führt häufig zur Transaktivierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren wie dem EGF-Rezeptor (*epidermal growth factor receptor*). Dabei phosphoryliert PKC den Rezeptor, was dessen Aktivierung und wachstumsfördernde Signale verstärkt (Schlessinger, 2000). Die multifunktionalen Wirkungen der PKC verknüpft diese mit einer Vielzahl zellulärer Prozesse, darunter die Reaktion auf Hypoglykämie, oxidativen Stress und altersbedingte Veränderungen (Lee and Shacter, 1999; Nishizuka, 1995). In diesen Zusammenhang zeigt PKC eine verstärkte Aktivität, die wiederum die Funktion zahlreicher Transportproteine und Rezeptoren moduliert (Newton, 2001; Steinberg, 2008).

Die Regulation membranständiger Proteine wie Rezeptoren oder Transporter erfolgt über komplexe Mechanismen, die die Interaktion zahlreicher Proteine erfordern. Auffällig ist dabei, dass viele Membranproteine ähnlich auf die Aktivierung von PKC reagieren, obwohl die zugrunde liegenden Mechanismen bis heute nicht vollständig aufgeklärt sind (Rozengurt, 2007). Es wird angenommen, dass ein allgemeiner Mechanismus der PKC-Regulation unabhängig von

den spezifischen Eigenschaften einzelner Membranproteine existiert. Beispiele für durch PKC regulierte Transporter umfassen zusätzlich zu dem hCAT-1 und -3 den GABA-Transporter GAT1, den Dopamin-Transporter DAT, sowie den Glutamat-Transporter GLAST-1 (Conradt and Stoffel, 1997; Corey et al., 1994; Gräf et al., 2001; Krotova et al., 2003; Rotmann et al., 2006, 2004; Visigalli et al., 2010). Einen solchen Mechanismus könnte die Endozytose darstellen. Da die meisten Transportproteine sich in der Plasmamembran befinden und es bekannt ist, dass PKC-Aktivierung die Oberflächenexpression einiger Transporter beeinflusst, ist es naheliegend, dass diese Regulation durch die Veränderung verschiedener Endozytose Wege entsteht.

1.3 Endozytose

Endozytose (Abbildung 2) steht für den Vorgang der Aufnahme in die Zelle (Internalisierung), welche durch Einstülpeln und Abschnüren von Teilen der Zellmembran unter Entstehung von Vesikeln oder Vakuolen ausgeführt wird (Maritzen, 2021).

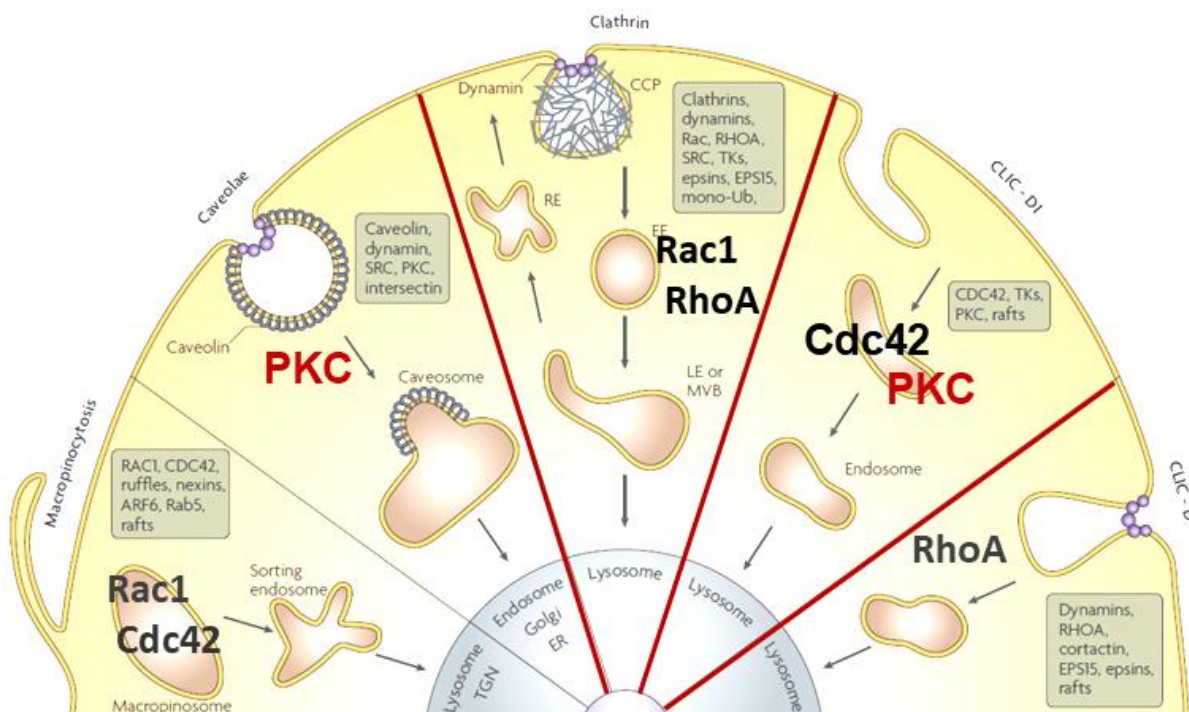


Abbildung 2. Übersicht Endozytosewege

Wege der Endozytose. Die Grafik zeigt die Endziele sowie die morphologischen und funktionellen Eigenschaften der Hauptwege der Endozytose von Transmembranproteinen. Die Kästchen listen die wichtigsten molekularen Akteure der jeweiligen Wege auf. CCP, Clathrin-beschichtete Grube; CDC42, Zellteilungszyklus 42; CLIC-D, Dynamine-abhängige Clathrin-unabhängige Träger; CLIC-DI, Dynamine- und Clathrin-unabhängige Träger; EPS15, epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptorsubstrat 15; ER, endoplasmatisches Retikulum; LE, spätes Endosom; MVB, multivesikulärer Körper; PKC, Proteinkinase C; RE, Recycling-Endosomen; TGN, trans-Golgi-Netzwerk; TK, Tyrosinkinase (übernommen und modifiziert aus Mosesson et al., 2008).

1.3.1 Clathrin-abhängige Endozytose

Bei der Clathrin-abhängigen Endozytose handelt es sich um einen rezeptorvermittelten Internalisierungsweg zur Aufnahme von Proteinen in Zellen. Diese Form der Internalisierung ist induzierbar, d. h. dieser Mechanismus wird durch ein Signal (Aktivierung eines anderen Proteins z.B. Bindung an den Rezeptor, Wachstumsfaktoren usw.) ausgelöst (Conner and Schmid, 2003). Gleichzeitig erfordert die Endozytose ein Zusammenspiel aus Proteinen wie AP-2, Dynamin, einiger Kinasen (z. B. Src (*Sarcoma-Kinase*), ACK1 (*Activated Cdc42-associated Kinase*)), aber auch des Aktins (McMahon and Boucrot, 2011). Die Markierung von Proteinen mit Ubiquitin entscheidet über das Schicksal des aufgenommenen Proteins (Royle and Murrell-Lagnado, 2003). Die Markierung selbst erfolgt über E3-Ligasen, die durch erkennende Sequenzen und strukturelle Merkmale entscheiden, ob ein bestimmtes Protein markiert werden muss.

Vor Endozytose werden Proteine wie z.B. Rezeptoren von Clathrin-ummantelten Vesikeln (*clathrin-coated pits*) eingehüllt, und die Vesikel werden durch die GTPase-Dynamin mechanochemisch von der Plasmamembran abgeschnürt, ihr Inhalt zu den frühen Endosomen transportiert (McMahon and Boucrot, 2011). In den frühen Endosomen, die auch als *sorting endosomes* bezeichnet werden, entscheidet sich der weitere Weg der internalisierten Proteine und/oder Rezeptoren. Entweder werden die eingeschlossenen Substanzen weiter zu den *recycling endosomes* geleitet und dann zurück zur Plasmamembran transportiert, oder aber der endolysosomale Weg führt zu den späten Endosomen, die für den Transport zu den Lysosomen verantwortlich sind und den Abbau induzieren (Doherty and McMahon, 2009). Diese Beschreibung des Clathrin-abhängigen Endozytosewegs stellt eine vereinfachte Version des eigentlich komplexen intrazellulären Vesikeltransports dar. Der Clathrin-abhängige Endozytoseweg ist einer der Hauptmechanismen, u. a. auch zur Regulation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) und durch diese induzierten Signaltransduktionswege (Conner and Schmid, 2003). Für die meisten GPCRs fungiert Arrestin durch seine AP-2- und Clathrinbindeaktivität als Adapterprotein zwischen Rezeptor und Clathrin-Ummantelung (Sorkin and Goh, 2009). Es wird vermutet, dass die unterschiedliche Affinität zwischen Arrestin und Rezeptor bereits Einfluss auf die postendozytische Sortierung der Rezeptoren in den Recycling- oder Abbauweg hat. Des Weiteren wurden kleine lineare Sequenzen von Aminosäuren innerhalb der intrazellulären Domäne von Transmembranproteinen häufig als ausschlaggebend für die

weitere Transportroute entlang des Endozytosewegs detektiert (Royle and Murrell-Lagnado, 2003). Klassische Dileucin- oder Tyrosin-basierte (YXX Φ) Motive dienen als Internalisierungsmotive für die Einhüllung von GPCRs in Clathrinvesikel (Conner and Schmid, 2003). Bislang ist unklar, wie genau die Mechanismen basierend auf Arrestin und Dileucin reguliert werden. Eine ähnliche Aufgabe wie Arrestin übernimmt die nicht-rezeptorständige Tyrosinkinase ACK1 während der Internalisierung von EGFR (*epidermal growth factor receptor*; McMahon and Boucrot, 2011). ACK1 verfügt ebenfalls über Bindedomänen für Clathrin, Aktin, Ubiquitin und auch Cdc42 (Praefcke and McMahon, 2004).

Ein entscheidender Beitrag zum Aufbau der *clathrin-coated pits* wird durch den hauptsächlichen Bindepartner der Proteine Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat (PIP₂) gewährleistet. Obwohl die Phosphatidylinositol-4-Phosphat-5-kinase, die die PIP₂ Proteine herstellt, nicht in den *clathrin-coated pits* lokalisiert ist, reguliert sie dennoch ihre Initiierung und ihr Wachstum (McMahon and Boucrot, 2011).

Außer der Endozytose von für den Clathrin-assoziierten Internalisierungsweg typischen Proteinen wie Transferrin oder EGFR sind mittlerweile auch verschiedene Transporter wie z.B. Glycintransporter (GlyT1), L-Typ Aminosäuretransporter (LAT1), Glutamattransporter 1 (GLT-1), Organo-Anion-Transporter (OAT-1), kationischer Aminosäuretransporter-1 (CAT-1) dafür bekannt, nach PKC-Aktivierung unter Beteiligung von Ubiquitin über diesen Weg zu internalisieren (Barrera et al., 2015; Barthelemy and André, 2019; Doherty and McMahon, 2009; García-Tardón et al., 2012; Li et al., 2013; Vina-Vilaseca et al., 2011).

1.3.2 Clathrin-unabhängige Endozytose

Zu den Clathrin-unabhängigen Endozytosewegen gehören zusätzlich zu CLIC-(DI / D) (Clathrin-independent carrier (*dynamine-independent* / *dynamine-dependent*)) die Makropinozytose und die Endozytose über Caveolae und *Lipid Rafts* (Doherty and McMahon, 2009; Parton and del Pozo, 2013). Aufgrund intensiver Forschung auf diesem Gebiet ist gesichert, dass sie u. a. entscheidende Aufgaben in der Reparatur der Plasmamembran, der zellulären Ausbreitung (*cellular spreading*), der Zellpolarisierung und der Modulierung interzellulärer Signaltransduktionswege übernehmen (Parton and del Pozo, 2013; Simons and Ikonen, 1997).

Endozytose über Caveolae und *Lipid Rafts*

Biochemisch sind Caveolae als spezielle Form eines *Rafts* anzusehen (Simons and Ikonen, 1997). Sie zeichnen sich im Unterschied zu den *Lipid Rafts* und den anderen Mikrodomänen durch das in Caveolae dominierende Protein Caveolin-1 aus (Rothberg et al., 1992). Dass es sich bei Caveolae um Detergens-beständige Membran (DRM, *detergent-resistant membranes*) handelt, die mit Glykosphingolipiden und Cholesterin angereichert sind, ist eine Eigenschaft, die sie wiederum mit den *Lipid Rafts* und übrigen Mikrodomänen gemeinsam haben (Parton and del Pozo, 2013; Simons and Ikonen, 1997). Die Funktion von Caveolin für die Endozytose über Caveolae ist je nach Zelltyp und Stimuli unterschiedlich (Thomas and Smart, 2008).

Wie bei anderen vesikulären Transportmechanismen wird auch in der Endozytose über Caveolae die Abschnürung von der Plasmamembran durch die GTPase-Dynamin gewährleistet (Praefcke and McMahon, 2004)..

Trotz Unklarheiten bezüglich der genauen Funktion von Caveolae und ihres Beitrags zur Clathrin-unabhängigen Endozytose konnte zweifelsfrei ihr Mitwirken im Cholesterol-Transport (Parton and del Pozo, 2013) sowie in der Clathrin-unabhängigen Endozytose einiger GPI-verankerter Proteine und von Cholera-Toxin belegt werden (Simons and Ikonen, 1997).

Dynamische Anordnungen von Cholesterin und Glykosphingolipiden in Membranen wurden als *Rafts* definiert (Simons and Ikonen, 1997). Die Hypothese, dass diese *Lipid Rafts* eine funktionelle Aufgabe im Membrantransport haben, basierte ursprünglich auf zwei Beobachtungen: Erstens werden Glykosphingolipide bevorzugt zum apikalen Pol polarisierter Zellen transportiert, und zweitens handelt es sich bei diesem Teil der Detergens-resistente Membranen, die auch GPI-verankerte Proteine enthalten, um solche, die zum apikalen Pol transportiert werden (Pike, 2006). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass entsprechend dem Gehalt an Cholesterin und Sphingolipiden, unterschiedliche sogenannte Mikrodomänen gebildet werden, in die sich unterschiedliche Proteine bevorzugt einlagern (Pike, 2006; Simons and Ikonen, 1997). Mikrodomänen scheinen eher kleine dynamische Strukturen zu sein, die durch Interaktionen mit dem Zytoskelett stabilisiert werden und auf einen Stimulus hin zu größeren Flächen aggregieren können (Simons & Ikonen, 1997).

Obwohl sowohl mit *Rafts* als auch mit Caveolae assoziierte Proteine als DRMs bezeichnet werden können, müssen dennoch Caveolae und *Lipid Rafts* als zwei verschiedene Strukturen auf der Zelloberfläche unterschieden werden, die unterschiedliche Moleküle kompartimentieren können (Parton and del Pozo, 2013; Pike, 2006). Eine Funktion von Mikrodomänen für Signaltransduktionswege wurde in vielen Berichten dokumentiert. Laut Simons und Ikonen (1997) können *Lipid Rafts*, die einen bestimmten Satz an Proteinen beinhalten, ihre Größe und Zusammensetzung als Reaktion auf intra- oder extrazelluläre Stimuli ändern.

Makropinozytose

Makropinozytose ist ein Clathrin-unabhängiger Endozytosemechanismus, der sich durch die Aufnahme von Substanzen in großen Vesikeln mit einem Durchmesser von 0,5 bis 5 µm auszeichnet. Diese Vesikel können Stoffe transportieren, die für die Clathrin-abhängige Endozytose zu groß sind. Makropinozytose ist unabhängig von rezeptorvermittelten Prozessen. Die Bildung und der Transport dieser makropinozytotischen Vesikel erfordern ein intaktes Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskelett, das als strukturelle Grundlage fungiert (Falcone et al., 2006). In bestimmten Zelltypen wurde beobachtet, dass makropinozytotische Prozesse durch extrazelluläre Signale, wie Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF; *Platelet-Derived Growth Factor*) oder dem PKC-Stimulator PMA induziert werden können. Diese Faktoren wirken vorübergehend als Trigger, um die Aufnahmeprozesse zu stimulieren (Swanson and Watts, 1995). Die extrazellulären Signale aktivieren intrazellulär Proteine, die wiederum Effektoren, wie kleine GTPasen der Rho-Familie aktivieren. Diese Rho-GTPasen, darunter Rac1 und Cdc42, induzieren Membranruffling – eine charakteristische Umgestaltung der Zellmembran durch Aktinpolymerisation (Egami et al., 2014; Kerr and Teasdale, 2009). Das Membranruffling führt schließlich zur Rückfaltung der Zellmembran, wodurch Makropinosomen entstehen, eine Vorstufe von Membranausstülpungen. Diese Vesikel spielen eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von Flüssigkeiten und gelösten Stoffen, insbesondere in Zellen des Immunsystems wie Makrophagen und dendritischen Zellen (Dharmawardhane et al., 2000; Kerr and Teasdale, 2009).

Endozytose und Adapterproteine in der PKC-Regulation

Die PKC-induzierte Endozytose von Transportern erfolgt häufig über Mechanismen der Clathrin- und Caveolae-abhängigen Endozytose. Studien zeigen, dass Adapterproteine eine

entscheidende Rolle bei der Verankerung und Funktion von Membranproteinen spielen. Ein prominentes Beispiel ist das MARCKS-Protein (*Myristoylated Alanine-Rich C Kinase Substrate*), ein direktes Substrat der PKC. Nach Phosphorylierung durch PKC diffundiert MARCKS in das Zytoplasma, was zur Freisetzung von PIP2 und zur Rekrutierung von Endozytose-Adapterproteinen wie AP2 führt. Diese Mechanismen können zur calciumabhängigen Endozytose und einer damit verbundenen Reduktion der Transportaktivität führen (Hartwig et al., 1992; Venardos et al., 2009).

Des Weiteren beeinflusst PKC die zelluläre Organisation durch die Regulation des Zytoskeletts. Die Stimulation mit PMA induziert eine Reorganisation des Zytoskeletts unter Beteiligung von Rho-GTPasen wie Cdc42 und Rac1, was zur Ausbildung von Membranruffeln und Lamellipodien führt (Ridley, 2001). Ein bemerkenswerter Effekt der PKC-Aktivierung betrifft die Lokalisation von Transportproteinen innerhalb der Plasmamembran. Studien deuten darauf hin, dass PMA eine Umverteilung von Transportern innerhalb von *Lipid-Rafts* induzieren kann, was möglicherweise die verminderte Aktivität trotz der Lokalisation in der Plasmamembran erklärt (Foster et al., 2003).

Endozytosewege der Transmembranproteine

Die Sortierung internalisierter Liganden und Rezeptoren zu ihren Zielorten innerhalb der Zelle wird als eine der ersten Funktionen des endozytotischen Systems angenommen (Sorkin and Goh, 2009). Der Weg, den ein Transmembranprotein einschlägt, hängt von seiner Funktion und der durchzuführenden Reaktion ab. Bekannte Proteine, auch wenn *per se* keine Membranproteine, wie Transferrin, *low density lipoprotein* (LDL) und *epidermal growth factor* (EGF) sind bekannt dafür, dass sie über den Clathrin-assoziierten Endozytoseweg in die Zelle gelangen (Kirchhausen, 2000; McMahon and Boucrot, 2011), wohingegen Toxine, Viren und bakterielle Proteine vorwiegend über Clathrin-unabhängige Endozytosewege aufgenommen werden (Doherty and McMahon, 2009). Während sowohl der Clathrin-abhängige als auch der Caveolin-abhängige Endozytoseweg eine funktionsfähige GTPase-Dynamin für die Abschnürung ihrer Vesikel von der Plasmamembran benötigen (Praefcke and McMahon, 2004), übernimmt diese Aufgabe in den Clathrin- und Caveolin-unabhängigen Endozytosewegen die GTPase Arf6 (Donaldson and Jackson, 2011). Für Transferrin, LDL und EGF wird angenommen, dass sie zuerst in einen gemeinsamen Pool von frühen Endosomen gelangen, bevor sie dann

entweder in Recycling-Endosomen oder in späte Endosomen geleitet werden (McMahon and Boucrot, 2011). Zur Verfolgung von Proteinen entlang ihres endolysosomalen Transportwegs werden Organell-spezifische Marker verwendet. Beispiele hierfür sind die GTPasen Rab5 (Marker für frühe Endosomen), Rab7 (Marker für späte Endosomen) und Rab11 (Marker für Recycling-Endosomen) (Bastin and Heximer, 2013).

1.3.3 Constitutive Cycling (konstitutiver Membranprotein-Kreislauf)

Unter *Constitutive Cycling* versteht man das dynamische Zusammenspiel von Endozytose, Recycling und Exozytose, das es Plasmamembranproteinen ermöglicht, ohne komplette Neusynthese dynamisch zu bleiben und ihre Funktion zu modifizieren. Diese zyklischen Prozesse stellen sicher, dass die Zellmembran flexibel bleibt und ihre Zusammensetzung ständig an die Bedürfnisse der Zelle anpassen kann (Royle and Murrell-Lagnado, 2003).

Constitutive Cycling wird vor allem durch Cathrin-abhängige Endozytose reguliert. Hierbei spielen spezifische Peptidsequenzen in den Zielproteinen eine entscheidende Rolle, die als Signal für die Rekrutierung von Clathrin und Adapterproteinen dienen. Diese Sequenzen können zwischen den Proteinen stark variieren, was eine hochspezifische Regulation ermöglicht (Bonifacino and Traub, 2003).

Ein anschauliches Beispiel für *Constitutive Cycling* ist die Regulierung bestimmter Transporterproteine, die durch die Aktivierung der Proteinkinase C beeinflusst werden. PKC kann in kurzer Zeit Änderungen der Endozytoserate der Transporter wie Dopamintransporter (DAT) und GABA Transporter (GAT1) induzieren, und somit deren Funktion direkt an die zellulären Anforderungen anpassen (Royle et al., 2005).

Makropinozytose und *Constitutive Cycling* sind essenzielle Prozesse, die nicht nur die Aufnahme und den Transport von Molekülen ermöglichen. Die Makropinozytose ist häufig bei der Antigenaufnahme und Immunantwort von Bedeutung und *Constitutive Cycling* spielt eine Schlüsselrolle bei der schnellen Anpassung der Zellmembran an veränderte Bedingungen (Royle and Murrell-Lagnado, 2003).

1.3.4 Rho-GTPasen und ihre Rolle in der Endozytose

Rho-GTPasen sind in nahezu allen eukaryotischen Organismen, von Pflanzen bis zu Säugetieren, hoch konserviert und ubiquitär exprimiert (Boueux et al., 2007). Die kleinen Guanin-Nukleotid-bindenden Proteine der Rho-GTPasen-Familie besitzen ein Molekulargewicht von etwa

21 kDa und gehören zur Ras-(*Rat Sarcoma*)-Superfamilie. Wie andere Mitglieder dieser Superfamilie agieren Rho-GTPasen als molekulare Schalterproteine, die zwischen einer aktiven GTP-gebundenen und einer inaktiven GDP-gebundenen Konformation wechseln, was sie in die Lage versetzt, zelluläre Signalwege zu steuern (Bourne et al., 1991). Das menschliche Genom enthält mehr als 20 Gene, die für Rho-GTPasen kodieren (Bernards and Settleman, 2004; Jaffe and Hall, 2005; Ridley, 2006). Die Rho-GTPasen-Familie umfasst mehrere Unterfamilien, einschließlich Rho, Rac, Cdc42, Rnd, RhoBTB, RhoH, RhoU/V und RhoD/F, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Sequenzen und zellulären Funktionen unterteilt werden (Boueux et al., 2007). Ihre Funktion in der Regulation und Umstrukturierung des Zytoskeletts ist am besten charakterisiert (Sorokina and Chernoff, 2005; Wennerberg and Der, 2004). RhoA, Rac1 und Cdc42, gelten als die zentralen Regulatoren des Zytoskeletts und beeinflussen vielfältige zelluläre Prozesse, wie Zellmigration, Zellpolarität, Zellteilung sowie die Endozytose und Exozytose (Aspenström et al., 2004; Govek et al., 2005; Jaffe and Hall, 2005; Murphy et al., 2001).

Regulation des Aktin-Zytoskeletts durch RhoA

Rho-GTPasen regulieren das Aktin-Zytoskelett primär durch die Förderung der Aktin-Myosin-Kontraktion sowie der Aktin-Polymerisation. RhoA selbst induziert die Bildung von Stressfasern und fokalen Adhäsionen, wobei letztere eine Kopplung der extrazellulären Matrix an das Aktin-Zytoskelett ermöglichen und somit Zellform, Zell-Matrix-Adhäsion sowie Zellmotilität beeinflussen (Wennerberg and Der, 2004). Schlüsselrollen spielen hier die Rho-Effektorproteine ROCK (*Rho-associated coiled-coil kinase*) und mDia (*mammalian Diaphanous protein 1*) (Nakano et al., 1999; Olson, 2008).

ROCK fördert durch Inhibierung der Myosin-Leichtketten-Phosphatase und direkte Phosphorylierung der Myosin-Leichtkette die Aktin-Myosin-Interaktion, was zur verstärkten Ausbildung von kontraktile Stressfasern führt (Kawano et al., 1999; Riento und Ridley, 2003). mDia, ein weiteres Effektorprotein, interagiert mit dem G-Aktin-bindenden Protein Profilin und initiiert die Polymerisation von Aktinfilamenten.

Regulation des Zytoskeletts durch Rac1 und Cdc42

Rac1 reguliert das Aktin-Zytoskelett durch Aktivierung des Effektorproteins WAVE, welches den Arp2/3-Komplex rekrutiert und die Aktin-Polymerisation induziert. Dieser Mechanismus

führt zur Ausbildung von Lamellipodien, flachen Aktin-Netzwerken, die bei der Zellmigration entscheidend sind (Schwartz, 2004). Cdc42 hingegen fördert die Bildung von Filopodien durch Aktivierung von N-WASP, das ebenfalls den Arp2/3-Komplex rekrutiert (Aspenström, 2019; Georgiou et al., 2008; Higgs and Pollard, 2000). Darüber hinaus scheint ACK1 (*Activated Cdc42-associated Kinase*) eine Schlüsselrolle bei der Internalisierung von Rezeptoren wie dem EGFR (*epidermal growth factor receptor*) zu übernehmen, wobei die genauen molekularen Mechanismen noch nicht vollständig geklärt sind (Kato-Stankiewicz et al., 2001; Kelley and Weed, 2012).

Zusätzlich reguliert Cdc42 die Zellpolarität über den Par6/aPKC-Komplex und stabilisiert Aktinfilamente durch Interaktion mit mDia (Etienne-Manneville and Hall, 2001; Olson, 2008). Weitere Effektorproteine wie PAK (*p21-activated kinase*) und IQGAP1 (*Ras GTPase-activating-like protein*) modulieren die Dynamik des Zytoskeletts in Kooperation mit Rac und Cdc42 (Schwartz, 2004; Watanabe et al., 2015).

Einfluss von Rho-GTPasen auf die Endozytose

Die Rolle von Rho-GTPasen in der Endozytose ergibt sich aus ihrer Funktion bei der Regulation des Zytoskeletts. Während der Endozytose sind Prozesse wie die Einstülpung der Plasmamembran, die Auflösung der kortikalen Aktin-Barriere und die Abschnürung von Vesikeln direkt oder indirekt mit dem Zytoskelett verknüpft (Qualmann et al., 2000).

Erste Hinweise auf die Beteiligung von Rho-GTPasen an der Clathrin-abhängigen Endozytose stammen aus Studien von Lamaze *et al.*, (1996). Die Überexpression konstitutiv aktiver Mutanten von Rac1 und RhoA führte zur Hemmung der Internalisierung des Transferrin- und EGF-Rezeptors. Dies wurde auf die Auswirkungen auf den Phosphatidylinositol-Stoffwechsel zurückgeführt, der eine entscheidende Rolle bei der Clathrin-abhängigen Endozytose spielt. Rac1 bindet hierbei spezifische Proteine, die am PI-Metabolismus beteiligt sind, obwohl Aktin in diesem Kontext keine direkte Rolle zu spielen scheint (Lamaze et al., 1996).

Rho-GTPasen sind zentrale Regulatoren der Endozytose, indem sie sowohl das Zytoskelett modulieren als auch direkt mit Signalwegen und Lipidkinasen interagieren. Zukünftige Forschungen sollten darauf abzielen, die detaillierten molekularen Mechanismen ihrer Funktion bei der

Vesikelbildung und Rezeptorinternalisierung weiter zu charakterisieren (Bu et al., 2010; Ridley, 2006)

Rho-GTPasen und ihre Rolle bei der Regulation von weiteren Membranvorgängen

Neben ihrer Rolle bei der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts, die für Zell-Adhäsion und -Migration sowie für die Kontrolle der Zellform entscheidend ist, modulieren Rho-GTPasen auch die Dynamik der Mikrotubuli und regulieren die Actomyosin-Kontraktion (Jaffe and Hall, 2005). GEFs fördern den Austausch von GDP zu GTP, was zur Aktivierung der GTPasen führt, während GAPs die Hydrolyse von GTP zu GDP verstärken und die inaktive Form der Rho-GTPasen stabilisieren. Eine weitere regulatorische Ebene stellen Guanin-Dissoziationsinhibitoren (GDIs) dar, die die Dissoziation von GDP verhindern und die GTPasen in ihrer inaktiven Form halten (Jaffe and Hall, 2005; Ridley, 2001).

In ruhenden Zellen befinden sich die Rho-GTPasen überwiegend in ihrer inaktiven Form, gebunden an GDIs. Nach einer Stimulation werden diese aus dem Komplex freigesetzt, verlagern sich an die Plasmamembran, wo sie durch ihren isoprenylierten C-Terminus verankert werden. Dort werden sie durch GEFs aktiviert, was zur Bindung an eine Vielzahl von Effektorproteinen führt, die unterschiedliche zelluläre Reaktionen auslösen (Mosaddeghzadeh and Ahmadian, 2021). Bis heute sind über 50 Effektorproteine für die klassischen Rho-GTPasen Rho, Rac und Cdc42 identifiziert worden, darunter Proteinkinasen, Lipidkinasen, Phospholipasen, Oxidasen und Gerüstproteine (Jaffe and Hall, 2005; Mosaddeghzadeh and Ahmadian, 2021).

Die Aktivierung der Rho-GTPasen erfolgt in der Regel über Rezeptoren auf der Zelloberfläche, wie beispielsweise Cytokin-Rezeptoren, Rezeptor-Tyrosinkinasen oder Adhäsionsrezeptoren (Kjøller and Hall, 1999). Neben den regulatorischen Faktoren (GEFs, GAPs und GDIs) können auch Mutationen in den Rho-GTPasen sowie bakterielle Toxine deren Aktivität modifizieren. Punktmutationen, die die GTPase-Aktivität hemmen oder verstärken, führen zu konstitutiv aktiven oder dominant negativen Varianten der Rho-GTPasen, was zu einer gestörten Zellfunktion führen kann (Heasman and Ridley, 2008). Bakterielle Toxine, wie das C3-Exoenzym von *Clostridium botulinum*, das RhoA, B und C durch ADP-Ribosylierung inaktiviert, oder das Toxin B von *Clostridium difficile*, das Rho, Rac und Cdc42 durch Monoglukosylierung inhibiert, sind ebenfalls bedeutende Werkzeuge in der Grundlagenforschung und haben zur

detaillierten Aufklärung der zellulären Funktionen der Rho-GTPasen beigetragen (Aullo et al., 1993; Just et al., 1995).

1.4 Regulationskaskade der hCATs

Beteiligung der Rho-GTPasen an der Regulationskaskade nach PKC-Aktivierung

Die bisherigen Ergebnisse der Arbeitsgruppe kurz zusammengefasst:

Bereits 1998 wurde der hemmende Effekt aktivierter PKC auf den Arginin-Transport des hCAT-1 untersucht (Gräf et al., 2001). Nachfolgend konnte festgestellt werden, dass eine Reduktion der Oberflächenexpression des hCAT-1 (Rotmann et al., 2006, 2004) eintritt, gefolgt von reduzierter Transportaktivität. Dieser Effekt war zeit- und konzentrationsabhängig sowie reversibel. Die Auswirkung einer kurzzeitigen PKC-Aktivierung durch PMA-Behandlung (in der Regel 30 Minuten) auf alle vier Isoformen (hCAT-1, -2A, -2B und -3) führen in *Xenopus laevis* Oozyten (Niegisch, 2004; Rotmann et al., 2004) zu einer Reduktion der Transportaktivität nach PKC-Aktivierung, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß (Abbildung 3). Eine direkte Phosphorylierung des hCAT-1 konnte ausgeschlossen werden.

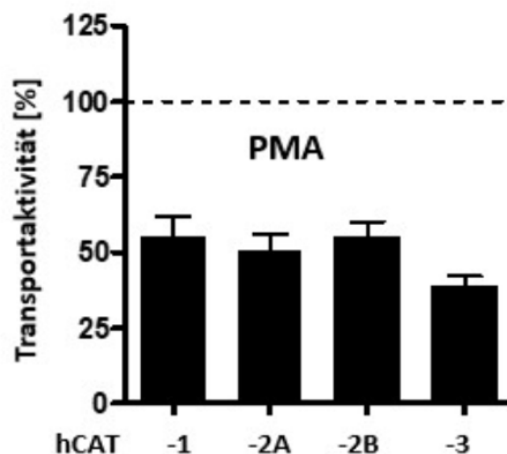


Abbildung 3. Transportverhalten aller vier Isoformen der hCATs nach PMA-Stimulation in *X. laevis* Oozyten

(Zusammengestellt aus Dissertationsarbeiten von A. Rothmann und G. Niegisch (AG Closs; Johann Gutenberg Universität, Mainz) Mit 30 ng cRNA des jeweiligen Transporters injizierte Oozyten wurden nach zweitägiger (beim hCAT-1 dreitägiger) Expression für 30 min in 0,1 mM (hCAT-1), 10 mM (hCAT-2A) und 1 mM L-Arginin (hCAT-2B, hCAT-3)-Lösungen mit PMA gegeben. Zur Kontrolle diente eine 0,1 %-(hC1) bzw. 0,2 %-(hC2A, hC2B, hC3) DMSO. Anschließend wurden die Oozyten 15 Minuten in Na⁺-Aufnahmepuffer mit 0,1 (hC1), 10 mM (hC2) bzw. 1 mM (hC2B, hC3) L-Arginin und 10 µCi/ml [³H]-L-Arginin gegeben, lysiert und der Radioaktivitätsgehalt bestimmt. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte. Die Werte sind als Prozentanteile der DMSO-Kontrollen dargestellt. 100 %

entsprechen 0,38 (hC1), 6,54 (hC2A), 2,8 (hC2B), 1,2 (hC3) nmol L-Arginin/Oozyte/h. Die 100 % Werte der Kontrolle ist zur besseren Vergleichbarkeit als gestrichelte Linie dargestellt. (Mittelwert aller DMSO-Kontrollen). Als Kontrollen wurden H₂O-injizierte Oozyten entsprechend behandelt und der erhaltene Wert (Größenordnung zum Vergleich 0,02 nmol/Oozyte/h) von den Messwerten der injizierten Oozyten abgezogen. hCAT1 Alexander Rotmann, -2A, -2B und -3 Günther Niegisch.

Aufgrund dieser Erkenntnisse schien es wahrscheinlich, dass Veränderungen in der Endozytose bzw. Zirkulation der Plasmamembranproteine zwischen Membran und Zellinnerem eine Rolle bei der Regulation des Transportes durch die humanen kationischen Aminosäuretransporter (hCATs) spielen. Durch Einsatz mehrerer Inhibitoren, die die unterschiedlichen Wege der Endozytose beeinflussen, konnte in *X. laevis* Oozyten gezeigt werden, dass weder die Clathrin- noch die Dynamin-abhängige Endozytose beteiligt war (Stenger, 2012). Zu dem Zeitpunkt war bereits bekannt, dass Rho-GTPasen an der Endozytose beteiligt sind (Lamaze et al., 1996; Ridley, 2006). Stenger (2012) konnte durch experimentellen Nachweis zeigen, dass Rho-GTPasen bei der Regulation der hCATs involviert sind. Über konstitutiv aktive Mutanten der Rho-GTPasen Cdc42 und Rac1 kann der Transport des hCAT-2A negativ beeinflusst werden (Stenger, 2012).

Aktivierung der Proteinkinase C führt zur Verminderung der Anzahl Transporter aller vier CAT-Isoformen führt (Gräf, 1998; Niegisch, 2004; Rotmann, 2004). Die Prozesse der Aktivierung sind noch nicht umfassend geklärt.

Basierend auf diesen Erkenntnissen, wurden die experimentellen Arbeiten zum Verständnis der Regulationsprozesse der kationischen Aminosäuretransporter im Rahmen dieser Doktorarbeit fortgeführt.

1.5 Fragestellung

Die hCAT-Transporter sind essenziell für die Aufnahme und den Transport kationischer Aminosäuren und spielen eine zentrale Rolle in verschiedenen physiologischen Prozessen, darunter Zellwachstum, Immunantwort und Stoffwechsel. Ziel der vorliegenden Dissertation war es, die Mechanismen der posttranslationalen Modifikation dieser Transporter wie z.B. der Regulation der Transportaktivität durch veränderte Oberflächenexpression weiter zu entschlüsseln.

Die Arbeit zielte darauf ab, die Rolle von Proteinkinase C und kleinen G-Proteinen, insbesondere Cdc42 für die Regulation von kationischen Aminosäuretransportern, zu verstehen. Der Fokus lag dabei auf der Isoform hCAT-2A.

Dazu sollten verschiedene Modelle verwendet werden, darunter *Xenopus laevis* Oozyten und humane U373 MG Glioblastomzellen, die hCAT-2A.EGFP stabil überexprimieren. Zusätzlich zu den genannten Expressionssystemen war die Suche nach weiteren geeigneten Zellkultursystemen ein Teil der Forschungsaufgabe.

Durch Einsatz verschiedener Toxine sollte ermittelt werden, ob Rho-GTPasen an den PKC-vermittelten Effekten beteiligt sind und selbst auch zu einer verminderten Expression der Transporter in der Plasmamembran führen.

Dazu sollten hCATs zusammen mit konstitutiv aktiven oder dominant negativen Mutanten von RhoA, Rac1 und Cdc42 in Oozyten von *Xenopus laevis* exprimiert werden.

In humanen Zellen sollten dagegen siRNAs eingesetzt werden, die das spezifische Ausschalten einzelner Gene ermöglichen, um so die Effekte bestimmten Proteinen zuordnen zu können.

Parallel dazu sollten weitere Kandidaten des Signalweges identifiziert werden, die an der PKC-vermittelten Regulation der Transportaktivität und der Veränderung der Oberflächenexpression beteiligt sind.

2 Material

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Reagenzien und Geräte wurden nachfolgend zusammengestellt. Sollten nicht explizit mit Hersteller- oder Typusangaben versehene Materialien zum Einsatz gekommen sein, so wurden in ihrer Qualität den handelsüblichen Erfordernissen entsprechende Geräte oder Materialien verwendet

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Allgemeine Laborgeräte

Gleichstromquelle	PowerPac 300 Bio Rad, (München)
Hochgeschwindigkeitszentrifuge	J2-MC mit RotorJLA 16.250 JS-13.1; Beckmann (Palo Alto, USA)
Avanti J-30I mit Rotor	Beckmann (Palo Alto, USA)
Kapillarziehmaschine Eigenbau	Werkstatt des Pharmakologischen Institutes (Mainz)
Kühlzentrifuge	5417R; Eppendorf (Hamburg)
Photometer	Gene Quant; Pharmacia (San Francisco)
Tischzentrifuge	5417c; Eppendorf (Hamburg)
Biofuge 13	Heraeus; (Hanau)
Binokular	M26; Leica (Solms)
Nanoliter Injektor	Transjektor 5246; Eppendorf (Hamburg)
Szintillationszähler (β -Strahlung)	TriCarb 1900CA <i>Liquid scintillation System</i> ; Packard (Meriden, USA)
Wasserbad	Frigomix [®] B; B. Braun (Melsungen)

Proteinbiochemie/Antikörper

Blot-Kammer	Trans Blot [®] Electrophoretic Transfer Cell; BioRad (München)
-------------	--

Gelelektrophoresekammer (vertikal) Model 45-2010-i; PeqLab (Erlangen)

Taumelschüttler Duomax 1030; Heidolph (Schwabach)

DNA- und RNA-Analyse

Gelelektrophoresekammer (horizon.) Eigenbau (Werkstatt des Pharmakologischen Institutes, Mainz)

Mikrotiterplatten-Photometer Sunrise (Tecan)

UV-Leuchttisch Mini-Transilluminator; BioRad (München)

Bakterienkultur

Inkubationsschüttler Incubation shaker Series, Innova[®]40; New Brunswick Scientific (Edison USA)

Mikrobiologischer Brutschrank WTB Binder (Tuttlingen)

2.1.2 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Entwicklungsflüssigkeit LX 24 Verdünnung 1:5 mit H₂O (Kodak, Stuttgart)

Fixierflüssigkeit AL 4 Verdünnung 1:5 mit H₂O (Kodak, Stuttgart)

Glaskapillaren *Glass replacement* 3,5 nl (World Precision Instruments, Berlin)

Kapillarenbefüllungsaufsätze Microloader(Eppendorf, Hamburg)

Netzmaterial für Oozyteninjektion Spectra/Mesh[®], 1000 µm Weite, 1020 µm Dicke (MembraPure GmbH, Bodenheim)

Nitrocellulose Membran 0,2 µM, Protran[®] 83 (Schleicher & Schuell, Dassel)

Parafilm Labratroy Film (American Nation Can; Merck, Darmstadt)

Pipettenspitzen 0,5 – 1500 µl; alle Sarstaed (Nürmbrecht)

Röntgenfilme Amersham Hyperfilm[™] ECL (GE Healthcare Limited, Buckinghamshire)

Sterilfilter Filter 0,2 µm (Schleicher & Schüll; Dassel)

Szintillationsflüssigkeit	<i>Lumasafe</i> TM Plus (Lumac LSC, Groningen)
Szintillationsröhrchen	<i>Olyethylene (PE) Vials</i> (Packard, Frankfurt am Main)
T-75 Zellkulturflaschen	<i>Corning (Fischer Scientific; Schwerte)</i>
Whatman Papier	Whatman 3 MM Papier (Macery-Nagel; Düren)
Wundnahtmaterial (resorbierbar)	Vicryl [®] 2/0 (3-metric) V-6 (Ethicon GmbH, Norderstedt)
Wundnahtmaterial (nicht resorb.)	Prolene [®] 3-0 usp (2-metric) V-7 (Ethicon GmbH, Norderstedt)
Zellkulturplatten 6-Loch	100-150 µl/Vertiefung
24-Loch Platte	50µl/Vertiefung alle: Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Zentrifugenröhrchen	PP-Röhrchen, Spitzboden, 15 ml und 50 ml (Greiner; Frickenhausen)

2.1.3 Chemikalien

Agarose	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Agar	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Ampicillin	Ratiopharm (Ulm)
3-Aminobenzoessäureethylester	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Antifoam A	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Arginin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Bactotryptone	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Ethanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Gentamycin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)

Hepes	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Harnstoff	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Kaliumpermanganat	Merck Eurolab GmbH (Darmstadt)
Kollagenase A	Roche (Grenzach-Wyhlen)
λ -DNA-Marker	Fermentas (St. Leon-Rot)
Leibowitz L15 PAA	(Pasching/ Österreich)
2-Mercaptoethanol	Merck Eurolab GmbH (Darmstadt)
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Methanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
N-Ethylmaleimide	PIERCE /Perbio (Bonn)
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Natriumhydrogenphosphat	Merck Eurolab GmbH (Darmstadt)
PMSF	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Proteinase-Inhibitor	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Page Ruler™ Prestained Protein Marker	Fermentas (St. Leon-Rot)
SDS	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Tris Base	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Tris-HCl	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Triton X 100	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tween 20	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Szintillationsflüssigkeit, <i>Luma Safe</i>	Perkin Elmer (Köln)

Radiobiochemika L-[4,5-³H]Arginin $\text{H}_2\text{NC}(=\text{NH})\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$
spezifische Aktivität: 39 Ci/mmol
ICN Biomedicals (Eschwege)

2.1.4 Enzyme und Kits

Enzyme/Enzympuffer:

EcoRI *Sall* *Afl* III Konzentratione für alle Enzyme: 10E/μl
NotI *XbaI* Fermentas (St. Leon-Rot)
Enzympuffer Puffer O (orange; 10x); Puffer Tango (yellow; 10 X)
nach Vorgabe von Fermentas (St. Leon-Rot)

Kit-Systeme:

Aufreinigung von DNA: NucleoSpin[®] Extract II (Katalognr. 740 609.250)
(Machery-Nagel, Düren)
Plasmid-Präparation: EndoFree[®] Plasmid Maxi Kit (Katalognr. 12362)
(Qiagen, Maryland, USA)
HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit (Katalognr. 811.02.25) (Invitrogen, Löhne)
mMessage mMaschine SP6 bzw. T7 Kit Ambion
RNeasy Mini Kit Qiagen
Cdc42 G-LISA Activation *CytoskeletonAssay Biochem. Kit* (Colorim.)
BCA Protein Assay Thermo Scientific

2.1.5 Bakterien, Plasmide, Vektoren und siRNAs

Bakterien

XL1-Blue supercompetent cells Stratagene

Vektoren

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Plasmide und Vektoren

SLC7-Mitglied	Name des Konstruktes	Enzym	Bemerkung
hCAT-1	pSP64T-hCAT-1 AB1C	EcoRI	
hCAT-2A	pSP64T-hCAT-2A 118	Sall	
hCAT-2A-EGFP	pSP64T-hCAT-2A EGFP	Afl III	
hCAT-2B	pSP64T-hCAT-2B 181	Sall	
hCAT-3	pSP64T-hCAT-3	Sall	
RhoA-GTPasen			
hCdc42V12	pcDNA 3.1 (+)-Cdc42 V12A	NotI	hCdc42 konst.-aktiv*
hCdc42N17	pcDNA 3.1 (+)-Cdc42 N17A	NotI	hCdc42 dom.-neg.#
rRac1V12	pGEM HE-Juel-rRac GV12	XbaI	rRac1 konst.-aktiv
rRac1N17	pGEM HE-Juel-rRac TN17	XbaI	rRac1 dom.-neg.
hRhoA V14	pcDNA 3.1 (+)-RhoA V14A	XbaI	hRhoA konst.-aktiv
hRhoA N19	pcDNA 3.1 (+)-RhoA N19A	XbaI	hRhoA dom.-neg

Sowohl der pSP64T- als auch pSGEM-Vektor enthalten die 3'- und 5'-UTR (untranslatierte Region) des *Xenopus laevis* β -Globin-Gens, sowie einen SP6- bzw. T7-Promotor. Die UTRs tragen zur Stabilität der cRNA in dem Expressionssystem bei. pcDNA 3.1 (+)-Vektor enthält ebenfalls einen T7-Promotor.

*Konstitutive aktive Mutante des Proteins, # dominant-negative Mutante des Proteins

Alle konstitutiv-aktive bzw. dominant-negative Mutanten wurden uns freundlicherweise von der Gruppe um Stefan Bröer (*School of Biochemistry & Molecular Biology, Australian National University, Canberra/ Australia*) zur Verfügung gestellt.

siRNAs

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten siRNAs

siRNA	Kennzeichnung	Einsatzmenge pro 6-well	Expressionszeit in Tagen d
Cdc42	SASI_Hs01_00113094	15nM	2
Rac1	SASI_Hs01_00015565	15nM	2
RhoA	SASI_Hs01_00132355	15nM	2

PAK1	SASI_Hs01_00087968	15nM	2
PKC α	SASI_Hs01_00018817	30nM	2
ACK1	SASI_Hs01_00028285	15nM	2
GRB2	SASI_Hs01_00129586	15nM	2

Alle verwendeten siRNAs wurde von der Firma Sigma-Aldrich bezogen und mit SAINT-RED (Synvolux Therapeutics B.V.) nach Protokoll transfiziert.

2.1.6 Antikörper

Tabelle 4: Übersicht der genutzten Antikörper

Primäre Antikörper	Hersteller	Verdünnung
rabbit-anti-hCAT-1	AG Closs [#]	1:15000 in AK-VP
rabbit-anti-hCAT-2 aff. pur. charge 1.3	AG Closs [*]	1:100 in AK-VP
Anti-GFP "Full-Length A.v. Polyclonal Antibody" Rabbit polyclonal Cat.#: 632382	BD Living Colours TM	1:5000 in Blotto
anti-Cdc42(11A11), rabbit monoclonal Cat.#: 2466	CellSignaling	1:1000 nach CS Protokoll
Anti-Rac1, clone 23A8, mouse, monoclonal Ca.# 05-389	Merck Millipore	1:1000 in Blotto
Anti-PKC α (H-7),mouse, monoclonal Cat.#: 8393	SantaCruz	1:5000 in Blotto
Anti-PAK1, rabbit polyclonal Cat.# 2602	CellSignaling	1:1000 nach CS Protokoll
Anti-RhoA, rabbit, monoclonal Cat.#: 2117	CellSignaling	1:1000 nach CS Protokoll
Anti-GRB2, rabbit, polyclonal Cat.# 3972	CellSignaling	1:1000 nach CS Protokoll
ACK1 (C-20); Cat.#: sc-323	SantaCruz	1:1000 in Blotto
Ubiquitin Ub (P4D1) Cat.#: sc-8017	SantaCruz	1:1000 in Blotto
β -Tubulin, mouse, monoclonal	Sigma-Aldrich	1:2000 in Blotto

Cat.#: T4026		
--------------	--	--

#) Eigenproduktion Institut für Pharmakologie (Mainz) 2010

) Eigenproduktion Institut für Pharmakologie (Mainz), zur Herstellung vgl. Dissertation von Petra Gräf (1998)

Tabelle 5: Übersicht sekundäre Antikörper

sekundäre Antikörper	Hersteller	Verdünnung
goat-anti-rabbit IgG H&L chain specific Peroxidase Conjugate Cat.#: 401393	Sigma-Aldrich	1:15.000-50.000 in Blotto
Anti-mouse IgG-Peroxidase; Produced in rabbit Cat.#: T4026	Sigma-Aldrich	1:5000 in Blotto

2.1.7 Substanzen Aktivitäts-Essay

Tabelle 6: Übersicht Substanzen und jeweilige Lösemittel

Name	Hersteller	Bemerkung
EGF, Cat.#: 100-008	RELIATech GmbH, (Wolfenbüttel)	gelöst in H ₂ O
PMA, Cat.#: 16561-29-8	Sigma-Aldrich	gelöst n DMSO
Dynamin Inhibitor I, (Dynasore), Cat.#: 324410	Calbiochem	Gelöst in DMSO
Rac1 Inhibitor II, Cat.#: 1090893-12-1	Calbiochem	Gelöst in DMSO
IPA 3, Cat.#: 3622	TOCRIS	Gelöst in DMSO
Rapamycin (Sirolimus), Cat.#: R-5000	LC Laboratories, Woburn, MA, USA	Gelöst in DMSO
AG 1879, PP2 Cat.#:529573	Calbiochem	Gelöst in DMSO

2.1.8 Puffer und Lösungen

Betäubungslösung 0,1% (1g/l) 3-Aminobenzoessäureethylester

Blotto 50mM Tris pH 8,0

2mM CaCl₂ x 2H₂O

0,01vol% Antifoam A

	0,05vol% Tween 20
	5m% Magermilchpulver
10x Ca ²⁺ -freie Pufferlösung	96mM NaCl
	2mM KCl
	1mM MgCl ₂
	5mM Hepes pH 7,6
10x Ca ²⁺ -haltige Pufferlösung (ND96)	96mM NaCl
	2mM KCl
	1mM MgCl ₂
	1,8mM CaCl ₂
	5mM Hepes pH 7,6
DEPC-Wasser (dH ² O)	200µl Diethylpyrocarbonat (DEPC)
	in 1l Aqua _{bidest.}
	Inkubation für 8 h auf dem Kreisschüttler und
	60 min Autoklavieren zur Entfernung von
	restlichem DEPC
Elektroblottingpuffer	20mM Tris Base
	150mM Glycin
	20vol % Methanol
10x SDS-Elektrophoresepuffer	240mM Tris Base
	1,9M Glycin
	1m % SDS
Inkubationsmedium (50 ml)	25ml Leibowitz L15-Medium
	750µl Hepes (1 M pH 7,6)
	100µl Gentamycin-Lösung (c = 50 mg/l)

	ad 50ml, steriles dH ₂ O
6x Ladepuffer	0,25vol % Bromphenolblau 0,25vol % Xylene Cyanol FF 30vol % Glycero
10x Na ⁺ -Aufnahmepuffer	20mM KCl 10mM MgCl ₂ 10mM CaCl ₂ 1M NaCl 50mM Tris-HCl pH 7,4 50mM Hepes pH 7,6
10x PBS-Puffer, pH 7,4	1,4M NaCl 26,8mM KCl 17,6mM KH ₂ PO ₄ 101mM Na ₂ HPO ₄
10x TAE-Puffer, pH 8,5	1,14vol % Eisessig 400mM Tris Base 10mM EDTA pH 8,0
10x TBE-Puffer, pH 8	900mM Tris Base 900mM Borsäure 20mM EDTA pH 8,0

2.1.9 Molekularbiologische Lösungen und Wachstumsmedien

Lösungen

Tabelle 7: LB-Medium:

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

LB⁺Amp

LB-Medium + 50 µg/ml Ampicillin

LB-Agar:

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

Tabelle 8: SOB-Medium:

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

SOC-Medium:

SOD-Medium + 20mM Glucose

Tabelle 9: 50x TAE:

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

2.1.10 Zellkultur – Lösungen und Inkubationsmedien

Tabelle 10: Zellkulturmedien und deren Zusammensetzung (übernommen aus Dissertation von A. Werner, 2020)

Medium	Zusammensetzung
RPMI-Vollmedium	RPMI-1640 Medium (#R8758, Sigma Adrich, St. Louis, MO, USA) 10 % FBS (Hitze-inaktiviert, #F7524, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 2 mM Glutamin 10 U/ml Penicillin 0,1 mg/ml Streptomycin
DMEM-Vollmedium	DMEM, high Glucose (#11960044, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 10 % FBS (Hitze-inaktiviert, #F7524, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 2 mM Glutamin 1 mM Natriumpyruvat 10 U/ml Penicillin 0,1 mg/ml Streptomycin
IMDM-Vollmedium	IMDM (#12440053, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 10 % FBS (Hitze-inaktiviert, #F7524, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 2 mM Glutamin 10 U/ml Penicillin 0,1 mg/ml Streptomycin
Argininfreies RPMI-Medium	RPMI-1640 with glutamine, without arginine, leucine, lysine and phenol red (#R1780, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 10 % dialysiertes FBS (Hitze-inaktiviert, #F0392, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 200 µM Lysin 400 µM Leucin 10 U/ml Penicillin 0,1 mg/ml Streptomycin
Argininfreies IMDM-Medium	IMDM for SILAC (#88367, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 10 % dialysiertes FBS (Hitze-inaktiviert, #F0392, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 2 mM Glutamin 200 µM Lysin 10 U/ml Penicillin 0,1 mg/ml Streptomycin

2.1.11 Tiere

Zur Gewinnung von Oozyten wurden weibliche Tiere des Krallenfrosches *Xenopus laevis* eingesetzt. Die Tiere werden in Gruppen in 250-Liter Flüssigkeit fassenden Becken in klimatisierten Räumen der Zentralen Versuchstierhaltung (ZVTE) der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, gehalten.

3 Methoden

Die nachfolgenden Methoden/Experimente wurden in den Räumlichkeiten der Arbeitsgruppe am Institut für Pharmakologie der Johannes Gutenberg-Universität (Mainz) durchgeführt.

3.1 Molekularbiologische Methoden

Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden die experimentellen Arbeitsschritte unter sterilen Arbeitsbedingungen durchgeführt.

3.1.1 Hitzeschocktransformation & Plasmid-Präparation aus *Escherichia coli*

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

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

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

3.1.2 Linearisierung & *in vitro*-Transkription

Für die *in vitro* Transkription müssen die Plasmide linearisiert vorliegen. Dabei wird hinter der abzulesenden Sequenz geschnitten, um so die Transkription zu terminieren. Dazu wurden 10

μg Plasmid für 2-4 Stunden mit 2 μl Restriktionsenzym (siehe Tabelle) in einem 100 μl -Ansatz bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 1 μl zur Überprüfung der Linearisierung in einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt. Nach erfolgreicher Linearisierung wurde der Restriktionsansatz mit dem NucleoSpin® Extract II-Kit (Machery-Nagel) aufgereinigt. Das linearisierte Plasmid wurde in 30 μl vorgewärmten Elutionspuffer (70°C) eluiert, wobei die resultierende DNA-Konzentration meist zwischen 0,2 und 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ lag.

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

3.1.3 Isolation von Gesamt-RNA

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

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

3.1.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

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

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

Formeln zur Berechnung des Nukleinsäuregehaltes:

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

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

3.2 Biochemische Methoden

3.2.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

BCA-Kit

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

Für die Proteinbestimmung wurde mit der im Kit enthaltenen Albumin-Lösung eine Standardkurve hergestellt. Die Lysate wurden je nach zu erwartender Konzentration unverdünnt oder als 1:5 - 1:10-Verdünnung eingesetzt. Von jeder Probe bzw. Standardlösung wurden 25 μl in eine Vertiefung einer 96-Loch-Platte gegeben. Anschließend wurden 200 μl der Analyse-

Lösung, bestehend aus Reagenz A und B im Mischungsverhältnis 50:1 dazugegeben und die Platte für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Detektion erfolgte in einem Mikrotiterplatten-Photometer (Sunrise, Tecan), bei einer Wellenlänge von 562 nm.

3.2.2 Zelllysate

Tabelle 11: RIPA-Puffer (radioimmune precipitation assay-buffer):

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

Lyse-Puffer:

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

N-Glycosidase F (Roche)

Stock-Lösung: 1 U/ μ l

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

Lysate aus *X. laevis* Oozyten

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

Lysate aus humanen Zellen

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

Deglykosilierung

Aufgrund der *in vivo* Glykosylierung der CAT-Proteine zeigt sich im Acrylamidgel ein breite undifferenziert „Schmierbande“ oberhalb der berechneten Molekülgröße. De-Glykolysierung des Proteins mündet in einer definierten Proteinbande im Analysegel. Zusätzlich verifiziert die entstehende Größenverschiebung die Richtigkeit der Bande.

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

3.2.3 Biotinylierung

Bei der Methode der Biotinylierung werden intakte Zellen in einer Biotin-haltigen Lösung inkubiert. Dabei bindet Biotin an primäre Amine von Proteinen (NH₂-Gruppen). Alle an der Zelloberfläche oder durch sie hindurchragenden Proteine werden hierbei mit Biotin markiert. Die Proben werden auf Eis bearbeitet, um zelluläre Prozesse (z.B. Endozytose) zu verlangsamen.

Verwendete Substanzen:

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

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

Biotinylierung von *Xenopus laevis* Oozyten:

Tabelle 12: PBS modifiziert

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

Tabelle 13: PBS mod. + CM

1mM	MgCl ₂
0,1mM	CaCl ₂ in PBS mod.

Biotin Lösung: 1mg/ml Biotin in PBS mod.

Stopp-Lösung: 50mM NH₄Cl in PBS mod.

Tabelle 14: Waschpuffer I:

50mM	Tris (pH 8)
500mM	NaCl
1mM	EDTA (pH 8)
0,5% (v/v)	Triton X-100
0,1% (w/v)	SDS frisch mit 1µl/ml PMSF (Stock 0,2 M in Aceton) versetzen

Tabelle 15: Waschpuffer II:

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

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

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

Zur Isolation der Oberflächenproteine aus dem Proteingemisch wurden 150 µl des Lysats (entspricht 7,5 Oozyten) auf 50µl Avidin-gekoppelte Perlen gegeben und über Nacht auf einem „end-over-end“-Schüttler inkubiert. Dabei bindet das Biotin am Avidin. Am nächsten Tag wurden die Proben abzentrifugiert (14.000 rpm, 4°C, 20 Minuten), der Überstand verworfen und

das Sediment 3-mal mit Waschpuffer I und einmal mit Waschpuffer II gewaschen (je 0,7 ml; 14.000 rpm, 4°C, 20 Minuten). Alternativ kann auch Lyse-Puffer (RIPA plus Protease-Inhibitor) zum Waschen der Perlen (*beads*) verwendet werden. Das Sediment wird nach dem letzten Waschschrift in 30 µl 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 10 Minuten bei 37°C inkubiert.

Biotinylierung humaner Zellen

Tabelle 16: PBS

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

Tabelle 17: PBS + CM:

1mM	MgCl ₂
0,1mM	CaCl ₂ in PBS

Biotin Lösung: 1 mg/ml Biotin in PBS+CM

Tabelle 18: Quenching-Puffer:

0,1mM	Glyzin in PBS+CM
-------	---------------------

Humane Zellen wurden in 10 cm oder 6-Well-Zellkulturplatten bis zur Konfluenz kultiviert. Nach 3-maligem Waschen mit PBS + CM wurden die Zellen in 2 ml bzw. 600 µl Biotin-Lösung inkubiert. Nach 20 Minuten wurde das Biotinylierungsreagenz abgesaugt und die Zellen zwei Mal mit 5 ml bzw. 2 ml Quenching-Puffer gewaschen. Um überschüssiges Biotin aus dem Ansatz zu entfernen, wurden die Zellen für 30 Minuten in weiteren 5 ml bzw. 2 ml Quenching-Puffer bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zwei Mal mit PBS + CM gespült und in 1 ml bzw. 150 µl Lyse-Puffer für 60 Minuten lysiert. Nach dem Abzentrifugieren des Lysats (14.000 rpm; 4°C, 15 Minuten) und einer Bestimmung des Proteingehalts wurden die Oberflächenproteine durch Avidin-Kopplung isoliert. Hierzu wurden 100 µg (für überexprimierte

Proteine) bzw. 300 µg Protein enthaltendes Lysat (bei endogenen Proteinen) auf 50 - 70 µl Avidin-gekoppelte Perlen gegeben und über Nacht auf einem „end-over-end“-Schüttler inkubiert. Ein kleinerer Teil (10 – 30 µg) des Volllysates wird mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt und 10 min bei 37 °C inkubiert. Diese Proben beinhalten sowohl die intrazelluläre als auch membranständige Menge des untersuchten Proteins.

Am Folgetag wurden die Proben abzentrifugiert (14.000 rpm, 4 °C, 20 Minuten), die Überstände in neue beschriftete 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und das Sediment vier Mal mit je 500 µl RIPA + 200 µM PMSF (Stock 0,2 M in Aceton) gewaschen. Um die Proteine wieder von den Avidin-Perlen zu lösen, wurde das Sediment am Ende in 30 µl 2x SDS-Probenpuffer für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Gleiche Mengen der Überstände aller Proben werden ebenfalls mit entsprechender Menge an 2x SDS-Probenpuffer versetzt und bei 37°C für 10 min inkubiert, um zu überprüfen, ob sich die Proteinmengen in allen Proben in einem vergleichbaren Bereich befinden.

3.2.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine bewährte Methode, um Proteine in Proteine ihrem Molekulargewicht entsprechend aufzutrennen (Green and Sambrook, 2012). Dabei lagert sich das anionische Detergenz SDS an die hydrophoben Regionen der Proteine an, denaturiert diese und verleiht ihnen so eine negative Gesamtladung. Diese Protein-SDS-Komplexe verfügen über ein konstantes Verhältnis von Ladung zu Masse. Die Denaturierung der Proteine wird unterstützt, indem das reduzierende Agens 2-Mercaptoethanol, während einer 10-minütigen Inkubation in SDS-Probenpuffer bei 37°C Disulfidbrücken spaltet. Um die Auftrennung der Proteine im sog. Trenngel zu verbessern, wurden diese zunächst durch ein geringer-prozentiges Sammelgel konzentriert.

In Vorbereitung des Gießprozesses für das Trenngel, wurde die Lösung zwischen zwei, zuvor mit Ethanol gereinigten, Glasplatten gefüllt und mit Wasser überschichtet, um eine glatte Trenngeloberfläche zu schaffen. Nach der Polymerisierung des Trenngels wurde das Wasser abgeschüttet und Reste gründlich mit Filterpapier abgezogen. Auf das Trenngel wurde das Sammelgel gegossen und ein Kunststoffkamm zur Aussparung von Proben Taschen zwischen die Glasplatten geschoben. War das Sammelgel polymerisiert, wurde das Gel in eine dazugehörige Elektrophorese-Kammer (Model 45-2010-i; PeqLab, Erlangen) überführt und diese mit

SDS-Elektrophorese-Puffer gefüllt. Der Kunststoffkamm wurde vorsichtig entfernt und die Probenaschen zur Entfernung von Gelresten mit Puffer gespült. Nachdem die mit 2x SDS-Probenpuffer versetzten Proben, sowie 4 µl Marker (*Proteinmarker Page Ruler™ Prestained Protein Marker*, Fermentas) aufgetragen waren, wurde zum Einlaufen der Proben in das Gel eine Spannung von 200 Volt angelegt, die nach 10 Minuten auf 120 Volt reduziert wurde.

Lösungen:

Tabelle 19: 2x SDS-Probenpuffer:

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

Tabelle 20: Rezepte Trenngel)

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

Tabelle 21: *Rezepte Sammelgel*

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

Tabelle 22: *SDS-Elektrophorese-Puffer (10x)*

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

3.2.5 Western-Blot

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

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

Ponceau S-Färbung mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst.}}$, wurde zum Nachweis der Proteine durch Antikörper-Bindung übergegangen.

Tabelle 23: Elektroblotting-Puffer:

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

Tabelle 24: Ponceau S Lösung:

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

Proteinnachweis durch Antikörper

Unspezifische Bindungsstellen auf der Membran wurden durch eine ein- bis zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur (RT) mit Blotto (bei späterer Benutzung von CAT-Antikörpern zusätzlich mit 4 % Ziegenserum) abgesättigt. Anschließend wurde drei Mal für 10 Minuten mit Blotto bzw. Antikörperverdünnungspuffer (AK-VP) auf einem Taumelschüttler bei RT gewaschen. Die Membran wurde zusammen mit in eine Plastikfolie eingeschweißt und auf einem "end over end" Schüttler über Nacht bei 4°C inkubiert. Alternativ konnte die Membran mit entsprechender Menge (entscheidend ist die Größe der Membran) Primärantikörperverdünnung auf dem Taumelschüttler bei 4°C inkubiert werden. Am folgenden Tag wurde die Membran aus der Plastikfolie entnommen und drei Mal für 10 min mit Blotto gewaschen. Es folgte die Inkubation für 1 Stunde bei RT auf dem Taumelschüttler mit der entsprechenden Sekundärantikörperverdünnung. Danach wurde die Membran dreimal mit 1x TBST und einmal mit 1x TBS gewaschen, auf eine Glasplatte gelegt und mit einer 1:1 Mischung des Chemilumineszenz Reagenz Plus (Perkin Elmar) gleichmäßig überschichtet. Nach einer Minute wurde die Lösung entfernt und die Membran mit einer Folie bedeckt.

Sollte die gleiche Membran mit einem zweiten Primärantikörper inkubiert werden, wurden die gebundenen Antikörper durch „Strippen“ entfernt. Dazu wurde die Membran nach viermaligem waschen mit 1x PBS für 30 Minuten bei 50°C mit Strip-Puffer inkubiert. Danach wurde

die Membran 6-mal mit 1x PBS gewaschen und konnte dann in Blotto (\pm Ziegenserum) erneut geblockt werden.

Beachte: Antikörper der Firma CellSignaling dürfen nicht in Blotto verdünnt werden. Sondern in 5%-iger BCA-Lösung in TBS.

Tabelle 25: Antikörperverdünnungspuffer

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

Tabelle 26: Blotto

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

Tabelle 27: 1x TBS:

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

1x TBST:

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

Tabelle 28: Strip-Puffer

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

3.3 Expressionssystem *Xenopus laevis*-Oozyten

Lösungen

Tabelle 29: 1x Ca²⁺-freier Puffer

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

1x Ca²⁺-haltiger Puffer

1x Ca²⁺-freier Puffer + 1,8 M CaCl₂

Kollagenaselösung

(Stock 200 mg/ml)

Gentamycin

(Stock 50 mg/ml)

Tabelle 30: Oozyten-Kulturmedium:

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

Tabelle 31: 1x Na⁺-Aufnahmepuffer:

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

3.3.1 Das Expressionssystem *Xenopus laevis*

Die Eizellen des afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* kommen in vielen Bereichen der Grundlagenforschung als Expressionssystem eukaryotischer Proteine zum Einsatz, da sie nach Injektion von mRNA-Molekülen diese translatieren, posttranslational modifizieren und prozessieren (Gurdon et al., 1971). Die exprimierten Proteine werden zumeist in das Zellkompartiment transferiert, das im Herkunftsorganismus auch Zielort des Proteins ist.

Transporterproteine wie z.B. hCAT-1 werden in die Plasmamembran eingebaut. Eine Untersuchung der Aktivität ist so nahezu unter Realbedingungen möglich. Die Größe der Oozyten ermöglicht eine flexible und komfortable Arbeitsweise zur funktionalen Proteintestung.

Aufzucht der Tiere

Der glatte Krallenfrosch *Xenopus laevis* gehört zur Gattung der Amphibia (Lurche), Ordnung der Anura (Froschlurche) und Familie der Pipidae (Zungenlose). Mit ca. 2 Jahren werden die Tiere geschlechtsreif. Die Frösche wurden in kleinen Gruppen von je 8 - 9 Tieren bei konstant 18 – 20 °C und einem 12-Stunden Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Röhren und Steine bieten naturnahe Versteckmöglichkeiten. Alle 3 - 4 Tage werden die Tiere mit pelletierter Nahrung oder getrockneten Bachflohkrebsen gefüttert. Aus hygienischen Gründen ist jedes Becken mit einem eigenen Kescher und einer eigenen Wasserfiltereinheit versehen. Krankheiten äußern sich bei *Xenopus* meist anhand auffälliger Veränderungen des Hautbildes. In solch einem Fall wurden die betroffenen Tiere von seinen Artgenossen isoliert und behandelt. Die Tiere werden in der zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Johannes Gutenberg-Universität gehalten.

Puffer *X. laevis* Behandlung

Ca²⁺-freier Puffer

96 mM NaCl

2 mM KCl

1 mM MgCl₂

5 mM Hepes (pH 7,6)

ND96-Puffer (Ca₂₊-haltige Pufferlösung)

Ca²⁺-freier Puffer +. 1,8 mM CaCl₂

Oozyten-Kulturmedium

50 vol % Leibovitz-Medium [Sigma-Aldrich]

1 mM L-Glutamin 200 mM [Gibco]

100 µg/ml Gentamycin 50 mg/ml [Sigma-Aldrich]

15 mM HEPES pH 7,6

Kollagenase-Lösung Stock 200 mg/ml

3.3.2 Gewinnung der *X. laevis* Oozyten

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

Zur Betäubung wurde der Frosch für 30 – 45 Minuten in eine eiskalte 0,1 %-ige 3-Aminobenzoessäureethylester-Lösung gesetzt, dann mit dem Rücken auf eine eisgefüllte Schale gelegt. Direkter Hautkontakt mit dem Eis, der zu Verletzungen führen kann, wurde durch Frischhaltefolie und feuchte Tücher vermieden. Einer Austrocknung der Froschhaut wurde ebenfalls durch feuchte Tücher entgegengewirkt, wobei nur der zu operierende Bereich und die Atemöffnungen ausgespart wurden.

Um keine Gefäße zu verletzen wurde ein ca. 10 mm langer Schnitt durch Ober- und Unterhaut (Fett- und Muskelgewebe) relativ weit seitlich, in der Nähe des Schenkels gesetzt. Durch diese Öffnung wurden die Ovarien mit Hilfe einer Pinzette aus der Bauchhöhle gezogen und mit einer Schere stückchenweise abgeschnitten. Diese Stücke wurden direkt in kaltem Ca^{2+} -haltigen Puffer gewaschen und in Ca^{2+} -haltigem Puffer (+ 0,1 mg/ml Gentamycin) bei 4°C gelagert.

Beim anschließenden Vernähen der Operationsöffnung wurde darauf geachtet, dass sich zwischen Muskelgewebe und Oberhaut keine Gewebereste befanden, da dies zu Infektionen und verschlechterter Wundheilung führen kann. Die Unterhaut wurde mit resorbierbaren (Vicryl 3/0) und die Oberhaut mit nicht-resorbierbaren sterilen chirurgischen Fäden (Prolene 3-0) vernäht.

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

3.3.3 Vereinzeln und Lagerung der *X. laevis* Oozyten

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

Um das Enzym Kollagenase vollständig zu entfernen, wurde 15-mal mit kaltem Ca^{2+} -freiem Puffer und anschließend 5-mal mit kaltem Ca^{2+} -haltigem Puffer gewaschen. Die Oozyten wurden anschließend in eine Petrischale überführt und in Ca^{2+} -haltigem Puffer mit ca. 2 % FCS inkubiert, um eine mögliche Restaktivität der Kollagenase zu blockieren. Beschädigte Oozyten und Restverbände wurden sofort aussortiert. Nach 2 - 3 Stunden wurde die FCS-haltige Lösung durch Ca^{2+} -haltigen Puffer (+ 0,1mg/ml Gentamycin) ersetzt.

Gelagert wurden die Oozyten in Ca^{2+} -haltigen Puffer (+ 0,1mg/ml Gentamycin) oder in Kulturmedium bei 4°C. Beschädigte oder degenerierende Oozyten werden täglich aussortiert, das Lagerungsmedium erneuert.

3.3.4 Synthese von cRNA durch *in vitro*-Transkription

Die Transkription der Plasmid-DNA in cRNA wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers mit dem mMESSAGE mMACHINE® SP6 Kit (Ambion) bzw. dem mMESSAGE mMACHINE® T7 Kit (Ambion) durchgeführt. Zunächst wurde die Plasmid-DNA linearisiert. Dabei kamen Restriktionsenzyme zum Einsatz, die hinter der kodierenden Sequenz schneiden und entweder einen 5'-Überhang oder ein glattes Ende erzeugen. Dies verhinderte die spätere Synthese von Antisense-RNA, da ein 3'-Überhang als Erkennungsstelle für die DNA-abhängige RNA-Polymerase hätte dienen können (Goldin, 1992). Nach der Linearisierung wurde die DNA durch Phenol-Extraktion gereinigt, mit Ethanol präzipitiert und in $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ resuspendiert. Der erfolgreiche Restriktionsverdau wurde mittels Gelelektrophorese überprüft, und die Konzentration der

geschnittenen DNA wurde durch Messung der optischen Dichte bestimmt. Die cRNA *in vitro*-Transkription erfolgte in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit folgendem Ansatz:

Transkriptionsansatz (20µl):

2µl 10x Transkriptionspuffer

10µl 2x Ribonucleotid-Mix (NTP-Mix)

(10 mM ATP, CTP, UTP, 2 mM GTP und 8 mM Cap-Analogon)

1 µg linearisierte cDNA

2 µl 10x Enzym-Mix (SP6-RNA-Polymerase, RNase-Inhibitor)

Mit H₂O_{reinst} auf 20 µl Gesamtvolumen auffüllen.

Der Transkriptionsansatz wurde gemischt, kurz zentrifugiert und anschließend für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Um die Plasmid-DNA zu entfernen, wurde dem Ansatz 1 µl DNase I (2 E/µl) hinzugefügt, die Probe gemischt, kurz zentrifugiert und für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Zur Beendigung der Reaktion wurde eine Fällung über Nacht bei -20 °C mit 25 µl LiCl-Präzipitationslösung (7,5 M LiCl, 75 mM EDTA) und unter Zugabe von 30 µl dH₂O durchgeführt. Nach der Fällung wurde der Ansatz zentrifugiert (20 Minuten, 4 °C, 14.000 rpm), der Überstand abpipettiert und das Pellet mit 70%-igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 10 µl H₂O_{reinst} resuspendiert und 1 µl zur Bestimmung der RNA-Konzentration entnommen (mittels optischer Dichte und Agarosegel-Elektrophorese). Die cRNA wurde bei -70 °C gelagert.

3.3.5 Injektion der cRNA und Expression der Proteine in *X. laevis* Oozyten

Um die Kontamination der *Xenopus*-Experimente mit ubiquitär vorkommenden RNAsen zu vermeiden, wurde bei der Herstellung und Während der Injektion der RNA möglichst RNase-frei gearbeitet. Das heißt: sterile Arbeitsumgebung, Handschuhe, DEPC-behandeltes dH₂O und Verwendung von RNase-Inhibitoren.

Die zu injizierenden RNA-Lösungen wurden mit frisch autoklaviertem H₂O_{reinst} auf die gewünschte Konzentration von 0,5 µg/µl verdünnt.

In einer Petrischale wurde ein Kunststoffnetz mit einer Maschenweite von 1 x 1 mm mit Ca²⁺-haltigem Puffer überschichtet. Auf dieses wurden zuvor ausgewählte Oozyten der Stadien V und VI so positioniert, dass ihr heller vegetativer Pol nach oben gerichtet war (Dumont, 1972). Beim Auswählen der Oozyten wurde darauf geachtet, dass diese nicht mehr von ihrem

Follikelhäutchen umgeben waren. Im Normalfall löst sich dieses Häutchen innerhalb der ersten 10 Stunden nach der Kollagenasebehandlung von selbst ab. Ist dies nicht der Fall, kann man versuchen die Haut mit Hilfe einer dünnen Pasteurpipette abzustreifen oder man verwirft die ganze Oozyte.

Mikrokapillaren wurden mit einem Kapillarziehgerät hergestellt und mit 1,5 - 5 μ l der jeweiligen cRNA-Lösung befüllt. Durch einen Mikroinjektor wurde ein definiertes Volumen (z.B. 20-40 nl) pro Oozyte injiziert. Das Volumen wurde anhand der Tröpfchengröße gemessen und über die Öffnungsgröße der Mikrokapillare und die Dauer des Ausstoßintervalls eingestellt. Die Kapillaröffnung wurde durch schrittweises Abknipsen der Spitze vergrößert, bis die gewünschte Tröpfchengröße erreicht war. Die Injektionsdauer wurde möglichst zwischen 4,7 und 5,3 Sekunden gewählt, sodass die Größe der injektionsbedingten Verletzung bei allen Versuchen möglichst ähnlich war. Zum Schutz des am animalen Pol liegenden Zellkerns, wurde die Kapillare stets in den vegetativen Pol eingestochen. Im Intervall von 15 - 20 Injektionen wurde das Injektionsvolumen kontrolliert.

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

3.3.6 Transportstudien in *X. laevis* Oozyten

10 X Na⁺-Aufnahmepuffer

20 mM KCl

10 mM MgCl₂

10 mM CaCl₂

1 M NaCl

50 mM Tris-HCl pH 7,4

50 mM Hepes pH 7,6

Um die Transporteigenschaften und -kinetik der hCAT-Proteine zu ermitteln, wurden die Oozyten drei Mal mit Na⁺-Aufnahmepuffer gewaschen und anschließend bis zur Äquilibration in die entsprechende kalte Aminosäurelösung überführt und für 30 min bei 18°C gelagert.

Nach der Behandlung der Oozyten mit entsprechenden Substanzen (je nach Fragestellung) wurden die Oozyten 15 Minuten bei 20°C in 200 µl [³H]-Aminosäurelösung in Na⁺-Aufnahmepuffer [5 - 10 µCi/ml] der angegebenen Konzentration inkubiert. Nach erneutem 4-maligen Waschen in Na⁺-Aufnahmepuffer wurden die Oozyten vereinzelt, für 30 Minuten in 200 µl 2% SDS lysiert und mit 2 ml Szintillationsreagenz (Luma Safe™) versetzt.

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

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

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

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

Y(AS): Menge der pro Probe aufgenommenen Aminosäure in mol

G: gemessene dpm pro Probe

Statistische Auswertung

Die graphische Darstellung, sowie die statistische Auswertung der Aufnahmestudien erfolgte mit Hilfe des Programms *GraphPad Prism 5.0* (*GraphPad Software Inc.*, San Diego, USA).

Ein kontinuierliches Skalenniveau in einem unabhängigen Studiendesign mit normalverteilten Zielgrößen ermöglicht die Anwendung des parametrischen Testverfahrens des unabhängigen t-Tests für statistische Analysen. Bei mehr als zwei unabhängigen Gruppen kann die Varianzanalyse verwendet werden (du Prel et al., 2010)

Im Rahmen eines multiplen Testens wurde die „*analysis of variance*“, („ANOVA“) mit einem nachgeschalteten Bonferroni-Test angewendet und ein Signifikanzniveau ($p = 0,05$) zu Grunde gelegt.

3.4 Zellkultur

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

Handhabung: Kultivierung, Passagieren und Lagerung

Die Zelllinien wurden kontinuierlich bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden alle Arbeiten mit Zelllinien ausschließlich unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Das verwendete Material sowie alle Medien, Lösungen und Puffer wurden steril bezogen oder steril filtriert. Vor der Verwendung wurden alle Medien, Lösungen und Puffer auf Raumtemperatur gebracht.

Die Kultivierung von Zellen erfolgte in verschiedenen Flaschentypen, geeignet für Zellkultur.

	Fläche	Inhalt
T25	25 cm ²	5 ml
T75	75 cm ²	10 ml

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

Zur Einlagerung wurden die Zellen mit Trypsin von der Flaschenoberfläche abgelöst und bei 800 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in vorgekühltem FCS-haltigem Medium + 10 % DMSO aufgenommen und auf spezielle Einfrierröhrchen verteilt. Nach 24 - 48 Stunden im -80 °C Gefrierschrank wurden die Zellen in den Stickstofftank zur Langzeitlagerung überführt.

Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Teil der Zellsuspension in eine Neubauer Zählkammer gegeben. Die auf einem speziellen Objektträger eingezeichneten Linien grenzen vier definierte Zählfelder ein. Zwischen Objektträger und Deckglas befindet sich eine Vertiefung definierter Höhe. Die Pipettenspitze wird an den Auflagepunkt des Deckglases auf dem Objektträger angesetzt, so dass sich ein definiertes Volumen der Zellsuspension durch die Kapillarkräfte in den Zwischenraum saugt. Mithilfe eines Lichtmikroskops wird die Zellzahl in jedem der 4 Großquadrate bestimmt, ein Mittelwert dieser vier Werte errechnet und mit dem Verdünnungsfaktor der Zellsuspension und der Kammerkonstante (10^4) multipliziert, um die Zellzahl pro ml zu erhalten.

3.4.1 Zelllinien: Herkunft, Morphologie und Kultivierung

U373MG

- Zelltyp: humanes Glioblastom-Astrozytom
- Herkunft: generiert aus einem Glioblastom eines 61 Jahre alten kaukasischen Mannes
- Morphologie: epithelähnliche, adhärente Zellen
- Referenz Pontén und Macintyre, 1968
- Medium: IMDM + 10 % FBS
- Kultivierung: bei 37 °C mit 5 % CO₂; 1-2mal pro Woche 1:10 – 1:20 splitten
- Inkubation: bei 37°C mit 5%CO₂
- Einfriermedium: IMDM + 10 % FBS + 10 % DMSO
- Bezogen von: ATCC, Manassas, VA, USA
- Stabil transfizierte Zelllinien wurden hier im Institut über eine Selektion mit G418 hergestellt und sind in vorhergehenden Doktorarbeiten beschrieben.

EA.hy 926

- Zelltyp: humane endotheliale Zelllinie
- Herkunft: Fusionsprodukt aus der humanen A549/8 Zelllinie (s.o.) mit humanen Umbilikalvenen-Endothelzellen (HUVEC)
- Morphologie: epithelähnliche, adhärente Zellen

- Referenz: Edgell et al., 1983 von der University of North Carolina at Chapel Hill, USA
- Medium: DMEM + 10 % FBS
- Kultivierung: bei 37 °C mit 10 % CO₂, 1x pro Woche 1:10 splitten
- Einfriermedium: DMEM + 10 % FBS + 10%DMSO

NT-2

- Zelltyp: humanes Teratokarzinom, mittels Retinsäure zu Neuronen differenzierbar
Herkunft: generiert aus einem Teratokarzinom eines 22 Jahre alten kaukasischen Mannes
- Morphologie: epitheliale, adhärenente Zellen
- Referenz: Pleasure and Lee, 1993
- Medium: DMEM/Nut Mix F-12 (Ham) + 5 % FBS
- Inkubation: bei 37 °C mit 5 % CO₂
- Einfriermedium: Medium+10 % FCS + 10 % DMSO

DLD-1

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

HepG2

- Zelltyp: humanes Hepatozelluläres Karzinom
- Herkunft: aus Lebergewebe 15 Jahre alten kaukasischen Jungen
- Morphologie: epithelähnliche, adhärenente Zellen
- Referenz: Ihrke et al., 1993
- Medium: DMEM + 5 % FBS
- Inkubation: bei 37 °C mit 10 % CO₂
- Einfriermedium: DMEM + 5 % FBS + 10 % DMSO

Hep3B

- Zelltyp: humanes Leberkarzinom
- Herkunft: aus Lebertumor-Biopsie eines 8-jährigen afro-amerikanischen Jungen hepatozellulärem Karzinom
- Morphologie: epithelähnliche, adhärenente Zellen
- Referenz: Knowles et al., 1980

- Medium: DMEM + 10 % FBS
- Inkubation: bei 37°C mit 10 % CO₂
- Einfriermedium: DMEM + 10 % FBS + 10 % DMSO

Huh7

- Zelltyp: humane Hepatozelluläres Karzinom
- Herkunft: aus Lebertumor eines 57-jährigen japanischen Mannes in 1982
- Morphologie: epithelähnliche, adhärenente Zellen
- Referenz: Nakabayashi et al., 1982
- Medium: DMEM + 10 % FBS
- Inkubation: bei 37°C mit 10 % CO₂
- Einfriermedium: DMEM + 10 % FBS + 10 % DMSO

HEK 293

- Zelltyp: unbekannt
- Herkunft: humane embryonale Nierenzellen
- Morphologie: epithelähnliche, adhärenente Zellen
- Referenz: Graham et al., 1977
- Medium: DMEM + 10 % FBS
- Inkubation: bei 37°C mit 10 % CO₂
- Einfriermedium: DMEM + 10 % FBS + 10 % DMSO

3.4.2 Mikroskopie

Fixieren und Färben der Zellen

Zur Vorbereitung des Färbeprozesses wurden auf Deckgläschen ausgesäte Zellen drei Mal mit DPBS gespült und bei RT für 10 Minuten in 4 % Paraformaldehyd inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 0,1 mM Triton-X 100 in PBS-Lösung für 30 min behandelt und danach drei Mal mit PBS+CM gewaschen. Zur Färbung wurde ein 20 µl großer Tropfen fertig verdünnte Färbelösung (*Texas Red X-Phalloidin*) auf ein Stück Parafilm-Folie aufgebracht. Die mit Zellen bedeckten Plättchen werden mit der Zellseite auf den Tropfen gelegt, luftdicht abgedeckt und 30 Minuten -1 Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut drei Mal mit DPBS gespült und das Glasplättchen auf einen Objektträger mit einem Tropfen „*ProLong® Gold Antifade Reagent*“ (Invitrogen) gelegt. Nach der Trocknungsphase wurde die Fluoreszenz an einem Laser-Scanning Mikroskop (LSM) Bilder aufgenommen.

Tabelle 32: Farbstoff Texas Red-X-Phalloidin

Farbstoff	Hersteller	Anwendung	Ex / Em [nm]
Texas Red®-X Phalloidin	Invitrogen	200 µM in PBS+CM 30min-1h	591 / 608

Tabelle 33: PBS+CM

0,1 mM	CaCl ₂
1 mM	MgCl ₂
	In DPBS Gibco)

3.4.3 Behandlung mit siRNA

Um die Expression bestimmter Gene herunterzuregulieren, wurden siRNAs (*small interfering RNA*) eingesetzt.

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

Einen Tag vor der Behandlung wurden 5×10^4 (24-Loch Platte) bzw. 3×10^5 (6-Loch Platte) ausgesät, so dass die Zellen am Tag der Transfektion ca. 60 % konfluent waren.

Zur Transfektion wurde zunächst in getrennten Reaktionsgefäßen die siRNA und das Saint-Red mit dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer „HBS“ gemischt. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden beide Ansätze gemischt und weitere 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurde mit Serum-freiem Medium auf das Endvolumen aufgefüllt und das Gemisch vorsichtig auf die zuvor einmal mit DPBS gewaschenen Zellen getropft. Pro Vertiefung wurde

bei einer 6-Loch Platte 225 μl Transfektions-Gemisch in einem Endvolumen von 900 μl verwendet, bei einer 24-Loch Platte 50 μl Transfektions-Gemisch in einem Endvolumen von 250 μl . Die siRNA lag standardmäßig in einer Stock-Konzentration von 20 μM bzw. 10 μM vor und wurde so eingesetzt, dass die Endkonzentration 15 nM betrug. In Tabelle 34 sind die Standardansätze pro Vertiefung einer 6- bzw. einer 24-Loch Platte dargestellt.

Tabelle 34: Standardansätze zur siRNA-Transfektion

	Reaktionsgefäß 1		Reaktionsgefäß 2		Medium
	siRNA	HBS	SAINT-RED	HBS	
6-Loch	0,675 bzw. 1,35 μl	111,875 μl	20 μl	92,5 μl	675 μl
24-Loch	0,1875 bzw. 0,375 μl	24,811 μl	2,5 μl	22,5 μl	200 μl

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

3.4.4 Transportstudien an humanen Zellen

Lösungen

Tabelle 35: 10x Locke's Lösung (LL)

154 mM	NaCl
5,6 mM	KCL
1 mM	MgCl ₂
10 mM	HEPES
3,6 mM	NaHCO ₃
pH 7,4 einstellen	

10x Locke's Lösung (LL) wird 1:10 verdünnt und mit 2 mM CaCl₂ und 5,6 mM Glucose versetzt. Die Wasch- sowie die Aufnahmelösung wurden auf 37°C vorgewärmt. Die Aufnahmelösungen enthielten 100 μM – 1 mM L-Aminosäure die mit 5 – 10 $\mu\text{Ci/ml}$ [³H]-Aminosäure versetzt wurde.

Durchführung

Die in 24- bzw. 96-Loch Platten ausgesäten Zellen wurden auf einem 37°C warmen Heizblock zwei Mal mit 300 µl bzw. 100 µl vorgewärmter Locke's Lösung gewaschen und anschließend für 30 Sekunden in Aufnahmelösung inkubiert. Die Aufnahmelösung wurde durch Ausschlagen der Platte auf Papier entfernt und die Zellen sofort 3-mal in eiskalter Locke's Lösung gespült, indem die Platte in eiskalte Locke's Lösung getaucht und anschließend wieder ausgeklopft wurde. Die Zellen wurden dann für ca. 30 Minuten in 100 µl bzw. 50 µl 0,5 N NaOH bei RT lysiert. Anschließend wurde die Lösung durch Zugabe von 100 bzw. 50 µl 0,5 N HCl neutralisiert und das Volumen durch die Zugabe von 100 bzw. 50 µl Locke's Lösung vergrößert.

Von dem Endvolumen von 300 µl bzw. 150 µl wurden 100 µl zur Messung der Radioaktivität im Szintillationszähler mit 2 ml Szintillationsreagenz (Luma Safe™) versetzt. Die Proteinbestimmung erfolgte mittels BCA-Assays (Probenvolumen 25 µl). Die Auswertung erfolgte, wie in Kapitel 3.3.6 beschrieben.

3.4.5 Nachweis von aktiven Cdc42

Aufgrund der hohen Zeit- und Kostenintensität des weitverbreiteten Pulldown-Assays zur quantitativen Bestimmung des Aktivitätsstatus von Rho-GTPasen, wurde entschieden, das Cdc42 G-LISA Activation Assay Kit der Firma Cytoskeleton, Inc zu verwenden. Diese Methode basiert auf dem gleichen Prinzip des klassischen Pulldown Assays, allerdings erfolgt die quantitative Messung, statt eines Western-Blots, kolorimetrisch. Die PBD-Domäne der PAK1 Kinase (Effektorprotein des Cdc42/Rac1) wird verwendet, das aktives bzw. GTP-gebundenes Cdc42 als auch Rac1 bindet. Das vorbereitete Zelllysate wurde in eine mit PBD-Domäne beschichteten 96-Loch Platte überführt. Die Menge an aktiviertem Rac bzw. Cdc42 wurde mittels spezifischem ersten Antikörper und eines Peroxidase-gekoppelten zweiten Antikörpers detektiert und fotometrisch vermessen.

Das Assay wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers (Version 3.0 und 4.0) durchgeführt. Da das aktive Cdc42 sehr instabil ist und durch Wachstumsfaktoren im Kälberserum aktiviert werden kann, war es notwendig, die Zellen bis zu einer maximalen Konfluenz von 20 % wachsen zu lassen und 16 Stunden vor der Stimulation das Medium durch serumfreies Medium zu ersetzen. Die Stimulation der in 10 cm Schalen bzw. 6-Well-Platten ausgesäten Zellen erfolgte

ebenfalls im serumfreien Medium bei 37°C im Brutschrank. Alle nachfolgenden Schritte wurden zügig und auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Experimente in *Xenopus laevis* Oozyten Expressionssystem

4.1.1 Beteiligung von Rho-GTPasen an der PKC-vermittelten Reduktion von in hCAT-Proteinen in der Plasmamembran

Langjährige Forschungsbemühungen zum Verständnis der Regulation der Transportaktivität der humanen kationischen Aminosäuretransporter (hCAT), mündeten in der Erkenntnis, dass eine Aktivierung der Proteinkinase C zur Verminderung der Anzahl an Transporter-Molekülen aller vier CAT-Isoformen in der Plasmamembran führt. Die Prozesse der Aktivierung sind noch nicht umfassend geklärt, bei CAT-1 kommt es jedoch nicht zu einer direkten Phosphorylierung durch PKC (Rotmann, 2004).

Es wurde vermutet, dass der PKC-Effekt auf die CAT-Proteine durch Veränderungen in der Endozytose oder im Recycling der Plasmamembranproteine vermittelt wird. Durch den Einsatz mehrerer Inhibitoren, die unterschiedliche Endozytosewege beeinflussen, konnte Stenger (2012) in *Xenopus laevis* Oozyten zeigen, dass weder die Clathrin- noch die Dynamin-abhängige Endozytose beteiligt waren. Ebenso war bekannt, dass Rho-GTPasen an der Endozytose beteiligt sind (Lamaze et al., 1996; Ridley, 2006). Basierend auf diesen Ergebnissen lag eine Untersuchung der hCAT-Regulation in Hinblick auf Rho-GTPasen nahe. Vorläufige Ergebnisse von Stenger ergaben, dass konstitutiv aktive Mutanten der Rho-GTPasen Cdc42 und Rac1 den Transport des hCAT-2A tatsächlich negativ beeinflussen (Stenger, 2012).

4.1.2 Aufhebung der Reduktion nach PKC-Aktivierung durch TcdB-Vorinkubation

Um den Mechanismus der durch PKC bewirkten Reduktion des CAT-vermittelten Transports zu untersuchen, waren weitere Studien erforderlich. Stenger (2012) zeigte, dass die dominant negativen Mutanten der Rho-GTPasen Cdc42, Rac1 und RhoA keine Wirkung hatten und ihre Funktionalität im *Xenopus laevis* Oozytensystem nicht überprüft werden konnte (Stenger, 2012). Daher wurden zwei Varianten der auf Rho-Proteine inhibitorisch wirkende *Clostridium difficile*-Toxine (Bakteriumstamm *Clostridium difficile*; TcdB 10463 und TcdB 1470) verwendet. Diese Toxine unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit, RhoA zu hemmen. TcdB 10463 hemmt alle drei Rho-GTPasen (Cdc42, Rac1 und RhoA), während TcdB 1470 hauptsächlich Rac1 und Cdc42 hemmt (Genth et al., 2006). Die Toxine übertragen eine Glukoseeinheit auf das entscheidende Threonin (Thr-37 in RhoA, Thr-35 in Rac1, RhoG oder Cdc42) in der Switch-I-Region der Rho-

Proteine. Diese Glykosylierung führt zur funktionellen Inaktivierung der Rho-Proteine aufgrund einer gestörten Kopplung an Effektor- und Regulationsproteine (Aktories and Just, 2005; Just and Gerhard, 2004).

Aufgrund der robusten Transportraten, die für hCAT-2A in Oozyten ermittelt wurden (Stenger, 2012), wurde diese Isoform für die meisten der experimentellen Untersuchungen gewählt. *Xenopus laevis* Oozyten wurden entweder mit einer für hCAT-2A-kodierenden cRNA oder nur mit Wasser injiziert. Nach einer Expressionszeit von zwei Tagen wurde ein Teil der Oozyten (200 ng) jeweils 200 ng des Toxins TcdB 10463 oder TcdB 1479 (TcdBs) injiziert und für weitere 1,5 Stunden inkubiert. Die Stimulation mit PMA und im Kontrollansatz mit dem Lösungsmittel DMSO (0,1%) erfolgte im Anschluss für 30 min. Danach wurde die Transportleistung von hCAT-2A unter den verschiedenen Versuchsbedingungen anhand der Aufnahme von Tritium-markiertem Arginin gemessen (Skizze des Versuchsaufbaus s. Abbildung 4A).

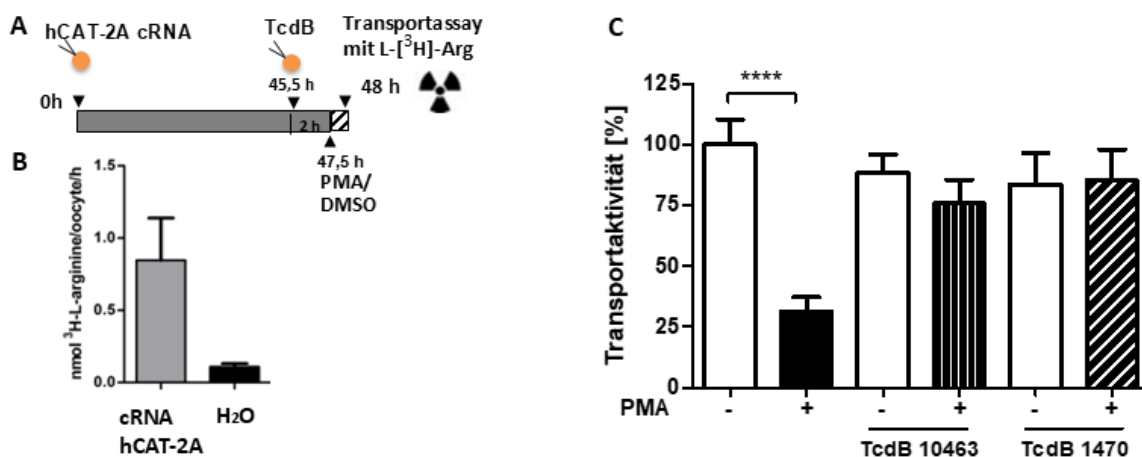


Abbildung 4. Auswirkung der Hemmung von endogenen Rho-GTPasen durch TcdB 10463 und TcdB 1470 auf die PKC-vermittelte Reduktion des Arginin-Transportes in hCAT-2A exprimiert in *X. laevis* Oozyten

(A) Skizze des Versuchsaufbaus. (B) Vergleich des Brutto-Arginin-Transportes und des endogenen Transportes in *X. laevis* Oozyten (mit H₂O-injiziert). In mit hCAT-2A-cRNA injizierten Oozyten lag der Transport bei $0,847 \pm 0,136$ nmol L-Arginin/Oozyte/h (N = 31) und in mit H₂O injizierten Oozyten bei $0,109 \pm 0,0273$ nmol L-Arginin/Oozyte/h (N = 23). In allen nachfolgenden Abbildungen ist der endogene Transport abgezogen (C) *X. laevis*-Oozyten wurden nach Protokoll isoliert und vorbereitet, anschließend in entsprechendem Reifestadium entnommen und mit jeweils 20 ng für hCAT-2A kodierende cRNA (in 40 nl Wasser oder nur mit 40 nl Wasser), injiziert. Nach zweitägiger Expression wurden die Oozyten der so gekennzeichneten Versuchsgruppe mit *C. difficile* Toxin TcdB 10463 oder TcdB 1470 (jeweils 200 ng in 40 nl pro Oozyte) erneut injiziert und für eine Gesamtdauer von 2 Stunden inkubiert. 30 min vor dem Transport-Assay wurden jeweils die Hälfte der Oozyten zusätzlich für 30 min in 100 nM PMA in 0,1% DMSO und die andere Hälfte nur in 0,1% DMSO als Kontrolle inkubiert. Anschließend wurden die Oozyten 15 Minuten in Na⁺-Aufnahmepuffer mit 1 mM L-Arginin und 10 µCi/ml [³H]L-Arginin überführt, lysiert und der Radioaktivitätsgehalt bestimmt. Die Werte sind als Prozentanteile der DMSO-Kontrollen dargestellt (100 % = $0,74 \pm 0,14$ nmol L-Arginin/Oozyte/h, N = 18 - 31). Statistische Analysen erfolgten mittels One-Way ANOVA-Varianztest gefolgt von einem Bonferroni Post-Test. Verglichen wurden Kontrolle DMSO (-) vs.

+ PMA, - vs. TcdB 10463/-, - vs. TcdB 1470/-, TcdB 10463/- vs. TcdB 10463/+PMA, TcdB 1470/- vs. TcdB 1470/+PMA. Signifikanzen: $p > 0,0001$: ****, nicht signifikante Veränderungen sind nicht gekennzeichnet.

Im Vergleich zum endogenen Transport wiesen Oozyten, die hCAT-2A exprimierten eine etwa achtfach erhöhte Transportrate für [³H]L-Arginin auf (Abbildung 4B). Die gewählte Inkubationszeit von 15 Minuten lag innerhalb des linearen Bereichs (nicht gezeigt). Im Folgenden werden nur noch Nettotransportraten (Differenz zwischen Rate in hCAT-2A-exprimierenden Oozyten und Kontroll-Oozyten) gezeigt. Erwartungsgemäß bewirken PMA (100 nM für 30 Minuten) eine signifikante Reduktion des hCAT-2A-vermittelten Transportes auf 33 % der entsprechenden Kontrollen. Nach Hemmung sowohl aller drei Rho-GTPasen (RhoA, Rac1 und Cdc42) durch TcdB 10463 als auch von nur Rac1 und vermutlich im geringeren Maße Cdc42 durch TcdB 1470 war keine signifikante Reduktion des hCAT-2A-Transportes durch PMA mehr zu beobachten. Auch unterschieden sich die Transportraten in den Toxin-injizierten Oozyten nicht signifikant von denen in Kontroll-Oozyten ohne Toxin- und PMA-Behandlung. Diese Befunde deuten darauf hin, dass Rho-GTPasen, insbesondere Rac1 und Cdc42, tatsächlich an der inhibitorischen Wirkung von PKC auf den CAT-vermittelten Transport beteiligt sein könnten.

4.1.3 Wirkung von konstitutiv aktiven Mutanten der Rho-GTPasen auf die Transportaktivität von hCAT-1 und hCAT-2A

Der Einsatz der TcdB-Toxine gibt keinen klaren Aufschluss darüber, welche der Rho-GTPasen für die Vermittlung des PKC-Effektes verantwortlich war. Die Folgeexperimente wurden zur Klärung dieser Frage mit konstitutiv aktiven Mutanten einzelner Rho-GTPasen durchgeführt (Freundliche Bereitstellung durch die Arbeitsgruppe von Prof. Stefan Bröer, *School of Biochemistry & Molecular Biology, Australian National University, Canberra/Australien*). Zum Einsatz kamen die konstitutiv aktiven Mutanten von Cdc42, Rac1 und RhoA gekennzeichnet als Cdc42V12, Rac1V12 und RhoAV14. Im Gegensatz zu Stenger (2012), wurden deutlich geringere Mengen an cRNA/Oozyte eingesetzt, da die hohen RNA-Mengen eine toxische Wirkung auf die Oozyten hatten. Statt der bis zu 60 ng cRNA/Oozyte (Stenger, 2012) wurden in den Folgeexperimenten mit 5 – 20 ng der Rho-GTPase-cRNA pro Oozyte der konstitutiv aktiven Mutanten eingesetzt.

Der Effekt der konstitutiv aktiven Rho-GTPasen wurde an den Isoformen hCAT-1 und hCAT-2A untersucht. Dazu wurden *X. laevis*-Oozyten mit cRNA des jeweiligen Transporters injiziert und nach 24 h Inkubationszeit ein zweites Mal mit cRNA der Rho-GTPasen injiziert. Die

Transportversuche fanden nach weiteren 24 h in Anwesenheit von 0,1 (hCAT-1) bzw. 1 mM (hCAT-2A) [³H]L-Arginin statt.

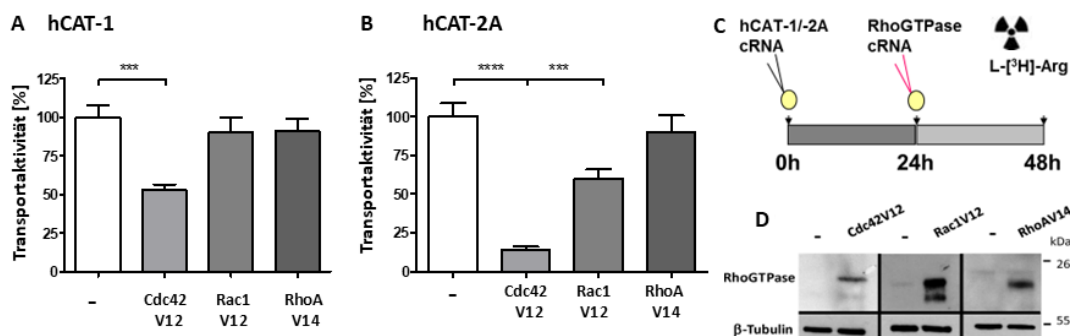


Abbildung 5. Einfluss von konstitutiv aktiven Mutanten verschiedener Rho-GTPasen auf den Arginin-Transport durch hCAT-1 und -2A

Aufnahme von 0,1 mM (A) bzw. 1 mM (B) Arginin [10 μ Ci/ml] in Oozyten, die entweder hCAT-1 (A) oder hCAT-2A (B) exprimierten. 24 h nach Injektion von cRNA des jeweiligen Transporterproteins erfolgte eine weitere Injektion mit cRNA einer der konstitutiv aktiven Rho-GTPasen Cdc42V12, Rac1V12 oder RhoAV14 (5 ng/in 20 nl/Oozyte)] Nach weiteren 24 h wurde die Transportaktivität gemessen. (hCAT-1): 100 % = 0,510 \pm 0,040, N = 17 - 21; hCAT-2A: 100 % = 2,050 \pm 0,180, N = 18 - 20). Statistische Analysen erfolgten mittels One-Way ANOVA-Varianztest gefolgt von einem Bonferroni Post-Test. Verglichen wurden jeweils die DMSO-Kontrolle mit der jeweiligen konstitutiven aktiven Rho-GTPase. Signifikanzen: $p > 0,0001$: ****, $p > 0,001$: ***; nicht signifikante Veränderungen sind nicht gekennzeichnet. (C) Skizze des Versuchsaufbaus. (D) Proteinmengen der konstitutiv aktiven Mutanten in Oozyten nach 24 h Expression. Dazu wurden die Oozyten mit 5 ng der jeweiligen Mutanten cRNA injiziert, nach 24 h lysiert und über eine Western-Blot analysiert. (Auftrag: 50 μ g Protein/Tasche; Antikörper: anti-Cdc42 (1:1000), anti-Rac1 und anti-RhoA (1:1000) nach Protokoll. Als Kontrolle wurde die Menge an β -Tubulin (1:2000, Monoklonaler Antikörper, Sigma Aldrich) verwendet.

Die Transportaktivität von hCAT-1 als auch von hCAT-2A wurden durch die Überexpression des Cdc42V12 herunterreguliert. Dabei zeigen sich unterschiedliche Ergebnisse für die jeweiligen Rho-GTPasen in Bezug auf die gemessene Transportaktivität der Isoformen 1 und 2A (Abbildung 5A und B). Bei Überexpression von RhoAV19 bleibt die Transportaktivität beider Isoformen unverändert. Cdc42V12 reduziert die Transportaktivität von hCAT-2A um 75%, die von hCAT-1 um 50 %. Eine Co-Expression von Rac1V12 reduziert die hCAT-2A Transportaktivität um ca. 50 %, wohingegen die Transportaktivität von hCAT-1 unverändert blieb (Abbildung 5).

4.1.4 Konstitutiv aktives Cdc42 reguliert die Transportaktivität aller vier hCAT Isoformen unterschiedlich stark

Nachdem eine Hemmung der beiden Isoformen hCAT-2A und hCAT-1 durch Cdc42 beobachtet worden war (Abbildung 5), wurde in analogen Experimenten die Wirkung von Cdc42 auch

hCAT-2B und hCAT-3 getestet. Tatsächlich war die Transportaktivität von hCAT-2B durch die Überexpression von Cdc42V12 ähnlich stark (auf $25,2 \% \pm 2,0$) reduziert, wie die von hCAT-2A (Abbildung 6A). Die weitgehende strukturelle Übereinstimmung zwischen diesen Isoformen könnte die Ursache hierfür sein (Closs et al., 1997). Nach Überexpression von Cdc42V12 in *Xenopus* Oozyten, kam die Transportaktivität von hCAT-3 nahezu komplett zum Erliegen. Lediglich $8 \pm 5 \%$ der ursprünglichen Transportaktivität wurde noch festgestellt. Ein ähnliches Muster unterschiedlicher Empfindlichkeit zeigen die einzelnen hCAT-Isoformen nach Aktivierung der PKC (Abbildung 3).

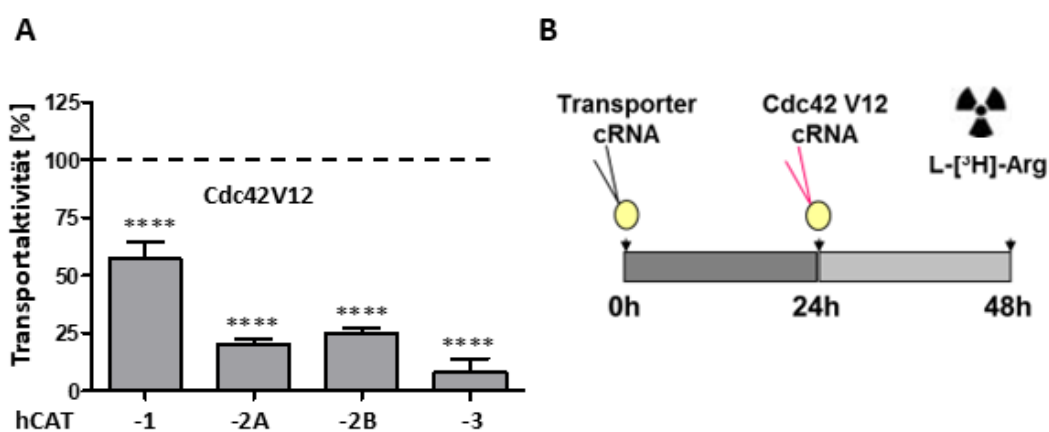


Abbildung 6. Einfluss von Cdc42V12 auf die Transportaktivität aller hCAT-Isoformen

(A) Aufnahme von 1 mM Arginin in hCAT-2A und 0,1 mM Arginine [$10 \mu\text{Ci/ml}$] in hCAT-1, -2B und -3 und nach 24h Cdc42V12 (5ng/20nl/Oozyte) exprimierenden Oozyten. Dazu wurden Oozyten mit 20 ng cRNA des jeweiligen Transporters injiziert und nach eintägiger Expression zusätzlich mit jeweils 5 ng cRNA der konstitutiv aktiven Mutante Cdc42V12. Nach weiteren 24h Inkubation wurde der Transport-Assay durchgeführt. Gezeigt sind Werte von Oozyten, die zusätzlich zu hCATs auch die konstitutive aktive Mutante Cdc42V12 exprimierten, bezogen auf die entsprechenden Kontrollwerte von Oozyten, die nur mit der betreffenden (hCAT cRNA, injiziert worden waren. (hCAT-1: $100 \% = 0,73 \pm 0,07$ N = 20, hCAT-2A: $100\% = 2,63 \pm 0,25$ N= 18 -20, hCAT-2B: $100 \% = 0,47 \pm 0,02$ N = 17-21, hCAT-3: $100 \% = 0,031 \pm 0,003$, N = 11 - 14). Die statistische Auswertung erfolgte mit einem t-Test. Signifikanzen: $p > 0,0001$:**** (B) Skizze des Versuchsaufbaus.

4.1.5 Konzentration- und Zeitabhängigkeit der Transportreduktion von hCAT-2A nach Cdc42V12-Überexpression

Aus der Erkenntnis, dass Cdc42V12 die Transportaktivität aller vier Isoformen der hCATs im ähnlichen Ausmaß wie aktive PKC herunterreguliert, ergab sich die Frage, wie schnell diese Wirkung einsetzt und welche Menge der konstitutiv aktiven Mutante dafür erforderlich ist. Aufgrund einer temporären Nicht-Verfügbarkeit von ³H markierten Arginin wurde [³H]L-Lysin eingesetzt. Lysin ist, wie Arginin ein Substrat aller hCATs (Closs, 1996). Sein Transport durch

hCAT-2A wurde durch Cdc42-Co-Expression im gleichen Ausmaß gehemmt, wie der von [^3H]L-Arginin. (Abbildung 7).

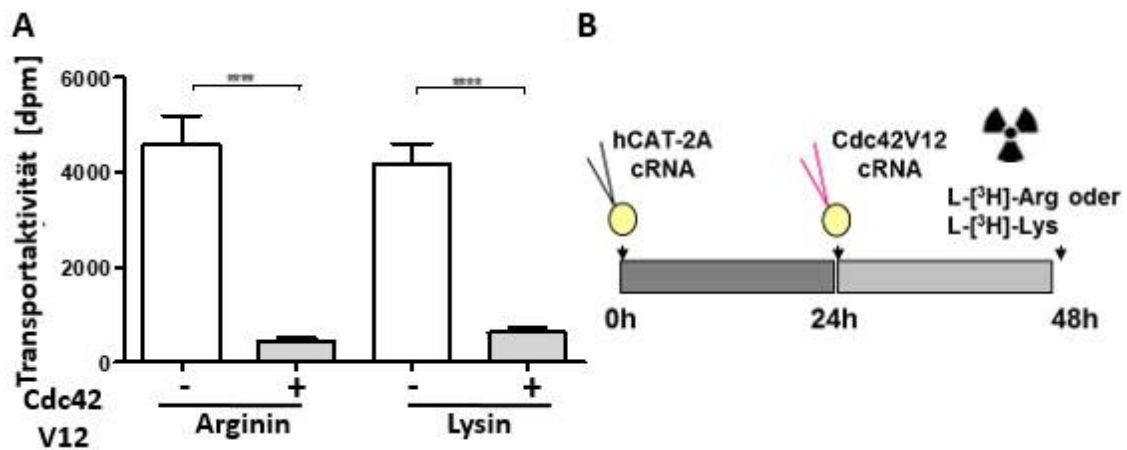


Abbildung 7. Vergleich der hCAT-2A Transportaktivität von Arginin und Lysin in Bezug auf Cdc42V12 Co-Expression

(A) Aufnahme von 1 mM [^3H]L-Arginin bzw. 1mM [^3H]L-Lysin [10 $\mu\text{Ci/ml}$] in hCAT-2A-exprimierenden Oozyten ohne und mit Cdc42V12-Co-Expression (5 ng/Oozyte/24h). (B) Skizze des Versuchsaufbaus. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM (N = 13 - 17). Statistische Analyse zwischen Arginin- und Lysin-Transport jeweils zusammen mit Cdc42V12-Co-Expression. wurde mit einem t -Test durchgeführt. Signifikanzen: $p > 0,0001$:****, $p > 0,001$.

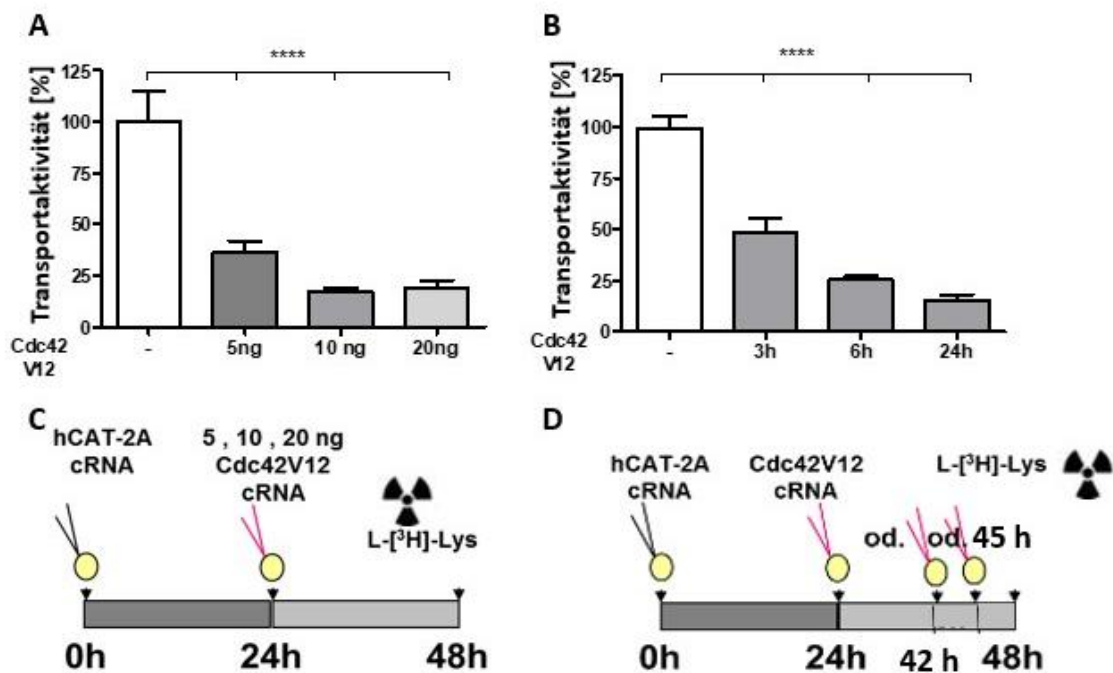


Abbildung 8. Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Transportreduktion des hCAT-2A nach Cdc42V12- Co-Expression in Oozyten

Aufnahme von 1mM [³H]-Lysin [10 μM Ci/ml] nach 24 h Co-Expression (A) Konzentrationsabhängigkeit: Oozyten wurden mit 20 ng/Oozyte hCAT-2A- cRNA und 24h später mit der jeweilig aufgeführten Konzentration der Cdc42V12-cRNA injiziert und nach weiteren 24 h die Transportaktivität gemessen. (100 % = 2,03 ± 0,31, N = 13 - 24) (B) Zeitabhängigkeit: Oozyten wurden mit 20 ng/Oozyte hCAT-2A-cRNA und 24, 42, oder 45h später mit 5 ng Cdc42V12-cRNA injiziert, sodass der Transport-Assay mit 1 mM Lysin [10 μM Ci/ml] aller Oozyten zeitgleich bei 48h erfolgen konnte. (100 % = 1,67 ± 0,19, N = 17 - 36). Statistische Analysen erfolgten mittels One-Way ANOVA-Varianztest gefolgt von einem Bonferroni Post-Test, verglichen jeweils mit der Kontrolle ohne Cdc42. Signifikanzen: p>0,0001:****, (C) und (D) jeweils die Skizze des Versuchsaufbaus.

Eine Reduktion der Transportaktivität wurde bereits bei der kleinsten eingesetzten Menge (5 ng) Cdc42V12-cRNA erreicht. Nur 36 ± 6 % der normalen Aktivität waren unter diesen Bedingungen messbar. Zusätzlich konnte nach 3 Stunden bereits eine Reduktion der Transportaktivität auf 48 ± 7% beobachtet werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der von Cdc42V12 verursachte Effekt schnell und bei geringen cRNA Mengen eintritt (Abbildung 8).

4.1.6 Reduktion der Zelloberflächenexpression des hCAT-2A nach Überexpression von Cdc42V12

Eine PKC-Aktivierung führt zur Verminderung der Oberflächenexpression von CAT-Proteinen in der Plasmamembran (Rotmann, 2004; Rotmann et al., 2006). Nachfolgend wurde am Beispiel von hCAT-2A untersucht, ob die Co-Expression der konstitutiv aktiven Cdc42-Mutante ebenfalls eine Reduktion der Zelloberflächenexpression des Transporters zur Folge hat. Dazu wurden die Oberflächenproteine der hCAT-2A-überexprimierenden Oozyten mit und ohne Cdc42V12 Co-Expression (3h und 24h) mit Biotin markiert und mithilfe von Avidin-Kügelchen von den anderen Proteinen getrennt. Diese Fraktionen wurden mittels Western-Blot auf ihre hCAT-2-Proteinmengen untersucht, wobei festgestellt wurde, dass bereits 3h nach Co-Expression von Cdc42V12 die Oberflächenexpression von hCAT-2A mit 46 ± 8 % erheblich reduziert und nach 24 h mit nur noch 17 ± 7 % kaum nachweisbar war (Abbildung 9C). Auch die Gefrierschnitte der Oozyten, die ein Fusionsprotein des hCAT-2A mit dem grün fluoreszierendem Protein EGFP exprimierten, zeigten, dass sich hCAT-2A Proteine nach 24-stündiger Co-Expression des Cdc42V12 vermehrt im Zellinneren und weniger in der Plasmamembran wiederfanden (Abbildung 9 B). Genau wie die aktivierte PKC, scheint Cdc42 die subzelluläre Lokalisation der CATs in Richtung von intrazellulären Kompartimenten zu verändern (siehe Einleitung, Abbildung 3).

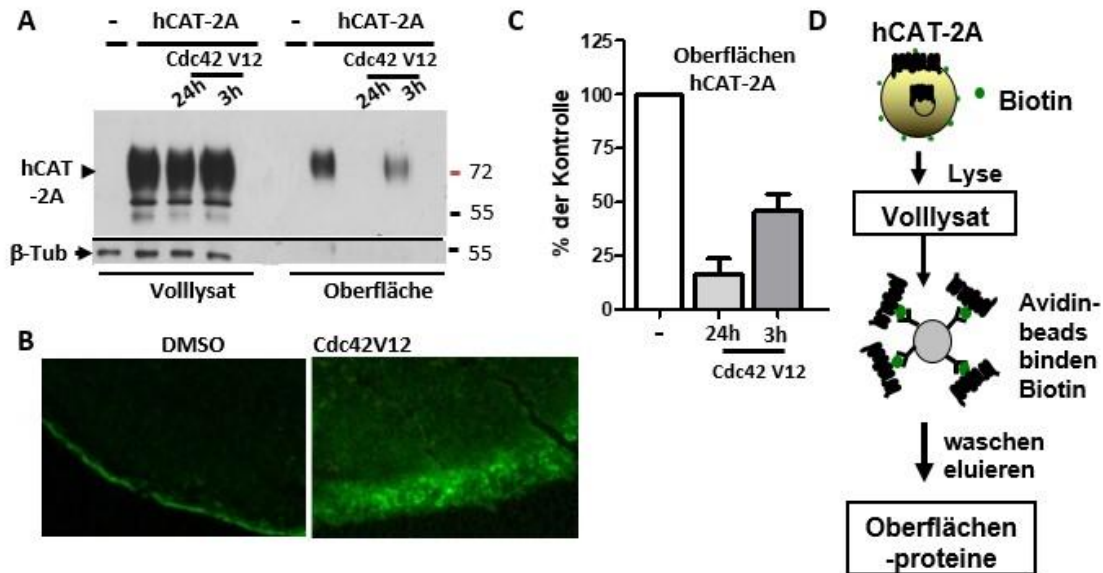


Abbildung 9. Reduktion der Oberflächenexpression von hCAT-2A nach Cdc42V12 Co-Expression in *X. laevis* Oozyten

(A) Dargestellt ist ein repräsentativer Western-Blot des hCAT-2A Proteins aus Transporter-exprimierenden und Kontroll-Oozyten aus *Xenopus laevis*. Gezeigt sind Gesamt- (linke Seite) und Zelloberflächenexpression (rechte Seite) von hCAT-2A mit und ohne 24h oder 3h-stündiger Cdc42V12-Co-Expression (5 ng). Probenaufbereitung: Voll-Lysate (Menge entsprach 0,5 Oozyten; linke Seite) und mit Biotin gekoppelte und mithilfe Avidin-beschichteter Kügelchen aufgereinigte Oberflächenproteine (Menge entsprach 7,5 Oozyten; rechte Seite), wurden über eine SDS-PAGE (Trenngel 7,5% SDS-Gel) aufgetrennt. Dieses wurde auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und zur Überprüfung der hCAT-2A-Proteinmenge mit einem hCAT-2A-Antikörper (1:100 in Blotto) behandelt. β -Tubulin (unten links) diente als Ladekontrolle (1:5000, monoclonal, Sigma Aldrich) und als Kontrolle des erfolgreichen Entfernens der intrazellulären Proteine (unten rechts). (B) Gefrierschnitte: Nach Injektion von 20 ng cRNA eines hCAT-EGFP-Fusionsproteins und eintägiger Inkubation in Kulturmedium, wurden die Oozyten ohne (links) oder mit 5 ng Cdc42V12 (rechts) für weitere 24 h inkubiert. Anschließend wurden Gefrierschnitte der Oozyten hergestellt und unter dem Fluoreszenzmikroskop abgelichtet. Dargestellt sind repräsentative Oozytenschnitte mit einer Dicke von 12 μ m. (C) Quantitative Auswertung von zwei Western-Blots. Die Intensitäten der Zelloberflächenexpression bei Cdc42V12-Co-Expression wurde in Bezug gesetzt zu jeweiligen Bandenintensität ohne Cdc42V12-Co-Expression. (D) Skizze der Isolation von an der Zelloberfläche lokalisierten Proteine.

Die Experimente (Abbildung 9) zeigen, dass die Wirkung von konstitutiv aktiven Cdc42V12 - ähnlich wie eine PKC-Aktivierung - die Zelloberflächenexpression der hCATs reduziert und dabei die Gesamtprotein-Expression unverändert bleibt.

4.1.7 Einfluss der Co-Expression der dominant negativen Mutanten Cdc42N17 und RacN17 auf den hCAT-2A-vermittelten Arginintransport

Die verringerte Internalisierung des Aminosäuretransporters hCAT-2A nach Cdc42V12 Überexpression, ähnelt der nach PKC-Aktivierung. Dies war ein weiterer Hinweis darauf, dass Cdc42 an der Regulation der Transportaktivität nach PKC-Aktivierung beteiligt sein könnte. Um die Rolle von Cdc42V12 in dieser Aktivierungs-Kaskade zu ermitteln, wurde eine PMA-Stimulation in hCAT-2A-exprimierenden Oozyten durchgeführt, in denen entweder die konstitutiv aktive

Mutante Cdc42V12 oder die dominant negative Mutante Cdc42N17 co-exprimiert wurde (Abbildung 10). Im Vergleich zu Experimenten von Stenger (2012), wurden statt 30 ng cRNA der jeweiligen Mutante nur 5 ng/Oozyte verwendet. Nach der Überexpression der jeweiligen Mutante, erfolgte die PKC-Aktivierung bzw. alleinige Inkubation mit dem Lösungsmittel DMSO (Kontrolle). Übereinstimmend mit vorherigen Experimenten resultierte die Co-Expression von Cdc42V12 in einer Reduktion des hCAT-2A-vermittelten Aminosäure-Transports auf ca. 40 %. Eine zusätzliche PKC-Aktivierung durch PMA ergab eine signifikant additive Wirkung zu Cdc42V12 (16 % \pm 4 % Restaktivität). Durch die Co-Expression von dominant negativen Mutante Cdc42N17 wurde der hemmende Effekt der PKC-Aktivierung auf den hCAT-2A-vermittelten Transport nicht aufgehoben. Gleichfalls veränderte die Co-Expression von Cdc42N17 die Transportaktivität von hCAT-2A nicht (103 % \pm 11%). Die Aktivierung von PKC konnte gleichfalls nicht aufgehoben werden. Die Ergebnisse stimmen, trotz stark verringerter cRNA-Mengen mit Stenger (2012) überein. Western-Blot-Analysen zeigen, dass beide Cdc42-Mutanten in den Oozyten etwa gleich stark exprimiert waren (Abbildung 10 C).

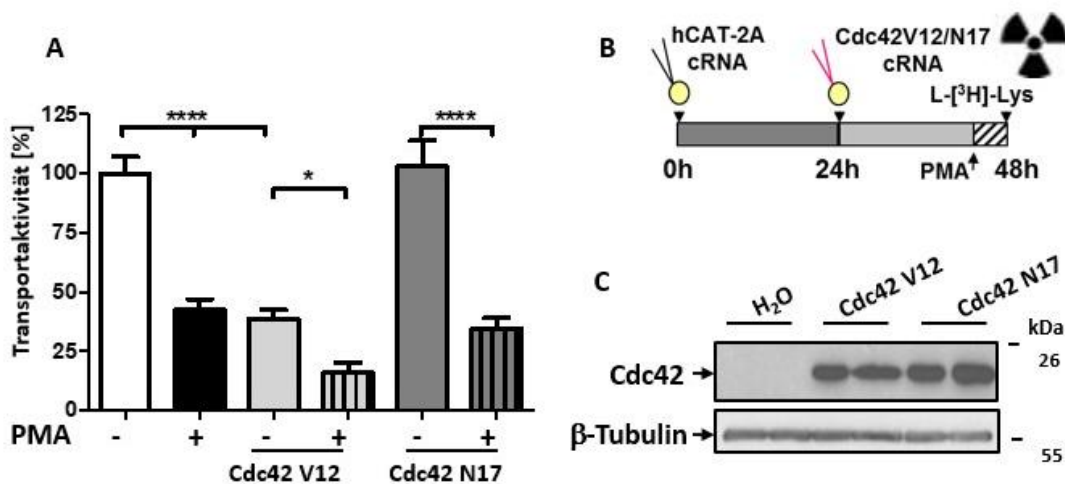


Abbildung 10. Hemmung der Transportaktivität von hCAT-2A nach PKC-Aktivierung und -Co-Expression von aktiver und dominant negativer Cdc42 Mutante

(A) Aufnahme von 1 mM Arginin [10 μ Ci/ml] in hCAT-2A-exprimierende Oozyten. Oozyten wurden mit 20 ng hCAT-2A cRNA injiziert und nach 23,5 h mit 5 ng Cdc42V12 oder Cdc42N17-kodierender cRNA ein zweites Mal injiziert. Vor Durchführung des Transport-Assays, wurde die Oozyten zu gleichen Teilen entweder mit 0,1% DMSO oder 100 nM PMA in 0,1% DMSO für 30 min inkubiert. Kontrolle: Mittelwerte der ohne Rho-GTPase hCAT-2A-exprimierenden und mit 0,1% DMSO behandelten Oozyten. (100 % = 1,15 \pm 0,08, N = 11 - 13). Statistische Analysen erfolgten mittels One-Way ANOVA-Varianztest gefolgt von einem Bonferroni Post-Test. Folgende Werte wurden verglichen: Kontrolle (-) vs. + PMA-Behandlung, - vs. Cdc42V12/-, Cdc42V12/- vs. Cdc42V12/+PMA, - vs. Cdc42N17/-, Cdc42N17/+ PMA. Signifikanzen: $p > 0,0001$:****, $p > 0,05$: *, nicht signifikante Veränderungen sind nicht gekennzeichnet. (B) Skizze des Versuchsaufbaus. (C) Proteinmengen der Cdc42 Mutanten in Oozyten nach 24 h Expression. Oozyten wurden mit 5 ng der jeweiligen Cdc42 Mutanten cRNA injiziert, nach 24 h lysiert und

im Western-Blot analysiert. 50 µg Protein/Tasche. Antikörper anti-Cdc42 (1:1000) nach Protokoll. Als Kontrolle wurde die Menge an b-Tubulin (1:2000, Monoklonaler Antikörper, Sigma Aldrich) verwendet.

Die Experimente mit den *C. difficile*-Toxinen (TcdB 10463 und TcdB 1470) ließen vermuten, dass die Inhibierung von Rac1 und/oder Cdc42 ausreichend ist, um die PKC-induzierte Transporthemmung aufzuheben (Abbildung 4). Zudem hemmen beide Rho-Proteine in ihrer konstitutiv aktiven Form die CAT-Aktivität (Abbildung 5). Das Ausbleiben der Aufhebung des PKC-Effekts durch die dominant negative Cdc42-Mutante N17 legt die Hypothese nahe, dass sowohl Cdc42 als auch Rac1, beides Rho-GTPasen, den PKC-Effekt vermitteln können. Zur Prüfung dieser Hypothese wurden die dominant negativen Mutanten Cdc42N17 und Rac1N17 einzeln und in Kombination mit hCAT-2A co-exprimiert (Abbildung 11) Wie im vorherigen Versuch ergab die Co-Expression von hCAT-2A mit Cdc42N17 eine tendenzielle, statistisch, aber nicht signifikante höhere Transportaktivität, die durch PMA mindestens im gleichen Maße gehemmt wurde, wie die der nur hCAT-2A-exprimierenden Oozyten. Dagegen war die hCAT-2A-Aktivität in Cdc42N17-co-exprimierenden Oozyten per se tendenziell erniedrigt und nach PMA-Inkubation etwas höher als in den Kontrollen. Bei Co-Expression beider dominant negativen Rho-Mutanten war die Tendenz der erniedrigten hCAT-2A-Aktivität noch ausgeprägter, während die Werte nach PMA-Stimulation etwa gleich waren wie in den Kontrollen ohne Co-Expression von Rho-GTPasen. Daraus ergab sich ein leicht abgeschwächter, aber nicht mehr signifikanter PMA-Effekt, der aber vor allem auf einer reduzierten Aktivität ohne PMA beruhte.

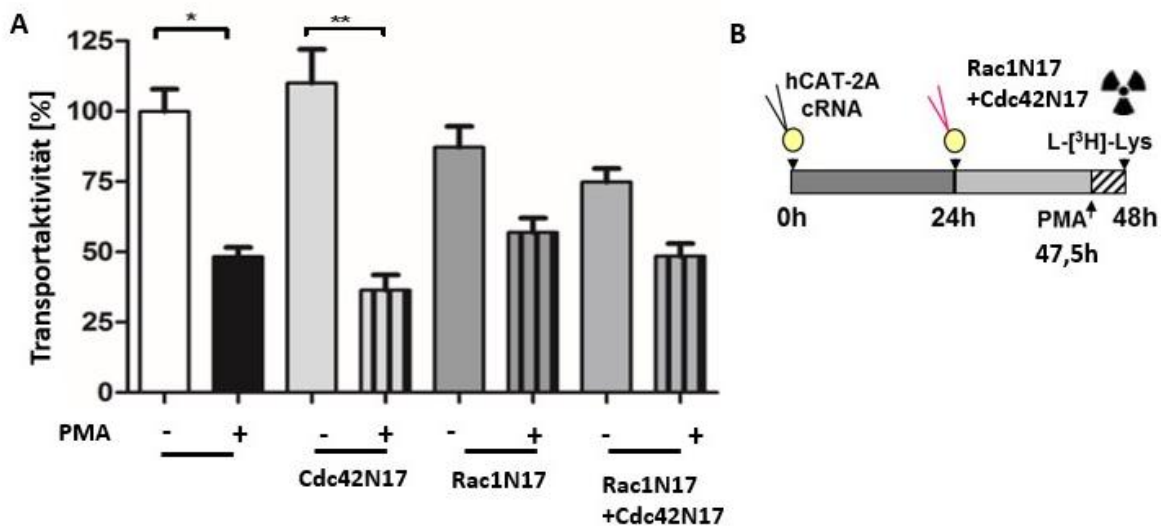


Abbildung 11. PMA-Effekt auf die Transportaktivität von hCAT-2A nach Co-Expression der dominant negativen Cdc42 N17, Rac1N17 Mutanten oder beider Rho-Mutanten

(A) 24h nach der Injektion von 20 ng hCAT-2A cRNA wurden Oozyten ein zweites Mal mit 5 ng cRNA injiziert, die für die dominant negative Rho-Mutante Cdc42N17 oder Rac1N17 kodiert, oder mit je 5 ng beider cRNAs. 24h später wurde jeweils die Hälfte der Oozyten 30 Minuten entweder mit 0,1% DMSO oder 100 nM PMA in 0,1% DMSO inkubiert. Die Mittelwerte von nicht mit Rho-GTPase injizierten und in 0,1% DMSO inkubierten Oozyten, stellten die Kontrolle dar, auf die die anderen Werte bezogen wurden. (100 % Wert $1,711 \pm 0,180$, N = 9 - 28). (B) Skizze des Versuchsaufbaus. Statistische Analysen erfolgten mittels One-Way ANOVA-Varianztest gefolgt von einem Bonferroni Post-Test. Folgende Säulen wurden miteinander verglichen: Kontrolle (-) vs. +PMA, - vs. Jeweilige Rho-GTPase/-, jeweilige Rho-GTPase /- vs. Rho-GTPase /+ PMA. Signifikanzen: $p > 0,0001$: ****, $p > 0,05$: *, nicht signifikante Veränderungen sind nicht gekennzeichnet.

Die Funktionalität der Mutanten in Oozyten konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht überprüft werden. Jedoch konnte die Publikation von Ruchhoeft et al. (1999) zeigen, dass diese u.a. humanen Konstrukte im *Xenopus laevis*-Zellsystem funktionieren, sodass wir davon ausgehen können, dass diese den PKC-vermittelten Effekt nicht inhibieren.

4.1.8 Toxine TcdB 1470 und TcdB 10463 heben die Reduktion des hCAT-2A-vermittelten Transportes durch Cdc42V12 auf

Der Einsatz der *Clostridium difficile* Toxine TcdB 10463 und TcdB 1470 wurde gewählt, um die Beteiligung der Rho-GTPase Cdc42 an der Regulation des Aminosäuretransports durch hCAT-2A zu überprüfen.

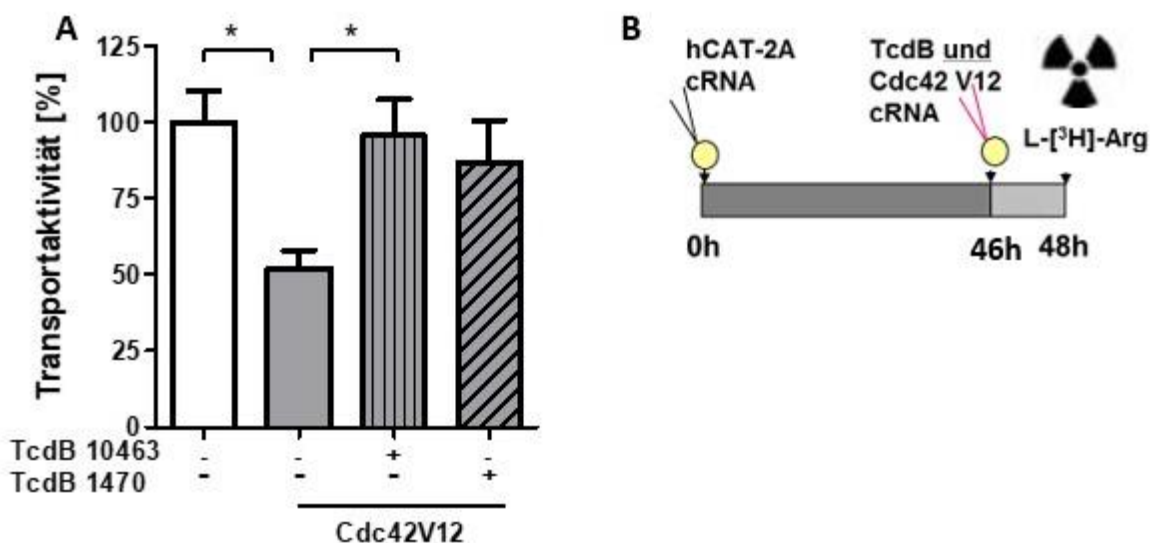


Abbildung 12. Cdc42V12-Wirkung auf die Transportaktivität des hCAT-2A nach Hemmung der Rho-GTPasen-Aktivität mit TcdB

(A) Aufnahme von 1 mM Arginin [5 μ Ci/ml] in Oozyten, die hCAT-2A 48h exprimiert hatten und 2h vor dem Transportassay mit Cdc42V12-cRNA und wo vermerkt mit TcdB 10463 oder TcdB 1470 (200ng/Oozyte) injiziert

worden waren. (100 % = $0,74 \pm 0,14$, gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM, N = 19 - 26). Die Mittelwerte der ohne Rho-GTPase oder Toxinen injizierten Oozyten, stellen die Kontrolle dar, auf die alle Werte bezogen wurden. Statistische Analysen erfolgten mittels One-Way ANOVA-Varianztest gefolgt von einem Bonferroni Post-Test. Verglichen wurden folgende Mittelwerte miteinander: Kontrolle (-) vs. Cdc42V12, - vs. TcdB 10463/-, - vs. TcdB 1470/- . Cdc42V12 vs. TcdB 10463/+, Cdc42V12 vs. TcdB 1470/+. Signifikanzen: $p > 0,05$: *, nicht signifikante Veränderungen sind nicht gekennzeichnet. (B) Skizze des Versuchsaufbaus.

Die Behandlung der *X. laevis*-Oozyten mit den genannten Toxinen führte tatsächlich zu einer Aufhebung der Cdc42V12-induzierten Reduktion des hCAT-2A-vermittelten Transports. Somit konnte gezeigt werden, dass sowohl PKC als auch Rho-GTPasen Cdc42 in einem gemeinsamen Toxin-sensitiven Weg münden. Welcher Weg das sein kann, bleibt bislang unklar (Abbildung 12).

4.1.9 Der PKC-Inhibitor BIM II hebt nur den PKC-Effekt auf, nicht den von Cdc42V12

Als Gegenprobe wurde der PKC-Inhibitor BIM II eingesetzt. Hier gilt es zu zeigen, dass Cdc42 nicht oberhalb der PKC in der Kaskade liegt. Erwartungsgemäß hob dieser Effekt die PKC-vermittelte Hemmung der hCAT-2A-Aktivität auf. Auf die Hemmung durch die konstitutiv aktive Rho-GTPase Cdc42V12 hatte er dagegen keinen Einfluss (Abbildung 13).

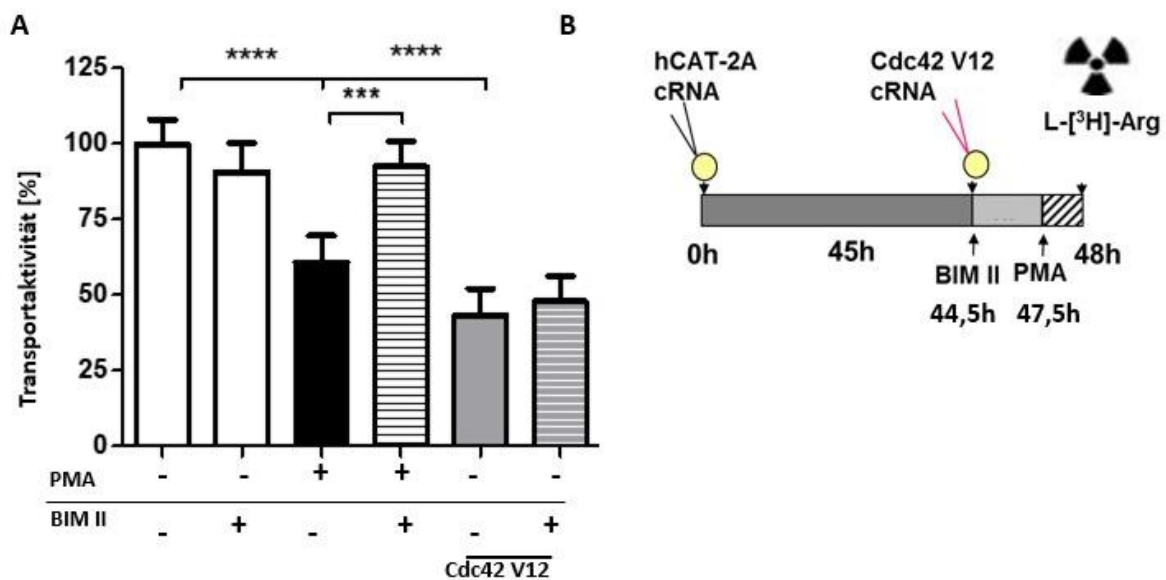


Abbildung 13. PKC- und Cdc42V12-Effekt auf hCAT-2A in Gegenwart des PKC-Inhibitors BIM II

(A) Aufnahme von 1 mM Arginin [5 μ Ci/ml] in hCAT-2A exprimierender Oozyten. Ein Teil der mit 20 ng cRNA injizierte Oozyten wurden nach 44,5 h ein zweites Mal mit Cdc42V12-cRNA (5 ng) injiziert und gleichzeitig die Hälfte der Oozyten in jedem Versuchsansatz in Aufnahmepuffer mit 1 μ M BIM II Lösung inkubiert. Drei Stunden später wurde ein Teil der Oozyten, die nicht mit Cdc42 injiziert worden waren, für 30 Minuten mit 100 nM PMA behandelt. (100 % = $2,300 \pm 0,180$, gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM, N = 17 - 21). Statistische Analysen erfolgten mittels One-Way ANOVA-Varianztest gefolgt von einem Bonferroni Post-Test. Folgende Werte wurden miteinander verglichen: Kontrolle (-) vs. +PMA, - vs. +BIM II /-, +BIM II /- vs. BIM II /+PMA, - vs. Cdc42V12/-, Cdc42V12/-

vs. Cdc42V12 /+BIM II. Signifikanzen: $p > 0,0001$:****, $p > 0,001$: ***; nicht signifikante Veränderungen sind nicht gekennzeichnet. (B) Skizze des Versuchsaufbaus

Die Überexpression der Rho-GTPase Cdc42 hemmt in ihrer aktiven Form den Arginintransport durch hCAT-2A, ähnlich der Regulation durch PKC-Aktivierung. Der Zusatz von BIM II-Inhibitor senkte die Transportleistung leicht, um ca. 10 %. Die Zugabe von PMA reduziert die Transportleistung deutlich (auf ca. 60 %). Die Kombination aus PMA und BIM II die Wirkung von PMA wieder auf. Die Überexpression von Cdc42V12 inhibiert den hCAT-2A deutlich.

4.2 Experimente in humanen Zellen

Obwohl sich die Expression humaner kationischer Aminosäuretransporter in *Xenopus laevis*-Oozyten sehr gut zur Untersuchung von Transportvorgängen eignet, ist das System in Bezug auf die Erforschung von Signalkaskaden, die die subzelluläre Lokalisation der Transporter regulieren, nur eingeschränkt einsetzbar. Die Amphibienzellen sind schon alleine in ihrer Morphologie sehr unterschiedlich zu humanen Zellen. Zudem kann nicht davon ausgegangen werden, dass in beiden Spezies die gleichen Signalproteine vorhanden sind, bzw. dass die Amphibienproteine in gleicher Weise mit den humanen Transportern interagieren, wie dies die humanen Orthologe tun. Humane Zellen bieten außerdem den Vorteil, dass hier einzelne Proteine mithilfe von etablierten siRNAs gezielt ausgeschaltet werden können. Damit steht ein wichtiges Werkzeug zur Identifikation von Proteinkomponenten in der Signalkaskade zur Verfügung. Allerdings führt eine Überexpression von CAT-Proteinen in Säugerzellen nur zu einer sehr moderaten Steigerung der Transportraten in den betreffenden Zellen. Aufgrund ihrer geringen Größe stellt sich in Säugerzellen außerdem sehr schnell ein Equilibrium zwischen transportierten Substraten innerhalb und außerhalb der Zelle ein. Dies erfordert sehr schnelle Versuchsabläufe.

4.2.1 Vergleich der endogenen Cdc42 in verschiedenen humanen Zelllinien

Zunächst wurden unterschiedliche humane Zelllinien auf ihre endogene Cdc42-Expression hin untersucht. Zellen der humanen Endothelzelllinie EA.hy 926 wiesen den höchsten Proteingehalt an Cdc42 auf. In der in der Arbeitsgruppe bereits vorhandenen U373 hCAT-2A EGFP-Zelllinie konnte ebenfalls eine deutliche Cdc42-Bande auf dem SDS-Gel nachgewiesen werden (Abbildung 14) Die U373-hCAT-2A-EGFP-Zelllinie eignete sich daher gut für Transportexperimente. Die Zelllinie NT-2, welche hCAT-3 endogen exprimiert, zeigt kaum endogene Expression. Da in *X. laevis* Oozyten der Cdc42V12 Effekt auf den hCAT-3 am größten war, war es naheliegend dies analog in den humane Zelllinie zu untersuchen.

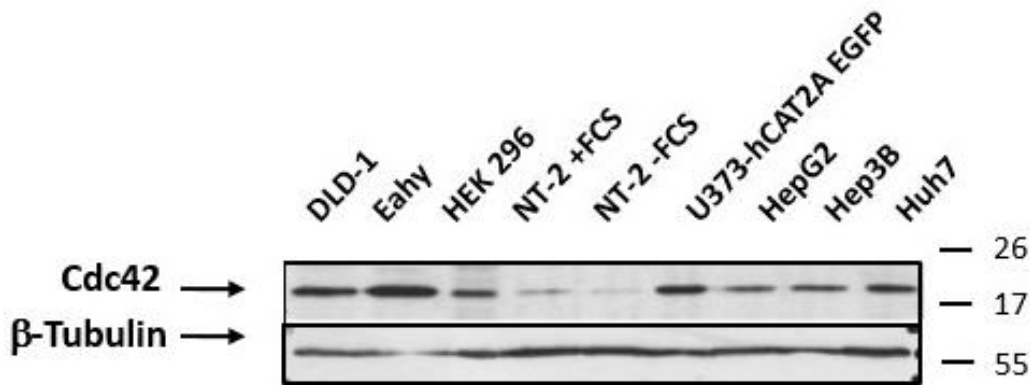


Abbildung 14. Endogenes Cdc42 in verschiedenen humanen Säugerzelllinien

Gezeigt ist ein Western-Blot mit verschiedenen humanen Zelllinien, die nach Protokoll kultiviert und anschließend lysiert wurden. 50 µg Protein/Tasche wurden auf ein 12,5 %-igen SDS-Gels aufgetragen und nach Elektrophorese auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Das Cdc42 Protein wurde anschließend mit dem anti-Cdc42 (1:1000) Antikörper nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde die Menge an β -Tubulin (1:2000) bestimmt.

4.2.2 Suche nach geeigneter humanen Zelllinie

Die Fokussierung auf hCAT-2A in den Transporter-Assays mit *Xenopus laevis*-Oozyten sollte beibehalten werden. Daher ist die Identifizierung von Zelllinien, die hCAT-2A endogen und in ausreichenden Mengen exprimieren, von entscheidender Bedeutung. Idealerweise sollte die Untersuchung der Rho-GTPase-abhängigen Transportmodulation in humanen Zellen erfolgen, die sowohl Cdc42 als auch hCAT-2A endogen exprimieren, um mögliche Artefakte durch Proteinüberexpression zu vermeiden. Dennoch bleibt die Überexpression von Proteinen ein etabliertes und nützliches Werkzeug, insbesondere im Hinblick auf die Möglichkeit der EGFP-Markierung, die zusätzliche Detektionsmöglichkeiten eröffnet.

4.2.3 Vergleich der hCAT-2A-Expression in verschiedenen humanen Leberzelllinien

hCAT-2A wird endogen vor allem in der Leber exprimiert (Paulusma et al., 2022). Gängige humanen Leberzelllinien wurden auf ihren Proteingehalt des hCAT-2A hin untersucht. Der ermittelte Gehalt an endogener Expression der hCAT-2A Isoform war allerdings in keiner der getesteten Leberzelllinien ausreichend.

Die Proteinexpression wurde über eine Western-Blot-Analyse ermittelt. Der eingesetzte primäre Antikörper kann nicht zwischen den Spleißvarianten hCAT-2A und -2B differenzieren. Zusätzlich wurde die RNA-Expression per quantitativer RT/PCR untersucht, da die Differenzierung zwischen den beiden Isoformen hier möglich war (Abbildung 15). In den beiden potenziell geeigneten Zelllinien (HepG2 und Huh7), die ausreichend Cdc42 exprimierten (Abbildung 14),

war die Isoform hCAT-2B und nicht die Isoform hCAT-2A in ausreichender Menge vorhanden (Abbildung 15 B). Aus diesem Grund wurden alle nachfolgenden Experimente mit U373-Zellen durchgeführt, die stabil das hCAT-2A-EGFP-Fusionsplasmid exprimierten. Dies ermöglichte, wie zuvor dargelegt, eine sensitivere Detektion von Veränderungen in der subzellulären Lokalisation durch Biotinylierung oder mikroskopische Analysen.

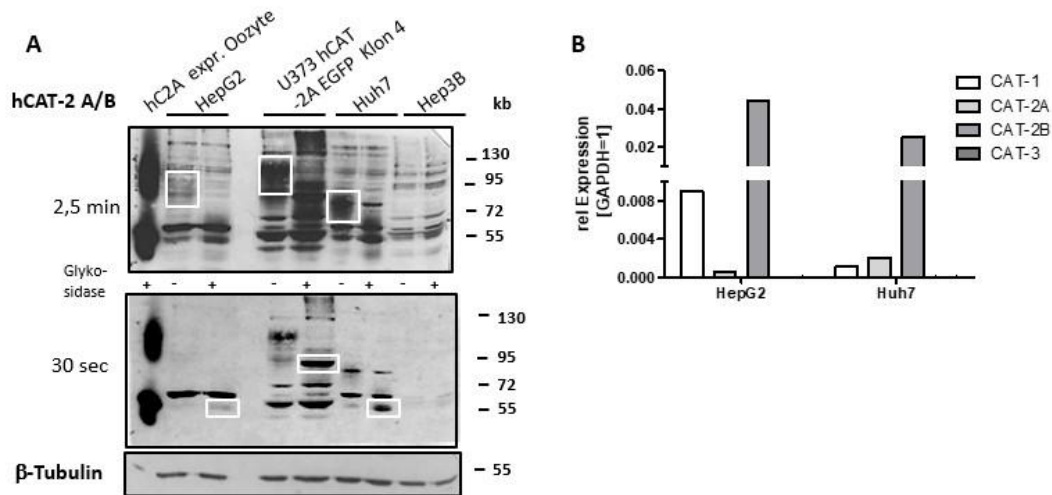


Abbildung 15. Vergleich der Proteinexpression von hCAT-2 und der mRNA-Expression aller hCAT-Isoformen in verschiedenen Zelllinien

(A) 50 μ g Protein aus dem Lysat der Leberkarzinom-Zelllinien HepG2, Huh7, Hep3B und der stabil transfizierte Zelllinie U373 hCAT-2A EGFP Klon4 wurden im Western-Blot (10 %-iges SDS-Gel) analysiert. Die Lysate wurden entweder unbehandelt belassen (-) oder mit N-Glykosidase behandelt (+) und mit dem hCAT-2 AK (1:100 in Blotto) AG () detektiert. Als Ladekontrolle wurde die Menge an β -Tubulin (1:2000) bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentativer Western-Blot. (B) qRT-PCR-Analyse der mRNA aller vier hCAT Isoformen, isoliert aus den HepG2 und Huh7 Zelllinien (durchgeführt von) Gezeigt ist die relative Expression der verschiedenen hCAT-Isoformen, bezogen auf die Expression der GAPDH-mRNA. Nach den RT-PCR Reaktionen wurde zur Normalisierung der Daten der CT-Wert des Haushaltsgens (GAPDH) von dem des entsprechenden Transporters subtrahiert (Δ CT). Die relative Expression wurde anschließend anhand der Formel $2^{-1 \times \Delta \Delta \text{CT}}$ berechnet, sodass die Expression der GAPDH als 1 definiert ist. (N = 1). Die Methodenbeschreibung ist der Dissertation von zu entnehmen (Jaenecke, 2012; Kapitel 2.2.7).

Die vorhandene U373 hCAT-2A EGFP-Zelllinie zeigte zwar eine ausreichende Gesamtproteinmenge an hCAT-2AE GFP, dennoch neigen solche stabil transfizierten Zelllinien mit längerer Kultivierungszeit sich zu verändern, sodass die Verteilung der Transporter nicht mehr optimal ist. Vor allem der Anteil des Transporters, der sich in der Plasmamembran befindet, nimmt über die Zeit ab. Deshalb war es notwendig eine neue stabil transfizierte hCAT-2A EGFP-Zelllinie zu generieren. Da die humane Glioblastom-Zelllinie U373 MG sich bereits für hCAT-1 und

-3 als geeignet erwiesen hat (Rotmann, 2004; Rotmann et al., 2006), wurde diese Zelllinie erneut für die Experimente im Rahmen der vorliegenden Arbeit ausgewählt.

4.2.4 Generierung einer U373-Zelllinie, die ein Fusionsprotein aus hCAT-2A und dem grün fluoreszierenden Protein EGFP-stabil exprimiert

In Zusammenarbeit mit [Name] wurde eine die humane U373-Zelllinie generiert, die stabil ein Fusionsprotein zwischen hCAT-2A und dem grün fluoreszierenden Protein EGFP exprimiert (Beyer, 2013).

Das zur Transfektion notwendige Plasmid (hCAT2A.pEGFP-N1) war in der Arbeitsgruppe bereits vorhanden, sodass direkt mit Transfektionsexperimenten begonnen werden konnte. Nach Selektion der bestmöglichen Klone mittels Mikroskopie, wurden fünf Klone in Transportversuchen mit Tritium-markiertem Arginin verglichen (Abbildung 15). Die Laser-Scanning-Mikroskopaufnahmen (LSM) zeigten die Lokalisation des hCAT-2A EGFP in der Plasmamembran, aber auch intrazellulär in den Membranen von Vesikeln. Leider war die Intensität des Fluoreszenz-Signals im Vergleich zu U373 EGFP-Kontroll-Zelllinie bzw. der U373 hCAT-1 EGFP (Klon 3)-Zelllinie mäßig bis schwach. Die fünf Klone unterscheiden sich in ihren Transportraten für Arginin nur unwesentlich voneinander (Abbildung 16). Im Vergleich zu den U373 EGFP-Kontrollzellen waren die Arginintransportraten etwa doppelt so hoch (Abbildung 17).

[Name] generierte ebenso eine stabile U373 hCAT-2A EGFP-Zelllinie. Ein Klon (JP) wurde zum Vergleich mit in die Reihe durchgeführter Experimente aufgenommen (Abbildung 17). Es zeigte sich, dass dieser Klon vergleichbare Transportraten aufwies wie Klon #4, der für die nachfolgenden Experimente für am besten geeignet befunden wurde.

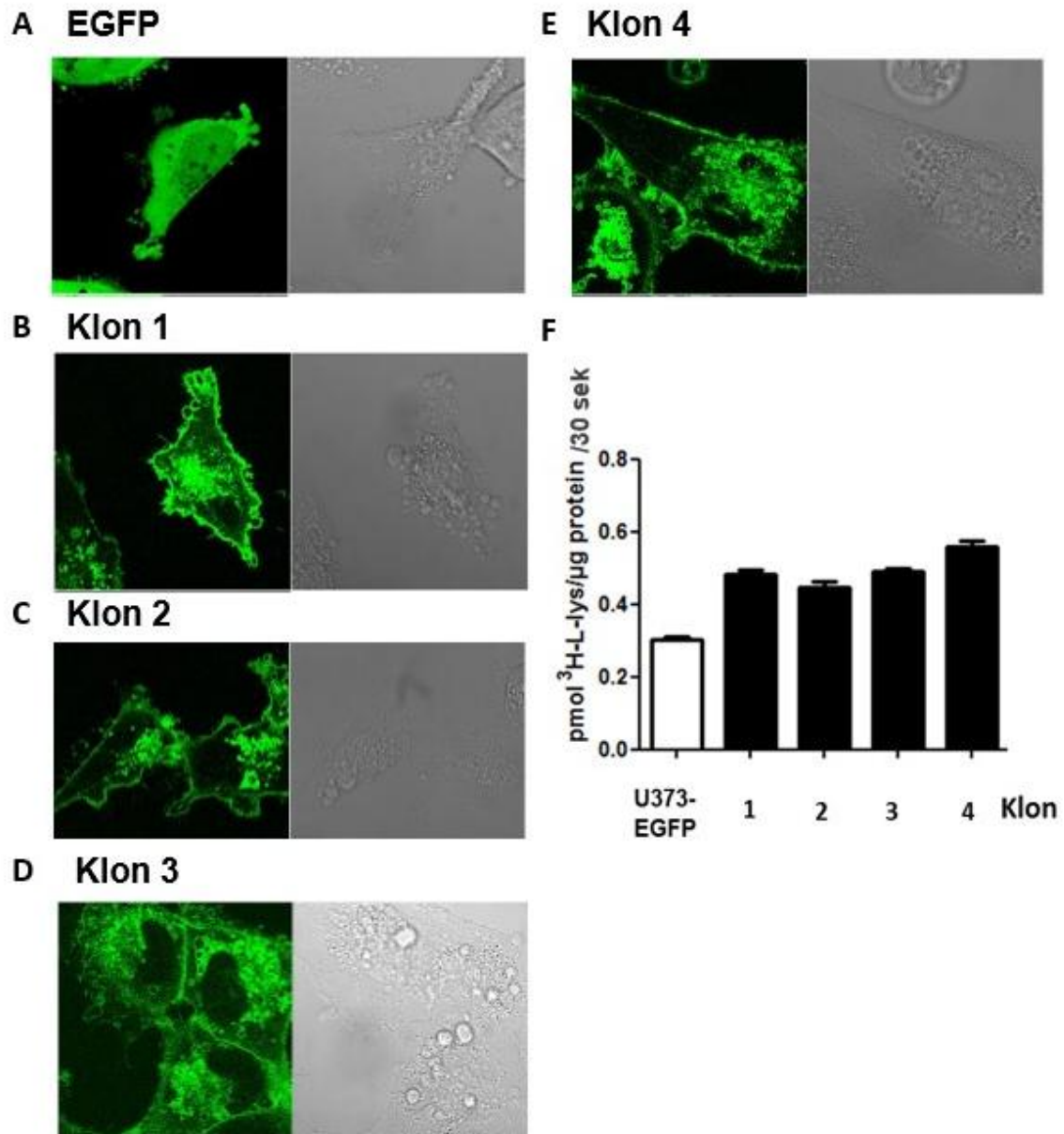


Abbildung 16. Vergleich der vier Klone 1 - 4 der generierten Zelllinie U373 hCAT-2A EGFP

Lokalisation des hCAT-2A EGFP in stabil exprimierenden U373 hCAT-2A EGFP-Zellen (transfiziert mit dem Plasmid hCAT2A.pEGFP-N1) mithilfe eines Laser-Scanning Mikroskops lebend fotografiert (durchgeführt von Dennis Strand) (A) Kontrollzelllinie U373 EGFP Klon 6. (B - E): U373 hCAT-2A EGFP Klon 1 - 4. (F): Arginin-Aufnahme der in A-E gezeigten Zellen. Gemessen wurden initiale Transportraten mit [³H]L-Arginin [10µCi/ml] im linearen Bereich. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM (N = 4).

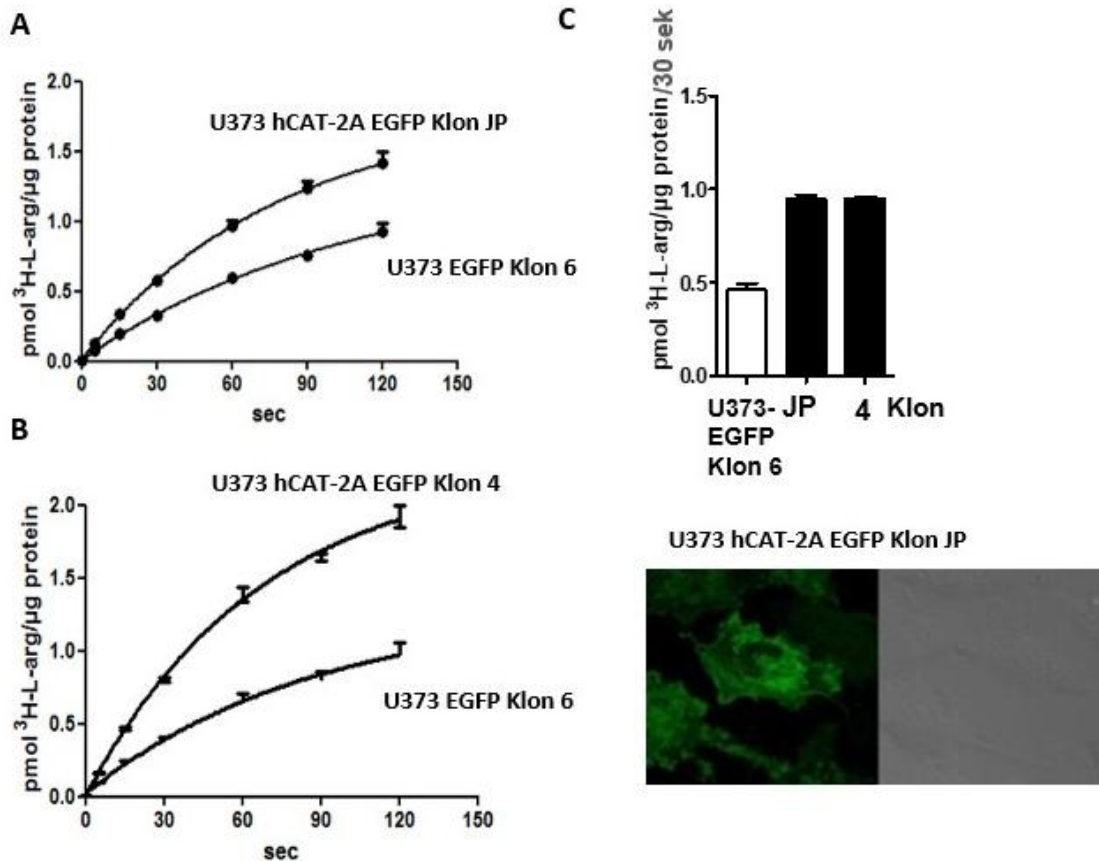


Abbildung 17. Vergleich des Transportverhaltens der Klone 4 und JP der U373 hCAT-2A EGFP-Zellen

(A und B) Dargestellt sind zeitliche Verläufe der $[^3\text{H}]\text{L-Arginin}$ -Aufnahme der U373 hCAT-2A EGFP- Klone 4 und JP im Vergleich zur Kontrollzelllinie, die nur EGFP exprimiert. Zeitkurve von Klon 4. B: Zeitkurve von Klon JP, (C) Direkter Vergleich des initialen Transportes der Klone JP und 4 im linearen Bereich bei 30 Sekunden (D) Lokalisation des hCAT-2A EGFP (hCAT2A.pEGFP-N1) des Klon JP mit Hilfe eines Laser-Scanning Mikroskops lebend fotografiert (durchgeführt von Dennis Strand).

Der Zeitverlauf der Klone 4 und JP im Vergleich zur Kontrollzelllinie U373 EGFP Klon6 (jeweils untere Kurve) ist in Abbildung 17 A (Klon JP) und B (Klon4) dargestellt.

4.2.5 Experimente mit U373-Zelllinien, die ein Fusionsprotein aus hCAT-2A und grün fluoreszierendem Protein EGFP stabil exprimieren

Auswirkungen einer PKC-Aktivierung auf den hCAT-2A-vermittelten Transport

Bei dieser experimentellen Reihe sollte überprüft werden, wie U373 hCAT-2A EGFP-Zellen auf die Aktivierung der PKC mit PMA reagieren. In diesem Zellsystem, zeigte hCAT-2A ein ähnliches Verhalten wie in *Xenopus* Oozyten. Es wurden verschiedene Klone der Zelllinie U373 hCAT-2A EGFP für die Experimente verwendet. Die einzelnen Klone der stabil transfizierten Zelllinie sind jeweils durch Nummerierung gekennzeichnet.

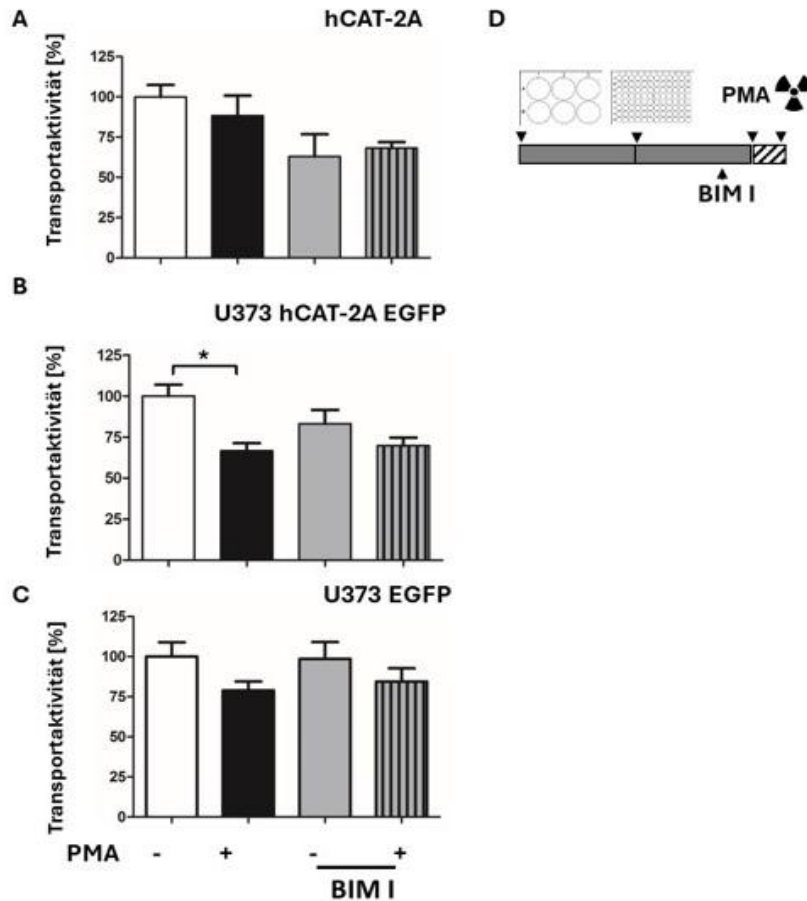


Abbildung 18. Auswirkungen einer PKC-Aktivierung auf den hCAT-2A-vermittelten Transport in mit hCAT-2A-EGFP stabil transfizierten U373-Zellen

Aufnahme von 1 mM Arginin [5 μ Ci/ml] in hCAT-2A-EGFP U373-Zellen nach PMA-Behandlung (100nM) mit und ohne den PKC-Inhibitor BIM I (1 μ M), wie jeweils gekennzeichnet. (A) hCAT-2A-Nettotransport: jeweilige Transportrate in U373 hCAT-2A EGFP-Zellen minus Transportrate in U373-EGFP-Zellen, jeweils bezogen auf den Proteingehalt der Lysate (B) Transportrate der U373 hCAT-2A EGFP-Zellen (Klon 4) (C) Transport der Kontrollzelllinie U373 EGFP (Klon 6). (Gesamttransport: 100 % = $1,139 \pm 0,105$; N = 12 - 23, Kontrollzelllinie: 100 % = $0,580 \pm 0,052$, gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM, N = 11 - 12, Netto-Transport errechnet sich aus der Differenz). Statistische Analysen erfolgten mittels One-Way ANOVA-Varianztest gefolgt von einem Bonferroni Post-Test. Verglichen miteinander wurden: - vs. + PMA, - gegen BIM I, BIM I gegen PMA. Signifikanzen: $p > 0,05$: *, nicht signifikante Veränderungen sind nicht extra gekennzeichnet. (D) Skizze des Versuchsaufbaus

Die Inhibierung der Transportaktivität nach PKC-Aktivierung mit PMA lag in den U373 hCAT-2A-Zellen in der Regel bei etwa 30 % (Abbildung 18 B) und war im Vergleich zur Kontrolle (0,1 % DMSO) signifikant. Nach Vorbehandlung mit dem PKC-Inhibitor BIM I war kein signifikanter Unterschied zwischen PMA-behandelten und unbehandelten Zellen mehr zu beobachten. Dieses Ergebnis ermöglicht die weitere Verwendung dieses Zellsystem für Experimente zur Untersuchung der Signalkaskade der kationischen Aminosäuretransporter.

Der Effekt von PMA war im Vergleich zu den Transportversuchen in *Xenopus*-Oozyten weniger deutlich ausgeprägt (Inhibierung auf $67 \% \pm 4,6$). In der Kontrollzelllinie U373 EGFP (Klon 6; in allen Experimenten verwendet) kam es tendenziell zu einer Verringerung der Arginin-Transportraten durch PMA-Behandlung, die durch BIM I-Behandlung aufgehoben wurde. Diese Effekte waren allerdings nicht signifikant (Abbildung 18 C). Die eindeutige Bestimmung des hCAT-2A-vermittelten Nettotransports erwies sich in diesem Zellsystem als komplex, da die Transportraten in den hCAT-2A-überexprimierenden Zellen lediglich etwa doppelt so hoch waren wie in den Kontrollzellen. Damit führen schon sehr geringe experimentelle Abweichungen zu großen Differenzen, insbesondere weil der lineare Bereich, in dem Transportraten bestimmt werden können sehr klein ist, d.h. das Zeitintervall zur Messung sehr kurz sein muss. Zwar wurde versucht, den endogenen Transport durch in diesen Zellen ebenfalls exprimierte y^+ LAT-Isoformen mit 2 mM Leucin zu inhibieren, da aber für hCAT-2A auch eine hohe Argininkonzentration (1 mM) verwendet werden musste, war die Inhibition mit großer Wahrscheinlichkeit nicht vollständig.

Die ermittelte Differenz zwischen Gesamttransport aus U373 hCAT-2A-EGFP-Zellen und den Kontrollzellen U373 EGFP ist in Abbildung 18A gezeigt. Der PMA-vermittelte Effekt ist hier kaum mehr vorhanden, während BIM I alleine den hCAT-2A vermittelten Transport um ca. 50 % zu reduzieren scheint. PMA hatte in Kombination mit BIM I keinen Effekt mehr.

Veränderung der Aktinstrukturen nach PMA-Behandlung

Wie bereits in der Literatur beschrieben, führt die Aktivierung der PKC durch PMA zu einer Veränderung des Zytoskeletts (Sakamoto et al., 1994). Dieses Phänomen sollte in U373-Zellen überprüft werden. Dazu wurden die U373hCAT-2A EGFP-Zellen für 30 min bei 37°C mit PMA behandelt, anschließend fixiert und gefärbt. Das Aktingerüst wurde mit Phalloidin-TexasRed sichtbar gemacht. Während bei den unbehandelten U373hCAT-2A EGFP-Zellen eine gleichmäßige Verteilung der grünen Fluoreszenz in der Plasmamembran erkennbar ist, erscheint dies nach PMA-Behandlung (19 B) in Clustern (Lamellipodien) aufzutreten. Gleichzeitig ist die Überlagerung der Aktinstrukturen (Phalloidin-Rot) und der EGFP-Markierung heller zu erkennen (orange Überlagerung, jeweils linke Seite). Die Lamellopodienstrukturen deuten auf die Beteiligung von Rho-GTPasen hin, vor allem Cdc42/Rac1 (Abbildung 19 B, unten; Nobes and Hall, 1995).

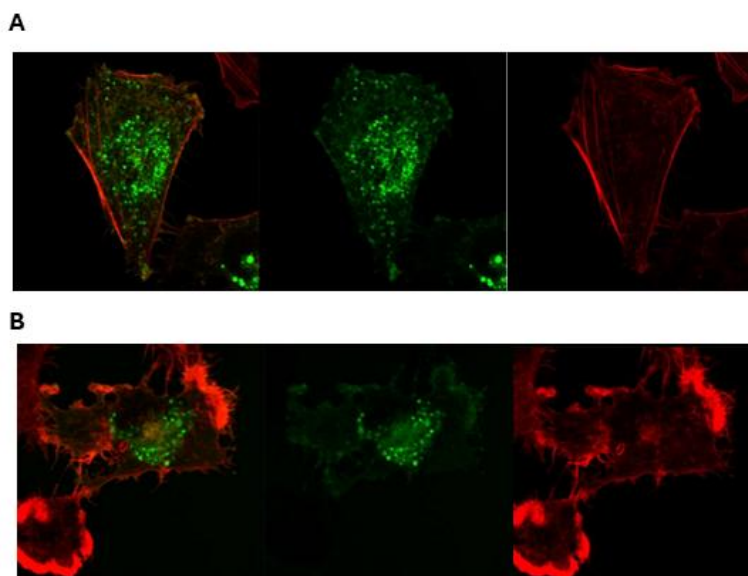


Abbildung 19. Veränderte Aktinstrukturen nach PMA-Behandlung

U373 hCAT-2A EGFP-Zellen wurden nach Protokoll kultiviert und fixiert. Die Färbung von Aktin erfolgte mit Phalloidin-TexasRed (200 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) in PBS gelöst (30 Minuten). Glasplättchen wurden nach dem Waschen auf dem Objektträger fixiert. Aufnahmen nach Rotanregung erfolgten am Leitz DMR (Leica, Wetzlar) 40 x Objektiv. (A) unbehandelte U373 hCAT-2A EGFP-Zellen (Klon 4) (B) die gleichen Zellen nach 30 Minuten PMA Behandlung.

Verwendung von Toxinen B

Als wesentliche Erkenntnis aus den Oozyten-Experimenten wurde die mögliche Beteiligung von Cdc42 und Rac1 an der Regulation der Transportaktivität durch PKC herausgearbeitet. Aufbauend auf diesen Ergebnissen, sollte das Verhalten von hCAT-2A in Interaktion mit den Toxinen TcdB 10463 und TcdB 1470 sowie der PKC-Aktivierung im U373 hCAT-2A-EGFP-Zellsystem zu analysiert werden. Zu diesem Zweck wurden die Zellen auf einer 96-Loch-Platte ausgesät und über Nacht inkubiert. Am Versuchstag wurden die Zellen zweimal mit Aufnahme-puffer (Lockslösung mit 1 mM Arginin) gewaschen und anschließend mit oder ohne Toxine (100 ng/ml) für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Toxin-haltige Lösung wurde vorsichtig entfernt und durch PMA-haltige Lockslösung mit oder ohne Toxine ersetzt. Nach weiteren 30 Minuten Inkubation bei 37 °C wurde die Lösung entfernt und durch ^3H -Arginin-haltige Lockslösung ersetzt. Nach 30 Sekunden wurde die Platte ausgeklopft und dreimal in eiskalter Lockslösung gewaschen, bevor die Zellen mit 0,5 M NaOH-Lösung versetzt wurde, um die Zell-Lyse zu initiieren. Nach Neutralisation der NaOH mit 0,5 M HCl und gleicher Menge Lockslösung konnte ein Teil des Zelllysats auf dessen Proteingehalt und die Menge an ^3H -Arginin überprüft werden. Die Abbildungen zeigen den bereinigten hCAT-2A Netto-Transport (jeweils A), der

sich aus der Differenz des Gesamttransports (jeweils B) und des Transports der Kontrollzelllinie (jeweils C) ergibt. Alle drei Abbildungen zusammen ergaben ein Gesamtbild, da sich die Kontrollzellen je nach Behandlung unterschiedlich verhielten. Dies könnte auf die Beteiligung weiterer Arginin-Transporter hinweisen, die unterschiedlich auf PMA- und Toxin-Behandlung reagieren.

Das unterschiedliche Verhalten der beiden Zelllinien zeigte sich besonders deutlich in Experimenten unter Verwendung der *Clostridium difficile* Toxine. Die Herunterregulation der Transportaktivität von hCAT-2A nach PKC-Aktivierung und Hemmung der Rho-GTPasen durch Toxine wurde unterschiedlich beeinflusst. Bei Hemmung aller drei Rho-GTPasen (TcdB 10463) kam es zu einem Anstieg der Transportaktivität von hCAT-2A um fast 50 % nach Korrektur des Transportes der Kontrollzellen. Der PMA-Effekt war jedoch weiterhin vorhanden. Die Kontrollzellen zeigten dieses Verhalten bei keinem der beiden Toxine. Allerdings war der PMA-Effekt beim Gesamttransport (Abbildung 20 B) weniger ausgeprägt. Die Hemmung von Rac1 und Cdc42 zeigte den erwarteten Effekt: Die Reduktion des Transportes nach PMA-Einwirkung war gehemmt, was im Einklang mit den Ergebnissen aus dem *Xenopus*-Expressionssystem steht. Dieses Ergebnis zeigte, dass die Rho-GTPasen je nach Kombination unterschiedlichen Einfluss auf die Transportaktivität haben (Abbildung 20). Die Überprüfung der Oberflächenexpression (Abbildung 20 E) zeigte jedoch, dass die kurzzeitige Hemmung aller drei Rho-GTPasen durch TcdB 10463 zu einer niedrigeren Oberflächenexpression von hCAT-2A führte (obere Linie), was auf den reduzierten Gesamtproteingehalt zurückzuführen ist (untere Linie, nach β -Tubulin). Die kurzzeitige Hemmung vor allem von Rac1 durch TcdB 1470 (Genth et al., 2014) führte dazu, dass die Oberflächenexpression anstieg, obwohl die Gesamtproteinmenge und die Transportraten von hCAT-2A unverändert blieben.

Im Folgeschritt galt es den Einfluss einzelner Rho-GTPasen im Zellsystem besser zu verstehen.

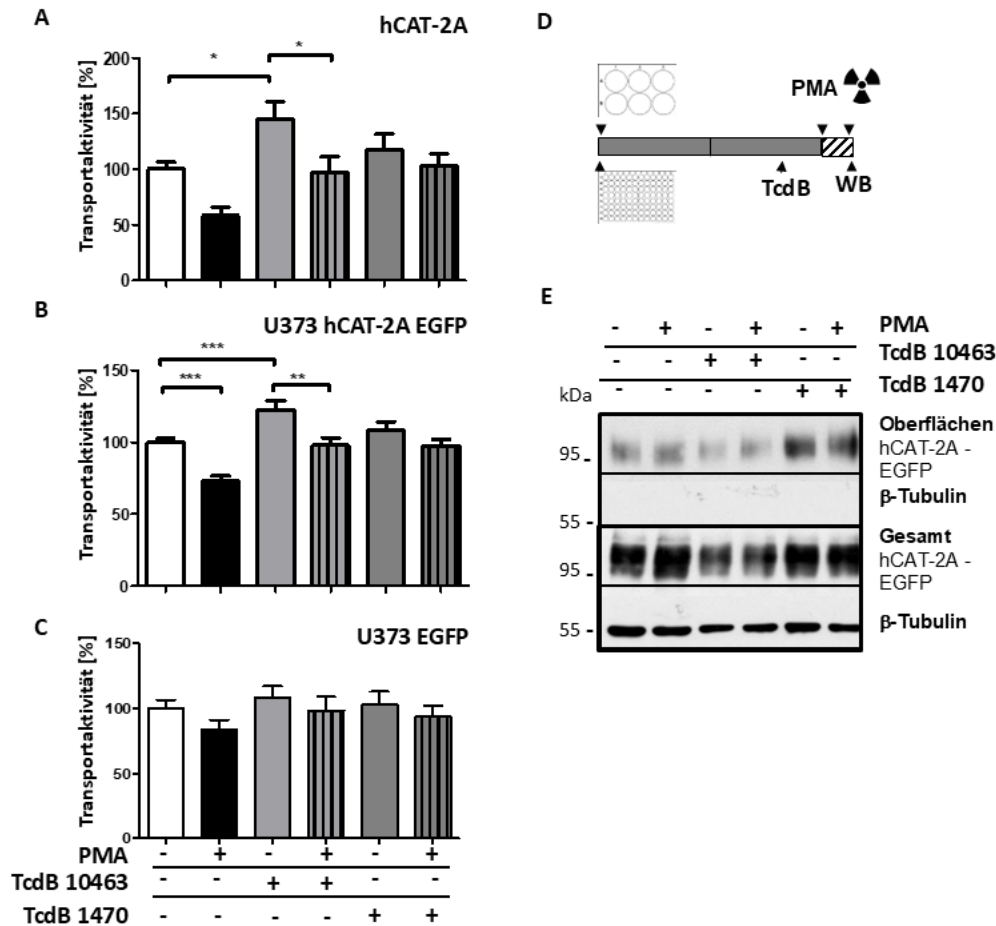


Abbildung 20. Auswirkung der TcdB 10463 und 1470 auf das Transportverhalten des hCAT-2A

Aufnahme von 1 mM Arginin [5 μ Ci/ml] in U373 hCAT-2A-EGFP- und U373 EGFP-Zellen - ohne und mit TcdB-Behandlung und anschließender PMA-Stimulation. Dazu wurden die U373 hCAT-2A EGFP-Zellen (Klon JP) auf eine 96-Well Platte in die obere Hälfte ausgesät, die unteren vier Reihen wurde die Kontrollzelllinie U373 EGFP (Klon 6) mitgeführt und identisch behandelt, sodass im Transport-Assay alle 8 Wells zeitgleich behandelt werden konnten. Parallel dazu wurde ein identischer Ansatz in eine 6 Well-Platte ausgesät, mit dem Ziel die Oberflächenexpression nach Biotinylierung zu untersuchen. Die kultivierten Zellen der 96-Well Platte wurden am Folgetag entweder mit TcdB Toxinen behandelt oder unbehandelt belassen und 1h später entweder nur mit 0,1 % DMSO oder mit 100 nM PMA (30 min) behandelt. Nach Waschen und Zugabe von [3 H]-L-Arginin und einer 30 Sekunden-Inkubation, wurden die Zellen erneut sorgfältig gewaschen und dann mit 200 μ l Lysepuffer aufgeschlossen. 100 μ l wurden für die Messung der Radioaktivität entnommen, 50 μ l für die Bestimmung der Proteinkonzentration genutzt. (A) Netto-Transport durch hCAT-2A errechnet aus der Differenz (B) U373 hCAT-2A EGFP-Zellen (C) U373 EGFP-Zellen (Gesamttransport: 100 % = $0,859 \pm 0,048$ N = 15 - 16, Kontrollzelllinie: 100 % = $0,459 \pm 0,032$, gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM, N = 11 - 12, Netto-Transport errechnet sich aus der Differenz). Statistische Analysen erfolgten mittels One-Way ANOVA-Varianztest gefolgt von einem Bonferroni Post-Test. Vergleichen wurden - vs. + PMA, - vs. TcdB 10463/-, - vs. TcdB 1470/-, TcdB 10463/- vs. TcdB 10463/+, TcdB 1470 /- vs. TcdB 1470 /+. Signifikanzen: $p > 0,001$: ***; $p > 0,01$: **; $p > 0,05$: *, nicht signifikante Veränderungen sind nicht extra gekennzeichnet. (D) Skizze des Versuchsaufbaus. (E) Oberflächenexpression des hCAT-2A EGFP. In 24-Well Platten wurden die U373 hCAT-2A EGFP-Zellen ebenfalls bis zur Konfluenz kultiviert und nach dem Waschen wie oben beschrieben behandelt. Nach der Behandlung wurden Proteine an der Zelloberfläche biotinyliert und nach der Lyse für die Western-Blot-Analyse vorbereitet. Voll-Lysate (je 30 μ g Protein als Volllysat aufgetragen; obere Reihe) und Oberflächenproteine, die mithilfe von Avidin-beschichteten Kügelchen aufgereinigt worden waren (je 150 μ g Protein eingesetzt; rechte Seite), über eine SDS-PAGE (Trenngel 10 % Acrylamid) aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Fusionsproteine wurden mit Hilfe eines anti-GFP Antikörpers (1:2000, BD Living colors) detektiert (oberes Bild). Der Nachweis von β -Tubulin diente als Ladekontrolle

(1:2000, Sigma Aldrich, unten) und als Kontrolle des erfolgreichen Entfernens der intrazellulären Proteine (zweite Reihe). Gezeigt ist ein repräsentativer Western-Blot.

Ausschalten der Rho-GTPasen Cdc42 und Rac1 unter Verwendung von siRNA

Kurzzeitige Hemmung von Rho-GTPasen mit Toxinen konnte zeigen, dass die Rho-GTPasen Cdc42, Rac1 und RhoA den hCAT-2A-vermittelten Transport tatsächlich beeinflussten (Abbildung 20). Zur Klärung des Effekts jeder einzelnen Rho-GTPase kamen siRNAs zum Einsatz, mit deren Hilfe spezifisch jeweils die Expression einer bestimmten Rho-GTPase ausgeschaltet wurde.

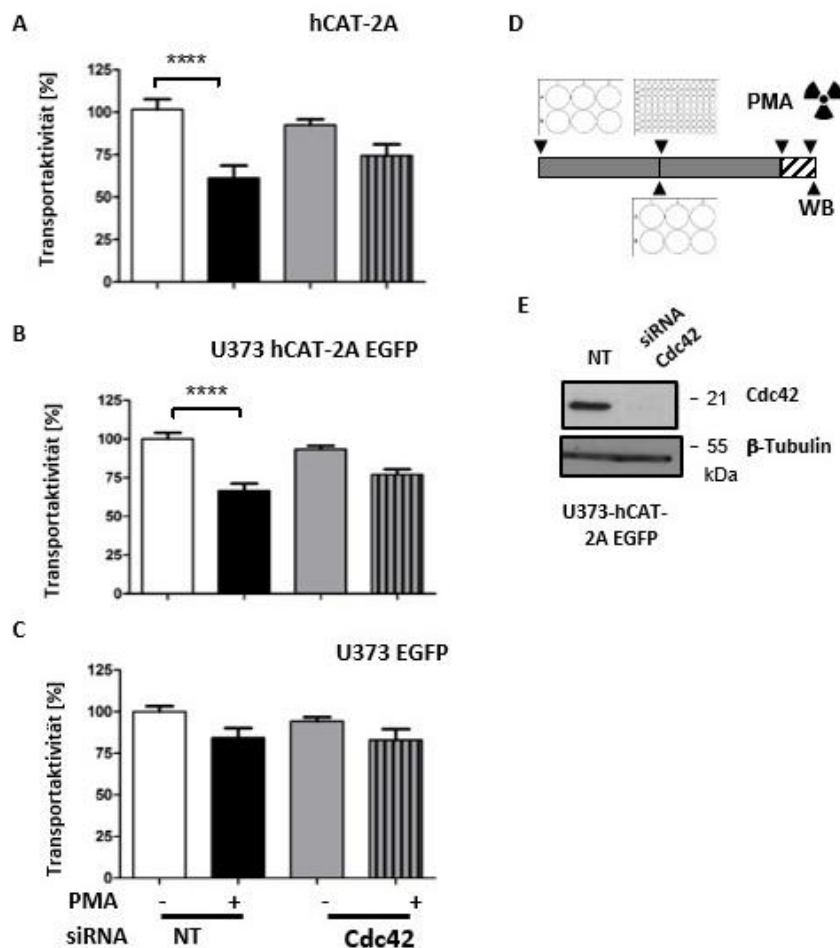


Abbildung 21. Herunterregulation von Cdc42 mit siRNA

(A-C) Aufnahme von 1 mM Arginin [10 µci/ml] ohne und mit einer Herunterregulation der Proteinmengen an Cdc42 (15 nM) mit siRNA (Sigma-Aldrich). Dazu wurden die U373 hCAT-2A EGFP-Zellen (Klon JP) auf eine 6-well Platte ausgesät und nach Anwachsen im serum-freien Medium mit 15nM/Well siRNA (die gegen das Cdc42 gerichtet, oder Kontroll-siRNA) transfiziert. Nach zwei Tagen Inkubation wurden Zellen in die oberen vier Reihen einer 96-Well Platte ausgesät und so für den Transport-Assay vorbereitet. In die unteren vier Reihen wurde die Kontrollzelllinie U373 EGFP (Klon 6) mitgeführt. Ein Teil der mit siRNA transferzierten Zellen wurde zusätzlich zur Kultivierung in eine weitere 6 Well-Platte ausgesät, um damit im Anschluss die erfolgreiche Transfektion zu belegen. Die bis zur Konfluenz kultivierten Zellen einer 96-Well Platte wurden am nächsten Tag pro Reihe entweder

mit DMSO alleine (Kontrolle) oder zusammen mit PMA behandelt und im Transport-Assay analysiert. (A) Netto-Transport durch hCAT-2A errechnet aus der Differenz (B) U373 hCAT-2A EGFP-Zellen (C) U373 EGFP- Zellen. (Gesamttransport: 100 % = $1,644 \pm 0,070$ N = 8 - 12, Kontrollzelllinie: 100 % = $0,600 \pm 0,026$, gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM, N = 8 - 12, Netto-Transport errechnet sich aus der Differenz). Statistische Analysen erfolgten mittels One-Way ANOVA-Varianztest gefolgt von einem Bonferroni Post-Test. Vergleichen wurden DMSO vs. PMA, DMSO vs. Signifikanzen: $p > 0,0001$:****, nicht signifikante Veränderungen sind nicht extra gekennzeichnet. (D) Skizze des Versuchsaufbaus. (E) repräsentativer Western-Blot mit über erfolgreiche Herunterregulation der beiden Proteine (50 μ g/Tasche, anti-Cdc42 (1:1000) von CellSignaling, β -Tubulin 1:2000, Sigma-Aldrich, 12,5 % SDS-Gel).

Mittels spezifischer siRNA wurden Cdc42 oder Rac1 ausgeschaltet, um deren Beteiligung an der PKC-Kaskade zu untersuchen. Drei Tage nach der Transfektion der siRNA war die Expression von Cdc42 und Rac1 stark reduziert, wie in Abbildung 21 (E) und 22 (E) gezeigt. Unter den gleichen Bedingungen wurden auch Transportexperimente durchgeführt, mit dem Ergebnis, dass die Herunterregulation des Cdc42 und des Rac1 mit siRNA die Wirkung von PKC auf die Transportaktivität des hCAT-2A verhindert.

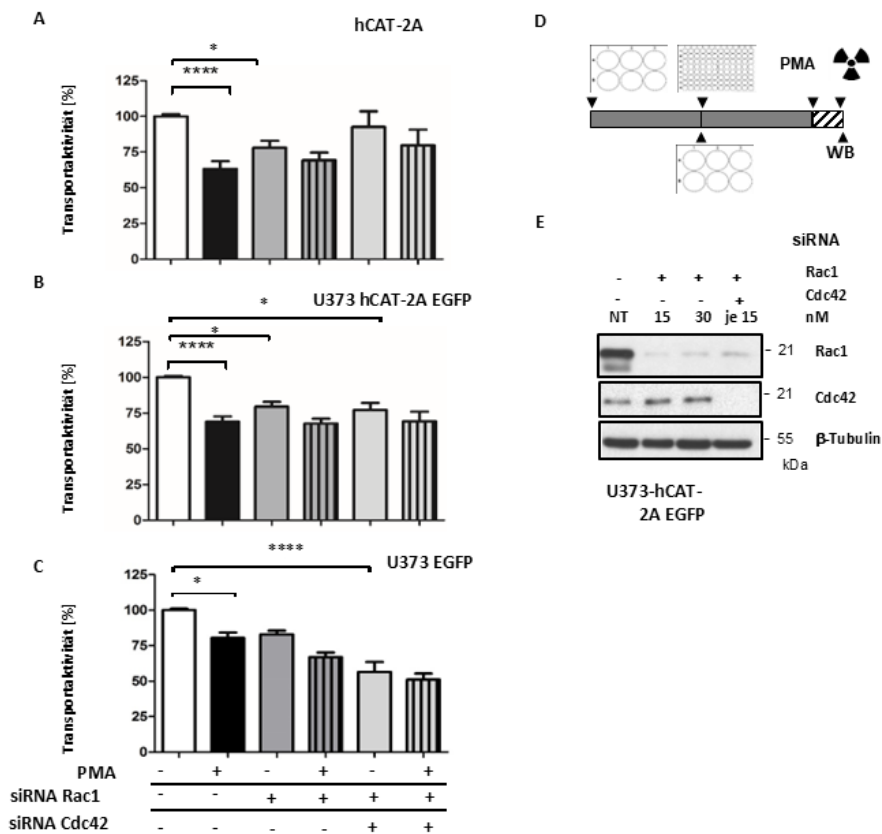


Abbildung 22. Herunterregulation von Rac1 und Cdc42 mit siRNA

(A-C) Aufnahme von 1 mM Arginin [5 μ Ci/ml] ohne und mit einer Herunterregulation der Proteinmengen an Cdc42 (15 nM) und Rac1 (15 nM) mit siRNA (Sigma-Aldrich). Dazu wurden die U373 hCAT-2A EGFP-Zellen (Klon JP) auf eine 6-well Platte ausgesät und nach Anwachsen im Serum-freien Medium mit jeweils 15 nM/Well siRNA

transfiziert. Nach zwei Tagen Inkubation wurden Zellen in Vorbereitung auf den Transport-Assay in die oberen vier Reihen einer 96-Well Platte ausgesät. In die unteren vier Reihen wurde die Kontrollzelllinie U373 EGFP (Klon 6) mitgeführt. Zum erfolgreichen Nachweis der Transfektion wurde ein Teil der Zellen mit siRNA transfiziert (6 Well-Platte). Die bis zur Konfluenz kultivierten Zellen einer 96-Well Platte wurden am Folgetag pro Reihe entweder mit DMSO als Kontrolle oder zusammen mit PMA behandelt und im Transport-Assay vermessen. (A) Netto-Transport durch hCAT-2A errechnet aus der Differenz (B) U373 hCAT-2A EGFP-Zellen (C) U373 EGFP- Zellen. (Gesamttransport: 100 % = $1,100 \pm 0,020$ N = 8 - 12, Kontrollzelllinie: 100 % = $0,399 \pm 0,007$, gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM, N = 8 - 12, Netto-Transport errechnet sich aus der Differenz). Statistische Analysen erfolgten mittels One-Way ANOVA-Varianztest gefolgt von einem Bonferroni Post-Test. Vergleichen wurden - vs. +PMA, - vs. siRac1/-, - vs. siRac1/Cdc42/-, siRac1/- vs. siRac1/+PMA, siRac1/Cdc42 /- vs. SiRac1/Cdc42 /+PMA. Signifikanzen: $p > 0,0001$:****, $p > 0,001$: ***, $p > 0,01$: **, $p > 0,05$: *, nicht signifikante Veränderungen sind nicht extra gekennzeichnet. (D) Skizze des Versuchsaufbaus. (E) repräsentativer Western-Blot über erfolgreiche Herunterregulation der beiden Proteine (50 μ g/Tasche, anti-Rac AK (1:1000) von Millipore, anti-Cdc42 (1:1000) von CellSignaling und β -Tubulin 1:2000, 12,5 % SDS-Gel).

Die Herunterregulation von Cdc42 allein ($93 \% \pm 3 \%$) zeigte ohne PKC-Aktivierung keinen signifikanten Effekt auf den Transport von hCAT-2A (Abbildung 21). Der PMA-Effekt war signifikant, jedoch zeigte sich eine tendenzielle Verminderung des Transports (auf $74 \% \pm 7 \%$).

Diese Ergebnisse verweisen auf die Beteiligung weiterer Akteure. In der Folge wurden Experimente aufgesetzt, die den Fokus auf Rac1 legten, wobei Rac1 allein und zusätzlich auch zusammen mit Cdc42 herunterreguliert wurde.

Die Inaktivierung von Rac1 reduzierte den hCAT-2A-vermittelten Transport signifikant auf $78 \% \pm 5 \%$. Eine zusätzliche PMA-Behandlung führte zu einer tendenziellen, aber statistisch nicht signifikanten weiteren Abnahme der Transportrate um etwa 10 %. Die kombinierte Inaktivierung beider Rho-GTPasen kompensierte die durch Rac1-Inaktivierung allein verursachte Reduktion ($92 \% \pm 11 \%$). Der PMA-Effekt war hier mit $80 \% \pm 11 \%$ nicht signifikant (Abbildung 22). Die Darstellung der Oberflächenexpression mit den herunterregulierten Rac1 Protein über Biotinylierungsversuche, konnte im Rahmen der Dissertation nicht erfolgreich umgesetzt werden. Auch Fluoreszenzbilder waren aufgrund eines schwachen GFP-Signals wenig aussagekräftig.

Ausschalten der Rho-GTPase RhoA durch Verwendung von siRNA

Im Gegensatz zum Toxin TcdB 1470 stimulierte das Toxin TcdB 10463 den hCAT-2A-vermittelten Transport in U373-Zellen und zeigte keine Aufhebung des PKC-Effekts (Abbildung 20). Da der Unterschied in der Wirkung der beiden Toxine auf Rho-GTPasen in der zusätzlichen Hemmung von RhoA besteht (Genth et al., 2014), wurde die Hypothese aufgestellt, dass auch RhoA eine Rolle in der Signalkaskade spielt, die sich von der von Cdc42/Rac1 unterscheidet.

Im nachfolgenden Experiment wurde eine zu RhoA passende siRNA verwendet, so dass nach drei Tagen Inkubation RhoA in U373 hCAT-2A EGFP-Zellen sehr stark herunterreguliert war (Abbildung 23 E). Transportexperimente zeigten überraschenderweise, dass ohne RhoA die Transportaktivität *per se* auf ein ähnliches Niveau fällt (ca. 75 %), wie dies bei Stimulation mit PMA der Fall ist. Eine zusätzliche Behandlung mit PMA führte zu keiner weiteren Verminderung des Arginintransports (Abbildung 22). Die Quantifizierung der Oberflächenexpression des hCAT-2A zeigte (Abbildung 24), dass die langfristige Hemmung von RhoA zu einer deutlichen Verringerung des Transportereinbaus in die Membran führt, was die verringerte Transportrate für Arginin erklären kann. Dies steht im Gegensatz zu den Experimenten mit *Clostridium difficile* Toxinen (Abbildung 20). Letztere erfolgten über eine Dauer von nur 1,5 Stunden, während durch die siRNA-vermittelte Herunterregulation von RhoA dieser Signalweg wahrscheinlich über Tage ausgeschaltet wurde.

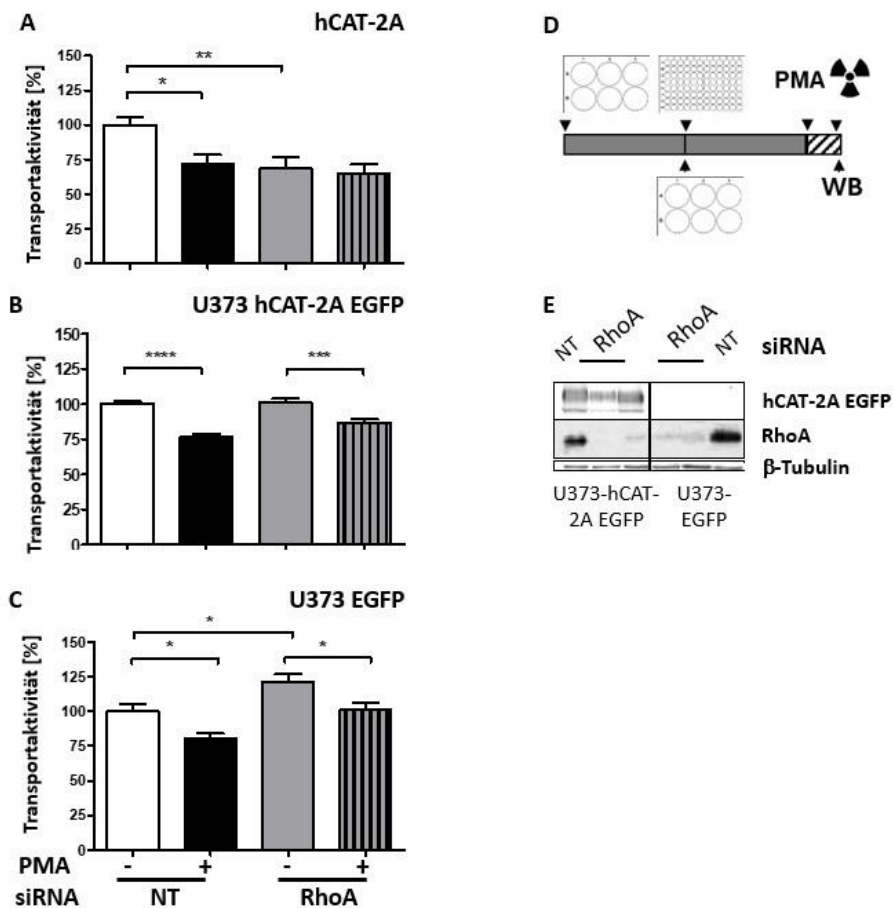


Abbildung 23. Effekt der Herunterregulation von RhoA auf die Transportaktivität von hCAT-2A ohne und mit PMA

(A-C) Aufnahme von 1 mM Arginin [5 μ Ci/ml] ohne und mit einer Herunterregulation der Proteinmengen durch RhoA siRNA (15 nM) (Sigma-Aldrich). Dazu wurden die U373 hCAT-2A EGFP-Zellen (Klon JP) auf eine 6-Well Platte ausgesät und nach Kultur im Serum-freien Medium mit jeweils 15 nM/Well siRNA (RhoA) transfiziert. Nach zwei Tagen Inkubation wurden Zellen in die oberen vier Reihen einer 96-Well Platte ausgesät und für den Transport-Assay vorbereitet. In die unteren vier Reihen wurde die Kontrollzelllinie U373 EGFP (Klon 6) mitgeführt. Zum Nachweis der erfolgreich durchgeführten Transfektion, wurde ein Teil der mit siRNA transfizierten Zellen zur weiteren Kultivierung in eine 6 Well-Platte ausgesät. Die bis zur Konfluenz kultivierten Zellen einer 96-Well Platte wurden am Folgetag pro Reihe entweder mit 0,1 % DMSO oder mit PMA behandelt und im Transport-Assay vermessen. (A) Netto-Transport durch hCAT-2A errechnet aus der Differenz (B) U373 hCAT-2A EGFP-Zellen (C) U373 EGFP- Zellen. (Gesamttransport: 100 % = $0,680 \pm 0,025$ N = 12, Kontrollzelllinie: 100 % = $0,400 \pm 0,019$, gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM, N= 12, Netto-Transport errechnet sich aus der Differenz. Statistische Analysen erfolgten mittels One-Way ANOVA-Varianztest gefolgt von einem Bonferroni Post-Test. Vergleichen wurden - vs. +PMA, - vs. siRhoA/-, - vs. siRhoA/-, siRhoA/- vs. siRhoA/+PMA. Signifikanzen: $p > 0,0001$:****, $p > 0,001$: ***, $p > 0,01$: **, $p > 0,05$: *, nicht signifikante Veränderungen sind nicht extra gekennzeichnet. (D) Skizze des Versuchsaufbaus. (D) Transport der Kontrollzellen; (E) Nachweis der Herunterregulation des RhoA-Proteins in U373 hCAT-2A Zellen durch Western-Blot-Analyse mit Anti-RhoA (1:1000, CellSignaling) nach Protokoll, anti-GFP, polyclonal, 1:2000, BD Living colors)

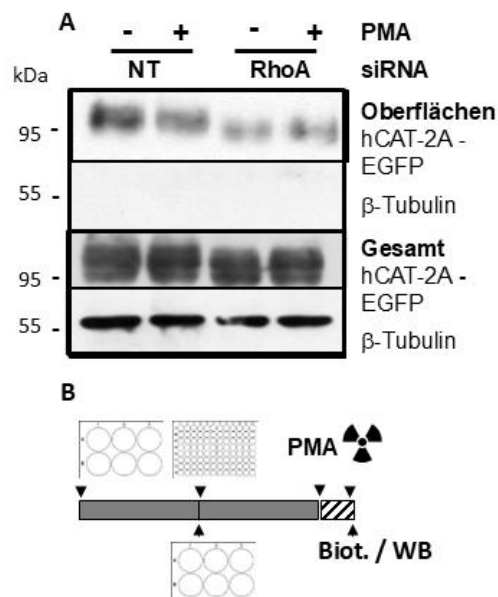


Abbildung 24. Effekt der Herunterregulation von RhoA auf die Oberflächenexpression von hCAT-2A ohne und mit PMA

U373 hCAT-2A EGFP-Zellen (Klon JP) wurden nach Protokoll mit siRNA RhoA siRNA (15 nM) (Sigma-Aldrich transfiziert und mit PMA behandelt. Nach der Biotinylierung und Lyse erfolgte die Separation mit Avidinbeads ÜN. (A) Dargestellt ist ein repräsentativer Western-Blot. Antikörper: anti-GFP, polyclonal, 1:2000, BD Living colors) und β -Tubulin, 12,5 % SDS-Gel, 15 μ g Voll-Lysat/Spur und 110 μ g /Spur für die biotinylierten Fraktion. (B) Skizze Versuchsaufbau.

Ausschalten der PKC α durch Verwendung von siRNA

Die PKC-Familie besteht aus verschiedenen Isoformen (Mellor and Parker, 1998). In der verwendeten Konzentration, aktiviert PMA hauptsächlich die α - und β -Isoform der PKC. Unter Verwendung verschiedener Inhibitoren, wurde gezeigt, dass PKC α die entscheidende Rolle bei

der Regulation des hCAT-1 Transporters übernimmt (Krotova et al., 2003). Zur Bestätigung dieser Ergebnisse, wurde PKC α mithilfe von siRNA (30 nM, 3d) um 93 % \pm 2,3 herunterreguliert (Abbildung 25 D). Erwartungsgemäß reduzierte die PMA-Behandlung in einer deutlichen Reduktion des hCAT-2A-vermittelten Transportes (auf 60 % \pm 5,7 %) in mit NT (*non-target*)-transfizierten Kontrollzellen. Die Herunterregulation der PKC- α durch siRNA führte bereits *per se* zu einer Reduktion der Transportaktivität auf etwa 50 %. Eine PMA-Behandlung reduzierte diese Aktivität nicht weiter. Die Protein-Expression von hCAT-2A EGFP war nach Ausschalten der PKC α ebenfalls stark reduziert (auf 54 % \pm 4,3), wie in Abbildung 25 dargestellt. Dies erklärte wahrscheinlich die verminderte Transportaktivität.

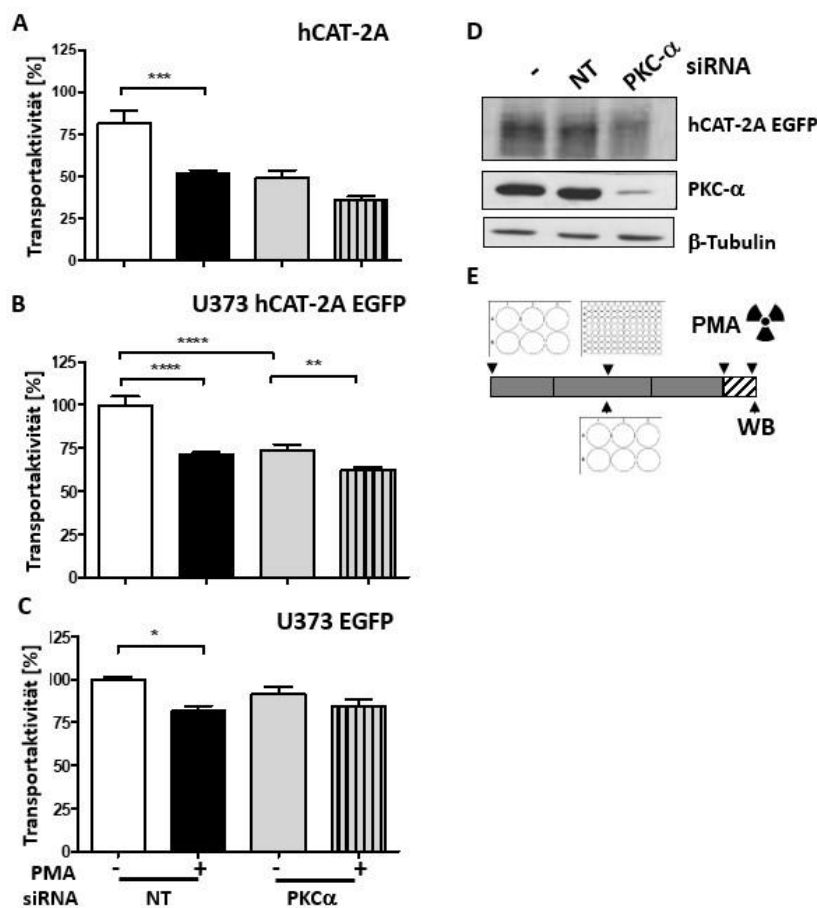


Abbildung 25. Auswirkungen der Herunterregulation der PKC- α auf die hCAT-2A Transportleistung

(A-C) Aufnahme von 1 mM Arginin [5 μ Ci/ml] ohne und mit einer Herunterregulation der Proteinmengen an PKC α siRNA (30 nM) (Sigma-Aldrich). Dazu wurden die U373 hCAT-2A EGFP-Zellen (Klon 4) und U373 EGFP-Zellen genauso behandelt, wie in Abbildung 21 und anschließend entweder mit DMSO als Kontrolle oder zusammen mit PMA behandelt und im Transport-Assay gemessen. (A) Netto-Transport durch hCAT-2A errechnet aus der Differenz (B) U373 hCAT-2A EGFP-Zellen (C) U373 EGFP- Zellen. (Gesamttransport: 100 % = 1,050 \pm 0,065, gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM, N = 16, Kontrollzelllinie: 100 % = 0,400 \pm 0,020 N = 16. Statistische Analysen erfolgten

mittels One-Way ANOVA-Varianztest gefolgt von einem Bonferroni Post-Test. Vergleichen wurden - vs. +PMA, - vs. siPKC α /-, - vs. si PKC α /-, si PKC α /- vs. si PKC α /+PMA. Signifikanzen: $p > 0,0001$: ****, $p > 0,001$: ***, $p > 0,01$: **, $p > 0,05$: *, nicht signifikante Veränderungen sind nicht extra gekennzeichnet. (D) Kontrolle der Herunterregulation des PKC α Proteins und Gesamtprotein hCAT-2A EGFP in U373 hCAT-2A EGFP Zellen im Western-Blot. 10 %-iges SDS Gel, anti-PKC α (1:5000 in Blotto, SantaCruz), nach Protokoll, anti-GFP 1:2000. (E) Skizze des Versuchsaufbaus.

Verhalten des hCAT-2A EGFP-Transporters auf der Zelloberfläche (Biotinylierung)

Die Biotinylierungs-Experimente mit Oozyten zeigten, dass die Überexpression von Cdc42V12 zu einem verminderten Einbau der hCAT-2A Aminosäuretransporter in die Zellmembran führt. Dies war bereits nach einer Zeitspanne von 3 Stunden sichtbar (Abbildung 5). Dazu wurden die Zellen auf 6-Loch Platten ausgesät und mit siRNA transfiziert. Nach zwei Tagen wurden diese Zellen für 30 Minuten mit PMA behandelt und anschließend biotinyliert.

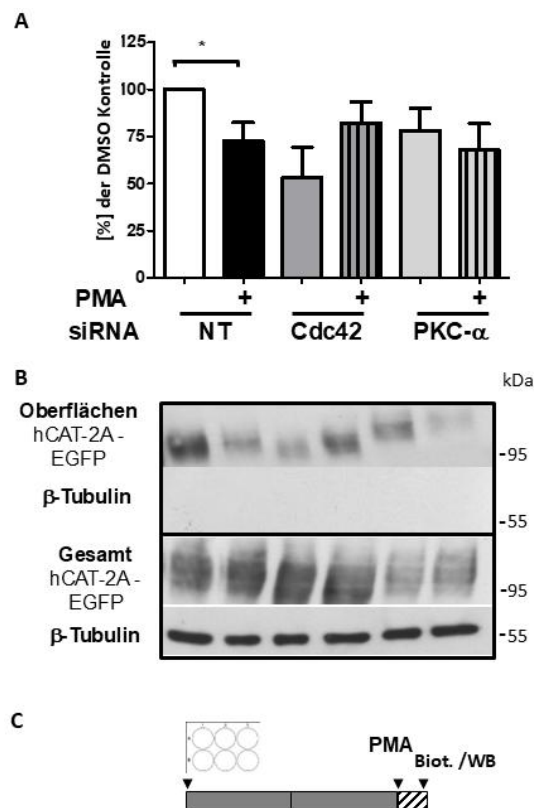


Abbildung 26. Veränderungen der Oberflächenexpression von hCAT-2A nach Herunterregulation von PKC α und Cdc42

U373 hCAT-2A EGFP Klon4 wurde nach Protokoll kultiviert, mit siRNA (15 nM/Well bei Cdc42 und 30 nM/Well bei PKC α) transfiziert, nach 2 Tagen mit DMSO oder PMA behandelt. Danach erfolgten Biotinylierung und Lyse sowie die Separation mit den Avidinbeads über Nacht und anschließend der Western-Blot. (A) Quantitative

Analyse aus drei Western-Blots (B) repräsentativer Western-Blot, 10 %-iges SDS-Gel, anti-GFP und β -Tubulin jeweils 1:2000, Verwendung der Antikörper nach Protokoll, (C) Skizze des Versuchsaufbaus

Wird das Verhältnis der hCAT-2A-Menge an der Zelloberfläche zur Gesamtproteinmenge betrachtet, zeigt sich, dass nach Herunterregulation von sowohl Cdc42 als auch PKC α keine PMA-induzierte Verringerung der hCAT-2A-Menge in der Plasmamembran mehr beobachtet wird. Die Oberflächenexpression des hCAT-2A ohne Cdc42 bzw. PKC α reagiert nicht mehr auf PMA-Stimulation (Abbildung 26 A, Auswertung von drei Western-Blots). Es wird bestätigt, dass nach PMA-Behandlung die Oberflächenexpression wie erwartet verringert wird. Bei Herunterregulation von Cdc42 wird diese Verminderung der Oberflächenexpression durch PMA aufgehoben und sogar gesteigert, wobei die Proteinmenge weit unter der der unbehandelten NT-Kontrolle bleibt. Die Ergebnisse der Western-Blots waren nicht eindeutig, sodass eine weniger starke Bande nach Herunterregulation von Cdc42 nur in diesem einen Western-Blot sichtbar wurde. Möglicherweise liegt hier ein nicht-offensichtlicher Laborfehler zugrunde. Da der PMA-Effekt hier sehr deutlich zu sehen war, wurde dieser Western-Blot verwendet. Die PKC α -Herunterregulation reduziert die an der Zelloberfläche detektierbare hCAT-2A Proteinmenge sichtbar, jedoch nicht signifikant. Nach PMA-Behandlung ist diese hCAT-2A Proteinmenge kaum mehr nachweisbar (Abbildung 26 B). Allerdings gilt es zu beachten, dass bei Co-Expression der PKC α die Gesamtproteinmenge an hCAT-2A ebenfalls deutlich reduziert ist (Abbildung 26; B Mitte, Gesamtprotein). Die Experimente aus den Oozyten konnten im U373 hCAT-2A EGFP-Zellsystem teilweise bestätigt werden.

Ausschalten der Tyrosinkinase PAK1 durch Verwendung von siRNA

In den Kaskaden laufen die Fäden des Cdc42 und Rac1 Signals bei der Serin/Threonin Kinase PAK1 (*p21-activated kinase 1*) zusammen (Knaus et al., 1995).

Basierend auf den Ergebnissen der Zellexperimenten, dass Cdc42 und Rac1 an der Herunterregulation des Transportes durch PKC beteiligt sind. Deshalb lag es nahe, auch die Beteiligung von PAK1 in dieser Kaskade zu untersuchen. Dazu wurden die U373hCAT-2A EGFP-Zellen mit der siRNA gegen PAK1 transfiziert.

Nach der Herunterregulation lag der Proteingehalt an PAK1 bei ca. 25 % (Abbildung 27 D). Unter identischen Bedingungen wurden die Zellen auf eine Veränderung des Aminosäuretransports durch hCAT-2A untersucht. Die Ergebnisse dieser Experimente zeigten, dass Zellen

mit reduzierten Mengen an PAK1-Protein weniger sensibel auf PMA-Stimulation reagierten als die mit NT-RNA transfizierten Kontrollzellen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass PAK1 ebenfalls Teil der Kaskade zur Regulation der kationischen Aminosäuretransportern hCAT ist. Interessanterweise verhalten sich die Kontrollzellen U373 EGFP anders als die hCAT-2A EGFP-über-exprimierenden Zellen. Der hCAT-2A EGFP Nettotransport zeigt jedoch, dass der PMA-Effekt durch Herunterregulation von PAK verschwindet. Dieses Ergebnis bestätigt die Beteiligung des Aktins (Abbildung 19) an der Regulation der Transportleistung von hCAT-2A durch PKC. PAK1 könnte das Protein sein, das für die Inhibition von RhoA verantwortlich ist. Publikationen von Alberts et al. (2005) zeigen ebenfalls einen Zusammenhang zwischen RhoA und PAK1 mit ähnlichem Ergebnis.

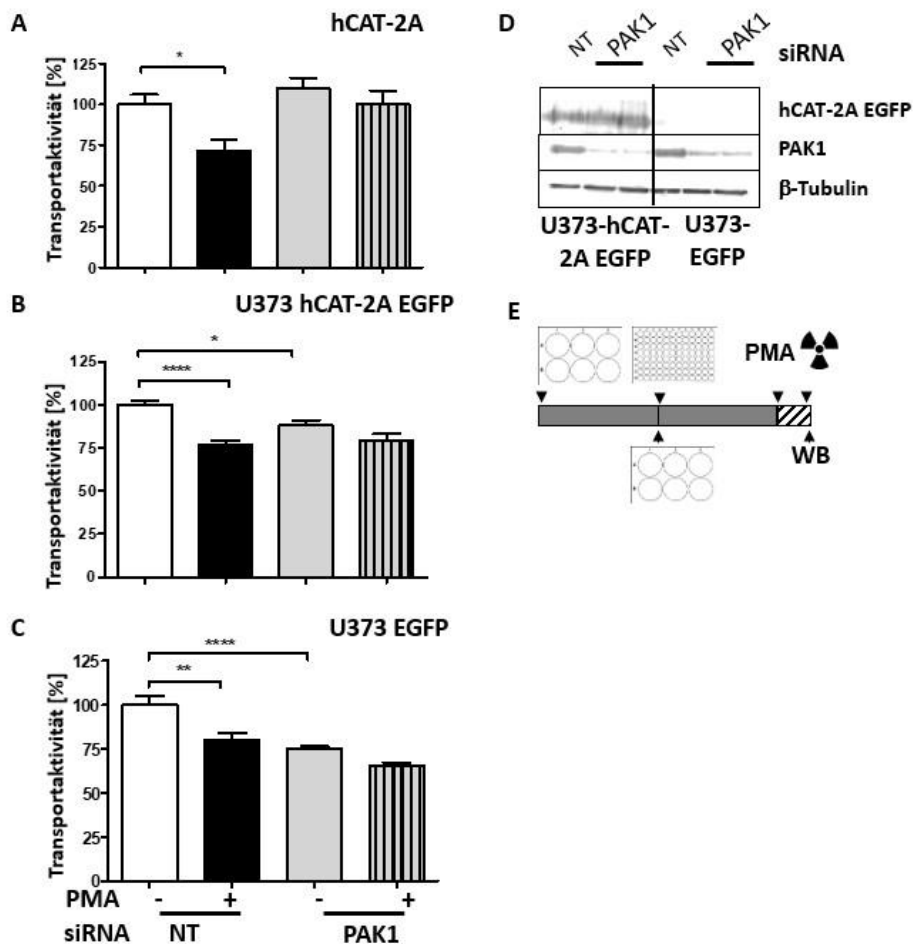


Abbildung 27. Auswirkungen von PAK1 auf die hCAT-2A Transportaktivität

(A-C) Aufnahme von 1 mM Arginin [5 μ Ci/ml] ohne und mit einer Herunterregulation der Proteinmengen an PAK siRNA (15 nM) (Sigma-Aldrich). Dazu wurden die U373 hCAT-2A EGFP-Zellen (Klon JP) genauso behandelt, wie in Abbildung 21 und anschließend entweder mit DMSO (Kontrolle) oder in Kombination mit PMA behandelt und im

Transport-Assay analysiert. (A) Netto-Transport durch hCAT-2A errechnet aus der Differenz (B) U373 hCAT-2A EGFP-Zellen (C) U373 EGFP- Zellen. (Gesamttransport: 100 % = $0,680 \pm 0,025$, gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM, N = 12, Kontrollzelllinie: 100 % = $0,400 \pm 0,019$ N = 12). Statistische Analysen erfolgten mittels One-Way ANOVA-Varianztest gefolgt von einem Bonferroni Post-Test. Verglichen wurden - vs. +PMA, - vs. siPAK1/-, - vs. si PAK1 /-, si PAK1 /- vs. si PAK1 /+PMA. Signifikanzen: $p > 0,0001$:****; $p > 0,01$: **; $p > 0,05$: *, nicht signifikante Veränderungen sind nicht extra gekennzeichnet. (D) Transport der Kontrollzellen; (D) Kontrolle der Herunterregulation des PAK-Proteins in U373 hCAT-2A im Western-Blot. Anti-PAK (1:2000, CellSignaling) nach Protokoll, anti-GFP 1:2000, anti- β -Tubulin 1:2000, 12,5 %iges Gel. (E) Skizze des Versuchsaufbaus

Beteiligung einer weiteren Tyrosinkinase ACK1 an der Regulation des hCAT-2A Transportes

In einer Zusammenarbeit mit Alexander Sorkin und seinen Mitarbeiter:innen (*University of Pittsburgh*) konnte gezeigt werden, dass der hCAT-1 nach PMA-Stimulation unter Beteiligung von Clathrin, E3-Ligase Nedd4-2/-1 und Ubiquitin internalisiert. Das direkte Bindeglied zwischen PKC und Transporter konnte jedoch nicht gefunden werden.

Eine systematische Literaturrecherche nach einem möglichen Bindeglied zwischen Cdc42, Aktin, Clathrin, Nedd2-4 (E3-Ligase) und Ubiquitin, verwies auf eine nicht-rezeptorgebundene Tyrosinkinase ACK1 (*activated cdc42 kinase 1*) (Kato-Stankiewicz et al., 2001). Diese Kinase war aufgefallen, da sie direkt an die Rho-GTPase Cdc42 bindet. Ebenso legte ihre Beteiligung an Internalisierungen von EGF-Rezeptoren (Kato-Stankiewicz et al., 2001) eine mögliche Beteiligung dieser Kinase bei der Regulation der hCATs nahe.

Wurde ACK1 mithilfe von siRNA ausgeschaltet (Western-Blot, Abbildung 28 D), so zeigte sich, dass die PKC-vermittelte Reduktion des hCAT-2A Transportes aufgehoben war. Es schien aber ein hCAT-2A spezifischer Effekt zu sein, denn die Kontrollzellen verhielten sich, ähnlich wie schon bei der RhoA und PAK-Herunterregulation, entgegengesetzt zu den hCAT-2A EGFP-überexprimierenden Zellen. In Zellen mit reduzierter ACK1-Expression konnte ein Anstieg des Transports gemessen werden und der durch PMA erzeugte Effekt scheint ausgeprägter. Somit ergibt sich für den hCAT-2A Transport folgendes Bild: Ohne ACK1 ist der Transport *per se* reduziert und in Kombination mit PMA unverändert (Abbildung 28).

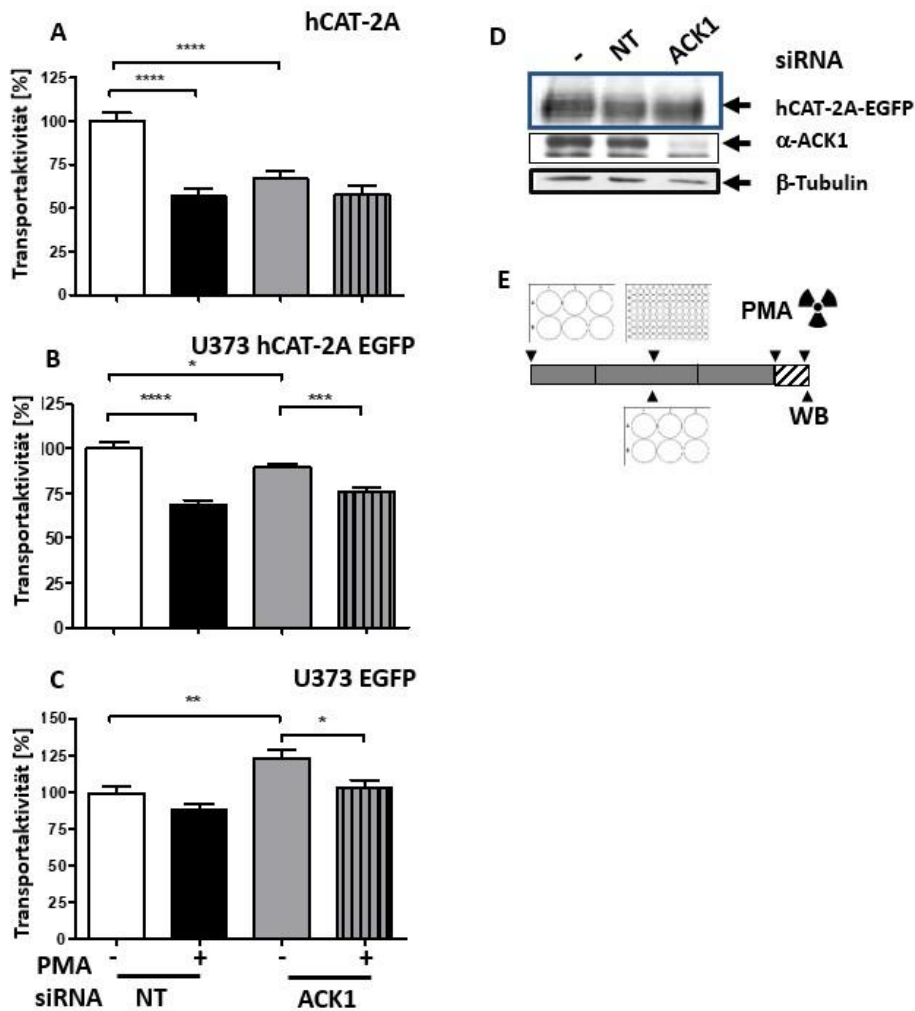


Abbildung 28. Auswirkung von ACK1 auf die hCAT-2A Transportverhalten

(A-C) Aufnahme von 1 mM Arginin [5 μ Ci/ml] ohne und mit einer Herunterregulation der Proteinmengen an ACK1 siRNA (15 nM) (Sigma-Aldrich). Dazu wurden die U373 hCAT-2A EGFP-Zellen (Klon 4) genauso behandelt, wie in Abb. 20a und anschließend entweder mit DMSO als Kontrolle oder zusammen mit PMA behandelt und im Transport-Assay analysiert. (A) Netto-Transport durch hCAT-2A errechnet aus der Differenz (B) U373 hCAT-2A EGFP-Zellen (C) U373 EGFP- Zellen. (Gesamttransport: 100 % = $0,858 \pm 0,049$, gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM, N = 16, Kontrollzelllinie: 100 % = $0,401 \pm 0,022$ N = 16). Statistische Analysen erfolgten mittels One-Way ANOVA-Varianztest gefolgt von einem Bonferroni Post-Test. Vergleichen wurden - vs. +PMA, - vs. iACK1^{-/-}, - vs. si ACK1^{-/-}, si ACK1^{-/-} vs. si ACK1^{-/-}+PMA. Signifikanzen: $p > 0,0001$:****, $p > 0,001$:***, $p > 0,01$:**, $p > 0,05$:*, nicht signifikante Veränderungen sind nicht extra gekennzeichnet. (D) Kontrolle der Herunterregulation des ACK1 Proteins und hCAT-2A EGFP-Gesamtprotein in U373 hCAT-2A im Western-Blot. anti-ACK1 (1:1000 in Blotto, SantaCruz) nach Protokoll, anti-GFP 1:2000, anti- β -Tubulin 1:2000, 10 %-iges Gel; (E) Skizze des Versuchsaufbaus

Die Möglichkeit, dass ACK1 als Adapter für hCAT-2A fungiert, sollte in weiteren Experimenten untersucht werden. LSM-Aufnahmen der U373 hCAT-2A EGFP (Klon JP) zeigten, dass sich Aktinstrukturen ohne ACK1 (15 nM siRNA, 3Tage) im Vergleich zur Kontrolle verändern. Es wurde eine geringe Ausbildung von Lamelliopodien beobachtet und in Kombination mit PMA zu einer zusätzlichen Ausbildung von Filopodien (Abbildung 29). Gleichwohl die Transportaktivität (vgl.

Aktivitätsmessung Abbildung 28 B) bei nur 75 % ermittelt wurde, zeigt die optische Analyse der U373 hCAT-2A EGFP-Zellen ein tendenziell stärkeres Signal der co-exprimierten EGFP-Proteine. Die Kontrollzellen (NT siRNA) entsprechen der hCAT-2A Reduktion, die im Aktivitätstests des Transporters sichtbar wird (Vergleich zu Abbildung 28 B, links), während die Signale in den Zellen, in denen ACK1 herunterreguliert wurde, dagegen nicht mit den Transportdaten übereinstimmen. (Abbildung 28 B, rechts). Die Herunterregulation der ACK1 scheint außerdem eine deutliche Verstärkung des hCAT-2A im Bereich des Aktingerüsts zu begünstigen (Abbildung 29; rechts + siACK1).

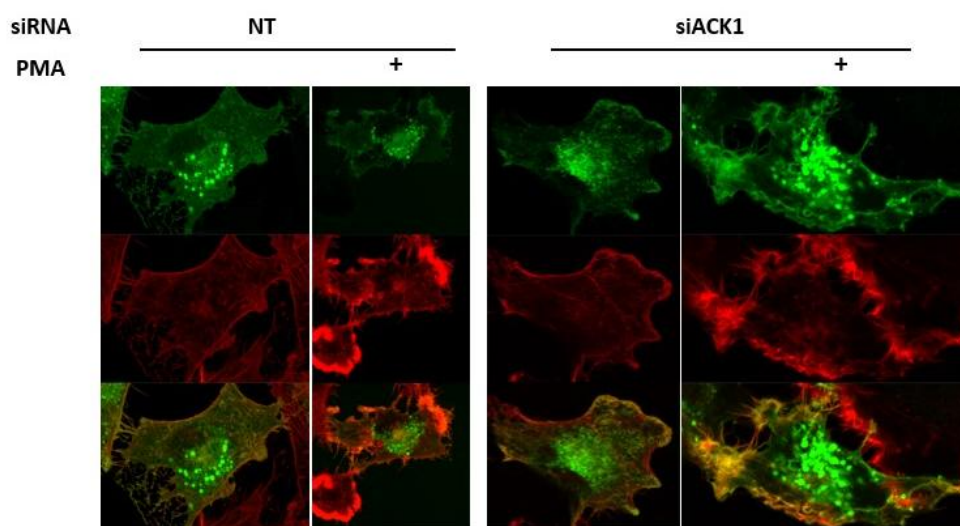


Abbildung 29. Lokalisation des hCAT-2A EGFP zusammen mit dem Aktingerüst von U373 hCAT-2A EGFP mit und ohne ACK1 und mit und ohne PMA-Behandlung

U373 hCAT-2A EGFP (Klon JP) Zellen wurden nach Protokoll mit siRNA (15nM, 3d) transfiziert und mit DMSO/PMA behandelt. Anschließend fixiert und mit Phalloidin Texas Red angefärbt. Eine optische Analyse erfolgte nach LSM-Aufnahmen. hCAT-2A (grün) Aktin (rot) Überlappung (orange-gelb). Die linke Seite zeigt U373 hCAT-2A Zellen mit *non target* (NT) siRNA transfiziert (Kontrolle) ohne (ganz links) und daneben im Vergleich Zellen, die mit PMA behandelt wurden. Rechte Seite: U373 hCAT-2A EGFP-Zellen, die mit siRNA gegen ACK1 transfiziert wurden. Die zweite Aufnahme von rechts zeigt die Zellen ohne PMA und die Aufnahme ganz rechts mit PMA behandelten Zellen. Das jeweils obere Bild zeigt das grün leuchtende EGFP des Fusionsprotein mit hCAT-2As, in der Mitte sieht man mit Phalloidin eingefärbtes Aktin und ganz unten jeweils eine Überlagerung der grünen und roten Aufnahmen, um mögliche Co-Lokalisationen zu detektieren.

4.2.6 Aktivierung des endogenen Cdc42

Die Expression der konstitutiv aktiven Mutante Cdc42V12 in *Xenopus*-Oozyten sollte in humanen Zellen reproduziert werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es nicht gelungen Cdc42V12 im U373-Zellsystem in ausreichender Menge zu exprimieren, sodass keine auswertbaren Effekte im Transport-Assay erhalten werden konnte (Ergebnisse nicht gezeigt).

Als alternative Herangehensweise wurden geeignete Aktivatoren von Cdc42 gesucht. Aus der Literatur war bekannt, dass mit Hilfe von EGF (*epidermal growth factor*) aber auch PMA endogenes Cdc42 aber auch Rac1 kurzzeitig aktiviert werden kann (Kurokawa et al., 2004). Die Ausbildung von Aktinstrukturen, die nach Aktivierung von Rho-GTPasen bzw. Cdc42 aus der Literatur bekannt ist, konnte nach EGF-Stimulation sichtbar gemacht und im Rahmen der Experimente überprüft werden (Abbildung 30).

Um diese Aktivierung auch quantitativ zu überprüfen, wurde ein G-LISA (*GTPase-linked Immunosorbent Assay*) eingesetzt, um aktives Cdc42 zu messen. In Abbildung 30 wird die Stimulation von endogenem Cdc42 durch EGF dargestellt. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Zugabe von EGF wurde in Zelllysaten vorhandenes Cdc42 im G-LISA gemessen. Die beobachtete Steigerung des Signals hatte nach 15 min ihren Höhepunkt erreicht (etwa 250 % der Kontrolle) und flachte daraufhin ab. Allerdings war 5 min nach EGF-Zugabe keine Aktivierung von Cdc42 nachweisbar. Möglicherweise kann dies als stufenweise Aktivierung gewertet werden, bei der eine sehr schnelle Aktivierung nach 1 min messbar ist, die nach 5 min abflacht und nach 15 min einen stärkeren und länger anhaltenden Effekt auslöst. Ähnliche Aktivierungskurven sind in Publikation von Kurokawa et al. (2004) zu sehen. Aufgrund der Streuung war es nicht möglich im Rahmen dieses Assays ein signifikantes Ergebnis zu erzielen.

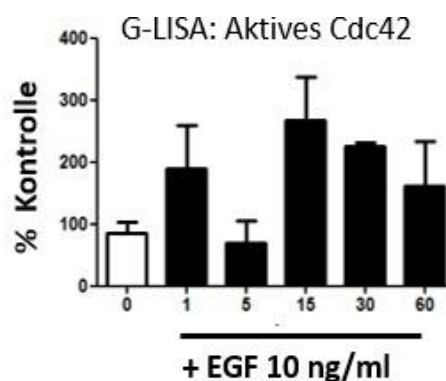


Abbildung 30. Stimulation von endogenen Cdc42 durch EGF

U373 hCAT-2A EGFP (Klon3) -Zellen wurden auf 6-Well Platten ausgesät und bis zu 20 % Konfluenz kultiviert. Danach erfolgte eine serumfreie Inkubationsphase für die Dauer von 16 Stunden. Die so präparierten Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (1, 5, 15, 30 und 60 Minuten) mit EGF (10 ng/ml) stimuliert und anschließend nach G-LISA Assay Protokoll analysiert. Dazu wurden die behandelten Zellen gewaschen, lysiert und auf spezielle 96-Well Platte überführt, deren Beschichtung spezifisch das GTP-gebundene Cdc42 quantitativ bindet. Nach 30-minütiger Inkubation nach Protokoll, konnte das GTP gebundene Cdc42 im Tecan Plattenreader gemessen werden. Positivkontrolle stellt den 100 %-Wert da. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM (100 % = $0,255 \pm 0,205$ N = 2 - 3)

4.2.7 Transportverhalten nach EGF-Stimulation

Im folgendem wurden zwei verschiedene Zelllinien auf das Transportverhalten nach EGF-Einwirkung untersucht. Die Oozytenexperimente demonstrierten, dass die hCAT-3-Isoform die höchste Sensitivität gegenüber der Überexpression von Cdc42V12 aufwies. Gestützt auf diese Erkenntnisse wurde, parallel zur U373 hCAT-2A EGFP (Klon3)-Zelllinie, die NT2-Zelllinie, die hCAT-3 als vorherrschenden Vertreter der hCATs exprimiert, einer zeitlich gestaffelten Behandlung mit EGF unterzogen. Dies führte in beiden Zelllinien zu einer Abnahme der Arginintransportraten, allerdings nicht mit der Intensität wie man es in den Oozytenexperimenten beobachten konnte.

Transportverhalten in U373 hCAT-2A EGFP über-exprimierender Zellen und NT-2 Zellen mit endogener hCAT-3 Expression

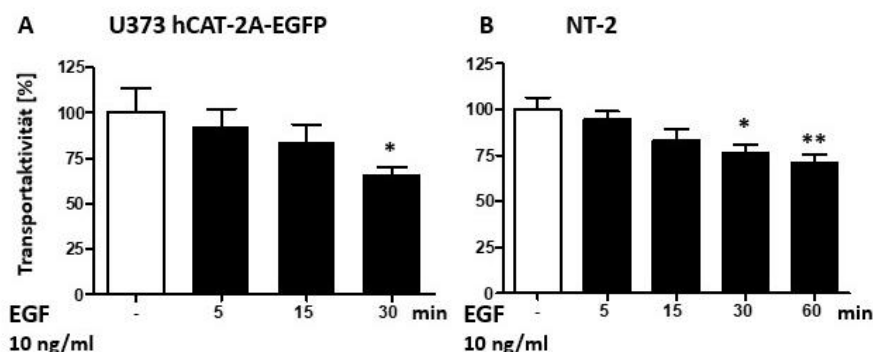


Abbildung 31. Auswirkungen der EGF-Stimulation auf den Transport von überexprimiertem hCAT-2A EGFP und endogen exprimiertem hCAT-3

Aufnahme von 1mM (hCAT-2A) bzw. 0,1 mM (hCAT-3) Arginin [10 μ Ci/ml] mit und ohne EGF-Stimulation. Nach dem Aussäen der U373 hCAT-2A EGFP (Klon3) (A) oder NT2 (B) Zellen auf 24 Well Platten für 20 % Konfluenz und 16 h in serumfreiem Medium, wurden diese mit EGF (10 ng/ml) für die angegebene Zeitpunkte bei 5, 15, 30 und 60 Minuten behandelt und anschließend die Transportaktivität gemessen. Signifikanzen: $p > 0,05$; *, nicht signifikante Veränderungen sind nicht extra gekennzeichnet (Klon3: 100 % = $1,296 \pm 0,124$; NT-2: 100 % = $1,400 \pm 0,100$, gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM, N = 7 - 8)

Die Behandlung der U373 hCAT-2A-EGFP-Zellen (Klon 3) mit *epidermal growth factor* (EGF), führte nach einer dreißigminütigen Inkubation zu einer signifikanten Reduktion der Transportaktivität auf ca. 67 %. Die Transportaktivität nahm zeitabhängig ab, sodass nach 5 Minuten im Mittel noch 92 %, nach 15 Minuten 83 % der Transportaktivität messbar waren. Statistische Signifikanz konnte nicht erreicht werden (Abbildung 31 A).

Gleichfalls wurde die Aktivität von endogenem hCAT-3 in NT2-Zellen durch die EGF-Stimulation verringert. Messdauer waren hier 60 Minuten. Die Transportaktivität ging auf knapp 71 % zurück. Eine zeitabhängige Abnahme konnte analog zu U373 hCAT-2A-EGFP-Zellen (Klon 3) beobachtet werden. Nach 5 Minuten waren knapp 92 % der Aktivität von hCAT-3 messbar, nach 15 Minuten 83 % und nach 30 Minuten waren noch 75 % der Transportaktivität messbar (Abbildung 31 B). Auch hier war der Unterschied zu Kontrollzellen erst nach 30 min signifikant.

Aktivierung von Cdc42 in U373 hCAT-2A EGFP-Zelllinie (Transport und G-LISA)

Die Auswirkung von EGF auf den Transport von hCAT-2A in Zellen, in denen die Expression mittels siRNA herunterreguliert wurde, wurde untersucht. U373 hCAT-2A EGFP-Zellen wurden mit Cdc42 siRNA transfiziert und anschließend für 30 Minuten mit EGF stimuliert. Im Nachgang wurde die Transportaktivität gemessen. Gleichzeitig wurden die Zellen in einem Parallelansatz mit BIM II behandelt ohne Cdc42-Herunterregulation und die Transportaktivität im Transport-Assay gemessen.

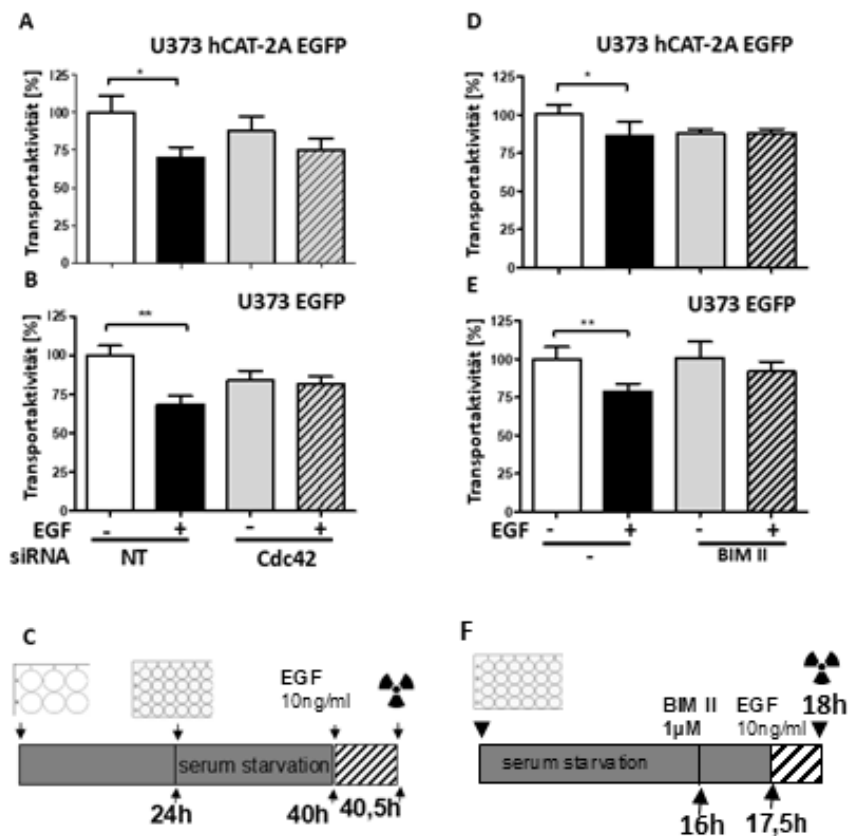


Abbildung 32. Aufhebung des EGF-Effektes auf den hCAT-2A-vermittelten Transport durch Herunterregulation von Cdc42 und PKC-Hemmung

(A-C) Herunterregulation von Cdc42: Aufnahme von 1 mM Arginin [5 μ Ci/ml] in U373 hCAT-2A EGFP (Klon3) (A) bzw. Kontrollzelllinie U373 EGFP (B). Zellen wurden nach Protokoll bis zu einer Konfluenz von 20 % kultiviert, weitere 16 h serumfrei kultiviert und dann mit EGF (10 ng/ml) für 30 min behandelt. Anschließend wurde der Transport-Assay durchgeführt. (Gesamttransport: 100 % = $0,440 \pm 0,031$, gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM, N = 12 - 15; Kontrollzelllinie: 100 % = $0,190 \pm 0,010$, gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM, N = 5) PKC-Hemmung durch BIM II. (C) Skizze des Versuchsaufbaus. (D-F) Aufnahme von 1 mM Arginin [10 μ Ci/ml] der U373 hCAT-2A EGFP (Klon4) (D) und Kontrollzellen U373 EGFP Klon6 (E) Zellen wurden auf 24-Loch Platten ausgesät und bei 20% Konfluenz und 16 h Serumentzug mit BIM II (1 μ M) oder DMSO für 1 h vorbehandelt. Anschließend erfolgte die Stimulation mit und ohne EGF (10 ng/ml). Signifikanzen: $p > 0,05$: *, nicht signifikante Veränderungen sind nicht extra gekennzeichnet (100 % = $0,805 \pm 0,082$, gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM, N: 11 - 14; Kontrollzelllinie: 100 % = $0,639 \pm 0,086$; N = 8) (F) Skizze des Versuchsaufbaus

Wie in Abbildung 32 (A-C) gezeigt, unterdrückte die Herunterregulation von Cdc42 die EGF-vermittelte Reduktion der Transportaktivität des hCAT-2A. Im Gegensatz zu der durch EGF verursachten Reduktion von ca. 32 % im Arginintransport in U373 hCAT-2A EGFP-Kontrollzellen, führte die EGF-Behandlung nach Herunterregulation von Cdc42 zu keiner signifikanten Änderung des Transportes (Abbildung 32 A). In U373 EGFP-Zellen führte die Behandlung mit Cdc42-siRNA zur Aufhebung des EGF-Effektes (Abbildung 32 B).

Auch nach Hemmung der Proteinkinase C durch BIM II war in beiden Zelllinien kein signifikanter Effekt von EGF auf den Arginintransport mehr festzustellen (Abbildung 32 D - F).

Aktivierung des endogenen Cdc42 nach PMA-Stimulation

Zur Überprüfung der Frage, ob PMA direkt Cdc42 aktivieren kann, wurde ein G-LISA unter zwei verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Zum einen wurden die U373 hCAT-2A EGFP-Zellen zur 20 %-iger Konfluenz und unter FCS-Entzug (16 h) kultiviert und dann unter Zugabe von PMA stimuliert.

Zum anderen wurden die Zellen unter den Bedingungen der bisherigen Transportversuche (konfluente Zellen, in Anwesenheit von FBS kultiviert) mit PMA behandelt. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen PMA-behandelten und unbehandelten Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 33).

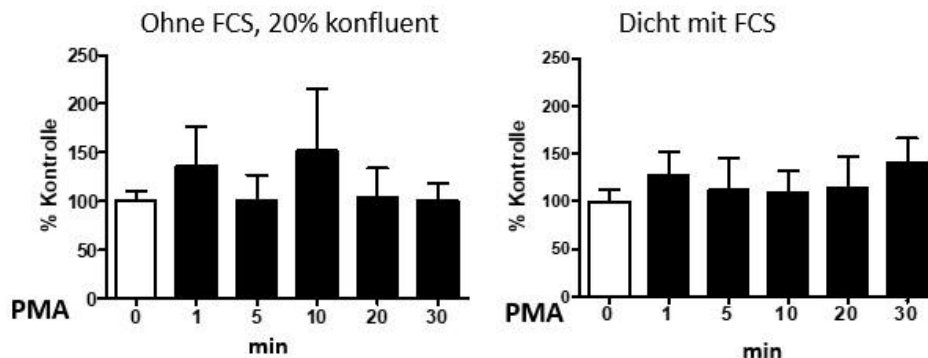


Abbildung 33. Aktivierbarkeit des endogenen Cdc42 nach PMA-Stimulation

(links) U373 hCAT-2A EGFP Klon3 Zellen wurden auf 6-Well Platten ausgesät und bis zur 20 %-iger Konfluenz kultiviert. Danach erfolgte eine 16-stündige Serum-freie Inkubationsphase. Die Stimulation mit PMA (100 nM) erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Zellen wurden nach Protokoll analysiert. Dazu wurden die behandelten Zellen gewaschen, lysiert und auf spezielle 96-Well Platte überführt, die über die Beschichtung das Cdc42-GTP quantitativ messbar machen. Nach 30-minütiger Inkubation, konnte das GTP gebundene Cdc42 im Tecan Plattenreader bei 490 nm gemessen werden. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM (100 % = $0,270 \pm 0,037$; N = 4). (rechts) U373 hCAT-2A EGFP (Klon4) auf 6-Well Platte in Serum-haltigen Medium ausgesät, bis zur 80 %-iger Konfluenz kultiviert, mit PMA für angegebene Zeitpunkten stimuliert und nach Protokoll am Tecan bei 490 nm analysiert. Lysepuffer dient als Negativkontrolle. Alle Werte sind auf die Positivkontrolle bezogen. Positivkontrolle stellt den 100 %-Wert dar. Gezeigt sind jeweils Mittelwerte \pm SEM (100 % = $0,667 \pm 0,087$; gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM, N = 3.)

4.2.8 Ein mögliches Adapterprotein für die hCATs

Adapterprotein GRB2 beeinflusst die Transportaktivität der hCAT-1 und -2A, jedoch auf unterschiedliche Art und Weise

Zeitgleich mit den im Rahmen der Doktorarbeit durchgeführten Experimenten veröffentlichte die Arbeitsgruppe um Chen et al. (2012) eine Studie, die zeigte, dass GRB2, ein etabliertes Adapterprotein für verschiedene Rezeptoren, nach der Infektion mit dem murinen Leukämievirus (MLV) mit mCAT-1 interagiert. Die bereits erwähnte Publikation von Kato-Stankiewicz et al. (2001) lieferte zusätzliche Hinweise darauf, dass GRB2 ebenfalls beteiligt sein könnte. Um zu untersuchen, ob GRB2 tatsächlich ein Adapterprotein von CATs ist, wurde in U373 hCAT-1 EGFP-Zellen erfolgreich siRNA gegen GRB2 eingesetzt.

hCAT-1-Transportverhalten nach Herunterregulation von GRB2

Die Transportaktivität von hCAT-1 war nach der Herunterregulation von GRB2 auf 36 % reduziert. In Kombination mit PMA erfolgte keine weitere Hemmung des Transports (Abbildung

34). Dieses Ergebnis wurde hinsichtlich der Oberflächenexpression nur bei hCAT-2A bestätigt. Aufgrund zeitlicher Beschränkungen wurden diese Experimente für hCAT-1 nur einmal und für hCAT-2A zweimal durchgeführt. Daher bleibt die Notwendigkeit bestehen, die vielversprechenden Transportergebnisse auf der Ebene der Oberflächenexpression weiter zu überprüfen.

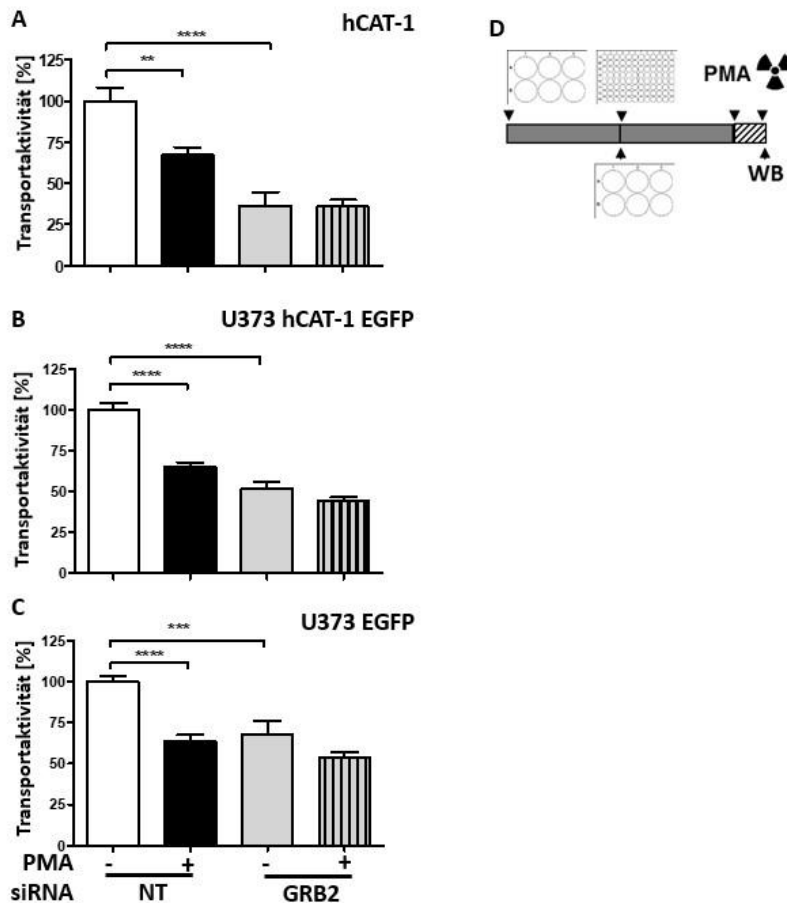


Abbildung 34. Transportverhalten des hCAT-1 mit und ohne GRB2 mit und ohne PKC-Aktivierung

(A) Netto-Transport des hCAT-1 (Aufnahme von 0,1 mM Arginin [5 μ Ci/ml]), Netto-Transport durch hCAT-2A errechnet aus der Differenz (B) U373 hCAT-2A EGFP-Zellen (C) U373 EGFP- Zellen (Gesamttransport: 100 % = $0,161 \pm 0,008$, gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM, N = 12, Kontrollzelllinie: 100 % = $0,079 \pm 0,004$, gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM, N = 12, Netto-Transport ergibt sich aus der Differenz). Signifikanzen: $p > 0,0001$:****, $p > 0,001$:***; $p > 0,01$:**, $p > 0,05$:*, nicht signifikante Veränderungen sind nicht extra gekennzeichnet

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass GRB2 für den basale hCAT1-Aktivität erforderlich ist. Welche spezifische Rolle GRB2 in diesem Zusammenhang spielt, kann derzeit noch nicht abschließend bestimmt werden.

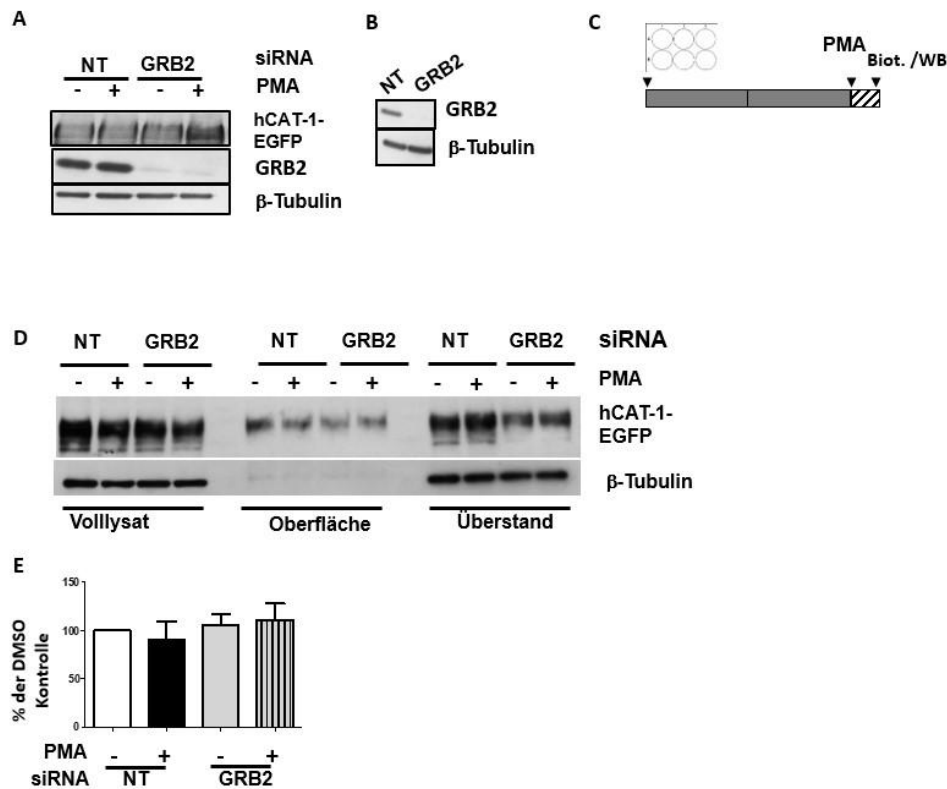


Abbildung 35. Veränderung der hCAT-1 EGFP-Oberflächenexpression mit und ohne GRB2

U373 hCAT-1 EGFP-Klon 3 Zellen wurden nach Protokoll transfiziert und mit PMA behandelt. Dargestellt ist ein repräsentativer Western-Blot. Anti-GRB2 (1:1000, Cell Signaling) nach Protokoll, anti-CAT-1 (AG) 1:100, Ladekontrolle erfolgte mit anti-β-Tubulin (1:2000, Sigma-Aldrich). (A) Herunterregulation des GRB2 Proteins in U373 hCAT-1 EGFP-Zellen, (B) Herunterregulation der GRB2 Proteins in Kontrollzellen, (C): Skizze des Versuchsaufbaus, (D) Western-Blot: Quantitative Analyse der Proteinmengen von hCAT-1 im Volllysat und an der Zelloberfläche. (E) Biotinylierung der Oberflächenproteine.

hCAT-2A Transportverhalten nach Herunterregulation von GRB2

In dieser Studie wurde der Einfluss der GRB2-Herunterregulation auf die Transportaktivität von hCAT-2A analysiert. Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Reduktion der hCAT-2A-vermittelten Transportfunktion. Eine nachfolgende PMA-Stimulation führte nicht zu einer weiteren Abnahme des Transports.

Ein auffälliger Befund war das unterschiedliche Verhalten der Kontrollzellen zwischen den Versuchsreihen der beiden Isoformen. Der einzige variable Parameter zwischen diesen Reihen war die Argininkonzentration (0,1 mM für hCAT-1 bzw. 1 mM für hCAT-2A). Dies deutet darauf hin, dass unter den Bedingungen einer 1 mM Argininlösung und 2 mM Leucin der endogene γ^L -vermittelte Transport möglicherweise nicht vollständig inhibiert wird (Abbildung 36).

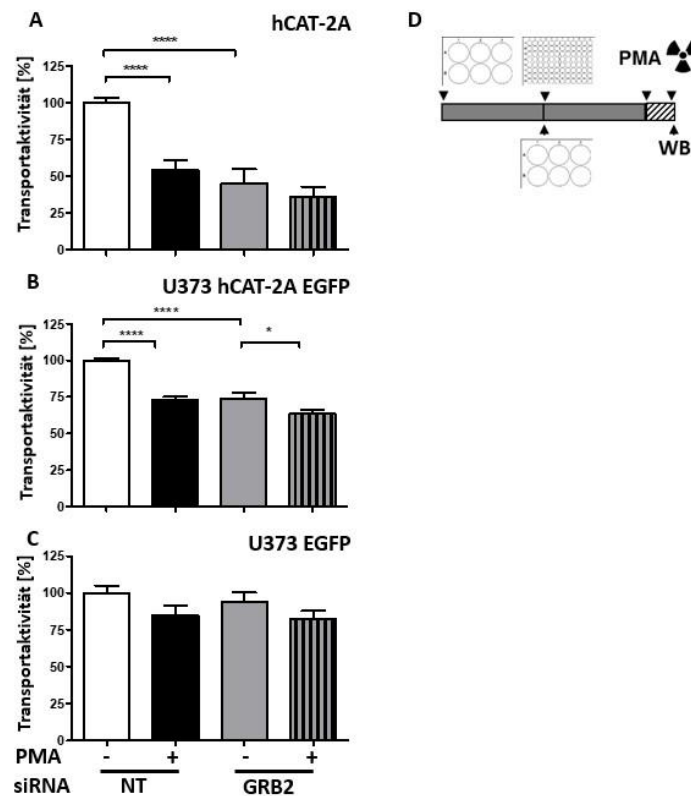


Abbildung 36. Transportverhalten des hCAT-2A mit und ohne GRB2 sowie mit und ohne PKC-Aktivierung

(A) Netto-Transport des hCAT-2A (Aufnahme von 1mM Arginin [5 μ Ci/ml]), Netto-Transport durch hCAT-2A errechnet aus der Differenz (B) U373 hCAT-2A EGFP-Zellen (C) U373 EGFP-Zellen (Gesamttransport: 100 % = 0,605 \pm 0,018, gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM, N = 16, Kontrollzelllinie: 100 % = 0,345 \pm 0,018; gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM, N = 16, Netto-Transport ergibt sich aus der Differenz) Signifikanzen: $p > 0,0001$: ****, $p > 0,001$: ***, $p > 0,01$: **; $p > 0,05$: *, nicht signifikante Veränderungen sind nicht extra gekennzeichnet

Bemerkenswerterweise ist die Oberflächenexpression von hCAT-2A in ähnlichem Maße reduziert wie die Transportraten, wie in Abbildung 37 E dargestellt. Dies unterscheidet sich deutlich von den Beobachtungen bei hCAT-1, wie in Abbildung 35 E gezeigt. Die genaue Wirkungsweise dieses Adapterproteins bei beiden Isoformen und die Gründe für das unterschiedliche Verhalten der Isoformen müssen in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

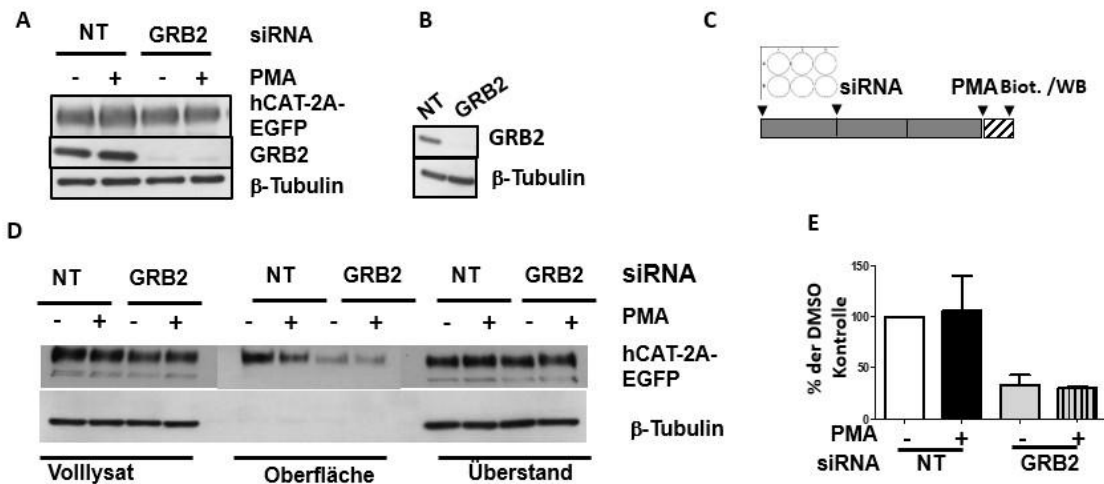


Abbildung 37. Veränderung der hCAT-2A Oberflächenexpression mit und ohne GRB2

U373 hCAT-2A EGFP Klon JP Zellen wurden nach Protokoll transfiziert und mit PMA behandelt. Dargestellt ist ein repräsentativer Western-Blot. Anti-GRB2 (1:1000, CellSignaling) nach Protokoll, anti-CAT-2 (AG) 1:100, Lagedkontrolle erfolgte mit anti-β-Tubulin (1:2000, Sigma-Aldrich). (A): Herunterregulation des GRB2 Proteins in U373 hCAT-2A EGFP-Zellen, (B): Herunterregulation der GRB2 Proteins in Kontrollzellen, (C): Skizze, (D): Biotinylierung (E): Quantitative Analyse der Proteinmengen des hCAT-2A an der Zelloberfläche von drei Western-Blots.

4.2.9 Untersuchung des Transportverhaltens von hCAT-1

In *Xenopus laevis* Oozyten zeigte sich hCAT-1 gegenüber einer Hemmung durch Rho-GTPasen weniger empfindlich als hCAT-2A, nur die Co-Expression mit Cdc42V12 bewirkte eine Hemmung des hCAT-1-vermittelten Transports.

Nachfolgend sollte mithilfe von Toxinen überprüft werden, inwieweit die Hemmung der Rho-GTPasen die PKC-vermittelte Reduktion der Transportaktivität, aber auch den hCAT-1 vermittelten Transport selbst, beeinflusst. Dazu wurden die U373 hCAT-1 EGFP (Klon 3) auf 96 Well-Platten ausgesät und nach 48 h mit den Toxinen TcdB 10463 und TcdB 1470 (100 ng/1h) vorbehandelt, gefolgt von einer DMSO- (Kontrolle) oder PMA-Stimulation. Die Transportaktivität wird mittels Transport-Assay ermittelt (Abbildung 38).

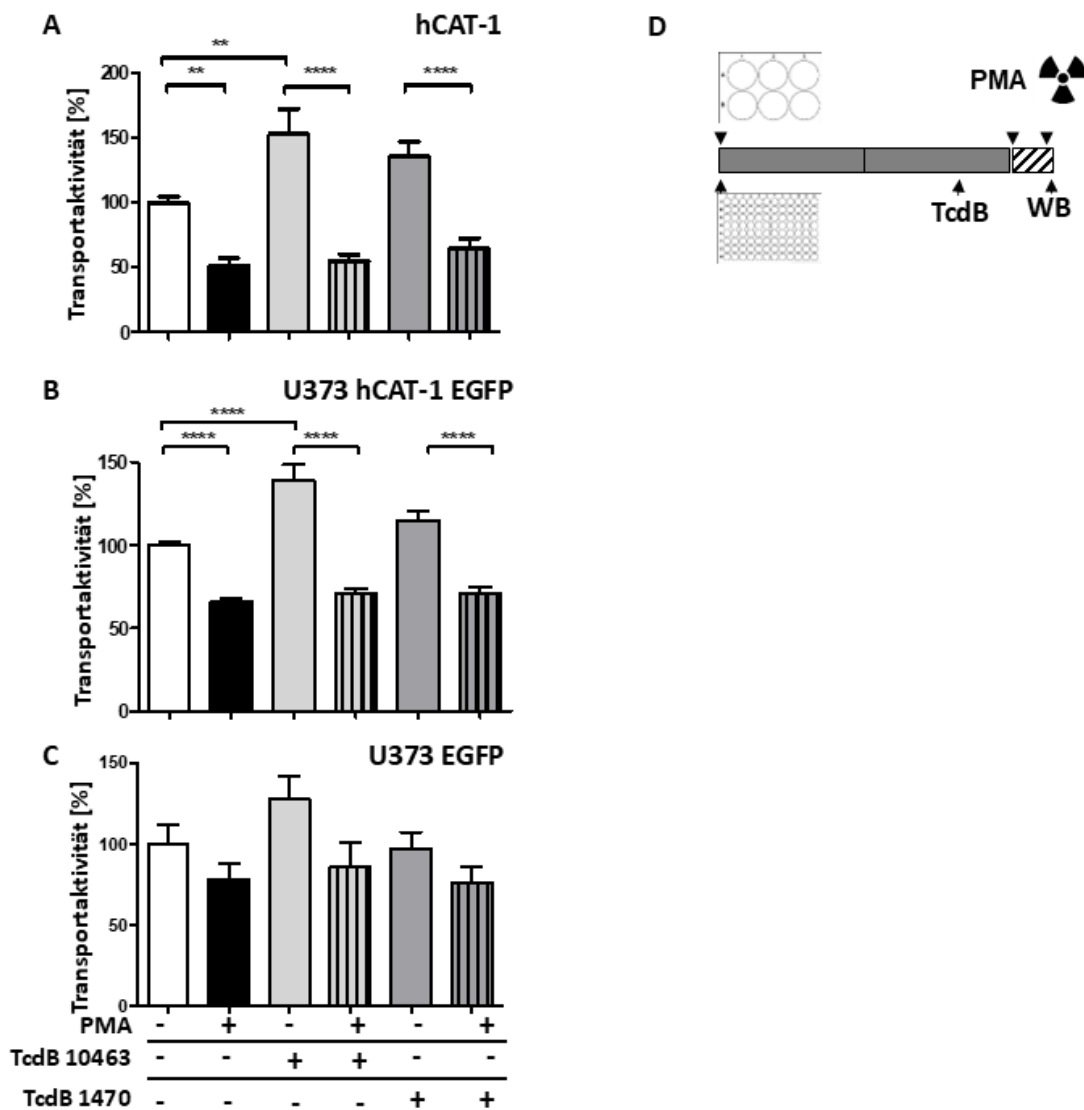


Abbildung 38. Auswirkung der TcdB 10463 und 1470 auf das Transportverhalten von hCAT-1

(A-C) Aufnahme von 0,1 mM Arginin (5 μ Ci/ml) in U373 hCAT-1 EGFP (Klon3) Zellen und U373 EGFP (Klon 6) Kontrollzellen mit und ohne TcdB (100 ng/ml, 1h) und mit und ohne PMA-Stimulation. Die Zellen wurden genauso behandelt, wie in Abbildung 20 beschrieben. (A) Netto-Transport durch hCAT-2A errechnet aus der Differenz (B) U373 hCAT-2A EGFP-Zellen (C) U373 EGFP-Zellen. (Gesamttransport: 100 % = $0,137 \pm 0,005$; gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM, N = 12, Kontrollzelllinie: 100 % = $0,067 \pm 0,003$; gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM, N = 12, Netto-Transport ergibt sich aus der Differenz). Statistische Analysen erfolgten mittels One-Way ANOVA-Varianztest gefolgt von einem Bonferroni Post-Test. Verglichen wurden - vs. + PMA, - vs. TcdB 10463/-, - vs. TcdB 1470/-, TcdB 10463/- vs. TcdB 10463/+, TcdB 1470 /- vs. TcdB 1470 /+. Signifikanzen: $p > 0,0001$:****, $p > 0,001$: **, nicht signifikante Veränderungen sind nicht extra gekennzeichnet. (D) Skizze des Versuchsaufbaus

Bei Behandlung von U373 hCAT-1 EGFP-Zellen mit PMA und nach Abzug des Transportes der Kontrollzellen U373 EGFP kam es zu einer Reduktion der Transportaktivität auf 44,4 %. Unter Zugabe von TcdB 10463 wurde die Transportaktivität deutlich (auf 144 %) erhöht. Wurden PMA und TcdB 10463 kombiniert, kam es zu einer Reduktion der Transportleistung auf 56%.

Ähnlich ist das Ergebnis mit TcdB 1470. Das Toxin erhöhte die Transportaktivität auf 128 % im Vergleich zur Kontrolle. Mit PMA-Stimulation senkte die Leistung des hCAT-1 dann auf 61 %.

Gesamttransport in U373 hCAT-1 EGFP-Zellen verhält sich vergleichbar. Auch hier führt die Zugabe der Toxine zu einer Steigerung der Transportaktivität, Toxine und PMA in Kombination reduzieren die Transportaktivität auf 68 % (Abbildung 38 B).

Werden U373 EGFP ohne überexprimierten hCAT-1 eingesetzt, bleibt das Ergebnis an sich vergleichbar, allerdings wird die Inhibition des Transporters weniger stark sichtbar (nur PMA; Reduktion auf 78 %), die Aktivierung mit TcdB 1470 unterbleibt. Im Gegensatz zu den anderen getesteten Systemen in diesem Versuchsansatz, wird ohne PMA nur eine Transportleistung von 91 % im Vergleich zur Kontrolle erreicht. Mit PMA wird diese nochmals auf 72,7 % reduziert. Allerdings sind diese Ergebnisse nicht signifikant (Abbildung 38 C).

Die Hemmung aller drei Rho-GTPasen aber auch die Hemmung von Rac1/Cdc42 führte zu einem signifikanten Anstieg (ca. 150 %) des Transportes sowohl im Gesamt- als auch im hCAT1-Netto-Transport. Im Gegensatz zum hCAT-2A verhinderte diese Hemmung den PMA-Effekt nicht, es verstärkte diesen sogar noch (Abbildung 38). Ähnlich zu den Experimenten in den *Xenopus*-Oozyten, scheinen Rho-GTPasen in Bezug auf hCAT-1 eine andere Rolle zu spielen, als es bei dem hCAT-2A der Fall ist.

Hemmbarkeit des Transportes nach Herunterregulation von Cdc42

Für hCAT-1 steht eine gut etablierte Zelllinie, die humane Endothelzelllinie EA.hy 926 (Edgell et al., 1983), zur Verfügung, die es ermöglicht den endogenen hCAT-1 zu untersuchen (Jaenecke, 2012). Zusätzlich zum hCAT-1 exprimierten diese Zellen auch die Transporter des γ^+ L-System (γ^+ LAT-1, -2), die sich durch Zugabe von 2 mM Leucin in der Aufnahme-Lösung hemmen lassen. Nachfolgende Experimente wurden in den Endothelzelllinie EA.hy 926 durchgeführt. Die Differenz zwischen Gesamttransport und γ^+ -Transport ergab den über γ^+ L-Transport gewährleisteten Transport.

Die EA.hy 926 Zellen wurden auf 6-Well Platten ausgesät und nach 24 h mit 15 nM siRNA gegen Cdc42 transfiziert. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen von 6-Well Platte auf 96-Well Platten überführt und nach weiteren 24 h Inkubation der Arginintransport gemessen.

Die Kontrolle der Proteinexpression über den in Abbildung 39 E dokumentierten Western-Blot zeigt die herunterregulierte Expression von Cdc42 durch die Behandlung der Zellen mit Cdc42-siRNA. Expression von hCAT-1 wurde durch die Herunterregulation von Cdc42 nicht beeinflusst.

Der gesamte Arginintransport und der γ^+ -vermittelte Transport wird unter Zugabe von PMA in Anwesenheit von Cdc42 und unter Herunterregulierter Cdc42-Expression bestimmt. Die EA.hy 926 Zellen zeigen unter Cdc42-Präsenz (Gesamttransport) eine Reduktion der hCAT-1-Aktivität um 50 % durch PMA. Wurde die Rho-GTPase Cdc42 herunterreguliert, lag die gemessene Transportaktivität bei 73 % im Vergleich zur Kontrolle, der PMA-Effekt blieb unverändert (ca. 50 %). Auch nach Differenzierung in Ansätze mit γ^+L und γ^+ -vermittelten Transport ergab sich ein ähnliches Bild. Die Kontrollzellen (mit Cdc42) zeigten nach PMA-Behandlung eine Reduktion der γ^+ -Transportaktivität der um gut 50% im Vergleich zur Kontrolle. Die mit siRNA (Cdc42) transfizierten Zellen zeigten einer verminderten γ^+ -Ausgangstransportaktivität (zwischen 70 – 80 %) und unter PMA-Stimulation fielen die Werte auf ca. 53 %. Die Ergebnisse des γ^+L -Transportes zeigen ein ähnliches Bild mit dem Unterschied, dass der PMA-Effekt stärker (39 %) ausgeprägt ist und der γ^+L -Transport nach PMA-Behandlung nicht mehr signifikant gesenkt wurde, im Vergleich zu γ^+ -Transportverhalten.

Diese Ergebnisse zeigten, dass Cdc42 *per se* einen hemmenden Effekt auf beide Systeme hat.

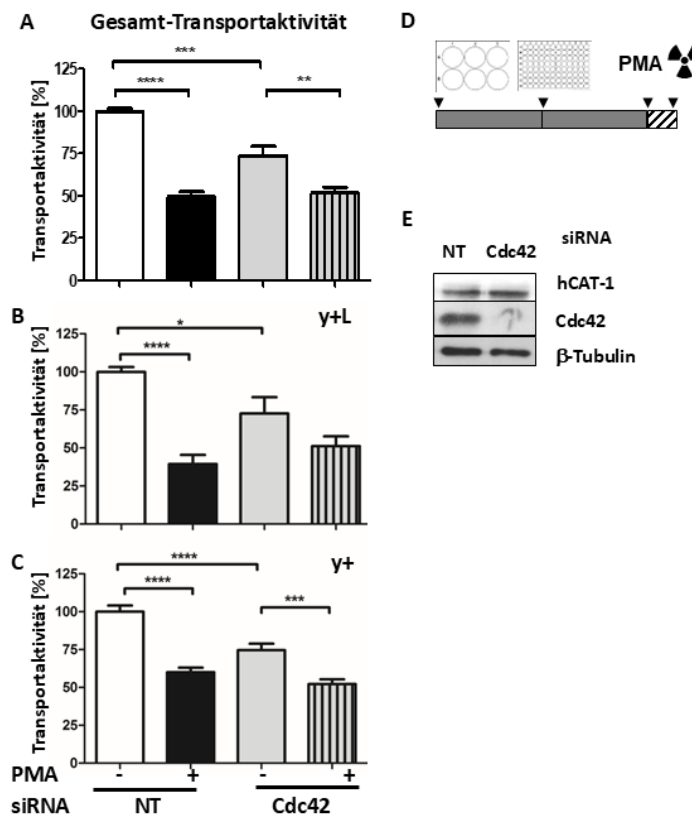


Abbildung 39. Transportverhalten von y^+ und y^+L Transportsystemen in EA.hy 926-Zellen nach Cdc42 Herunterregulation und PKC-Aktivierung

Aufnahme von 0,1 mM [3H]Arginin [10 μ Ci/ml] in An- (+) bzw. Abwesenheit (-) von 1 mM Leucin in EA.hy926-Zellen, die zwei Tage zuvor auf 6-Well Platten mit siRNA gegen Cdc42 oder non-target RNA (NT) transfiziert und nach 24 h auf 96-Well Platte ausgesät worden waren. 30 min vor dem Transport-Assay wurden diese Zellen mit 0,1% DMSO bzw. PMA (100 nM) behandelt. (A) Gesamttransport in EA.hy 926 Zellen: Werte ermittelt in Abwesenheit von Leucin. (B) y^+L System: errechnet aus der Differenz zwischen ohne und mit Leucin erhaltenen Werten. (C) y^+ System: Werte bestimmt in Anwesenheit von 1 mM Leucin. (E) Überprüfung der Herunterregulation von Cdc42 in EA.hy926 Zellen: Werte ermittelt in Abwesenheit von Leucin. (repräsentativer Western-Blot, Verwendung der AK nach Protokoll). (Gesamttransport: 100 % = $0,148 \pm 0,004$; gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM, N = 12-20; , y^+ : 100% = $0,060 \pm 0,002$, gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM, N=12-20, y^+L : 100% $0,088 \pm 0,002$ N=12-20).). Statistische Analysen erfolgten mittels One-Way ANOVA-Varianztest gefolgt von einem Bonferroni Post-Test. Verglichen wurden NT - vs. + PMA, NT- vs. siCdc42/-, siCdc42/- vs. SiCdc42 /+PMA. Signifikanzen: $p > 0,0001$:****, $p > 0,001$:***, $p > 0,01$:**, $p > 0,05$:*, nicht signifikante Veränderungen sind nicht extra gekennzeichnet. (D) Skizze des Versuchsaufbaus.

Diese Ergebnisse zeigen wiederum, dass der hCAT-1, der in dieser Zelllinie als einziger Vertreter der CATs exprimiert wird, stärker als der hCAT-2A auf PMA-Stimulation reagiert. Obwohl diese Zelllinie eine vergleichsweise hohe Menge an endogenem Cdc42 exprimiert (Abbildung 14), ist hier möglicherweise nicht nur Cdc42 alleine für den PKC-vermittelten Effekt verantwortlich.

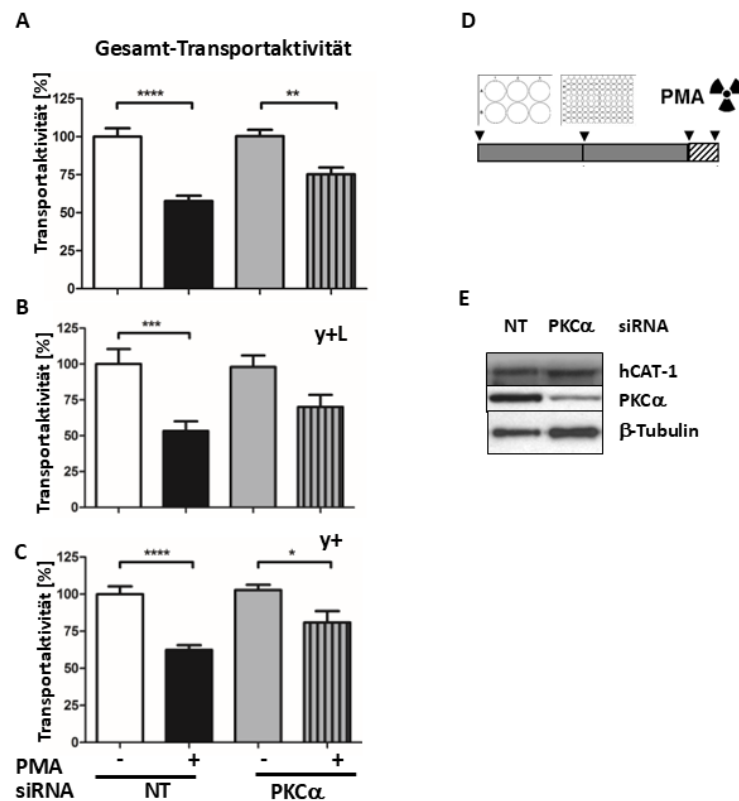
Beteiligung der PKC α 

Abbildung 40. Transportverhalten von y^+ und y^+L Transportsystemen in EA.hy 926-Zellen nach PKC α Herunterregulation mit und ohne PMA-Inkubation

Aufnahme von 0,1 mM [3H]Arginin [10 μ Ci/ml] in An- (+) bzw. Abwesenheit (-) von 1 mM Leucin in EA.hy926-Zellen die zwei Tage zuvor auf 6-Well Platten mit siRNA gegen PKC α transfiziert und nach 24h auf 96-Well Platte ausgesät worden waren. 30 min vor dem Transport-Assay wurden diese Zellen mit DMSO bzw. PMA (100 nM) behandelt. (A) Gesamttransport in EA.hy 926 Zellen: Werte ermittelt in Abwesenheit von Leucin. (B) y^+L System: errechnet aus der Differenz zwischen ohne und mit Leucin erhaltenen Werten. (C) y^+ System: Werte bestimmt in Anwesenheit von 1 mM Leucin. (Gesamttransport: 100 % = $0,129 \pm 0,005$; N = 12-20; y^+ : 100 % = $0,060 \pm 0,002$, gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM, N = 12-20, y^+L : 100 % $0,069 \pm 0,003$, gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM, N=12-20). Statistische Analysen erfolgten mittels One-Way ANOVA-Varianztest gefolgt von einem Bonferroni Post-Test. Verglichen wurden NT - vs. + PMA, NT- vs. siPKC α /-, siPKC α /- vs. siPKC α /+PMA. Signifikanzen: $p > 0,0001$:****, $p > 0,001$:***, $p > 0,01$:**, $p > 0,05$:*, nicht signifikante Veränderungen sind nicht extra gekennzeichnet. (D) Skizze des Versuchsaufbaus. (E) Überprüfung der Herunterregulation des PKC α Proteins. Gezeigt ist ein repräsentativer Western-Blot mit 12,5 %igem SDS-Gel, anti-CAT-1 (1:10000, AG).

Um zu überprüfen, ob die α -Isoform der PKC auch im Zellsystem EA.hy 926 eine entscheidende Rolle in der PMA-induzierten Hemmung des Arginintransports spielt, wurde der Proteingehalt von PKC α mittels siRNA herunterreguliert und anschließend mit PMA behandelt (Abbildung 40).

Die α -Isoform scheint nicht die einzige Isoform zu sein, die am PMA-Effekt beteiligt ist. Eine geringe Menge an Restprotein reicht aus, um den in Abbildung 40 A gezeigten Effekt zu erzeugen. Die Reduktion ist weniger ausgeprägt, aber dennoch signifikant. Im γ^+L -System wird nach PMA-Behandlung in Zellen mit reduziertem PKC α ebenfalls eine Abnahme beobachtet, jedoch ist dieser Effekt nicht signifikant. Die Publikation von Xu et al. (2008) zeigt die Verteilung der PKC-Isoformen in EA.hy-Zellen. Somit könnten auch die β - und ϵ -Isoformen eine Rolle spielen.

Überprüfung der Beteiligung der ACK1 (*Activated Cdc42-associated Kinase 1*)

Die Reduktion von Cdc42 allein war ausreichend, um die Transportraten zu verringern, obwohl dies den PMA-Effekt nicht aufhob. Daher stellte sich die Frage, ob beide Wege über eine gemeinsame Signalkaskade verlaufen könnten. Es lag nahe, dass ACK1 als direktes Substrat von Cdc42 beteiligt sein könnte. Die gemeinsame Publikation mit Vina-Vilaseca et al. (2011) zeigt, dass bei der Herunterregulation von hCAT-1 nach PKC-Aktivierung ein Protein beteiligt sein könnte, das NEDD4-1 bzw. NEDD4-2 E3 Ubiquitin-Ligase benötigt, um über den Clathrin-abhängigen Endozytoseweg zu internalisieren. Diese Anforderungen erfüllt ACK1.

Um zu überprüfen, ob ACK1 eine Funktion in der Regulation in diesem Zellsystem übernimmt, wurde die ACK1-Proteinmenge mittels siRNA herunterreguliert und anschließend der Arginin-Transport gemessen. Es konnte jedoch keine Beteiligung von ACK1 am PMA-Effekt festgestellt werden (Abbildung 41). Die Ergebnisse legen nahe, dass die Wahl des Zellsystems einen entscheidenden Faktor für die beobachteten Transporterfunktionen darstellt.

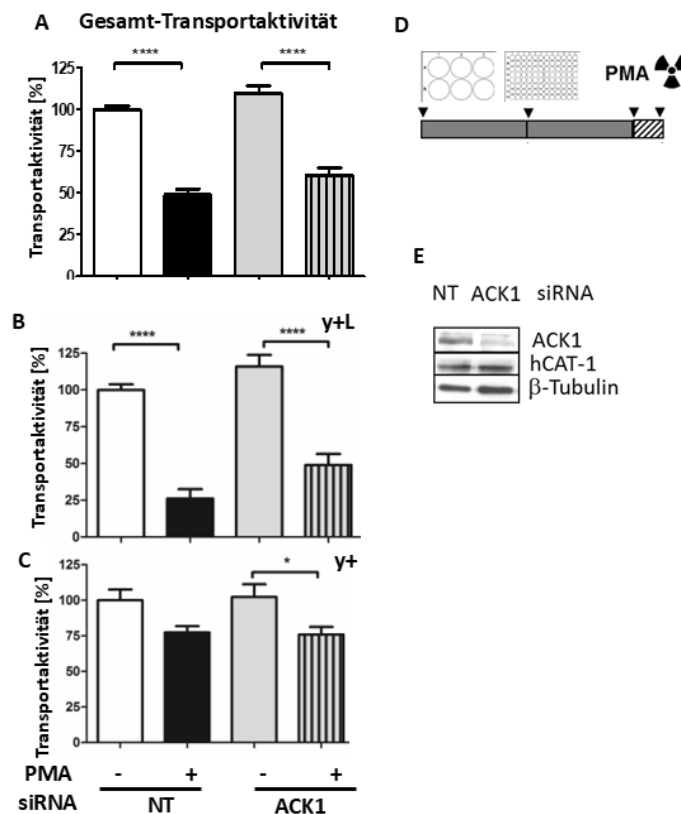


Abbildung 41. Transportverhalten von y^+ und y^+L Transportsystemen in EA.hy 926-Zellen nach ACK1 Herunterregulation und PKC-Aktivierung

Aufnahme von 0,1 mM [3H]Arginin [5 μ Ci/ml] in An- (+) bzw. Abwesenheit (-) von 1 mM Leucin in EA.hy 926-Zellen die zwei Tage vorher auf 6-Well Platten mit siRNA gegen ACK1 transfiziert worden waren und nach 24h auf 96-Well Platte ausgesät wurden. 30 min vor dem Transport-Assay wurden diese Zellen mit DMSO bzw. PMA (100nM) behandelt. (A) Gesamttransport in EA.hy 926 Zellen: Werte ermittelt in Abwesenheit von Leucin. (B) y^+L System: errechnet aus der Differenz zwischen ohne und mit Leucin erhaltenen Werten. (C) y^+ System: Werte bestimmt in Anwesenheit von 1 mM Leucin. (Gesamttransport: 100 % = $0,128 \pm 0,006$; N = 12-16; y^+ : 100 % = $0,058 \pm 0,002$, gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM, N = 12 - 16, y^+L : 100 % $0,070 \pm 0,004$, gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM, N = 12 - 16). Statistische Analysen erfolgten mittels One-Way ANOVA-Varianztest gefolgt von einem Bonferroni Post-Test. Verglichen wurden NT - vs. + PMA, NT- vs. siACK1/-, siACK1/- vs. SiACK1/+PMA. Signifikanzen: $p > 0,0001$:****; $p > 0,05$: *, nicht signifikante Veränderungen sind nicht extra gekennzeichnet. (D) Skizze des Versuchsaufbaus. (E) Überprüfung der Herunterregulation des ACK1 Proteins. Gezeigt ist ein repräsentativer Western-Blot mit 12,5 %igem SDS-Gel, anti-CAT-1 (1:10000, AG)

5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, ein besseres Verständnis über die Regulation der humanen kationischen Aminosäuretransporter (hCATs), Mitglieder der SCL7-Transporter-Familie, zu erhalten. Im Fokus stand die Untersuchung der Regulation der Transportaktivität nach Aktivierung der Proteinkinase C (PKC). Obwohl die Wirkung von PKC auf Plasmamembranproteine seit langem bekannt ist, sind die genauen Mechanismen, insbesondere in Bezug auf Transporter, noch weitgehend ungeklärt. Die Regulation der Transportaktivität durch PKC, vor allem in Bezug auf die Transporter-Expression an der Zelloberfläche, ist bis heute größtenteils unbekannt.

Zahlreiche Publikationen haben sich mit der Frage wie PKC-Membranproteine beeinflusst, beschäftigt. Auch für die hCATs waren bereits verschiedenste Teilaspekte der Regulation bekannt, jedoch blieb der genaue Ablauf dieser Prozesse weiterhin unklar. Zu den offenen Fragestellungen gehörten beispielsweise die Ubiquitynylierung, die Beteiligung von Phosphatasen, die Verlagerung von Transportern innerhalb der Plasmamembran, sowie Interaktionen mit Adapterproteinen oder auch die Beteiligung anderer Proteine wie Tyrosinkinasen oder Rho-GTPasen.

Diese Arbeit fokussiert sich auf die Rolle von Rho-GTPasen bei der nach PKC-Aktivierung erfolgenden schnellen Reduktion der Transportaktivität der hCATs, die auf einer verminderten Expression in der Plasmamembran beruhen. Rho-GTPasen sind bekanntermaßen an der Regulation des Zytoskeletts beteiligt und beeinflussen über Aktin verschiedene Endozytosewege. Zudem sind sie Teil verschiedener Signalwege, die langfristige Effekte, wie beispielsweise veränderte Genexpression, auslösen können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch ausschließlich die kurzzeitige Veränderung der Transportaktivität in Bezug auf die Beteiligung von Rho-GTPasen und anderer nachgeschalteter Proteine detaillierter untersucht.

5.1 Bisherige Erkenntnisse zur hCAT-Regulierung

Frühere Studien deuten darauf hin, dass eine PKC-Aktivierung verschiedene zelluläre Prozesse beeinflussen kann, darunter die Ubiquitynylierung von Proteinen (Barthelemy and André, 2019; Vina-Vilaseca et al., 2011), die Verlagerung von Transportern in spezifische Plasmamembranbereiche wie *Lipid Rafts* (Gabriel et al., 2013) und die Modulation von Interaktionen mit Adapterproteinen (Boudanova et al., 2008). Darüber hinaus könnten auch andere

Signalmoleküle wie Tyrosinkinasen (Wu et al., 2016) und Rho-GTPasen (Brandt et al., 2002; Kurokawa et al., 2004; Mehta et al., 2001; Morishita and Nurse, 2023; Nomura et al., 2007a; Peterson et al., 2006; Ridley, 2006, 2001; Tatin et al., 2006; Wolfgang et al., 2003) an der Regulation von Transportern beteiligt sein. Ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit war es, die Rolle von Rho-GTPasen bei der PKC-induzierten Verminderung Plasmamembran-Expression von hCATs zu untersuchen. Rho-GTPasen sind an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt, darunter die Regulation des Zytoskeletts und die Modulation verschiedener Signalwege, die langfristige Effekte wie die Transkription von Proteinen induzieren können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch der Schwerpunkt auf kurzfristige Veränderungen der kationischen Transportaktivität der hCATs gelegt.

Die Veränderung der subzellulären Lokalisation von Transportern ist ein wichtiger Regulationsmechanismus über welchen indirekt ihre Aktivität reguliert werden kann. Grundsätzlich kann zwischen der basalen und induzierten Internalisierung von Transportern unterschieden werden. Die basale Internalisierung der Plasmamembran ist ein eher langsamer und konstanter Prozess, der mit dem Recyclingmechanismus im Gleichgewicht steht. Die induzierbare Internalisierung ist eher schnell und reversibel, d.h. dass sich der inhibierende Effekt nach einiger Zeit wieder normalisiert. Eine weitere Möglichkeit der induzierbaren Regulation ist die Verschiebung membranständiger Transportproteine in bestimmte Areale der Plasmamembran, sodass die Proteine zwar an der Zelloberfläche verbleiben, aber reduzierte Transportaktivität vorweisen (Liu et al., 2018; Rotmann, 2004). Die Aktivität der Transporter kann durch verschiedenste Mechanismen reguliert werden, darunter Internalisierung durch Endozytose, Recycling, Exozytose aber auch Konformationsänderungen oder das Fehlen von z.B. Cholesterin (Liu et al., 2018). Diese Mechanismen befinden sich in einem dynamischen Gleichgewicht, das durch das zelluläre Umfeld beeinflusst wird. Je nach Art der Aktivierung oder Hemmung, verschiebt sich dieses Gleichgewicht, was zu einer Veränderung der Transportaktivität führt.

Es wichtig zu beachten, dass die Anzahl an der Zelloberfläche exprimierter Transporterproteine, nicht zwangsläufig mit der Transportaktivität korreliert, (Beyer et al., 2013; Rotmann, 2004). Jungnickel et al. (2018) konnte zeigen, dass der humane kationische Aminosäuretransporter 1 (hCAT-1) das Binden von Cholesterin benötigt, um seine volle Transportaktivität entfalten zu können. Dies kann Grundlage der Annahme sein, dass bei einer Lokalisation des hCAT

in einer Region der Plasmamembran mit geringer oder fehlender Cholesterinkonzentration dieser eine verminderte Transportaktivität aufweist.

5.2 Erkenntnisse aus dem *Xenopus laevis* Oozyten-Expressionssystem

Die Rho-GTPase Cdc42 beeinflusst den Arginintransport durch hCATs, ähnlich wie PKC Hypothese eines gemeinsamen Regulationsweges

Durch bereits publizierte Ergebnisse bestand ein umfangreicher Überblick über die Einflüsse auf die hCATs, vor allem über den negativen Einfluss der PKC auf die Transportaktivität (Gräf, 1998; Rotmann, 2004; Rotmann et al., 2006). Die Herunterregulation der Transportaktivität ist auf die verminderte Oberflächenexpression zurückzuführen. Diese wird sowohl bei CAT-1 als auch bei CAT-3 (in unterschiedlichem Ausmaß) herunterreguliert (Rotmann et al., 2006, 2004). Dieser kurzzeitige Effekt ist reversibel und lässt sich wahrscheinlich auf die Veränderung bzw. Verstärkung der induzierbaren Endozytose zurückzuführen. Wichtige Akteure der Endozytose, vor allem der Clathrin-unabhängigen Endozytose, sind die kleinen G-Proteine, die Rho-GTPasen Cdc42, Rac1 und RhoA, deren Rolle in der Modulation der Transportaktivität in anderen Systemen beschrieben wurden (Krotova et al., 2003). Rho-GTPasen selbst können nach PKC-Aktivierung in unterschiedlichen Systemen aktiv werden (Kurokawa et al., 2004; Sewald et al., 2011; Tatin et al., 2006).

Konstitutiv aktives Cdc42V12 und eine Aktivierung von PKC hatten qualitativ und quantitativ dieselben Auswirkungen auf humane CATs: Sie bewirkten je nach Isoform eine unterschiedlich starke Hemmung der Transportaktivität (Abbildung 3 und 6). Ursache war eine Expressionsabnahme der Transporter in der Plasmamembran (für Cdc42V12 nur für hCAT-2A gezeigt, Abbildung 9). Die Effekte beider Mediatoren ließen sich durch *Clostridium difficile*-Toxine hemmen, die Rho-GTPasen inhibieren. Dies legte die Vermutung nahe, dass der PKC-Effekt über eine Aktivierung von Cdc42 vermittelt wird. Allerdings ließ sich der PKC-Effekt nicht durch die dominant negative Mutante Cdc42N17 hemmen (Abbildung 10). Umgekehrt ließ sich der Cdc42V12-Effekt auch nicht mit einem PKC-Inhibitor BIM II hemmen (Abbildung 13).

Die Ergebnisse sprechen demnach dafür, dass beide Mediatoren unabhängig voneinander agieren. Dies wird auch durch die Beobachtung gestützt, dass PMA und Cdc42V12 einen additiven Effekt zeigen (Abbildung 10). Die Aktivierung von PKC und Cdc42 scheint in einen gemeinsamen Signalweg zu münden, der durch die *C. difficile*-Toxine gehemmt werden kann. Welcher Signalweg dies sein könnte, bleibt bisher ungeklärt.

RhoA kann ausgeschlossen werden, da es durch Tcd1470 nicht gehemmt wird und seine konstitutiv aktive Form keinen hemmenden Effekt zeigte (Abbildung 5). Konstitutiv aktives Rac1V12 hatte auf hCAT-2A einen schwächeren und auf hCAT-1 gar keinen inhibitorischen Effekt (Abbildung 5). Die dominant negative Mutante von Rac1N17 schien den durch PMA erzeugten Effekt abzuschwächen. Allerdings beruhte dieser Effekt vor allem darauf, dass auch diese Mutante die Transportaktivität von hCAT-2A bereits ohne PMA-Behandlung verminderte. Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass Rac1 möglicherweise nicht die erwartete notwendige Funktion im PKC-Signalweg und der Transporterinternalisierung erfüllt (Abbildung 11).

Interessanterweise hemmte Tcd1470 ebenso den Effekt von Cdc42V12, obwohl diese konstitutiv aktive Mutante nicht durch das Toxin gehemmt werden sollte. Die Publikation von Camli et al. (2025) zeigt zwar, dass die TcdB Toxine auch die aktive GTP-gebundene Form der Rho-GTPasen binden können, jedoch mit geringerer Affinität. Hier wird außerdem bestätigt, dass TcdB die inaktive GDP-gebundene Rac1 Form mit größter Affinität bindet. Dies ist ein weiterer Hinweis auf eine Toxin-empfindliche, noch nicht identifizierte zelluläre Komponente, über die sowohl PKC als auch Cdc42 wirken.

Die Beobachtung, dass der PKC-Inhibitor BIM II den Cdc42V12-Effekt in unserem *Xenopus*-Zellsystem nicht aufheben konnte, deutet darauf hin, dass im Gegensatz zu den Ergebnissen von Slater et al. (2001) keine PKC-Aktivierung durch Rho-GTPasen stattfindet. Es ist jedoch wichtig zu beachten, dass Slater et al. (2001) mit rekombinanten Proteinen und nicht mit Überexpression gearbeitet haben, was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse einschränkt.

Die kurzzeitige Inhibierung der Rho-GTPasen Cdc42, Rac1 und RhoA durch das TcdB 10463-Toxin führte zur Aufhebung des PKC-Effekts, ohne selbst (ohne PKC-Aktivierung) einen Einfluss auf die Transportaktivität auszuüben. Ein ähnlicher Effekt wurde bei der Inhibierung von Cdc42 und Rac1 durch TcdB 1470 beobachtet (Abbildung 4). Dies deutet darauf hin, dass die basale Internalisierung der Transporter von Aktivität dieser Rho-GTPasen nicht beeinflusst wird, die induzierbare Internalisierung wahrscheinlich ohne die Aktivität von Rho-GTPasen jedoch nicht möglich ist. Es ist denkbar, dass ein Adapterprotein involviert ist, das sowohl PKC als auch die Rho-GTPasen bindet.

Die Überexpression aktiver Mutanten von Rac1 und RhoA führte zu unterschiedlichen Effekten, sowohl im Vergleich zueinander als auch in Bezug auf hCAT-1 und hCAT-2A. Der

Transporter hCAT-1 zeigte eine geringere Sensitivität gegenüber diesen Einflüssen, was sich auch in einer reduzierten Hemmung nach PKC-Aktivierung im Vergleich zu anderen hCAT-Isoformen widerspiegelte. Die Überexpression von konstitutiv aktivem RhoA (langfristige Stimulation) hatte keine Auswirkungen auf die Aktivität beider Transporter (hCAT-1 und hCAT-2A, Abbildung 5). In Übereinstimmung mit Stenger (2012) zeigte die Verwendung dominant-negativer Rho-GTPase-Mutanten einen weiterhin vorhandenen PMA-Effekt (Abbildung 10, Dissertation Stenger, 2012).

Ergebnisse dieser Arbeit im *X. laevis* Oozyten Transportsystem haben zum einen bewiesen, dass nach Co-Expression mit konstitutiv aktiven Mutanten Cdc42V12 oder Rac1V12, ähnlich der PKC-Aktivierung, die hCAT-2A-Transportaktivität herunterreguliert wird.

Die Ergebnisse der Oberflächenexpression von hCAT-2A zeigten, dass die konstitutiv aktive Mutante Cdc42V12 die Oberflächenexpression reduziert, sodass Transporterproteine vermehrt im Zellinneren nachzuweisen sind. Dies verstärkt den Hinweis auf eine Internalisierung der Transporter. Im Experiment blieb die Gesamtproteinmenge der Transporter gleich, die ermittelte Aktivität nahm dagegen ab (siehe Abbildung 9). Eine Kombination von konstitutiv aktiven Cdc42 mit PKC-Aktivierung verstärkte diesen Effekt (Abbildung 10), ein Hinweis darauf, dass verschiedene Wege die Lokalisation des Transporters gleichsam beeinflussen (Wu et al., 2015). Der Einsatz des PKC-Inhibitors BIM in Co-Expression mit Cdc42V12 bestätigt dieses Ergebnis: der Effekt durch Cdc42V12 konnte durch den PKC-Inhibitor BIM nicht aufgehoben werden (Abbildung 13). An dieser Stelle könnte man annehmen, dass der PKC-induzierte (kurzzeitige) negative Effekt durch die verstärkte Internalisierung bzw. Endozytose des Transporters erfolgt. Die Überexpression bzw. Co-Expression der konstitutiv aktiven Mutante Cdc42V12 ist im Gegensatz zum Einsatz von Aktivatoren wie PMA oder Inhibitoren wie BIM oder Toxine, eher langfristig und verstärkt wahrscheinlich die basale Clathrin-unabhängige Endozytose, ähnlich wie es in verschiedenen Publikationen bereits beschrieben wurde (Francia, 2018; Mosesson et al., 2008). Ein Einfluss des Recyclingprozesses bzw. des Wiedereinbaus von intrazellulären Vesikeln in die Plasmamembran, der durch Cdc42 verlangsamt werden könnte kann basierend auf den bisherigen Versuchsergebnissen jedoch auch nicht ausgeschlossen werden.

Jede der vier hCAT-Isoformen reagierte in ähnlicher Ausprägung gleichsam auf die Aktivierung von PKC, und auf die Überexpression von Cdc42V12 (Abbildung 6). Dies stärkt die Vermutung,

dass die Beeinflussung bzw. Herunterregulation der Transportaktivität bei allen vier Isoformen über ähnliche Prozesse abläuft. Obwohl sich die Isoformen der hCATs in ihren Eigenschaften unterscheiden, lassen sich die Erkenntnisse aus den hCAT-2A Experimenten auf andere Isoformen oder gar auf andere Transporter übertragen. Geyer (2016) wies den Cdc42V12-Effekt an γ^+ LATs nach, der einen ähnlichen Effekt zeigt, wie die im Rahmen dieser Doktorarbeit ermittelten Daten.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Rho-GTPase Cdc42 im Oozyten-System einen unterschiedlich starken Einfluss auf jede der vier hCAT-Isoformen ausübt, jedoch über einen ähnlichen Weg der Internalisierung erfolgt (vereinfachtes Regulationsschema, Abbildung 42). Obwohl die Hemmung mit Toxinen darauf hindeutet, dass PKC über die Aktivierung einer Rho-GTPase wirkt, und Rho-GTPasen einen gemeinsamen Signalweg nutzen, konnte dies durch den Einsatz von dominant-negativen Mutanten der verwendeten Rho-GTPasen nicht bestätigt werden. Der PKC-Effekt auf die Transportaktivität hat sich durch den Einsatz dieser dominant-negativen Mutanten nicht hemmen lassen. Die Funktionalität dieser wurde jedoch nicht überprüft. Die Beobachtung von (Ruchhoeft et al., 1999) konnten allerdings zeigen, dass diese Mutanten, obwohl sie Mutanten humaner Proteine sind, auch die endogenen Rho-GTPasen in *Xenopus laevis* inhibieren. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass diese auch in *Xenopus laevis*-Oozyten ihre Wirksamkeit zeigen. Die Publikation von Hippenstiel et al. (1998) zeigt, dass das Toxin TcdB 10463, das alle drei Rho-GTPasen hemmen kann, auch die PKC-Aktivierung selbst hemmen kann. Ob die beiden Toxine, die hier zum Einsatz kamen, in *X. laevis* Oozyten ebenfalls zu Hemmung der PKC-Aktivierung, führen, wurde nicht untersucht. Jedoch zeigte keines der beiden Toxine im Oozyten-System einen signifikanten Effekt auf die basalen Transportraten. Es wäre von Interesse, zu untersuchen, ob der Effekt von Rac1V12 auf die Transportaktivität durch den PKC-Inhibitor BIM inhibiert werden kann, um die Hypothese der PKC-Aktivierung durch Rho-GTPasen zu validieren.

Die beiden eingesetzten Toxine (TcdB 10463 und TcdB 1470) hemmen neben den bereits genannten (Cdc42, Rac1 und RhoA) weitere Proteine (Genth et al. 2014). So inhibieren beide Toxine zusätzlich zu Rac1 auch GTPasen TC10 sowie TCL im gleichen Maße. Allerdings wird bei GTPase RhoG, ähnlich der Cdc42, ein unterschiedlicher Inhibierungsgrad beobachtet, wobei TcdB 10463 diese stärker hemmt als TcdB 1470. Im Gegensatz dazu wird die Ras GTPase (H-, N-, K-Ras, R-Ras, -1,-2) und Rap2a und RalC ausschließlich von TcdB 1470 in einem

mäßigen bis schwachen Ausmaß gehemmt, wobei nur TcdB 10463 in der Lage ist, RhoA/B/C GTPasen zu inhibieren. Zudem zeigt sich, dass nach etwa zwei Stunden Behandlung mit TcdB 10463, im Gegensatz zu TcdB 1470, die Expression der Rho-GTPase RhoB erhöht und damit eine stärkere Aktivierung erfolgt. Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass weitere Untersuchungen erforderlich sind, um die Auswirkungen der Toxine auf den Arginintransport und Rolle der Rho-GTPasen darauf besser zu verstehen. Es liegt jedoch nahe, dass nur jene Kandidaten in Betracht gezogen werden, die durch beide Toxine gehemmt werden – es sei denn, die beide Toxine hemmen jeweils unterschiedliche, jedoch für PKC und Cdc42 essenzielle Schritte.

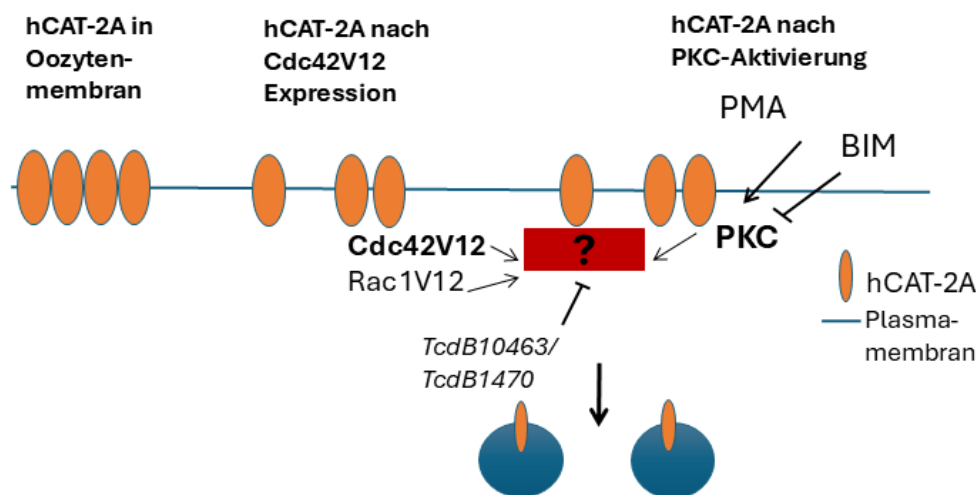


Abbildung 42. Vereinfachte schematische Darstellung der Erkenntnisse aus *X. laevis*-Oozyten. PKC und Cdc42V12 / Rac1V12 verstärken die Internalisierung des hCAT-2A.

Verminderte Expression des hCAT-2A in der Plasmamembran nach PKC-Aktivierung und/oder nach Cdc42V12 Überexpression, vermutlich über einen gemeinsamen TcdB-sensitiven Signalweg. Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass Rho-GTPasen im Rahmender Signalkaskade nicht unterhalb von PKC auf den Transport der hCATs wirken.

5.3 Erkenntnisse aus humanen Zellsystemen

Unterschiedliche Rollen der Rho-GTPasen RhoA, Cdc42 und Rac1 bei der Regulation des hCAT-2A-vermittelten Transports

Nach erfolgreicher Etablierung der humanen Zelllinie U373 als Expressions- und Testsystem, konnte die kurzzeitige und langanhaltende Hemmung der Rho-GTPasen in Bezug auf die

Transportaktivität von hCAT-1 und hCAT-2A untersucht werden. Dies erfolgte durch den Einsatz von TcdB-Toxinen und spezifischen siRNAs.

Generell resultiert die PKC-vermittelte Aktivierung von Transportern in einer Reduktion der Transportaktivität. Eine detaillierte Analyse selbst eng verwandter Transporter offenbart jedoch, dass die Wirkung von PKC selbst zwischen einzelnen Isoformen variieren kann. Diese Beobachtung wurde bereits in Experimenten mit Oozyten-Zellsystemen gemacht (siehe Abbildung 3). Sowohl bei den hCATs als auch in anderen Transporter-Familien variiert die Auswirkung auf die Transportaktivität zwischen den Isoformen. Auch die Auswirkung der Rho-GTPasen scheint sich in der Kombination der interagierenden Mitglieder zu unterscheiden. Die Reaktion auf ein Signal kann je nach Rho-GTPase und deren Konzentration variieren. In den verschiedenen, im Rahmen der Arbeit untersuchten Zelllinien schwankte die Menge an endogenem Cdc42 deutlich (Abbildung 14). Die Unterschiede in der Wirkung von PMA auf hCAT-1 in unterschiedlichen Zelllinien, die von Alexander Rotmann (Rotmann, 2004; Rotmann et al., 2006) beobachtet wurden, könnten eher auf Expressionsunterschiede von PKC zurückzuführen sein und dadurch Auswirkungen auf den Arginintransport haben.

Die kurzzeitige Hemmung (1,5 Stunden) der Rho-GTPasen mit TcdB 10463 Toxin in U373 hCAT-2A EGFP-Zellen, erhöhte den basalen Transport um 45 % und hob den PMA-Effekt nicht auf (Abbildung 20). Hippenstiel et al. (1998) zeigen für TcdB 10463, dass dieses Toxin die Translokation bzw. Aktivierung von PKC durch PMA hemmen kann. Eine zentrale Rolle von RhoA wird dabei postuliert. Ergebnisse im Oozyten-Expressionssystem zeigen, dass die dominant-negative RhoAN19-Mutante den PMA-Effekt nicht aufhebt (Stenger, 2012). Auch verstärkt die konstitutiv aktive RhoAV14-Mutante den PMA-Effekt nicht. Aus diesem Grund wird angenommen, dass RhoA auf die PKC-Aktivierung in *X. laevis* Oozyten keine Auswirkung hatte. Es erscheint plausibel, dass Rac1 an der Aktivierung von PKC beteiligt gewesen sein könnte, da die Inhibition durch TcdB 1470, einem potenten Rac1-Inhibitor (Chaves-Olarte et al., 2003), den PKC-Effekt aufheben konnte (siehe Abbildung 20). Zum Vergleich: den hCAT-1 vermittelten Transport in U373 hCAT-1 EGFP-Zellen erhöhten beide Toxine um 40 – 50 % und keines der beiden verhinderte den PKC-Effekt (Abbildung 34). Demnach scheint TcdB 1470 auf hCAT -2A anders zu wirken als auf hCAT-1. Wie es zu diesem Isoform-spezifischen Effekt von TcdB 1470 kommt, ist bisher nicht geklärt. In der vereinfachten schematischen Skizze (Abbildung 43) sind die Erkenntnisse der Wirkung von beiden TcdB-Toxinen skizziert. Beide Toxine erhöhen den basalen

Transport, jedoch hemmt lediglich das Toxin TcdB 1470 den PKC-vermittelten Effekt auf den hCAT-2A Transport.

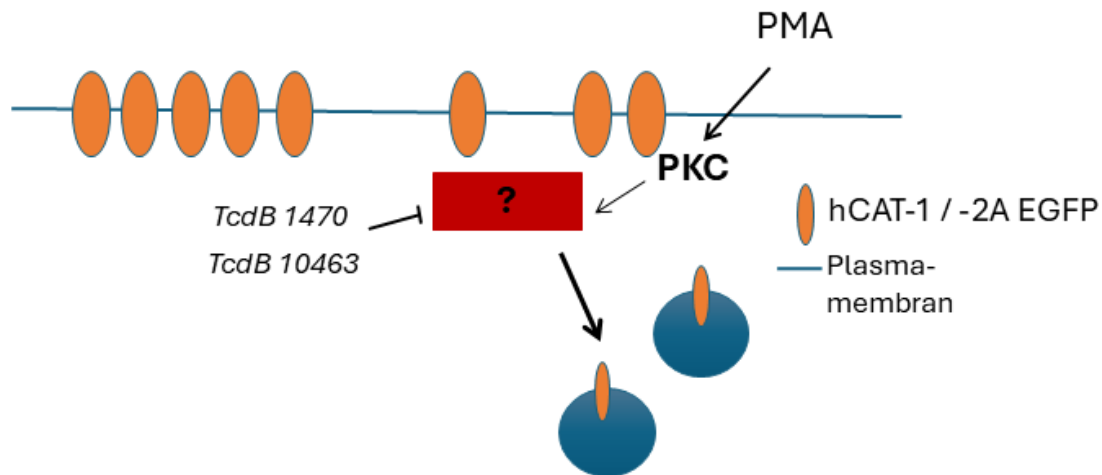


Abbildung 43. Vereinfachte schematische Darstellung der Erkenntnisse und Annahmen der Internalisierung in U373 hCAT-1 EGFP und -2A EGFP-Zellen nach Toxin-Behandlung und PKC-Aktivierung

TcdB 10463 und TcdB 1470 erhöhen den Transport beider Isoformen hCAT-1 EGFP und hCAT-2A EGFP. TcdB 10463 hebt den PKC-Effekt jedoch bei beiden Transportern nicht auf, während TcdB 1470 Toxin die PKC-vermittelte Hemmung des hCAT-2A EGFP-vermittelten Transportes aufhebt, jedoch nicht des hCAT-1 EGFP-Transporters.

Unter Berücksichtigung der siRNA-Experimente, die zur langfristigen Herunterregulation von Cdc42 und Rac1 führen, lässt sich folgendes, in Abbildung 44 skizzierte. Es scheint, dass beide Rho-GTPasen für den PMA-Effekt wichtig zu sein, was mit der TcdB 1470-Wirkung übereinstimmen würde, aber nicht mit der Wirkung von TcdB 10463.

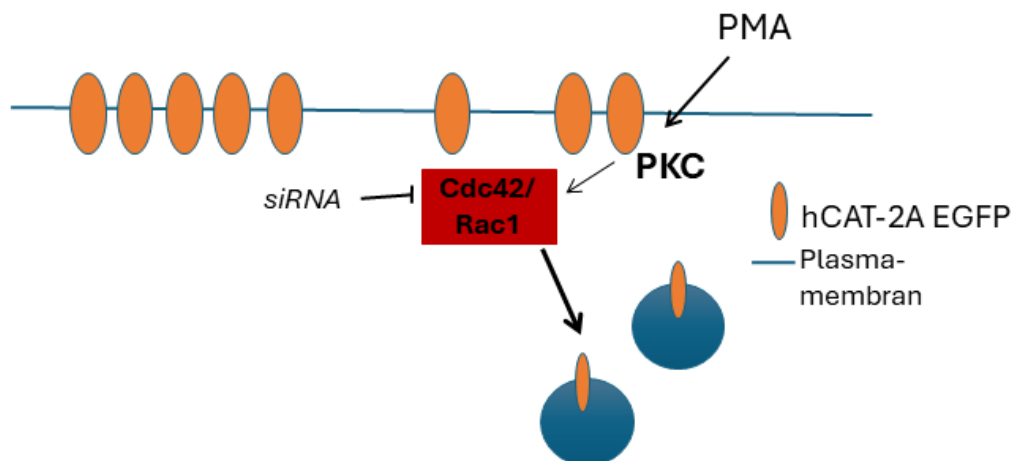


Abbildung 44. Vereinfachte schematische Darstellung der Erkenntnisse und Annahmen aus U373 hCAT-2A EGFP-Experimenten nach Herunterregulation von Cdc42 und Rac1 durch siRNA Transfektion

Aufhebung der verminderten Expression des hCAT-2A EGFP in der Plasmamembran nach PKC-Aktivierung nach Herunterregulation von Cdc42 und Rac1

Die beiden Rho-GTPasen Cdc42 und Rac1 übernehmen nach PKC-Aktivierung eine wichtige Rolle, wobei sie jeweils unterschiedliche Auswirkungen auf Transportraten des hCAT-2A aber auch auf den PKC-Effekt aufwiesen. Herunterregulation von Cdc42 führt dazu, dass der hCAT-2A-vermittelte Transport *per se* nicht gehemmt war, jedoch der PKC-Effekt aufgehoben wurde (Abbildung 21). Im Gegensatz zu Cdc42 führte die Herunterregulation von Rac1 allein zur Hemmung des hCAT-2A-vermittelten Transports, verhinderte aber wie die Cdc42-siRNA eine weitere Hemmung durch PMA (Abbildung 22). Diese Beobachtung wird durch Studien gestützt, die zeigen, dass PMA in Glioblastoma-Zellen zur Aktivierung von Rac1 führt (Nomura et al., 2008, 2007a, 2007b). Offen bleibt allerdings, wie das Fehlen von Rac1, das den negativen Effekt von PKC auf hCAT-2A vermittelt, zur Verminderung des hCAT-2A-Transport führt. In Abbildung 44 sind die Erkenntnisse der Herunterregulation von Cdc42 und Rac1 skizziert. Die siRNA-vermittelte Depletion von Cdc42 und Rac1 zeigte unterschiedliche Verhaltensweisen beider Rho-GTPasen. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das Fehlen von Cdc42 und Rac1 sowohl den basalen hCAT-2A-Transport als auch den PKC-Effekt beeinflusst. Die genauen Funktionen der einzelnen Rho-GTPasen können derzeit nicht differenziert werden. Um diese zu klären, sind weitere Untersuchungen, beispielsweise mit selektiven Aktivatoren, erforderlich. Zudem sollte die mögliche Beteiligung von Rac1 an der PKC-Aktivierung in diesem Zellsystem untersucht werden. Erwähnenswert ist auch, dass in Langzeitversuche mit siRNA indirekte Effekte z.B. auf die Expression von interagierenden Proteinen nicht ausgeschlossen werden können.

Der hCAT-2A-vermittelte Transport wurde nach Herunterregulation von RhoA *per se* reduziert (Skizze Abbildung 45). Der basale Transport verringerte sich um ca. 30 %. Dies ließ sich auf eine verringerte Oberflächenexpression zurückführen (Abbildung 26). Eine weitere Reduktion nach PMA-Stimulation blieb jedoch aus, was dafürspricht, dass man in U373 MG-Zellsystem RhoA benötigt, um den hCAT-2A Transport aufrecht zu erhalten. Diese Erkenntnisse unterscheiden sich zu den Erkenntnissen aus den *X. laevis* Oozyten. Im Oozytensystem zeigte die dominant-negative Mutante keinen hemmenden Effekt auf hCAT-2A-vermittelten Transport. Auch konnte durch Überexpression von RhoAN19 der PKC-Effekt nicht aufgehoben werden

(Stenger, 2012). Zharikov et al. (2001) beschreiben eine Veränderung der Aktinstruktur durch die Hemmung von RhoA. Dies deutet darauf hin, dass die verminderte Lokalisation der Transporter in der Plasmamembran und der reduzierten Transportaktivität nach Herunterregulation von RhoA zugrunde liegen, da sich die hCAT-Proteine ggf. ohne RhoA weniger gut in der Membran halten können. In der Publikation von Duong und Chun (2019) wird gezeigt, dass aktiviertes RhoA den Glukosetransport verstärkt und die Herunterregulation von RhoA mit siRNA diesen reduziert. Auch der basale Transport (ohne Insulin Behandlung) ist nach Herunterregulation von RhoA reduziert.

Es ist bekannt, dass Rho-GTPasen sich gegenseitig beeinflussen können. In einer Kaskade aktiviert Cdc42 Rac1 (El Atat et al., 2019; Hladyshau et al., 2023), aktives Rac1 wiederum inhibiert RhoA (Bar-Sagi und Hall, 2000). Ob die Erkenntnis von Hippenstiel et al. (1998), dass RhoA für die Aktivierung von PKC nach PMA-Stimulation benötigt wird, auf die in unseren Experimenten verwendeten U373 hCAT-2A EGFP-Zellen übertragbar ist, lässt sich weder ausschließen noch eindeutig nachweisen. Die Erkenntnisse aus den Oozyten-Experimenten lassen dies auch eher unwahrscheinlich erscheinen. Die Überexpression von konstitutiv aktive Mutante RhoAV14 in *X. laevis* Oozyten hatte weder auf hCAT-2A- noch auf hCAT-1-vermittelten Transport einen Effekt (Abbildung 5).

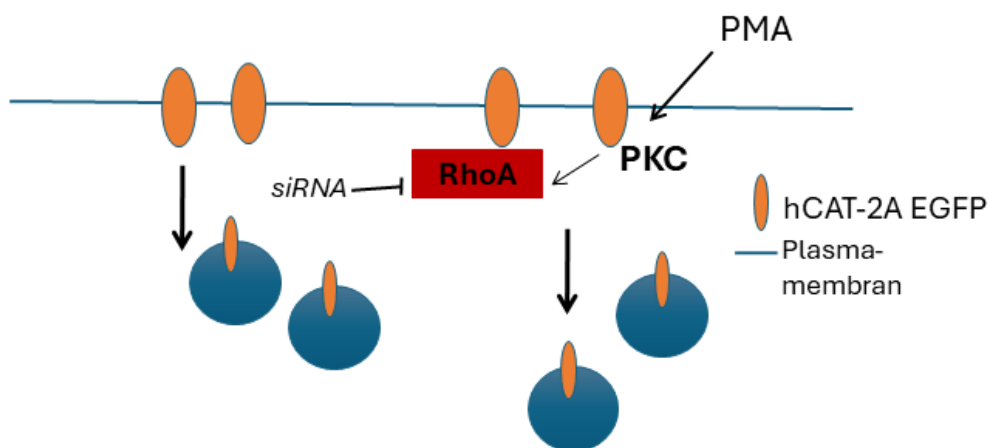


Abbildung 45. Vereinfachte schematische Darstellung der Erkenntnisse aus U373 hCAT-2A EGFP-Experimenten nach Herunterregulation von RhoA durch siRNA Transfektion.

Reduktion des basalen hCAT-vermittelter Transportes und keine stärker reduzierte Expression des hCAT-2A EGFP in der Plasmamembran nach PKC-Aktivierung.

Eine Publikation von Dovas et al. (2010) dokumentiert allerdings, dass RhoGDI (*guanine diphosphate dissociation inhibitor* α) nach PKC-Aktivierung an Serin 34 phosphoryliert wird, worauf dieses Protein spezifisch die GTP-gebundene Form von RhoA freisetzt und damit für höhere Level von aktiven RhoA führt. Brandt et al. (2002) zeigten wiederum, dass nach PKC-Aktivierung RhoA nach 60 min im geringeren Ausmaß in aktiver Form vorliegt. Es lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt und vorhandener Literatur nur schwer eine eindeutige Rolle bzw. Mechanismus hinter einer RhoA-Beteiligung für unsere Erkenntnisse ableiten. Weitere Experimente sind notwendig, um eine genaue Rolle im Zusammenhang mit hCAT-vermittelten Arginintransport zu bestätigen.

Experimente, die die Rolle des endogenen Cdc42 ermitteln sollten, stellten eine Herausforderung in der experimentellen Umsetzung dar. Zur Aktivierung von endogenem Cdc42 mussten U373 hCAT-2A EGFP-Zellen in Vorbereitung auf epidermalen Wachstumsfaktor (EGF)-Behandlung mindestens 16 Stunden unter Hungerbedingungen kultiviert werden (also ohne FBS, *fetal bovine serum*) und durften auch maximal 20 % konfluent gewachsen sein. So war der Höhepunkt der Cdc42-Aktivierung (Abbildung 30) mit einem Zeitrahmen von ca. 15 Minuten sehr schnell erreicht und reversibel. Nach 30 Minuten konnte der Effekt zwar beobachtet werden, die Ausprägung war aber nicht besonders stark. Die erhobenen Daten zeigen, dass die EGF-induzierte Reduktion des hCAT-2A Transportes Cdc42-abhängig ist (Abbildung 31). Durch endogen aktiviertes Cdc42 wurde der hCAT-2A-vermittelte Transport in U373 hCAT-2A EGFP-Zellen aber auch den endogenen Arginintransport in NT-2 Zellen (endogener hCAT-3 Transport) reduziert (Abbildung 31). Es ist anzunehmen, dass eine Verringerung ebenfalls auf einer verminderten Expression der Transporter in Plasmamembran beruht. Dies gilt es aber noch experimentell nachzuweisen.

Um eine mögliche gemeinsame Rolle der Rho-GTPasen Cdc42 und Rac 1 nach EGF-Stimulation in der Regulation des Arginintransports zu prüfen, könnten weitere siRNA Experimente zum Einsatz kommen. Die Analyse der simultanen Herunterregulation beider GTPasen könnte Aufschluss darüber geben, ob ein kombinierter Effekt auf die Reduktion des Arginintransports nachweisbar ist. Die vorliegenden Ergebnisse legen nahe, dass der durch EGF induzierte Effekt möglicherweise PKC-abhängig ist (siehe Abbildung 32). Hier konnte im Gegensatz zu den Ergebnissen in *X. laevis* Oozyten die leichte, jedoch signifikante Hemmung der hCAT-2A-Transportaktivität durch Vorbehandlung mit dem PKC-Inhibitor BIM aufgehoben werden, jedoch

schien der Arginintransport nach BIM-Behandlung in U373-hCAT-2A-EGFP Zellen verringert zu sein (Abbildung 32).

Die unterschiedlichen Ergebnisse in Oozyten und humanen Zellen (Beteiligung von Rho-GTPasen wie Cdc42 und Rac1 am PKC-Effekt) zeigen, dass die vorliegenden Ergebnisse lediglich Hinweise auf eine mögliche Beteiligung und Abhängigkeiten von Rho-GTPasen und PKC geben. Für gesicherte Erkenntnisse sind weitere Experimente nötig. Die vorliegenden Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass einzelne Rho-GTPasen unterschiedliche, möglicherweise gegenläufige oder zeitlich versetzte Wirkungen haben können (Halabi-Cabazon et al., 2008). Diese Komplexität erschwert die Interpretation der Ergebnisse und unterstreicht die Notwendigkeit weiterer Experimente zur Klärung der spezifischen Funktionen der einzelnen Rho-GTPasen. Darüber hinaus scheint es einen Unterschied zu machen, ob Rho-GTPasen kurzzeitig gehemmt oder vollständig aus dem System entfernt werden, wie es bei siRNA-Transfektionen der Fall ist.

Adapterprotein GRB2 hat einen erheblichen Einfluss auf die Transportaktivität von hCAT-1 und hCAT-2A

Anknüpfend an die Publikation von Vina-Vilaseca et al. (2011) in der das beteiligte Adaptorprotein nicht identifiziert werden konnte, gibt die Publikation von Chen et al. (2012) einen Hinweis auf die mögliche Beteiligung des Adaptorproteins GRB2 in der Zelloberflächenexpression von mCAT-1. Dort wurde gezeigt, dass die siRNA-vermittelte Reduktion von GRB2 zu einer Verringerung der murinen Leukämievirus-Bindung und Membranfusion führt, und dass dieselbe Reduktion von GRB2 zur verringerten Oberflächenexpression von mCAT-1 führt. Diese Interaktion von GRB2 und Rezeptor ist besonders im Zusammenhang mit dem EGFR-Rezeptor bekannt (Jiang et al., 2003), was gut mit unseren Ergebnissen übereinstimmt.

Im Rahmen der vorliegenden experimentellen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass beide Transporter (hCAT-1 und hCAT-2A) GRB2 benötigen, um ihre volle Transportaktivität zu erlangen. Die Isoformen verhalten sich jedoch unterschiedlich. Im Falle von hCAT-1 führte die Herunterregulation von GRB2 dazu, dass hCAT-1 in der Plasmamembran verblieb, die Transportaktivität jedoch auf nur 40 % der Ausgangsaktivität abfiel. Im Vergleich dazu wurde die Transporter-Isoform 2A bei Fehlen von GRB2 nur in geringerem Maße in der Oberfläche exprimiert. Dies führte zu einer geringen Transportaktivität von 45 %. Nach PKC-Aktivierung von

hCAT-2A wurde eine nicht signifikante weitere Reduktion der Transportrate beobachtet. Um diese Erkenntnisse zu verfestigen, bedarf es weiterer Wiederholung der genannten Experimente.

Die Rolle von GRB2 in der Regulation von Rezeptoren ist gut beschrieben (Huang and Sorkin, 2005; Jiang et al., 2003). Aus diesen Ergebnissen lässt sich GRB2 als wichtiges Adapterprotein für hCAT-1 postulieren, um den Aminosäuretransport bzw. die Lokalisation in der Plasmamembran zu ermöglichen (Abbildung 34 und 35). Für die Isoform hCAT-2A scheint GRB2 zusätzlich zum Transport selbst auch für die Lokalisation in der Plasmamembran unentbehrlich (siehe Abbildungen 36 und 37). PMA hat direkten Einfluss auf das Adapterprotein GRB2 (Oser et al., 2011). Die vereinfachte Darstellung der Zusammenhänge zwischen PKC und dem Adapterprotein GRB2 ist in Abbildung 46 dokumentiert.

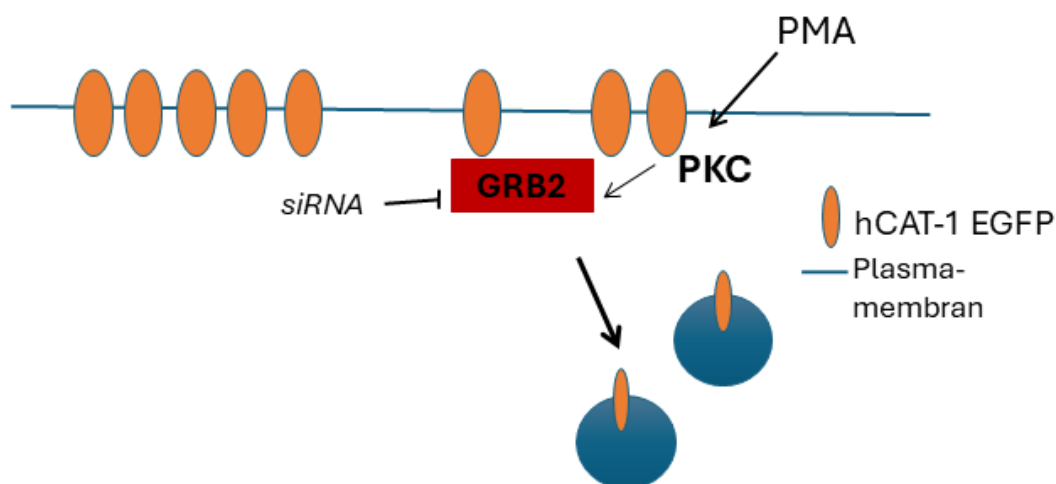


Abbildung 46. Vereinfachte Darstellung der Ergebnisse aus U373 hCAT-1 EGFP-Zellen zur Untersuchung des Einflusses von GRB2 an der Isoform hCAT-1 in Kombination mit PMA

Verminderte Expression des hCAT-1 EGFP in der Plasmamembran nach PKC-Aktivierung mit und ohne Vorhandensein von GRB2.

Wie genau GRB2 in der PKC-Kaskade innerhalb des basalen hCAT-vermittelten Transportes eingebunden ist, lässt sich auf Grundlage der vorliegenden Daten nicht zweifelsfrei bestimmen. Dazu müssen zukünftige Studien die Interaktion von GRB2 und den Transporter-Isoformen weiter untersuchen. Immunpräzipitations-Experimente oder auch LSM-Aufnahmen mit Biotin-markiertem überexprimiertem GRB2-Protein könnten helfen, die Co-Lokalisation

dieses Protein mit den Transportern besser zu verstehen und die spezifische Rolle von GRB2 zu bestimmen (Abbildung 47).

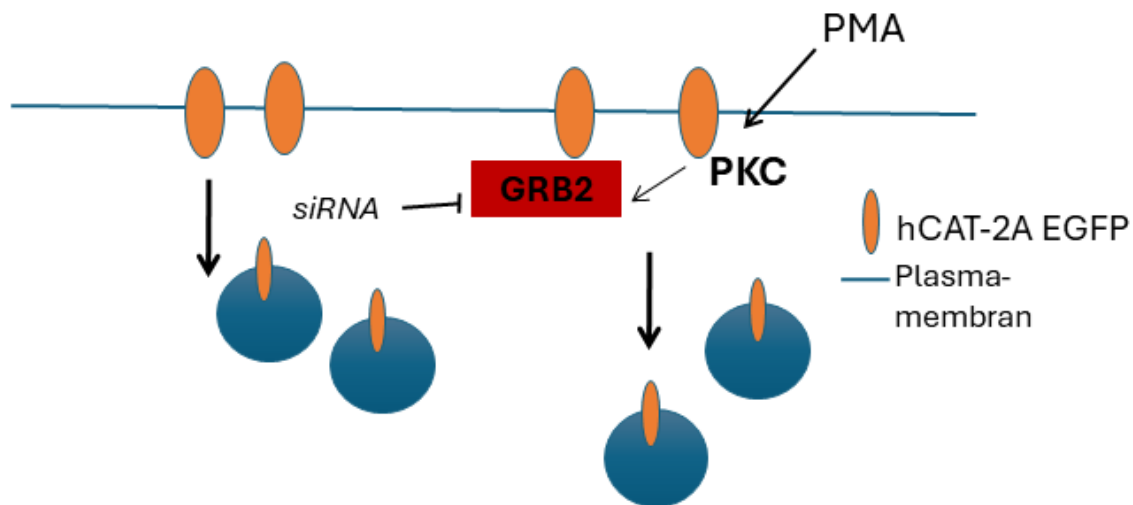


Abbildung 47. Vereinfachte Darstellung der Ergebnisse aus U373 hCAT-2A EGFP zur Untersuchung des Einflusses von GRB2 an der Isoform hCAT-2A in Kombination mit PMA

Verminderte Expression des hCAT-2A in der Plasmamembran nach PKC-Aktivierung in An- und Abwesenheit von GRB2.

Die von Puto et al. (2003) beschriebene Interaktion von PAK1 und GRB2 nach Stimulation durch Wachstumsfaktoren wie EGF, ist in Bezug auf unsere Experimente besonders aufschlussreich. Mit Putos Erkenntnissen korrelieren nicht nur unsere Ergebnisse in Bezug auf die Stimulation mit EGF, sondern auch Ergebnissen aus weiteren Publikationen, die sich mit der Stimulation von Arginintransport durch hCAT-1 beschäftigten (Cendan et al., 1995; Durante et al., 1996; Pan et al., 1995). Kurzzeitige (< 2 Stunden) Stimulation mit PDGF (Durante et al., 1996) führt dazu, dass der Arginintransport reduziert wird, bevor zu einer langzeitigen Steigerung kommt (Cendan et al., 1995; Pan et al., 1995). In der Publikation von Pan et al. (1995) ist die Stimulation von Arginintransport mit *Tumor necrosis factor* (TNF) PKC-abhängig. Dies könnte auf eine Beteiligung von GRB2 an der Regulation des Transporters hindeuten. Der tatsächliche Nachweis muss experimentell noch geführt werden.

Nicht-Rezeptorständige Tyrosinkinasen ACK1 und PAK1 als möglicher Teil der Regulationskaskade

Aufbauend aus den Erkenntnissen von Stenger (2012) zum Effekt des kleinen G-Proteins Cdc42, erschien eine Beteiligung der Kinase ACK1 an der Regulationskaskade der hCATs wahrscheinlich. ACK1 ist ein direktes Substrat des aktivierten Cdc42 (Kelley and Weed, 2012; Manser et al., 1993). ACK1 kann ebenfalls an die Nedd-4 Ligasen binden und dadurch ubiquitinyliert werden (Lin et al., 2010). Auch eine direkte Bindung an Clathrin ist ein Hinweis auf mögliche Beteiligung.

In einer Zusammenarbeit mit Alexander Sorkin und seinen Mitarbeiter:innen konnte auch gezeigt werden, dass der hCAT-1 nach PMA-Stimulation unter Beteiligung von Clathrin, E3-Ligase Nedd4-2/-1 und Ubiquitin internalisiert. Das direkte Bindeglied zwischen PKC und Transporter konnte jedoch nicht gefunden werden (Vina-Vilaseca et al., 2011). Dieser PKC-induzierte Effekt ist Clathrin-abhängig, vereint doch ACK1 genau die Eigenschaften, kann ACK1 z.B. Clathrin (Shen et al., 2011) und E3-Ligasen (Chan et al., 2009) binden. Ebenso legte die Beteiligung an Internalisierungen von EGF-Rezeptoren (Kato-Stankiewicz et al., 2001) eine mögliche Beteiligung dieser Kinase bei der Regulation der hCATs nahe. In U373 hCAT-2A EGFP-Zellen schien eine ACK1 Präsenz für den hCAT-2A-vermittelten Arginintransport notwendig zu sein (Abbildung 28). In Abwesenheit von ACK1 war kein PKC-induzierter Effekt auf den Arginintransport feststellbar. Nach Herunterregulation von ACK1 traten zwar Aktinveränderungen auf, jedoch ohne weitere Experimente, lässt sich eine klare Aussage daraus ableiten (Abbildung 29). Betrachtet man sich die ACK1 Ergebnisse im Zusammenhang mit PKC α , RhoA auch BIM II sowie TcdB 1470 – im Gegensatz zu TcdB 10463 - so lässt sich doch ein ähnliches Muster erkennen. Eine eindeutige Funktion von ACK1 in U373 hCAT-2A EGFP-Zellen muss daher noch durch weitere Studien bestätigt werden.

Zwar deutet die Publikation von Wu et al. (2015) darauf hin, dass ACK1 eine Rolle bei der Regulation von Transportern spielt, jedoch bedarf es noch weiterer Untersuchungen, um mit Sicherheit zeigen zu können, ob und wie ACK1 an der Regulation von hCATs beteiligt ist. Es wurde gezeigt, dass ACK1 den Dopamintransporter (DAT) in der Zelloberfläche stabilisiert und bei PKC-vermittelter ACK1 Hemmung diese „endozytotische Bremse“ gelöst wird, sodass DAT internalisieren kann. Wird davon ausgegangen, dass ACK1 nach PMA-Stimulation in geringerem Maße phosphoryliert vorliegt, wie dies von Linseman et al. (2001) gezeigt wurde, dann

wäre das für hCAT-2A erhaltene Ergebnis so zu interpretieren, dass PKC-Aktivierung zur Hemmung von ACK1 führt. Die Herunterregulation von ACK1 mit siRNA bestätigt dieses Ergebnis (Abbildung 28). Im Gegensatz dazu, zeigen die in EA.hys-Zelllinien durchgeführten Experimente nach Herunterregulation von ACK1 keine Hemmung der Transportaktivität (Abbildung 37).

Ob der hemmende Effekt des Wachstumsfaktors EGF auf den hCAT-2A-vermittelten Transport durch Beteiligung der Kinase ACK1 wahrscheinlich ist, bedarf weiterer experimenteller Untersuchungen (Galisteo et al., 2006). Dazu müsste die ACK1 mit siRNA in hCAT-2A EGFP-exprimierenden U373 Zellen vor EGF-Behandlung herunterreguliert werden, um festzustellen, ob ACK1 für den EGF-Effekt benötigt wird.

Ein anderes Bild ergibt sich für die Tyrosinkinase PAK1 (vereinfachte schematische Darstellung der Regulationsprozesse in Abbildung 48). PAK1 als gemeinsames Substrat von Cdc42 und Rac1, ist dafür bekannt an Aktinveränderungen beteiligt zu sein, insbesondere nach Stimulation mit PMA (Viaud und Peterson 2009). Auch (Menard und Mattingly, 2003) konnten zeigen, dass PMA-Stimulation in COS7 Zellen über Rho-GTPasen Cdc42 /Rac1 zur PAK1-Aktivierung führt. Im Rahmen der Arbeit ist es gelungen, PAK1 als einen Baustein der gemeinsamen Regulationskaskade von hCAT-2A zu identifizieren (Abbildung 27).

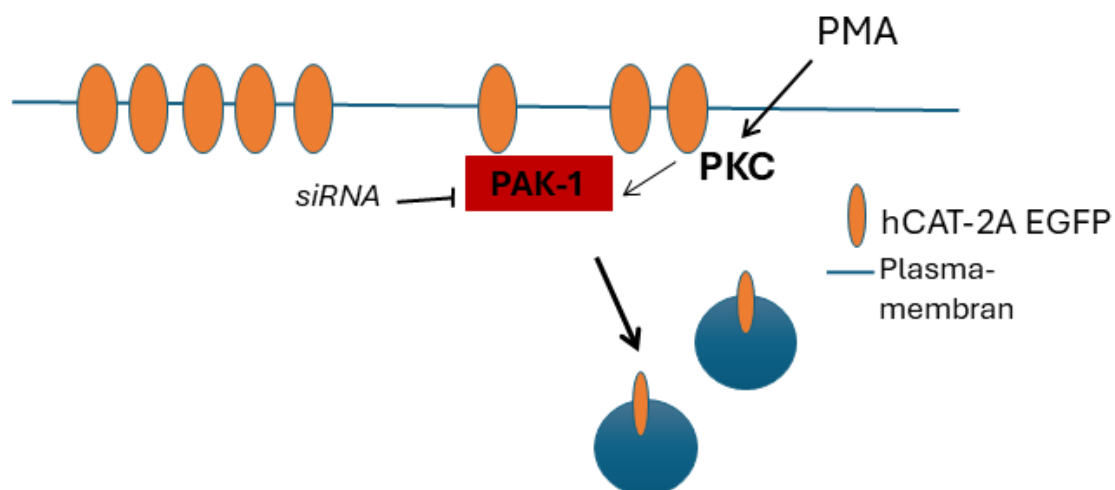


Abbildung 48. Vereinfachte schematische Darstellung der Erkenntnisse aus U373 hCAT-2A EGFP-Experimenten nach Herunterregulation von PAK1 durch siRNA Transfektion mit und ohne PKC-Aktivierung.

Aufhebung der verminderten Expression des hCAT-2A EGFP in der Plasmamembran nach PKC-Aktivierung nach Herunterregulation von PAK-1.

Genth et al. (2014) konnten zeigen, dass die Toxine TcdB 10463 und TcdB 1470 PAK1 inhibieren, indem diese Rho-GTPasen glykosylieren und damit inhibieren. Dies stimmt mit unseren Erkenntnissen für das Toxin TcdB1470 insoweit überein, dass der PKC-Effekt in U373 hCAT-2A EGFP-Zellen nach der Herunterregulation von PAK1 gehemmt wurde (Abbildung 27). Ergebnisse von Viaud und Peterson (2009) haben gezeigt, dass der PMA-induzierte Effekt auf die Aktinveränderung durch IPA (*p21-Activated Kinase Inhibitor*), einem spezifischen PAK1-Inhibitor, aufgehoben werden kann.

Weitere Experimente mit siRNA gegen PAK1 und die Biotinylierung an der Zelloberfläche exprimierten hCAT-2A-Proteine müssen noch erfolgen, um die Beteiligung von PAK1 am PKC-Effekt vollständig zu belegen. Erwähnenswert ist es auch, dass PAK1 auch ohne aktivierte Rho-GTPasen Cdc42/Rac1 auf die Aktinreorganisation wirken kann (Sells et al., 1997). Erkenntnisse, dass PAK1 direkt zur Inhibierung von RhoA führt (Alberts et al., 2005; Puto et al., 2003) können ebenfalls Hinweise zum möglichen Zusammenspiel zwischen Rho-GTPasen geben. Ob das in hier genannten Zellsystemen der Fall ist, lässt sich erst nach weiteren Untersuchungen sicher belegen.

Aus den Erkenntnissen von Experimenten mit endogen aktiviertem Cdc42, dass das Verhalten des Transports nach EGF-Stimulation Cdc42- und PKC-abhängig ist (Abbildung 32), kann die Hypothese erstellt werden, dass hCATs eine ähnliche Regulation über Cdc42 erfahren, wie sie von Rezeptoren als Plasmamembranproteine bekannt ist. Daher ist es plausibel anzunehmen, dass Proteine wie Tyrosinkinasen (z.B. ACK1 und PAK1), ähnlich wie es bei Rezeptoren der Fall ist, an der Regulation der Internalisierung bzw. Regulation der hCATs beteiligt sind.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mögliche Regulatoren identifiziert, die den Transport kationischer Aminosäure beeinflussen. Diese grundlegenden Erkenntnisse tragen dazu bei, die komplexe Regulation der humanen kationischen Aminosäuretransporter (hCATs) zu entschlüsseln und basierend auf diesem Wissen in der klinischen Anwendung therapeutische Ansätze bei kardiovaskulären, immunologischen oder auch Krebserkrankungen entwickeln zu können. Wie genau die einzelnen identifizierten Proteine miteinander agieren, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

5.4 Methodische Limitierung

Obwohl unsere Ergebnisse wichtige Einsichten in die Regulation der hCAT-Transporter liefern, gibt es einige Begrenzungen, die bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden müssen.

1. Die Untersuchungen wurden in einem Modellsystem, den *X. laevis* Oozyten und zusätzlich in kultivierten humanen Zelllinien durchgeführt. Diese Modellumgebung kann möglicherweise Ergebnisse generieren, die aufgrund von zellspezifischen Bedingungen nicht 1:1 auf andere Zelltypen und physiologische Bedingungen übertragen werden können. Oozyten stellen ein sehr gutes Expressions- und Testsystem für Transporter dar, aber diese Zellen unterscheiden sich deutlich von humanen Zellen und es stehen weniger experimentelle Werkzeuge bereit. Außerdem sind die Experimente sehr zeitaufwendig, angefangen mit der Operation der Froschweibchen, der Vereinzelung der Oozyten, der Qualitätsbeurteilung und schließlich der Injektion jeder einzelnen Oozyte und die Handhabung während Kultur und Experiment. Funktionalität der Rho-GTPase-Mutanten in *Xenopus laevis*-Oozyten wurde angenommen, jedoch nicht überprüft.
2. Aufgrund von nicht ausreichend endogen exprimiertem hCAT-2A in den zur Verfügung stehenden Zelllinien, ist es nicht gelungen den endogen exprimierten hCAT-2A so zu untersuchen, dass ein besseres Verständnis durch eindeutigere Ergebnisse gewonnen werden konnte. Die gemessenen Transportdaten ließen sich nicht eindeutig einem spezifischen Transporter zuordnen. Gerade bei Überexpression wird sehr schnell das Gleichgewicht erreicht, sodass die Inkubationszeiten sehr kurz sein müssen und damit eine höhere Varianz entsteht, die sich bei der Auswertung über mehrere Rechenschritte verstärken kann. Die Bildung einer Differenz von Transportraten über zwei unterschiedlichen Zelllinien (U373 EGFP und U373 hCAT-2A EGFP) birgt eine höhere Fehlerrate als der Vergleich von Zellen in ein und derselben Zelllinie miteinander. Der Anstieg der Transporterraten bei Überexpression von hCAT-2A EGFP war vergleichsweise gering, sodass nicht eindeutig feststellbar war, was der durch den überexprimierten Transporter verursachte Nettotransport ist. So ergibt sich in Abbildung 18 zwar ein signifikanter Effekt von PMA auf den hCAT-2A EGFP-überexprimierenden Zellen, aber nicht auf den Nettotransport von hCAT-2A-EGFP. Die Optimierung der Durchführung hat dazu geführt, dass in Abbildung 20 der Nettotransport signifikant gehemmt wurde.

Beide Zelllinien mussten auf einer Platte untereinander ausgesät werden, damit beide Zelllinien identisch behandelt werden konnten. In Zukunft könnten automatisierte Systeme zeitliche Abläufe bei Inkubations- und Manipulationszeiten des Transport-Assay konstanter halten und gleichzeitig eine größere Anzahl von Ansätzen erlauben, sodass aussagekräftigere Ergebnisse erhalten werden können. Weiterhin könnte es sein, dass überexprimierte Transporter nicht in gleicher Weise reguliert werden wie endogen exprimierte, da bei ihrer großen Anzahl eventuell nicht genügend Interaktionspartner zur Verfügung stehen. So ist es auffällig, dass ein Großteil des überexprimierten hCAT-2A EGFP-Fusionsproteins vermehrt in den intrazellulären Vesikeln befand. Allerdings ergab ein früherer Vergleich zwischen endogenem und überexprimiertem hCAT-EGFP keinen signifikanten Unterschied im Verhältnis zwischen Expression in der Plasmamembran und intrazellulären Vesikeln (Habermeier et al., 2003; Wolf et al., 2002).

3. Die Verfügbarkeit von spezifischen Inhibitoren der endogen vorhandenen kleinen G-Proteine Cdc42 oder Rac1 würde ermöglichen, dass vor allem der kurzzeitige Effekt der Hemmung von einzelnen Rho-GTPasen auf die Transportaktivität von hCATs studiert werden könnte. Über das Ausschalten von endogenen Rho-GTPasen mit siRNAs können nur langfristige Effekte, nicht aber die schnellen Reaktionen der Zelle auf die Signalwege, simuliert werden. Auch indirekte Effekte z.B. auf die Expression von interagierenden Proteinen können bei den Langzeitversuchen nicht ausgeschlossen werden. Experimente, die zeitkritische Veränderung in der ein und derselben Zelle untersuchen und die subzelluläre Lokalisation der Transporter mithilfe der EGFP-markierten Transporter verfolgen, wären aufschlussreich.

6 Fazit und Ausblick

Mit unseren Experimenten konnten wir folgende Erkenntnisse erhalten:

1. Alle vier Isoformen der hCATs reagieren auf konstitutiv aktives Cdc42V12 Co-Expression mit unterschiedlich starker Reduktion einer Herunterregulation der Transportaktivität in *Xenopus laevis*-Oozyten, ähnlich dem PMA-Effekt. Im Gegensatz zu hCAT-1 reagiert hCAT-2A ebenfalls auf Rac1V12 mit reduzierter Transportrate, jedoch weniger stark als nach Cdc42V12 Co-Expression.
2. In Gegensatz zu humanen Zellsystemen zeigen Experimente in Oozyten, dass die Rho-GTPasen inhibierenden Toxine TcdB 10463 und TcdB 1470 auf den basalen Transport keinen signifikanten Einfluss haben. Allerdings hebt die Hemmung der Rho-GTPasen in beiden Fällen den PKC-Effekt auf. Das legt ein unterschiedliches Verhalten der Rho-GTPasen in den beiden verwendeten Expressionssystemen nahe, bzw. zeigt, dass es einen Unterschied macht, welches Zellsystem im Experiment zum Einsatz kommt.
3. In humanen U373-Zellen, die hCAT-1-EGFP überexprimierten, hat die kurzzeitige (1,5 Stunden) Inkubation mit Toxinen (TcdB 10463 und/oder 1470) keinen Effekt auf die PKC-vermittelte Hemmung des Arginintransportes. Das kurzzeitige Inaktivieren aller drei Rho-GTPasen Cdc42, Rac 1 und RhoA ruft jedoch eine Aktivierung des basalen Arginintransportes hervor. Dieser Effekt konnte aufgrund unserer Untersuchungen zum ersten Mal gezeigt werden. Die genauen Ursachen für diesen Effekt sind Gegenstand weiterer Forschung. Es ist denkbar, dass das Inaktivieren der im untersuchten Zellsystem aktiven Rho-GTPasen den Recyclingprozess der Aminosäuretransporter beschleunigen oder die Endozytose so weit heruntersetzt, dass mehr Transporter in der Plasmamembran vorhanden sind und der Transport von Arginin so erhöht wird.
4. Die Isoform 2A des humanen Arginintransporters zeigt ein anderes Verhalten. Identische Transportversuche in humanen U373-Zellen, die hCAT-2A EGFP überexprimieren, zeigen unter Toxineinfluss (TcdB 10463) und demzufolge Hemmung aller drei Rho-GTPasen eine Steigerung des initialen Transportes. Die durch PKC-Aktivierung induzierte Endozytose wurde im Gegensatz zu TcdB 1470 durch TcdB 10463 nicht gehemmt. Dies wird als Bestätigung der in Oozyten durchgeführten Experimente gelesen. Bleibt RhoA aktiv, verändert sich der initiale Transport nicht. Dies legt nahe, dass

RhoA in aktiver Form dafür sorgen könnte, dass die basale Endozytose unverändert bleibt und der Transporter sich in der Plasmamembran halten kann. Für die Aufhebung des PKC-Effektes scheint die Hemmung von Cdc42 und Rac1 auszureichen. Warum TcdB 10463 den PKC-Effekt nicht aufhebt, obwohl dieses Toxin auch beide Cdc42 und Rac1 hemmt, muss Gegenstand weiterer Untersuchung sein. Es ist nicht auszuschließen, dass sich mehrere Effekte überlagern.

5. Wachstumsfaktoren, wie z.B. EGF führen zu einer Hemmung des hCAT-2A-vermittelten Transportes unter Beteiligung der Rho-GTPase Cdc42 aber auch Proteinkinase C (PKC)
6. PKC α ist die PKC-Isoform, die für den PKC-Effekt verantwortlich ist, jedoch hat die Herunterregulation dieser Isoform Auswirkung auf die Expression des Gesamtproteins
7. Die PKC-induzierte Endozytose des hCAT-1 und hCAT-2A lässt sich durch Herunterregulation des GRB2 aufheben. Der basale Transport verringert sich bei beiden Isoformen, die Oberflächenexpression bleibt aber nur für hCAT-1 stabil. Dies deutet darauf hin, dass hCAT-1 sich in Anwesenheit von GRB2 in einer Region der Plasmamembran befindet, in der entweder geringe Konzentrationen von Cholesterin oder kein Cholesterin vorhanden ist oder ein für den Transport wichtiges Adapterprotein fehlt.
8. Die Herunterregulation von Tyrosinkinasen ACK1 und PAK1 führt dazu, dass die PKC-vermittelte Reduktion von hCAT-2A-vermitteltem Transport gehemmt wird. Jedoch ist der basale hCAT-2A Transport ohne ACK1 in Gegensatz zur Herunterregulation von PAK1 bereits reduziert.

Ein interessanter Aspekt war auch das unterschiedliche Verhalten der verschiedenen Isoformen. Dies ist insbesondere spannend, da hCAT-1 ubiquitär in allen Zelltypen exprimiert wird, die Isoform hCAT-2A nur in der Leber und in geringerem Maß in Skelettmuskel, Pankreas und glatten Muskelzellen exprimiert wird und nur dort als Transporter fungiert.

Effekte auf den endogenen hCAT-1:

- 1 In EA.hy 926-Zellen scheint Cdc42 für den Transport eine Rolle zu spielen, jedoch ohne den Effekt der Proteinkinase C aufzuheben. Ohne Cdc42 ist der initiale Transport niedriger, was dafürspricht, dass weniger Transporter an der richtigen Stelle in der Plasmamembran positioniert sind. Zukünftige Forschungsansätze müssen die Oberflächenexpression klären, sodass diese Hypothese belegt oder verworfen werden kann.

- 2 Es wird vermutet, dass die Isoform PKC α der Proteinkinase C die Hauptrolle, bei der durch PMA induzierten Reaktion spielt. Obwohl die PMA-Wirkung nicht vollständig aufgehoben werden konnte, deutet dies auf die Bedeutung von PKC α hin. In EA.hy-Zellen war die Herunterregulierung von PKC α nicht vollständig, was den verbleibenden Effekt erklären könnte. Im Gegensatz dazu war die Herunterregulierung von PKC α in U373-Zellen erfolgreicher. Interessanterweise führte die Herunterregulierung von PKC α nicht zu einer verringerten Gesamtproteinmenge von endogenem hCAT-1, im Gegensatz zu den Beobachtungen bei überexprimiertem hCAT-2A.
- 3 Das Fehlen von ACK1 scheint in EA.hy-Zelllinien keine große Rolle zu spielen. Das könnte allerdings ein Zelltyp-spezifischer Effekt sein.

Die Ergebnisse dieser Dissertation eröffnen mehrere Richtungen für zukünftige Forschungsarbeiten:

1. **Erweiterte Untersuchung der Signalwege:** Zukünftige Studien sollten die Interaktionen zwischen PKC und Rho-GTPasen nicht nur im Zusammenhang des Aminosäuretransports, sondern auch in anderen relevanten Signalwegen untersuchen. Dies ermöglicht es, potenzielle Gemeinsamkeiten oder unterschiedliche Regulationsmechanismen aufzudecken. Signalwege, wie die hier für hCAT untersuchten, sind in eine Vielzahl zellulärer Prozesse involviert, darunter die Regulation von Transportern und Rezeptoren. Sie gewährleisten die Bereitstellung von Metaboliten in den Zellen. Es ist denkbar, dass die Regulationsmechanismen von hCAT, Ähnlichkeiten zu denen anderer Transporter aufweisen.
2. **Therapeutische Anwendungen:** Ein besseres Verständnis der grundlegenden Mechanismen, durch die PKC, Rho-GTPasen und weiterer möglicher Adapterproteine die hCAT-Transporter regulieren, könnte therapeutische Ansätze zur Modulation der Aminosäureaufnahme, insbesondere in Tumorzellen oder entzündeten Geweben, unterstützen. Eine gezielte Beeinflussung verschiedener Prozesse innerhalb einer Signalkaskade könnte zur Entwicklung neuer Behandlungsstrategien zur Krebstherapie oder anderer chronischer Erkrankungen z.B. im Bereich der inflammatorischen Erkrankungen (z.B. Arthritis oder Autoimmunkrankheiten) führen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die im Rahmen der Doktorarbeit gewonnenen Erkenntnisse wichtige Fortschritte im Zusammenspiel und Verständnis der posttranslationalen Regulation der hCAT-Transporter durch PKC und Rho-GTPasen liefert. Weitere Forschungsarbeiten, die sich auf die *In-vivo*-Validierung und die Untersuchung anderer regulatorischer Signalwege konzentrieren, sind notwendig, um das wichtige therapeutische Potenzial dieser Mechanismen vollständig auszuschöpfen.

7 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die posttranslationale Regulation der kationischen Aminosäuretransporter (hCATs) durch Proteinkinase C (PKC) unter Beteiligung der Rho-GTPasen (Cdc42, Rac1 und RhoA) und anderen potenziellen beteiligten Proteinen untersucht.

Zentrale Erkenntnis der Arbeit ist, dass sowohl PKC als auch Rho-GTPasen, insbesondere Cdc42, eine entscheidende Rolle bei der Modulation der Transportaktivität aller vier hCAT-Isoformen spielen. Die Aktivierung von PKC führt zu einer signifikanten Reduktion der Argininaufnahme durch die hCATs. Dieser Effekt konnte sowohl im Modellsystem der *Xenopus*-Oocyten als auch in verschiedenen humanen Zelllinien nachgewiesen werden. Interessanterweise wird die verminderte Argininaufnahme durch die veränderte Membranlokalisation der Transporter (wahrscheinlich induzierte Endozytose) verursacht.

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Arbeit ist die Untersuchung des Zusammenspiels von Rho-GTPasen bei der Regulation der hCAT-Transporter. Die Aktivierung von Rho-GTPasen z.B. durch EGF, deutet auf eine Beteiligung dieser GTPasen bei der Regulation der Transportaktivität hin. Die Ergebnisse legen nahe, dass die gleichzeitige Aktivierung von PKC und Rho-GTPasen zu einer komplexen Regulation der hCAT-Transporter führt, die sich in einer reduzierten Oberflächenexpression der Transporter äußert.

Die Bedeutung der Membranlokalisation für die Funktion der hCAT-Transporter wurde in dieser Arbeit besonders hervorgehoben. Es ist von zentraler Bedeutung, die Mechanismen zu verstehen, die die Membranproteine, insbesondere die Transporterproteine, regulieren, da sie sowohl Angriffspunkte als auch Sensoren für die Umgebung der Zelle darstellen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Forschungsarbeit einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der komplexen Regulation von Aminosäuretransportern, insbesondere der hCATs, leistet. Die Ergebnisse zeigen, dass PKC und Rho-GTPasen eine entscheidende Rolle bei der Modulation der Transportaktivität spielen und dass die Membranlokalisation der Transporter ein wichtiger Faktor für ihre Funktion ist. Die Interaktion zwischen PKC und Rho-GTPasen könnte ein fein abgestimmtes System darstellen, das die Aminosäureaufnahme bedarfsgerecht steuert.

8 Literaturverzeichnis

- Aktories, K., Just, I., 2005. Clostridial Rho-inhibiting protein toxins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 291, 113–145. https://doi.org/10.1007/3-540-27511-8_7
- Alberts, A.S., Qin, H., Carr, H.S., Frost, J.A., 2005. PAK1 negatively regulates the activity of the Rho exchange factor NET1. *J. Biol. Chem.* 280, 12152–12161. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405073200>
- Aspenström, P., 2019. The Intrinsic GDP/GTP Exchange Activities of Cdc42 and Rac1 Are Critical Determinants for Their Specific Effects on Mobilization of the Actin Filament System. *Cells* 8, 759. <https://doi.org/10.3390/cells8070759>
- Aspenström, P., Fransson, A., Saras, J., 2004. Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem. J.* 377, 327–337. <https://doi.org/10.1042/BJ20031041>
- Aullo, P., Giry, M., Olsnes, S., Popoff, M.R., Kocks, C., Boquet, P., 1993. A chimeric toxin to study the role of the 21 kDa GTP binding protein rho in the control of actin microfilament assembly. *EMBO J.* 12, 921–931. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb05733.x>
- Banjarnahor, S., Rodionov, R.N., König, J., Maas, R., 2020. Transport of L-Arginine Related Cardiovascular Risk Markers. *J. Clin. Med.* 9, 3975. <https://doi.org/10.3390/jcm9123975>
- Barrera, S.P., Castrejon-Tellez, V., Trinidad, M., Robles-Escajeda, E., Vargas-Medrano, J., Varela-Ramirez, A., Miranda, M., 2015. PKC-Dependent GlyT1 Ubiquitination Occurs Independent of Phosphorylation: Inespecificity in Lysine Selection for Ubiquitination. *PLoS One* 10, e0138897. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138897>
- Bar-Sagi, D., Hall, A., 2000. Ras and Rho GTPases: a family reunion. *Cell* 103, 227–238. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00115-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00115-x)
- Barthelemy, C., André, B., 2019. Ubiquitylation and endocytosis of the human LAT1/SLC7A5 amino acid transporter. *Sci. Rep.* 9, 16760. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53065-w>
- Bastin, G., Heximer, S.P., 2013. Rab Family Proteins Regulate the Endosomal Trafficking and Function of RGS4. *J. Biol. Chem.* 288, 21836–21849. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.466888>
- Benes, C., Soltoff, S.P., 2001. Modulation of PKCdelta tyrosine phosphorylation and activity in salivary and PC-12 cells by Src kinases. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 280, C1498-1510. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.280.6.C1498>
- Bernards, A., Settleman, J., 2004. GAP control: regulating the regulators of small GTPases. *Trends Cell Biol.* 14, 377–385. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.05.003>
- Beyer, S.R., 2013. Identifikation kritischer Cysteinreste im humanen kationischen Aminosäuretransporter 2A (hCAT-2A). Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Beyer, S.R., Mallmann, R.T., Jaenecke, I., Habermeier, A., Boissel, J.-P., Closs, E.I., 2013. Identification of cysteine residues in human cationic amino acid transporter hCAT-2A that are targets for inhibition by N-ethylmaleimide. *J. Biol. Chem.* 288, 30411–30419. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.490698>

- Bhattacharyya, S.N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E.I., Filipowicz, W., 2006. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* 125, 1111–1124. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.04.031>
- Bishop, A.L., Hall, A., 2000. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem. J.* 348 Pt 2, 241–255.
- Bode, B.P., 2001. Recent Molecular Advances in Mammalian Glutamine Transport. *J. Nutr.* 131, 2475S–2485S. <https://doi.org/10.1093/jn/131.9.2475S>
- Bonifacino, J.S., Traub, L.M., 2003. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 395–447. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161800>
- Boudanova, E., Navaroli, D.M., Stevens, Z., Melikian, H.E., 2008. DOPAMINE TRANSPORTER ENDOCYTIC DETERMINANTS: CARBOXY TERMINAL RESIDUES CRITICAL FOR BASAL AND PKC-STIMULATED INTERNALIZATION. *Mol. Cell. Neurosci.* 39, 211–217. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2008.06.011>
- Boueux, A., Vignal, E., Faure, S., Fort, P., 2007. Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* 24, 203–216. <https://doi.org/10.1093/molbev/msl145>
- Bourne, H.R., Sanders, D.A., McCormick, F., 1991. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349, 117–127. <https://doi.org/10.1038/349117a0>
- Brandt, D., Gimona, M., Hillmann, M., Haller, H., Mischak, H., 2002. Protein Kinase C Induces Actin Reorganization via a Src- and Rho-dependent Pathway *. *J. Biol. Chem.* 277, 20903–20910. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200946200>
- Bremer, J., 1983. Carnitine--metabolism and functions. *Physiol. Rev.* 63, 1420–1480. <https://doi.org/10.1152/physrev.1983.63.4.1420>
- Bröer, A., Friedrich, B., Wagner, C.A., Fillon, S., Ganapathy, V., Lang, F., Bröer, S., 2001. Association of 4F2hc with light chains LAT1, LAT2 or y+LAT2 requires different domains. *Biochem. J.* 355, 725–731.
- Bu, W., Lim, K.B., Yu, Y.H., Chou, A.M., Sudhakaran, T., Ahmed, S., 2010. Cdc42 interaction with N-WASP and Toca-1 regulates membrane tubulation, vesicle formation and vesicle motility: implications for endocytosis. *PloS One* 5, e12153. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012153>
- Camli, D.N., Iscil, H.A.O., Acuner, S.E., 2025. MuGger Toxins: Exploring the Selective Binding Mechanism of Clostridial Glucosyltransferase Toxin B and Host GTPases. *Proteins* 93, 934–944. <https://doi.org/10.1002/prot.26770>
- Cendan, J.C., Souba, W.W., Copeland, E.M., Lind, D.S., 1995. Characterization and growth factor stimulation of L-arginine transport in a human colon cancer cell line. *Ann. Surg. Oncol.* 2, 257–265. <https://doi.org/10.1007/BF02307033>
- Chan, W., Tian, R., Lee, Y.-F., Sit, S.T., Lim, L., Manser, E., 2009. Down-regulation of active ACK1 is mediated by association with the E3 ubiquitin ligase Nedd4-2. *J. Biol. Chem.* 284, 8185–8194. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806877200>

- Chaves-Olarte, E., Freer, E., Parra, A., Guzmán-Verri, C., Moreno, E., Thelestam, M., 2003. R-Ras glucosylation and transient RhoA activation determine the cytopathic effect produced by toxin B variants from toxin A-negative strains of *Clostridium difficile*. *J. Biol. Chem.* 278, 7956–7963. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209244200>
- Chen, Z., Kolokoltsov, A.A., Wang, J., Adhikary, S., Lorinczi, M., Elferink, L.A., Davey, R.A., 2012. GRB2 interaction with the ecotropic murine leukemia virus receptor, mCAT-1, controls virus entry and is stimulated by virus binding. *J. Virol.* 86, 1421–1432. <https://doi.org/10.1128/JVI.05993-11>
- Chillarón, J., Roca, R., Valencia, A., Zorzano, A., Palacín, M., 2001. Heteromeric amino acid transporters: biochemistry, genetics, and physiology. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* 281, F995–F1018. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.2001.281.6.F995>
- Chin-Dusting, J.P.F., Willems, L., Kaye, D.M., 2007. L-Arginine transporters in cardiovascular disease: A novel therapeutic target. *Pharmacol. Ther.* 116, 428–436. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.08.001>
- Christensen, H.N., Antonioli, J.A., 1969. Cationic amino acid transport in the rabbit reticulocyte. Na⁺-dependent inhibition of Na⁺-independent transport. *J. Biol. Chem.* 244, 1497–1504.
- Closs, E.I., 2002. Expression, regulation and function of carrier proteins for cationic amino acids. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 11, 99–107. <https://doi.org/10.1097/00041552-200201000-00015>
- Closs, E.I., 1996. CATs, a family of three distinct mammalian cationic amino acid transporters. *Amino Acids* 11, 193–208. <https://doi.org/10.1007/BF00813860>
- Closs, E. I., Boissel, J.-P., Habermeier, A., Rotmann, A., 2006. Structure and function of cationic amino acid transporters (CATs). *J. Membr. Biol.* 213, 67–77. <https://doi.org/10.1007/s00232-006-0875-7>
- Closs, E.I., Gräf, P., Habermeier, A., Cunningham, J.M., Förstermann, U., 1997. Human cationic amino acid transporters hCAT-1, hCAT-2A, and hCAT-2B: three related carriers with distinct transport properties. *Biochemistry* 36, 6462–6468. <https://doi.org/10.1021/bi962829p>
- Closs, E.I., Simon, A., Vékony, N., Rotmann, A., 2004. Plasma membrane transporters for arginine. *J. Nutr.* 134, 2752S-2759S; discussion 2765S-2767S. <https://doi.org/10.1093/jn/134.10.2752S>
- Cohen, P., 2000. The regulation of protein function by multisite phosphorylation – a 25 year update. *Trends Biochem. Sci.* 25, 596–601. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01712-6](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01712-6)
- Conner, S.D., Schmid, S.L., 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422, 37–44. <https://doi.org/10.1038/nature01451>
- Conradt, Stoffel, W., 1997. Inhibition of the High-Affinity Brain Glutamate Transporter GLAST-1 via Direct Phosphorylation. *J. Neurochem.* 68, 889–1332.
- Corey, J.L., Davidson, N., Lester, H.A., Brecha, N., Quick, M.W., 1994. Protein kinase C modulates the activity of a cloned gamma-aminobutyric acid transporter expressed in

- Xenopus oocytes via regulated subcellular redistribution of the transporter. *J. Biol. Chem.* 269, 14759–14767.
- Devés, R., Boyd, C. a. R., 1998. Transporters for Cationic Amino Acids in Animal Cells: Discovery, Structure, and Function. *Physiol. Rev.* 78, 487–545. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.2.487>
- Dexter, D.L., Barbosa, J.A., Calabresi, P., 1979. N,N-Dimethylformamide-induced Alteration of Cell Culture Characteristics and Loss of Tumorigenicity in Cultured Human Colon Carcinoma Cells¹. *Cancer Res.* 39, 1020–1025.
- Dexter, D.L., Spremulli, E.N., Fligiel, Z., Barbosa, J.A., Vogel, R., VanVoorhees, A., Calabresi, P., 1981. Heterogeneity of cancer cells from a single human colon carcinoma. *Am. J. Med.* 71, 949–956. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(81\)90312-0](https://doi.org/10.1016/0002-9343(81)90312-0)
- Dharmawardhane, S., Schürmann, A., Sells, M.A., Chernoff, J., Schmid, S.L., Bokoch, G.M., 2000. Regulation of Macropinocytosis by p21-activated Kinase-1. *Mol. Biol. Cell* 11, 3341–3352.
- Doherty, G.J., McMahon, H.T., 2009. Mechanisms of endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 857–902. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540>
- Donaldson, J.G., Jackson, C.L., 2011. ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 362–375. <https://doi.org/10.1038/nrm3117>
- Dovas, A., Choi, Y., Yoneda, A., Mulhaupt, H.A.B., Kwon, S.-H., Kang, D., Oh, E.-S., Couchman, J.R., 2010. Serine 34 Phosphorylation of Rho Guanine Dissociation Inhibitor (RhoGDI α) Links Signaling from Conventional Protein Kinase C to RhoGTPase in Cell Adhesion. *J. Biol. Chem.* 285, 23296–23308. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.098129>
- du Prel, J.-B., Röhrig, B., Hommel, G., Blettner, M., 2010. Choosing statistical tests: part 12 of a series on evaluation of scientific publications. *Dtsch. Arzteblatt Int.* 107, 343–348. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2010.0343>
- Dumont, J.N., 1972. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morphol.* 136, 153–179. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051360203>
- Duong, K.H.M., Chun, K.-H., 2019. Regulation of glucose transport by RhoA in 3T3-L1 adipocytes and L6 myoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 519, 880–886. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.09.083>
- Durante, W., Liao, L., Iftikhar, I., Cheng, K., Schafer, A.I., 1996. Platelet-derived growth factor regulates vascular smooth muscle cell proliferation by inducing cationic amino acid transporter gene expression. *J. Biol. Chem.* 271, 11838–11843. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.20.11838>
- Durante, W., Liao, L., Reyna, S.V., Peyton, K.J., Schafer, A.I., 2001. Transforming growth factor-beta(1) stimulates L-arginine transport and metabolism in vascular smooth muscle cells: role in polyamine and collagen synthesis. *Circulation* 103, 1121–1127. <https://doi.org/10.1161/01.cir.103.8.1121>

- Edgell, C.J., McDonald, C.C., Graham, J.B., 1983. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 3734–3737. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.12.3734>
- Egami, Y., Taguchi, T., Maekawa, M., Arai, H., Araki, N., 2014. Small GTPases and phosphoinositides in the regulatory mechanisms of macropinosome formation and maturation. *Front. Physiol.* 5, 374. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00374>
- El Atat, O., Fakhri, A., El-Sibai, M., 2019. RHO G Activates RAC1 through CDC42 Leading to Tube Formation in Vascular Endothelial Cells. *Cells* 8, 171. <https://doi.org/10.3390/cells8020171>
- Etienne-Manneville, S., Hall, A., 2001. Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta. *Cell* 106, 489–498. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00471-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00471-8)
- Falcone, S., Cocucci, E., Podini, P., Kirchhausen, T., Clementi, E., Meldolesi, J., 2006. Macropinocytosis: regulated coordination of endocytic and exocytic membrane traffic events. *J. Cell Sci.* 119, 4758–4769. <https://doi.org/10.1242/jcs.03238>
- Förstermann, U., Kleinert, H., 1995. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 352, 351–364. <https://doi.org/10.1007/BF00172772>
- Foster, L.J., de Hoog, C.L., Mann, M., 2003. Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 5813–5818. <https://doi.org/10.1073/pnas.0631608100>
- Fotiadis, D., Kanai, Y., Palacín, M., 2013. The SLC3 and SLC7 families of amino acid transporters. *Mol. Aspects Med.* 34, 139–158. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.10.007>
- Francia, V., 2018. Endocytosis of nanomedicines: Dissecting the pathways of uptake of nano-sized drug carriers by cells. University of Groningen, [Groningen].
- Gabriel, L.R., Wu, S., Kearney, P., Bellvé, K.D., Standley, C., Fogarty, K.E., Melikian, H.E., 2013. Dopamine Transporter Endocytic Trafficking in Striatal Dopaminergic Neurons: Differential Dependence on Dynamin and the Actin Cytoskeleton. *J. Neurosci.* 33, 17836–17846. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3284-13.2013>
- Galisteo, M., Yang, Y., Ureña, J., Schlessinger, J., 2006. Activation of the nonreceptor protein tyrosine kinase Ack by multiple extracellular stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 9796–801. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603714103>
- García-Tardón, N., González-González, I.M., Martínez-Villarreal, J., Fernández-Sánchez, E., Giménez, C., Zafra, F., 2012. Protein kinase C (PKC)-promoted endocytosis of glutamate transporter GLT-1 requires ubiquitin ligase Nedd4-2-dependent ubiquitination but not phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 287, 19177–19187. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.355909>
- Genth, H., Huelsenbeck, J., Hartmann, B., Hofmann, F., Just, I., Gerhard, R., 2006. Cellular stability of Rho-GTPases glucosylated by *Clostridium difficile* toxin B. *FEBS Lett.* 580, 3565–3569. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.04.100>

- Genth, H., Pauillac, S., Schelle, I., Bouvet, P., Bouchier, C., Varela-Chavez, C., Just, I., Popoff, M.R., 2014. Haemorrhagic toxin and lethal toxin from *Clostridium sordellii* strain vpi9048: molecular characterization and comparative analysis of substrate specificity of the large clostridial glucosylating toxins. *Cell. Microbiol.* 16, 1706–1721. <https://doi.org/10.1111/cmi.12321>
- Georgiou, M., Marinari, E., Burden, J., Baum, B., 2008. Cdc42, Par6, and aPKC regulate Arp2/3-mediated endocytosis to control local adherens junction stability. *Curr. Biol.* CB 18, 1631–1638. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.09.029>
- Geyer, T., 2016. Mechanismus der PKC-vermittelten Internalisierung der Aminosäuretransporter γ -LAT1/4F2hc und γ -LAT2/4F2hc (Dissertation). Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Goldin, A.L., 1992. Maintenance of *Xenopus laevis* and oocyte injection. *Methods Enzymol.* 207, 266–279. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(92\)07017-i](https://doi.org/10.1016/0076-6879(92)07017-i)
- Govek, E.-E., Newey, S.E., Van Aelst, L., 2005. The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev.* 19, 1–49. <https://doi.org/10.1101/gad.1256405>
- Grady, E.F., Böhm, S.K., Bunnett, N.W., 1997. Turning off the signal: mechanisms that attenuate signaling by G protein-coupled receptors. *Am. J. Physiol.* 273, G586-601. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1997.273.3.G586>
- Gräf, P., 1998. Charakterisierung der Transportproteine für basische Aminosäuren: CAT-1, CAT-2A und CAT-2B (Dissertation). Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Gräf, P., Förstermann, 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. *Br. J. Pharmacol.* 132, 1193–1200. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703921>
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., Nairn, R., 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36, 59–74. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-36-1-59>
- Green, M.R., Sambrook, J., 2012. *Molecular Cloning*, 4th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Gurdon, J.B., Lane, C.D., Woodland, H.R., Marbaix, G., 1971. Use of Frog Eggs and Oocytes for the Study of Messenger RNA and its Translation in Living Cells. *Nature* 233, 177–182. <https://doi.org/10.1038/233177a0>
- Habermeier, A., Wolf, S., Martiné, U., Gräf, P., Closs, E.I., 2003. Two amino acid residues determine the low substrate affinity of human cationic amino acid transporter-2A. *J. Biol. Chem.* 278, 19492–19499. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210254200>
- Halabi-Cabezón, I., Huelsenbeck, J., May, M., Ladwein, M., Rottner, K., Just, I., Genth, H., 2008. Prevention of the cytopathic effect induced by *Clostridium difficile* Toxin B by active Rac1. *FEBS Lett.* 582, 3751–3756. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.10.003>
- Hartwig, J.H., Thelen, M., Rosen, A., Janmey, P.A., Nairn, A.C., Aderem, A., 1992. MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. *Nature* 356, 618–622. <https://doi.org/10.1038/356618a0>

- Hatzoglou, M., Fernandez, J., Yaman, I., Closs, E., 2004. Regulation of cationic amino acid transport: the story of the CAT-1 transporter. *Annu. Rev. Nutr.* 24, 377–399. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.23.011702.073120>
- Heasman, S.J., Ridley, A.J., 2008. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 690–701. <https://doi.org/10.1038/nrm2476>
- Hepler, J.R., Earp, H.S., Harden, T.K., 1988. Long-term phorbol ester treatment down-regulates protein kinase C and sensitizes the phosphoinositide signaling pathway to hormone and growth factor stimulation. Evidence for a role of protein kinase C in agonist-induced desensitization. *J. Biol. Chem.* 263, 7610–7619.
- Higgs, H.N., Pollard, T.D., 2000. Activation by Cdc42 and PIP(2) of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) stimulates actin nucleation by Arp2/3 complex. *J. Cell Biol.* 150, 1311–1320. <https://doi.org/10.1083/jcb.150.6.1311>
- Hippenstiel, S., Kratz, T., Krüll, M., Seybold, J., Eichel-Streiber, C. v., Suttorp, N., 1998. Rho Protein Inhibition Blocks Protein Kinase C Translocation and Activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245, 830–834. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8525>
- Hladyshau, S., Stoop, J.P., Kamada, K., Nie, S., Tsygankov, D., 2023. Spatiotemporal Coordination of Rac1 and Cdc42 at the Whole Cell Level during Cell Ruffling. *Cells* 12, 1638. <https://doi.org/10.3390/cells12121638>
- Huang, F., Sorkin, A., 2005. Growth factor receptor binding protein 2-mediated recruitment of the RING domain of Cbl to the epidermal growth factor receptor is essential and sufficient to support receptor endocytosis. *Mol. Biol. Cell* 16, 1268–1281. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-09-0832>
- Hucho, F., Buchner, K., 1997. Signal transduction and protein kinases: the long way from the plasma membrane into the nucleus. *Naturwissenschaften* 84, 281–290. <https://doi.org/10.1007/s001140050396>
- Hunter, T., 2014. The Genesis of Tyrosine Phosphorylation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6, a020644. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020644>
- Hunter, T., 2000. Signaling—2000 and Beyond. *Cell* 100, 113–127. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81688-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81688-8)
- Ihrke, G., Neufeld, E.B., Meads, T., Shanks, M.R., Cassio, D., Laurent, M., Schroer, T.A., Paganano, R.E., Hubbard, A.L., 1993. WIF-B cells: an in vitro model for studies of hepatocyte polarity. *J. Cell Biol.* 123, 1761–1775. <https://doi.org/10.1083/jcb.123.6.1761>
- IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY, 2019. SLC superfamily of solute carriers | Transporters [WWW Document]. URL <https://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyDisplayForward?familyId=863> (accessed 1.17.25).
- Jaenecke, I., 2012. Lysosomaler Transport kationischer Aminosäuren durch Mitglieder der SLC7-Familie (Dissertation). Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Jaenecke, I., Boissel, J.-P., Lemke, M., Rupp, J., Gasnier, B., Closs, E.I., 2012. A chimera carrying the functional domain of the orphan protein SLC7A14 in the backbone of SLC7A2 mediates trans-stimulated arginine transport. *J. Biol. Chem.* 287, 30853–30860. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.350322>

- Jaffe, A.B., Hall, A., 2005. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 247–269. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.020604.150721>
- Jeckelmann, J.-M., Zaugg, J., Morozova, V., Müller, J., Kantipudi, S., Schroeder, M., Graff, J., Albrecht, C., Altmann, K.-H., Gertsch, J., Fotiadis, D., 2022. Structure, Function and Pharmacology of SLC7 Family Members and Homologues. *Chimia* 76, 1011–1018. <https://doi.org/10.2533/chimia.2022.1011>
- Jiang, X., Huang, F., Marusyk, A., Sorkin, A., 2003. Grb2 Regulates Internalization of EGF Receptors through Clathrin-coated Pits. *Mol. Biol. Cell* 14, 858–870. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-08-0532>
- Jiang, X., Liu, K., Jiang, H., Yin, H., Wang, E. D, Cheng, H., Yuan F., Xiao, F., Wang F., Lu, W., Peng, B., Shu, Y., Li, X., Chen S., Gua F., 2023. SLC7A14 imports GABA to lysosomes and impairs hepatic insulin sensitivity via inhibiting mTORC2. *Cell Rep.*, 43 (1) <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111984>
- Julian, L., Olson, M.F., 2014. Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK). *Small GTPases* 5, e29846. <https://doi.org/10.4161/sgtp.29846>
- Jungnickel, K.E.J., Parker, J.L., Newstead, S., 2018. Structural basis for amino acid transport by the CAT family of SLC7 transporters. *Nat. Commun.* 9, 550. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03066-6>
- Just, I., Gerhard, R., 2004. Large clostridial cytotoxins. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 152, 23–47. <https://doi.org/10.1007/s10254-004-0033-5>
- Just, I., Selzer, J., von Eichel-Streiber, C., Aktories, K., 1995. The low molecular mass GTP-binding protein Rho is affected by toxin A from *Clostridium difficile*. *J. Clin. Invest.* 95, 1026–1031.
- Kato-Stankiewicz, J., Ueda, S., Kataoka, T., Kaziro, Y., Satoh, T., 2001. Epidermal growth factor stimulation of the ACK1/Dbp pathway in a Cdc42 and Grb2-dependent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284, 470–477. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5004>
- Kavanaugh, M.P., 1993. Voltage dependence of facilitated arginine flux mediated by the system y⁺ basic amino acid transporter. *Biochemistry* 32, 5781–5785. <https://doi.org/10.1021/bi00073a009>
- Kawano, Y., Fukata, Y., Oshiro, N., Amano, M., Nakamura, T., Ito, M., Matsumura, F., Inagaki, M., Kaibuchi, K., 1999. Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo. *J. Cell Biol.* 147, 1023–1038. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.5.1023>
- Kelley, L.C., Weed, S.A., 2012. Cortactin is a substrate of activated Cdc42-associated kinase 1 (ACK1) during ligand-induced epidermal growth factor receptor downregulation. *PLoS One* 7, e44363. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044363>
- Kelly, B., Pearce, E.L., 2020. Amino Assets: How Amino Acids Support Immunity. *Cell Metab.* 32, 154–175. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.06.010>
- Kerr, M.C., Teasdale, R.D., 2009. Defining macropinocytosis. *Traffic Cph. Den.* 10, 364–371. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00878.x>

- Kirchhausen, T., 2000. Clathrin. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 699–727. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.699>
- Kjøller, L., Hall, A., 1999. Signaling to Rho GTPases. *Exp. Cell Res.* 253, 166–179. <https://doi.org/10.1006/excr.1999.4674>
- Knaus, U.G., Morris, S., Dong, H.J., Chernoff, J., Bokoch, G.M., 1995. Regulation of human leukocyte p21-activated kinases through G protein--coupled receptors. *Science* 269, 221–223. <https://doi.org/10.1126/science.7618083>
- Knowles, B.B., Howe, C.C., Aden, D.P., 1980. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 209, 497–499. <https://doi.org/10.1126/science.6248960>
- Komander, D., Kular, G.S., Schüttelkopf, A.W., Deak, M., Prakash, K.R.C., Bain, J., Elliott, M., Garrido-Franco, M., Kozikowski, A.P., Alessi, D.R., van Aalten, D.M.F., 2004. Interactions of LY333531 and other bisindolyl maleimide inhibitors with PDK1. *Struct. Lond. Engl.* 1993 12, 215–226. <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.01.005>
- Krotova, K.Y., Zharikov, S.I., Block, E.R., 2003. Classical isoforms of PKC as regulators of CAT-1 transporter activity in pulmonary artery endothelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 284, L1037-1044. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00308.2002>
- Kurokawa, K., Itoh, R.E., Yoshizaki, H., Nakamura, Y.O.T., Matsuda, M., 2004. Coactivation of Rac1 and Cdc42 at lamellipodia and membrane ruffles induced by epidermal growth factor. *Mol. Biol. Cell* 15, 1003–1010. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-08-0609>
- Lamaze, C., Chuang, T.H., Terlecky, L.J., Bokoch, G.M., Schmid, S.L., 1996. Regulation of receptor-mediated endocytosis by Rho and Rac. *Nature* 382, 177–179. <https://doi.org/10.1038/382177a0>
- Lee, Y., Shacter, E., 1999. Oxidative Stress Inhibits Apoptosis in Human Lymphoma Cells *. *J. Biol. Chem.* 274, 19792–19798. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.28.19792>
- Li, S., Zhang, Q., You, G., 2013. Three ubiquitination sites of organic anion transporter-1 synergistically mediate protein kinase C-dependent endocytosis of the transporter. *Mol. Pharmacol.* 84, 139–146. <https://doi.org/10.1124/mol.113.086769>
- Lin, Q., Wang, J., Childress, C., Sudol, M., Carey, D.J., Yang, W., 2010. HECT E3 Ubiquitin Ligase Nedd4-1 Ubiquitinates ACK and Regulates Epidermal Growth Factor (EGF)-Induced Degradation of EGF Receptor and ACK. *Mol. Cell. Biol.* 30, 1541–1554. <https://doi.org/10.1128/MCB.00013-10>
- Linseman, D.A., Heidenreich, K.A., Fisher, S.K., 2001. Stimulation of M3 muscarinic receptors induces phosphorylation of the Cdc42 effector activated Cdc42Hs-associated kinase-1 via a Fyn tyrosine kinase signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 5622–5628. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006812200>
- Liu, J.J., Hezghia, A., Shaikh, S.R., Cenido, J.F., Stark, R.E., Mann, J.J., Sublette, M.E., 2018. Regulation of monoamine transporters and receptors by lipid microdomains: implications for depression. *Neuropsychopharmacology* 43, 2165–2179. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0133-6>

- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., Sudarsanam, S., 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298, 1912–1934. <https://doi.org/10.1126/science.1075762>
- Manser, E., Leung, T., Salihuddin, H., Tan, L., Lim, L., 1993. A non-receptor tyrosine kinase that inhibits the GTPase activity of p21cdc42. *Nature* 363, 364–367. <https://doi.org/10.1038/363364a0>
- Maritzen, T., 2021. Die Endozytose — ein zellulärer Aufnahmeweg mit vielfältigen Funktionen. *BIOspektrum* 598–600. <https://doi.org/10.1007/s12268-021-1641-1>
- Markl, J., Sadava, D., Orians, G.H., Heller, H.C., Hillis, D., Berenbaum, M.R., 2011. *Purves, Biologie*, 9. Aufl. 2012 Edition. ed. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Martí i Líndez, A.-A., Reith, W., 2021. Arginine-dependent immune responses. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 78, 5303–5324. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03828-4>
- Mascia, F., Denning, M., Kopan, R., Yuspa, S.H., 2012. The Black Box Illuminated: Signals and Signaling. *J. Invest. Dermatol.* 132, 811–819. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.406>
- McMahon, H.T., Boucrot, E., 2011. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 517–533. <https://doi.org/10.1038/nrm3151>
- Mehta, D., Rahman, A., Malik, A.B., 2001. Protein Kinase C- α Signals Rho-Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitor Phosphorylation and Rho Activation and Regulates the Endothelial Cell Barrier Function *. *J. Biol. Chem.* 276, 22614–22620. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101927200>
- Mellor, H., Parker, P.J., 1998. The extended protein kinase C superfamily. *Biochem. J.* 332, 281–292.
- Menard, R.E., Mattingly, R.R., 2003. Cell surface receptors activate p21-activated kinase 1 via multiple Ras and PI3-kinase-dependent pathways. *Cell. Signal.* 15, 1099–1109. [https://doi.org/10.1016/s0898-6568\(03\)00087-1](https://doi.org/10.1016/s0898-6568(03)00087-1)
- Morgan, D.M., 1994. Polyamines, arginine and nitric oxide. *Biochem. Soc. Trans.* 22, 879–883. <https://doi.org/10.1042/bst0220879>
- Morishita, J., Nurse, P., 2023. Identification of a small RhoA GTPase inhibitor effective in fission yeast and human cells. *Open Biol.* 13, 220185. <https://doi.org/10.1098/rsob.220185>
- Morris, S.M., 2009. Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases. *Br. J. Pharmacol.* 157, 922–930. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00278.x>
- Morris, S.M., 2016. Arginine Metabolism Revisited. *J. Nutr.*, 146(12). <http://doi.org/10.3945/jn.115.226621>
- Mosaddeghzadeh, N., Ahmadian, M.R., 2021. The RHO Family GTPases: Mechanisms of Regulation and Signaling. *Cells* 10, 1831. <https://doi.org/10.3390/cells10071831>
- Mosesson, Y., Mills, G.B., Yarden, Y., 2008. Derailed endocytosis: an emerging feature of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 8, 835–850. <https://doi.org/10.1038/nrc2521>

- Murphy, C., Saffrich, R., Olivo-Marin, J.-C., Giner, A., Ansorge, W., Fotsis, T., Zerial, M., 2001. Dual function of rhoD in vesicular movement and cell motility. *Eur. J. Cell Biol.* 80, 391–398. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00173>
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T., Sato, J., 1982. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res.* 42, 3858–3863.
- Nakano, K., Takaishi, K., Kodama, A., Mammoto, A., Shiozaki, H., Monden, M., Takai, Y., 1999. Distinct Actions and Cooperative Roles of ROCK and mDia in Rho Small G Protein-induced Reorganization of the Actin Cytoskeleton in Madin–Darby Canine Kidney Cells. *Mol. Biol. Cell* 10, 2481–2491. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.8.2481>
- Newton, A.C., 2010. Protein kinase C: poised to signal. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298, E395-402. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00477.2009>
- Newton, A.C., 2001. Protein kinase C: Structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem. Rev.* 101, 2353–2364.
- Newton, Alexandra C., 2001. Protein Kinase C: Structural and Spatial Regulation by Phosphorylation, Cofactors, and Macromolecular Interactions. *Chem. Rev.* 101, 2353–2364. <https://doi.org/10.1021/cr0002801>
- Niegisch, G., 2004. Protein-Kinase-C-vermittelte Regulation der kationischen Aminosäuretransporter hCAT-2A, hCAT-2B und hCAT-3 in Oozyten von *Xenopus laevis* (Dissertation). Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Nishizuka, Y., 1995. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 9, 484–496.
- Nobes, C.D., Hall, A., 1995. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multi-molecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53–62. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90370-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90370-4)
- Nomura, N., Nomura, M., Mizuki, N., Hamada, J.-I., 2008. Rac1 mediates phorbol 12-myristate 13-acetate-induced migration of glioblastoma cells via paxillin. *Oncol. Rep.* 20, 705–711.
- Nomura, N., Nomura, M., Sugiyama, K., Hamada, J.-I., 2007a. Src regulates phorbol 12-myristate 13-acetate-activated PKC-induced migration via Cas/Crk/Rac1 signaling pathway in glioblastoma cells. *Int. J. Mol. Med.* 20, 511–519.
- Nomura, N., Nomura, M., Takhira, M., Sugiyama, K., 2007b. Phorbol 12-myristate 13-acetate-activated protein kinase C increased migratory activity of subconjunctival fibroblasts via stress-activated protein kinase pathways. *Mol. Vis.* 2007 13, 2320–2327.
- Olson, M.F., 2008. Applications for ROCK kinase inhibition. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 242–248. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.01.002>
- Oser, M., Dovas, A., Cox, D., Condeelis, J., 2011. Nck1 and Grb2 localization patterns can distinguish invadopodia from podosomes. *Eur. J. Cell Biol.* 90, 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2010.08.006>

- Palacín, M., Estévez, R., Bertran, J., Zorzano, A., 1998. Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol. Rev.* 78, 969–1054. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.4.969>
- Pan, M., Wasa, M., Lind, D.S., Gertler, J., Abbott, W., Souba, W.W., 1995. TNF-stimulated arginine transport by human vascular endothelium requires activation of protein kinase C. *Ann. Surg.* 221, 590–600; discussion 600–601. <https://doi.org/10.1097/00000658-199505000-00017>
- Parton, R.G., del Pozo, M.A., 2013. Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 98–112. <https://doi.org/10.1038/nrm3512>
- Paulusma, C.C., Lamers, W.H., Broer, S., van de Graaf, S.F.J., 2022. Amino acid metabolism, transport and signalling in the liver revisited. *Biochem. Pharmacol.* 201, 115074. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115074>
- Pawson, T., Scott, J.D., 2005. Protein phosphorylation in signaling--50 years and counting. *Trends Biochem. Sci.* 30, 286–290. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.04.013>
- Peterson, J.R., Lebensohn, A.M., Pelish, H.E., Kirschner, M.W., 2006. Biochemical suppression of small molecule inhibitors: a new strategy to identify inhibitor targets and signaling pathway components. *Chem. Biol.* 13, 443–452. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2006.02.009>
- Pike, L.J., 2006. Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J. Lipid Res.* 47, 1597–1598. <https://doi.org/10.1194/jlr.E600002-JLR200>
- Pleasure, S.J., Lee, V.M., 1993. Ntera 2 cells: a human cell line which displays characteristics expected of a human committed neuronal progenitor cell. *J. Neurosci. Res.* 35, 585–602. <https://doi.org/10.1002/jnr.490350603>
- Pontén, J., Macintyre, E.H., 1968. Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 74, 465–486. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1968.tb03502.x>
- Praefcke, G.J.K., McMahon, H.T., 2004. The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 133–147. <https://doi.org/10.1038/nrm1313>
- Prasanth, K.V., Prasanth, S.G., Xuan, Z., Hearn, S., Freier, S.M., Bennett, C.F., Zhang, M.Q., Spector, D.L., 2005. Regulating gene expression through RNA nuclear retention. *Cell* 123, 249–263. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.033>
- Puto, L.A., Pestonjamas, K., King, C.C., Bokoch, G.M., 2003. p21-activated kinase 1 (PAK1) interacts with the Grb2 adapter protein to couple to growth factor signaling. *J. Biol. Chem.* 278, 9388–9393. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208414200>
- Qualmann, B., Kessels, M.M., Kelly, R.B., 2000. Molecular Links between Endocytosis and the Actin Cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 150, 111–116.
- Ridley, A.J., 2006. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol.* 16, 522–529. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.08.006>
- Ridley, A.J., 2001. Rho GTPases and cell migration. *J. Cell Sci.* 114, 2713–2722. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.15.2713>

- Riento, K., Ridley, A.J., 2003. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 446–456. <https://doi.org/10.1038/nrm1128>
- Rothberg, K.G., Heuser, J.E., Donzell, W.C., Ying, Y.-S., Glenney, J.R., Anderson, R.G.W., 1992. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68, 673–682. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90143-Z](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90143-Z)
- Rotmann, A., 2004. Elektrophysiologische Charakterisierung und PKC-vermittelte Regulation des humanen Transporters für basische Aminosäuren hCAT-1. Johannes Gutenberg-Universität Mainz. <https://doi.org/10.25358/OPENSCIENCE-2483>
- Rotmann, A., Strand, D., Martiné, U., Closs, E.I., 2004. Protein kinase C activation promotes the internalization of the human cationic amino acid transporter hCAT-1. A new regulatory mechanism for hCAT-1 activity. *J. Biol. Chem.* 279, 54185–54192. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409556200>
- Rotmann, A., Vékony, N., Gassner, D., Niegisch, G., Strand, D., Martiné, U., Closs, E.I., 2006. Activation of classical protein kinase C reduces the expression of human cationic amino acid transporter 3 (hCAT-3) in the plasma membrane. *Biochem. J.* 395, 117–123. <https://doi.org/10.1042/BJ20051558>
- Royle, S.J., Murrell-Lagnado, R.D., 2003. Constitutive cycling: A general mechanism to regulate cell surface proteins. *BioEssays* 25, 39–46. <https://doi.org/10.1002/bies.10200>
- Royle, S.J., Qureshi, O.S., Bobanović, L.K., Evans, P.R., Owen, D.J., Murrell-Lagnado, R.D., 2005. Non-canonical YXXGPhi endocytic motifs: recognition by AP2 and preferential utilization in P2X4 receptors. *J. Cell Sci.* 118, 3073–3080. <https://doi.org/10.1242/jcs.02451>
- Rozengurt, E., 2007. Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors. *J. Cell. Physiol.* 213, 589–602. <https://doi.org/10.1002/jcp.21246>
- Ruchhoeft, M.L., Ohnuma, S., McNeill, L., Holt, C.E., Harris, W.A., 1999. The Neuronal Architecture of Xenopus Retinal Ganglion Cells Is Sculpted by Rho-Family GTPases In Vivo. *J. Neurosci.* 19, 8454–8463. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-19-08454.1999>
- Sakamoto, T., Hinton, D.R., Sakamoto, H., Ryan, S.J., McDonnell, P., 1994. Thrombin induced cytoskeletal change in cultured bovine corneal endothelial cells mediated via protein kinase C pathway. *Curr. Eye Res.* 14, 35–45.
- Scalise, M., Galluccio, M., Console, L., Pochini, L., Indiveri, C., 2018. The Human SLC7A5 (LAT1): The Intriguing Histidine/Large Neutral Amino Acid Transporter and Its Relevance to Human Health. *Front. Chem.* 6. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00243>
- Schlessinger, J., 2000. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103, 211–225. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00114-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00114-8)
- Schwartz, M., 2004. Rho signalling at a glance. *J. Cell Sci.* 117, 5457–5458. <https://doi.org/10.1242/jcs.01582>
- Scott, J.D., Newton, A.C., 2012. Shedding light on local kinase activation. *BMC Biol.* 10, 61. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-61>

- Scott, J.D., Pawson, T., 2009. Cell signaling in space and time: where proteins come together and when they're apart. *Science* 326, 1220–1224. <https://doi.org/10.1126/science.1175668>
- Sells, M.A., Knaus, U.G., Bagrodia, S., Ambrose, D.M., Bokoch, G.M., Chernoff, J., 1997. Human p21-activated kinase (Pak1) regulates actin organization in mammalian cells. *Curr. Biol. CB* 7, 202–210. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(97\)70091-5](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(97)70091-5)
- Seok, S.-H., 2021. Structural Insights into Protein Regulation by Phosphorylation and Substrate Recognition of Protein Kinases/Phosphatases. *Life* 11, 957. <https://doi.org/10.3390/life11090957>
- Sewald, X., Jiménez-Soto, L., Haas, R., 2011. PKC-dependent endocytosis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin in primary T lymphocytes. *Cell. Microbiol.* 13, 482–496. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01551.x>
- Shen, H., Ferguson, S.M., Dephoure, N., Park, R., Yang, Y., Volpicelli-Daley, L., Gygi, S., Schlessinger, J., De Camilli, P., 2011. Constitutive activated Cdc42-associated kinase (Ack) phosphorylation at arrested endocytic clathrin-coated pits of cells that lack dynamin. *Mol. Biol. Cell* 22, 493–502. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-07-0637>
- Simons, K., Ikonen, E., 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569–572. <https://doi.org/10.1038/42408>
- Slater, S.J., Seiz, J.L., Stagliano, B.A., Stubbs, C.D., 2001. Interaction of protein kinase C isozymes with Rho GTPases. *Biochemistry* 40, 4437–4445. <https://doi.org/10.1021/bi001654n>
- Sorkin, A., Goh, L.K., 2009. Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Exp. Cell Res.* 315, 683–696. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.07.029>
- Sorokina, E.M., Chernoff, J., 2005. Rho-GTPases: new members, new pathways. *J. Cell. Biochem.* 94, 225–231. <https://doi.org/10.1002/jcb.20327>
- Souba, W.W., Pacitti, A.J., 1992. How amino acids get into cells: mechanisms, models, menus, and mediators. *JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.* 16, 569–578. <https://doi.org/10.1177/0148607192016006569>
- Sperandeo, M.P., Borsani, G., Incerti, B., Zollo, M., Rossi, E., Zuffardi, O., Castaldo, P., Tagliatela, M., Andria, G., Sebastio, G., 1998. The gene encoding a cationic amino acid transporter (SLC7A4) maps to the region deleted in the velocardiofacial syndrome. *Genomics* 49, 230–236. <https://doi.org/10.1006/geno.1998.5252>
- Steinberg, S.F., 2008. Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol. Rev.* 88, 1341–1378. <https://doi.org/10.1152/physrev.00034.2007>
- Stenger, T.M., 2012. Einfluss der kleinen G-Proteine RhoA, Rac1 und Cdc42 auf das Transportverhalten und die Proteinkinase C-vermittelte Regulation des humanen kationischen Aminosäuretransporters hCAT-2A (Dissertation). Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Swanson, J.A., Watts, C., 1995. Macropinocytosis. *Trends Cell Biol.* 5, 424–428. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(00\)89101-1](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(00)89101-1)

- Tatin, F., Varon, C., Génot, E., Moreau, V., 2006. A signalling cascade involving PKC, Src and Cdc42 regulates podosome assembly in cultured endothelial cells in response to phorbol ester. *J. Cell Sci.* 119, 769–781. <https://doi.org/10.1242/jcs.02787>
- Thomas, C.M., Smart, E.J., 2008. Caveolae structure and function. *J. Cell. Mol. Med.* 12, 796–809. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00295.x>
- Toker, A., 1998. Signaling through protein kinase C. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 3, D1134-1147. <https://doi.org/10.2741/a350>
- Torrents, D., Estévez, R., Pineda, M., Fernández, E., Lloberas, J., Shi, Y.-B., Zorzano, A., Palacín, M., 1998. Identification and Characterization of a Membrane Protein (γ +L Amino Acid Transporter-1) That Associates with 4F2hc to Encode the Amino Acid Transport Activity γ +L: A CANDIDATE GENE FOR LYSINURIC PROTEIN INTOLERANCE *. *J. Biol. Chem.* 273, 32437–32445. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.49.32437>
- Vanoaica, L., Behera, A., Camargo, S.M.R., Forster, I.C., Verrey, F., 2016. Real-time functional characterization of cationic amino acid transporters using a new FRET sensor. *Pflugers Arch.* 468, 563–572. <https://doi.org/10.1007/s00424-015-1754-9>
- Vega-Agapito, V., Almeida, A., Hatzoglou, M., Bolaños, J.P., 2002. Peroxynitrite stimulates L-arginine transport system γ (+) in glial cells. A potential mechanism for replenishing neuronal L-arginine. *J. Biol. Chem.* 277, 29753–29759. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203728200>
- Vékony, 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. *Biochemistry* 40, 12387–12394. <https://doi.org/10.1021/bi011345c>
- Venardos, K., Enriquez, C., Marshall, T., Chin-Dusting, J.P.F., Ahlers, B., Kaye, D.M., 2009. Protein kinase C mediated inhibition of endothelial L-arginine transport is mediated by MARCKS protein. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 46, 86–92. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.09.712>
- Verrey, F., Closs, E.I., Wagner, C.A., Palacín, M., Endou, H., Kanai, Y., 2004. CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. *Pflugers Arch.* 447, 532–542. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1086-z>
- Viaud, J., Peterson, J.R., 2009. An allosteric kinase inhibitor binds the p21-activated kinase autoregulatory domain covalently. *Mol. Cancer Ther.* 8, 2559–2565. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-0102>
- Vina-Vilaseca, A., Bender-Sigel, J., Sorkina, T., Closs, E.I., Sorkin, A., 2011. Protein kinase C-dependent ubiquitination and clathrin-mediated endocytosis of the cationic amino acid transporter CAT-1. *J. Biol. Chem.* 286, 8697–8706. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.186858>
- Visigalli, R., Barilli, A., Parolari, A., Sala, R., Rotoli, B.M., Bussolati, O., Gazzola, G.C., Dall'Asta, V., 2010. Regulation of arginine transport and metabolism by protein kinase Ca in endothelial cells: stimulation of CAT2 transporters and arginase activity. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 49, 260–270. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.04.007>
- Watanabe, T., Wang, S., Kaibuchi, K., 2015. IQGAPs as Key Regulators of Actin-cytoskeleton Dynamics. *Cell Struct. Funct.* 40, 69–77. <https://doi.org/10.1247/csf.15003>

- Wennerberg, K., Der, C.J., 2004. Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J. Cell Sci.* 117, 1301–1312. <https://doi.org/10.1242/jcs.01118>
- Werner, A., 2020. Die Bedeutung von Aminosäuretransportern und endogener Synthese für die Bereitstellung von Arginin in humanen T-Lymphozyten und chronischen lymphatischen Leukämiezellen (Dissertation). Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Wolf, S., Janzen, A., Vékony, N., Martiné, U., Strand, D., Closs, E.I., 2002. Expression of solute carrier 7A4 (SLC7A4) in the plasma membrane is not sufficient to mediate amino acid transport activity. *Biochem. J.* 364, 767–775. <https://doi.org/10.1042/BJ20020084>
- Wolfgang, C.L., Lin, C., Meng, Q., Karinch, A.M., Vary, T.C., Pan, M., 2003. Epidermal growth factor activation of intestinal glutamine transport is mediated by mitogen-activated protein kinases. *J. Gastrointest. Surg. Off. J. Soc. Surg. Aliment. Tract* 7, 149–156. [https://doi.org/10.1016/s1091-255x\(02\)00130-0](https://doi.org/10.1016/s1091-255x(02)00130-0)
- Wu, N.-L., Huang, D.-Y., Wang, L.-F., Kannagi, R., Fan, Y.-C., Lin, W.-W., 2016. Spleen Tyrosine Kinase Mediates EGFR Signaling to Regulate Keratinocyte Terminal Differentiation. *J. Invest. Dermatol.* 136, 192–201. <https://doi.org/10.1038/JID.2015.381>
- Wu, S., Bellve, K.D., Fogarty, K.E., Melikian, H.E., 2015. Ack1 is a dopamine transporter endocytic brake that rescues a trafficking-dysregulated ADHD coding variant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 15480–15485. <https://doi.org/10.1073/pnas.1512957112>
- Xia, R., Peng, H.-F., Zhang, X., Zhang, H.-S., 2024. Comprehensive review of amino acid transporters as therapeutic targets. *Int. J. Biol. Macromol.* 260, 129646. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129646>
- Xu, H., Czerwinski, P., Hortmann, M., Sohn, H.-Y., Förstermann, U., Li, H., 2008. Protein kinase C alpha promotes angiogenic activity of human endothelial cells via induction of vascular endothelial growth factor. *Cardiovasc. Res.* 78, 349–355. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvm085>
- Yahyaoui, R., Pérez-Frías, J., 2019. Amino Acid Transport Defects in Human Inherited Metabolic Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 119. <https://doi.org/10.3390/ijms21010119>
- Zhao, S., Xu, W., Jiang, W., Yu, W., Lin, Y., Zhang, T., Yao, J., Zhou, L., Zeng, Y., Li, H., Li, Y., Shi, J., An, W., Hancock, S.M., He, F., Qin, L., Chin, J., Yang, P., Chen, X., Lei, Q., Xiong, Y., Guan, K.-L., 2010. Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. *Science* 327, 1000–1004. <https://doi.org/10.1126/science.1179689>
- Zharikov, S.I., Block, E.R., 2000. Association of L-arginine transporters with fodrin: implications for hypoxic inhibition of arginine uptake. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 278, L111-117. <https://doi.org/10.1152/ajplung.2000.278.1.L111>
- Zharikov, S.I., Sigova, A.A., Chen, S., Bubb, M.R., Block, E.R., 2001. Cytoskeletal regulation of the L-arginine/NO pathway in pulmonary artery endothelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 280, L465-473. <https://doi.org/10.1152/ajplung.2001.280.3.L465>

9 ANHANG

9.1 Lebenslauf

Persönliche Daten

10 Eidesstattliche Erklärung / Affidavit

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbst angefertigt und alle benutzten Hilfsmittel und Quellen in der Arbeit angegeben habe. Ich habe weder die jetzt als Dissertation vorgelegte Arbeit noch Teile davon bei einer anderen Fakultät bzw. einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht.

With this statement I declare that the thesis presented here was written only by me and all the resources and sources used are clearly marked within the text. I have never submitted this thesis – or parts thereof – as a dissertation at another faculty or department.

Ort, Datum

Unterschrift

Place, Date

Signature