

**Rekombinante Expression und  
Identifizierung essentieller Strukturelemente  
des humanen H<sup>+</sup>-Aminosäure-Cotransporters hPAT1**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Biowissenschaften  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Diplom-Biochemikerin Madlen Dorn  
geboren am 07.09.1980 in Lutherstadt Wittenberg

Gutachter:

1. PD Dr. Matthias Brandsch, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2. Prof. Dr. Rainer Rudolph, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
3. Prof. Dr. Hermann Koepsell, Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Halle (Saale), 25.08.2009

Tag der Verteidigung: 18.12.2009

# INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG .....	1
2 MATERIAL .....	6
2.1. CHEMIKALIEN.....	6
2.2. PUFFER, LÖSUNGEN UND MEDIEN .....	8
2.2.1. <i>Allgemeine Puffer und Lösungen</i> .....	8
2.2.2. <i>Stammlösungen und Medien für die Bakterienkultivierung</i> .....	9
2.2.3. <i>Stammlösungen für die zellfreie Expression</i> .....	10
2.3. STANDARDS UND KIT SYSTEME.....	11
2.4. ENZYME UND ANTIKÖRPER .....	12
2.5. PLASMIDE UND OLIGODESOXYNUKLEOTIDE.....	13
2.6. ORGANISMEN .....	16
2.7. GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN .....	17
3 METHODEN.....	18
3.1. MIKROBIOLOGISCHE METHODEN .....	18
3.1.1. <i>Kultivierung und Lagerung von E. coli</i> .....	18
3.1.2. <i>Herstellung elektrokompenter E. coli-Zellen</i> .....	18
3.1.3. <i>Transformation von E. coli</i> .....	18
3.2. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN .....	19
3.2.1. <i>Plasmidpräparation</i> .....	19
3.2.2. <i>Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren</i> .....	19
3.2.3. <i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i> .....	19
3.2.4. <i>Zielgerichtete Mutagenese</i> .....	20
3.2.5. <i>Restriktionsverdau von Nukleinsäuren</i> .....	20
3.2.6. <i>Agarosegelelektrophorese</i> .....	21
3.2.6.1. <i>Native Agarosegelelektrophorese (Auftrennung von DNA)</i> .....	21
3.2.6.2. <i>Denaturierende Agarosegelelektrophorese (Auftrennung von RNA)</i> .....	21
3.2.7. <i>Elution von DNA aus Agarosegelen</i> .....	21
3.2.8. <i>Ligation von DNA-Fragmenten</i> .....	22
3.2.9. <i>cRNA-Synthese</i> .....	22
3.3. EXPRESSION VON PROTEINEN IN VERSCHIEDENEN EXPRESSIONSSYSTEMEN.....	23
3.3.1. <i>Rekombinante Expression in E. coli</i> .....	23
3.3.1.1. <i>Expressionstest</i> .....	23
3.3.1.2. <i>Proteinexpression im Schüttelkolben (T7-Polymerase)</i> .....	24
3.3.1.3. <i>Fed-batch Fermentation</i> .....	24
3.3.2. <i>Zellfreie Expression</i> .....	25
3.3.2.1. <i>Kommerzielles zellfreies Proteinexpressions Kit</i> .....	25
3.3.2.2. <i>Nicht-kommerzielles, eigenes zellfreies Expressionssystem</i> .....	25
3.3.2.3. <i>Präparation des S30-Extraktes</i> .....	29
3.3.3. <i>Heterologe Expression in HRPE-Zellen</i> .....	30
3.3.3.1. <i>Zellkultur</i> .....	30
3.3.3.2. <i>Heterologe Expression</i> .....	30

3.3.4. <i>Heterologe Expression in Xenopus laevis Oozyten</i> .....	32
3.3.4.1. Einführung in die Methode.....	32
3.3.4.2. cRNA-Injektion.....	33
3.4. ISOLIERUNG UND REINIGUNG VON hPAT1 NACH REKOMBINANTER EXPRESSION IN <i>E. COLI</i> .....	33
3.4.1. Zellaufschluss und inclusion body-Präparation .....	33
3.4.2. Solubilisierung von inclusion bodies.....	34
3.4.3. Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatografie (IMAC).....	34
3.5. ISOLIERUNG UND REINIGUNG VON hPAT1 NACH ZELLFREIER EXPRESSION.....	35
3.5.1. Unlösliche Expression.....	35
3.5.2. Lösliche Expression.....	35
3.6. ISOLIERUNG UND REINIGUNG DER T7-POLYMERASE .....	36
3.7. PROTEINANALYTIK .....	36
3.7.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	36
3.7.1.1. SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen.....	36
3.7.1.2. SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen.....	37
3.7.2. Western Blot.....	37
3.7.3. Bestimmung der Proteinkonzentration.....	38
3.7.4. Massenspektrometrische Analyse.....	39
3.7.5. Circular dichroismus-Spektroskopie.....	39
3.8. TRANSPORTSTUDIEN.....	40
3.8.1. Transportuntersuchungen an transfizierten HRPE-Zellen .....	40
3.8.2. Transportuntersuchungen an injizierten <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	40
3.9. IMMUNFLUORESCENZ-MIKROSKOPIE.....	41
3.9.1. Immunfluoreszenz-Untersuchung an transfizierten HRPE-Zellen.....	41
3.9.2. Immunfluoreszenz-Untersuchung an injizierten <i>Xenopus laevis</i> Oozyten .....	42
3.10. BIOTINYLIERUNG FREIER SH-GRUPPEN.....	42
3.11. DEGLYKOSYLIERUNG .....	43
3.12. DATENAUSWERTUNG.....	44
4 ERGEBNISSE & DISKUSSION.....	46
4.1. REKOMBINANTE EXPRESSION VON hPAT1 IN <i>E. COLI</i> .....	46
4.1.1. Klonierung der hPAT1-cDNA in verschiedene <i>E. coli</i> -Expressionsvektoren .....	47
4.1.2. Expressionsstudien von hPAT1 mit N- oder C-terminalem Histidin-tag .....	48
4.1.3. Expression von hPAT1 mit N-terminalem T7-tag .....	52
4.1.4. Expressionsstudien von hPAT1 mit N-terminalen Fusionsproteinen.....	53
4.1.5. Rekombinante Expression des humanen H <sup>+</sup> -Peptid-Cotransporters hPEPT2 .....	55
4.1.6. Diskussion der Ergebnisse zur rekombinanten Expression in <i>E. coli</i> .....	57
4.2. ZELLFREIE EXPRESSION DES HUMANEN H <sup>+</sup> -AMINOSÄURE-COTRANSPORTERS hPAT1... ..	62
4.2.1. Vorversuche zur zellfreien Expression.....	66
4.2.2. Etablierung eines nicht-kommerziellen, eigenen Expressionssystems.....	68
4.2.3. Optimierung der zellfreien Expression von hPAT1.....	71
4.2.4. Zusammenfassung der Ergebnisse der zellfreien Expression und Ausblick .....	79
4.3. IDENTIFIZIERUNG EINER ESSENTIELLEN DISULFIDBRÜCKE IN hPAT1 .....	81
4.3.1. Klonierung der hPAT1 cDNA in den Oozytenexpressionsvektor pNKS und anschließende Bestimmung der Transportcharakteristika .....	84
4.3.2. Einfluss von DTT auf die Transportfunktion von hPAT1.....	85

4.3.3. <i>Untersuchung der Transportaktivität und Oberflächenexpression von Cystein-Einzelmutanten</i> .....	87
4.3.4. <i>Nachweis einer Disulfidbrücke in hPAT1</i> .....	91
4.3.5. <i>Zusammenfassung der Ergebnisse</i> .....	96
4.4. EINFLUSS VON N-GLYKOSYLIERUNGEN AUF DIE TRANSPORTAKTIVITÄT UND OBERFLÄCHENEXPRESSION VON hPAT1 .....	98
4.4.1. <i>N-Glykosylierungsmuster von hPAT1</i> .....	100
4.4.2. <i>Untersuchung der Transportfunktion von N-Glykosylierungs-Mutanten</i> .....	105
4.4.3. <i>Zelluläre Lokalisation der N-Glykosylierungs-Mutanten</i> .....	107
4.4.4. <i>Zusammenfassung der Ergebnisse</i> .....	109
5 ZUSAMMENFASSUNG .....	111
6 LITERATURVERZEICHNIS.....	114
7 ANHANG .....	126

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AcP	Acetylphosphat
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintri-phosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
CD	Circulardichroismus
CECF	<i>continuous exchange cell free expression</i>
CFCF	<i>continuous flow cell free expression</i>
CMC	<i>critical micellar concentration</i>
CTP	Cytidintri-phosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
FM	<i>feeding-Mix</i>
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GLP1-Rezeptor	<i>Glucagon-like peptide-1-Rezeptor</i>
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GSH	Glutathion reduziert ( $\gamma$ -Glutamylcysteinylglyzin)
GSSG	Glutathion oxidiert
GTP	Guanosintri-phosphat
HA	Hämagglutinin
hPAT1	humaner protonen-abhängiger Aminosäuretransporter 1 = humaner H <sup>+</sup> -Aminosäure-Cotransporter 1
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HRPE	<i>human retina pigment epithelium</i>
IMAC	Immobilisierte Metallchelataffinitätschromatographie
IU	<i>infectious units</i>
kDa	Kilodalton
LYAAT1	<i>lysosomal amino acid transporter 1</i>
MSP	<i>Membrane Scaffold Protein</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>

NTA	Nitrilotriessigsäure ( <i>Nitrilotriacetic acid</i> )
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
ORi	Oocyten-Ringer-Lösung
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEP	Phosphoenolpyruvat
PEPT2	H <sup>+</sup> /Peptid-Cotransporter 2
RM	Reaktionsmix
rMVA	rekombinantes modifiziertes Vaccinia Virus Ankara
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
S.E.M.	Standardfehler
SGLT1	Na <sup>+</sup> /Glukose-Cotransporter
SLC	<i>solute carrier</i>
Spezies:	h = Mensch m = Maus r = Ratte rb = Kaninchen
SUMO	<i>small ubiquitin-like modifiers</i>
SV	Säulenvolumen
TCEP	Tris(2-Carboxyethyl)phosphin
TMD	Transmembrandomänen
UTP	Uridintriphosphat
<i>X. laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>
X-ray	Röntgenkristallographie

# 1 EINLEITUNG

Eine Grundvoraussetzung für alle Lebensvorgänge ist der Transport und der Austausch von Stoffen, Energie und Informationen zwischen einer Zelle und ihrer Umgebung. Transportvorgänge erfolgen in erster Linie über Transportproteine, die in die zellumgebende Membran eingebaut sind. Die Superfamilie der Transporter für organische Solute (SLC – *solute carrier*) stellt die größte Gruppe der Transportproteine dar (Fredriksson *et al.* 2008). Sie umfasst derzeit 384 Transporter, u.a. für organische Ionen, Aminosäuren, Zucker, Purine oder Fettsäuren, die in 46 verschiedene SLC-Familien eingeordnet werden. Nach der Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) repräsentiert die SLC-Superfamilie damit die zweitgrößte Gruppe der Membranproteine.

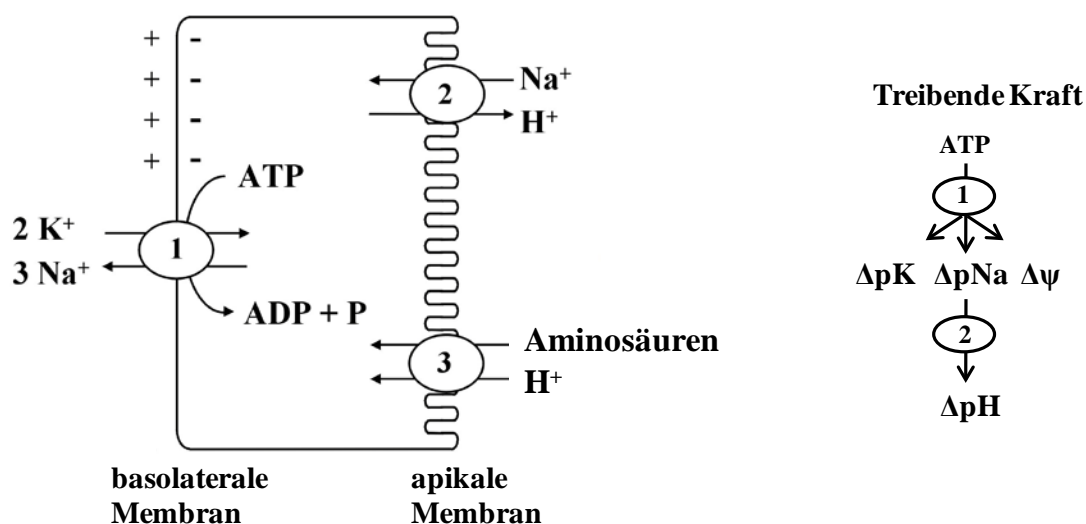
Der H<sup>+</sup>-Aminosäure-Cotransporter PAT1 (*proton-coupled amino acid transporter 1*) gehört zur SLC-Familie 36. Bereits zu Beginn der 1990er Jahre wurde ein H<sup>+</sup>-gekoppelter Aminosäure-Cotransporter durch Thwaites und Mitarbeiter funktionell durch Untersuchungen an der humanen intestinalen Zelllinie Caco-2 beschrieben (Thwaites *et al.* 1993). Die Identifizierung und Klonierung des Transporters erfolgte 2001 durch Sagné und Mitarbeiter aus Neuronen des Rattenhirns als LYAAT1 (*lysosomal amino acid transporter 1*) (Sagné *et al.* 2001). Kurz danach wurde die PAT1-cDNA der Maus (mPAT1) isoliert (Boll *et al.* 2002). Die Klonierung und funktionelle Charakterisierung des humanen H<sup>+</sup>-gekoppelten-Aminosäure-Cotransporters hPAT1 erfolgte im Jahr 2003 aus Caco-2-Zellen (Boll *et al.* 2003b; Chen *et al.* 2003). Mit Hilfe von Immunfluoreszenzstudien wurde der Transporter in der apikalen Membran von intestinalen Caco-2-Zellen nachgewiesen (Chen *et al.* 2003).

hPAT1 ist neben anderen Transportsystemen für die Absorption von Abbauprodukten des luminalen Proteinverdaus (Aminosäuren) am Darmepithel verantwortlich. Des Weiteren ist hPAT1 in der Membran von neuronalen Lysosomen lokalisiert und vermittelt den Export von Aminosäuren nach lysosomaler Proteolyse in das Cytoplasma der Zelle. Zudem wurde die mRNA des Transporters im Skelettmuskel, in der Niere, der Lunge, der Leber und in der Milz nachgewiesen (Boll *et al.* 2002; Chen *et al.* 2003). Typische hPAT1-Substrate sind kurzketige neutrale Aminosäuren wie Glyzin, L-Alanin und L-Prolin sowie Aminosäurederivate wie z.B. trans-4-Hydroxy-L-prolin (THLP),  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure (AIB) und  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) (Anderson *et al.* 2004; Boll *et al.* 2002; Brandsch 2006; Chen *et al.* 2003; Metzner *et al.* 2004; Thwaites *et al.* 1993; Thwaites & Anderson 2007). Des Weiteren werden

Osmolyte wie Sarcosin und Betain transportiert (Thwaites *et al.* 1995b; Wunz & Wright 1993). Eine Besonderheit des Transportsystems liegt in der Akzeptanz von D-Enantiomeren (z.B. D-Alanin, D-Prolin oder D-Serin) mit gleicher bzw. höherer Affinität als die der entsprechenden L-Enantiomere (Boll *et al.* 2002; Boll *et al.* 2003a; Ranaldi *et al.* 1994; Thwaites *et al.* 1995a). Die Affinitätskonstanten ( $K_t$ ,  $K_i$ ) liegen im millimolaren Bereich (1–10 mM) (Boll *et al.* 2004). Damit stellt hPAT1 ein Transportsystem mit niedriger Affinität aber hoher Kapazität dar. Als Inhibitoren des Aminosäuretransportes wurden Serotonin, L-Tryptophan und Tryptamin identifiziert (Metzner *et al.* 2005).

Neben den physiologischen Substraten werden auch pharmazeutisch relevante Wirkstoffe mit ähnlicher Grundstruktur von hPAT1 akzeptiert. Dazu gehören z.B. D-Cycloserin, L-Azetidin-2-carbonsäure, 3-Amino-1-propansulfonsäure, 3,4-Dehydro-L-prolin, Vigabatrin und andere GABA-Analoga (Larsen *et al.* 2008; Metzner *et al.* 2004; Thwaites & Anderson 2007). Aufgrund des breiten Substratspektrums gehört hPAT1 vermutlich zu den wichtigsten Transportsystemen für GABA-verwandte Wirkstoffe sowie andere *drugs* und *prodrugs* am Darmepithel. Der Transporter ermöglicht die orale Gabe dieser Substanzen.

Der Transport von Aminosäuren durch hPAT1 erfolgt in Abhängigkeit von einem nach innen gerichteten Protonengradienten. PAT1 transportiert eine Aminosäure im Symport mit einem Proton in einer 1:1 Stöchiometrie (Boll *et al.* 2002). Die Bindung von Aminosäure und Proton erfolgt nach einem geordneten Mechanismus, wobei zuerst das Proton bindet (Foltz *et al.*



**Abb. 1.1 Schematische Darstellung des intestinalen Aminosäuretransportes über PAT1 an Epithelzellen.** 1 – Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, 2 – Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscher, 3 – PAT1; ΔpK, ΔpNa und ΔpH beschreiben die chemischen Transmembrangradienten für K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> und H<sup>+</sup>; Δψ stellt das Membranpotential dar. Modifiziert nach Ganapathy *et al.* 1994.



2005). Erst kürzlich konnte der für die Bindung und Translokation des Protons essentielle Histidinrest (His 55) identifiziert werden (Metzner *et al.* 2008). Der für den Transportprozess benötigte  $H^+$ -Gradient wird durch das Zusammenspiel der basolateral lokalisierten  $Na^+/K^+$ -ATPase und des in der apikalen Membran lokalisierten  $Na^+/H^+$ -Austauschers erzeugt. Abbildung 1.1 veranschaulicht den tertiär aktiven  $H^+$ /Aminosäuresymport via PAT1. Eine maximale Transportrate wurde bei einem extrazellulären pH-Wert von 5,0 bis 5,5 beobachtet (Boll *et al.* 2002; Chen *et al.* 2003).

Strukturell wurde der aus 476 Aminosäureresten (53 kDa) bestehende hPAT1 bisher nicht charakterisiert. Seine Membrantopologie ist ungeklärt. Chen und Mitarbeiter schlagen eine Organisation des Membranproteins in 9 TMD vor (Chen *et al.* 2003), wohingegen in einem anderen Modell von 11 TMD ausgegangen wird (Boll *et al.* 2003b). Für beide Varianten wird für den N-Terminus eine intrazelluläre und für den C-Terminus eine extrazelluläre Lokalisation vorhergesagt.

Aufgrund seiner Fähigkeit, pharmazeutisch relevante Stoffe aus dem Darm aufzunehmen, ist die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur des Transporters insbesondere für die pharmazeutische Industrie von großer Bedeutung. Detaillierte strukturelle Informationen würden die Entwicklung neuer Wirkstoffe mit verbesserter oraler Verfügbarkeit durch *computer aided drug design* ermöglichen. Die therapeutische Relevanz von Membranproteinen wird durch die Tatsache verdeutlicht, dass 60 % aller derzeitigen Medikamente auf Membranproteine gerichtet sind. Bisher ist jedoch nur eine sehr geringe Anzahl dreidimensionaler Strukturen von Membranproteinen bekannt. Von den derzeit insgesamt ~ 30000 Einträgen in der Proteinstrukturdatenbank betreffen nur ~ 200 Membranproteine (überwiegend prokaryotische Proteine). Dieses Missverhältnis beruht auf der Schwierigkeit bei der Strukturaufklärung von (eukaryotischen) Membranproteinen. Eines der größten Probleme hierbei ist die Bereitstellung größerer Mengen an korrekt gefaltetem und funktionellem Protein. Nur in wenigen Ausnahmefällen können Membranproteine in ausreichenden Mengen aus natürlichen Quellen isoliert werden (z.B. Rhodopsin aus *Halobacterium salinarium* (Henderson *et al.* 1990) oder Rhodopsin aus der Rinderretina (Palczewski *et al.* 2000)). Für die Mehrzahl der Membranproteine ist die Konzentration in der Membran jedoch zu gering, sodass ihre Gewinnung durch rekombinante Expression erfolgen

muss (Tate 2001)<sup>1</sup>. Allerdings ist auch das für diese Proteinklasse extrem schwierig. Aufgrund toxischer Effekte werden häufig nur sehr geringe Proteinausbeuten erhalten. Der Hauptgrund dafür liegt vermutlich in der hydrophoben Natur von Membranproteinen. Die Überexpression resultiert oft in der Insertion der Proteine in die Membran des Wirtsorganismus, wodurch die Membranintegrität negativ beeinflusst wird. Dies führt zu einer Wachstumsverzögerung oder sogar Zelllyse des Wirtsorganismus (Klammt *et al.* 2006). Zudem wird vermutet, dass die Überexpression heterologer Membranproteine die Expression essentieller homologer Membranproteine verhindert (Wuu & Swartz 2008). Des Weiteren sind die nachfolgende Reinigung und notwendige Rekonstitution des gewonnenen Proteins in Detergenzien und Liposomen nicht trivial. Die Kristallisation von Membranproteinen wird wiederum durch die Anwesenheit von Detergenzien negativ beeinträchtigt. Die dynamische Struktur der flexiblen *loop*-Regionen in Membranproteinen erschwert außerdem die Kontaktbildung innerhalb des Kristalls (Lundstrom 2006).

Erste Anhaltspunkte zur 3D-Struktur von Membranproteinen können durch die Methode der zielgerichteten Mutagenese gewonnen werden. Der Austausch spezifischer Aminosäuren und die funktionelle Untersuchung der generierten Varianten eines Proteins ermöglichen die Identifizierung der für seine Funktion essentiellen Aminosäuren (Dorn *et al.* 2009b; Metzner *et al.* 2008). Des Weiteren können auch Hinweise auf strukturelle Eigenschaften erhalten werden (Dorn *et al.* 2009a). Die Proteine werden heterolog in gut etablierten Expressionssystemen exprimiert und die Funktion wird *in vivo* analysiert.

Trotz der erwähnten Schwierigkeiten wurden insbesondere in den letzten beiden Jahren vielversprechende Ergebnisse auf dem Gebiet der Strukturaufklärung von eukaryotischen Membranproteinen erzielt. So konnten innerhalb der Gruppe der GPCRs die dreidimensionalen Strukturen des humanen  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors (Cherezov *et al.* 2007; Rasmussen *et al.* 2007), des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors des Truthahns (Warne *et al.* 2008) und des humanen A<sub>2A</sub> Adenosin Rezeptors (Jaakola *et al.* 2008) nach rekombinanter Expression der Proteine in Sf9-Zellen aufgeklärt werden. Für die Familie der eukaryotischen SLCs ist allerdings bis heute

---

<sup>1</sup> Die gebräuchlichsten Expressionssysteme sind derzeit prokaryotische wie z.B. *Escherichia coli*, Hefen wie *Pichia pastoris*, Insektenzellen wie z.B. Sf9-Zellen/Baculovirus oder verschiedene Säugerzellen (COS-Zellen oder CHO-Zellen) (Junge *et al.* 2008). Eine vergleichsweise junge Methode zur rekombinanten Expression stellt die zellfreie Expression dar. Eigenschaften wie das Fehlen eines lebenden Wirtsorganismus und der freie Zugriff auf die Reaktion macht diese Methode insbesondere für die Expression von Membranproteinen attraktiv (Keller *et al.* 2008; Schwarz *et al.* 2007a). Auf die in der Arbeit verwendeten Expressionssysteme wird in den entsprechenden Kapiteln des Methoden- sowie des Ergebnis- und Diskussionsteil näher eingegangen.

keine einzige dreidimensionale Struktur bekannt. Auch hinsichtlich einer rekombinanten Expression von Mitgliedern dieser Proteinfamilie sind bisher wenige Untersuchungen publiziert worden. Überzeugende Daten liegen vor zur Expression des Serotonin-Transporters rSERT (in *E. coli*, *Pichia pastoris*, Sf9-Zellen und in verschiedenen Säuger-Zelllinien) (Tate *et al.* 2003), des humanen Na<sup>+</sup>/Glukose Transporters hSGLT1 (in *E. coli*) (Panayotova-Heiermann *et al.* 1999; Quick & Wright 2002), der organischen Kationen-Transporter rOCT1 und rOCT2 (in Sf9-Zellen (rOCT1) und im zellfreien Expressionssystem (rOCT1 und rOCT2)) (Keller *et al.* 2005; Keller *et al.* 2008) sowie des organischen Anionen-Transporters rOAT1 (in *Saccharomyces cerevisiae* und im zellfreien Expressionssystem) (Sawamiphak *et al.* 2005; Keller *et al.* 2008).

Das Ziel dieser Arbeit war, Vorarbeiten für eine Strukturaufklärung des humanen H<sup>+</sup>-Aminosäure-Cotransporters hPAT1 zu leisten und funktionell wichtige Strukturelemente aufzuklären. Im ersten Teil der Arbeit sollte der Transporter rekombinant, in für die Strukturaufklärung ausreichenden Mengen, exprimiert werden. Dafür sollte sowohl das *E. coli*-Expressionssystem als auch das zellfreie Expressionssystem zum Einsatz kommen. Anschließend sollten erste biophysikalische und funktionelle Charakterisierungen des Transportproteins erfolgen.

Der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit bestand in zielgerichteten Mutagenesestudien zur Aufklärung der Funktion extrazellulärer Cysteinseitenketten und deren potentielle Beteiligung an Disulfidbrücken. Des Weiteren sollten der N-Glykosylierungsstatus von hPAT1 aufgeklärt und der Einfluss potentieller Glykanstrukturen auf die Transportaktivität analysiert werden. Die Ergebnisse solcher Untersuchungen sind wiederum für rekombinante Expression und Proteinpräparation von Bedeutung. Da N-Glykosylierungen typisch eukaryotische Proteinmodifizierungen darstellen, würde nur ein von Glykanstrukturen unabhängiger Transportmechanismus die Expression eines funktionsfähigen Transporters in prokaryotischen Expressionssystemen erlauben. Die Existenz von essentiellen Disulfidbrücken würde den Zusatz besonderer Additive während der Proteinpräparation erfordern.

## 2 MATERIAL

### 2.1. Chemikalien

Tab. 2.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller/Bezugsquelle
1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin (DMPC)	Fluka (Buchs, Schweiz)
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	AppliChem (Darmstadt)
2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES)	Fluka (Buchs, Schweiz)
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)	AppliChem (Darmstadt)
4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochlorid (DAPI)	Roth (Karlsruhe)
5-Formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolsäure	Fluka (Buchs, Schweiz)
Acetylphosphat Kalium-Lithiumsalz	Fluka (Buchs, Schweiz)
Adenosin-5'-triphosphat	Roche Diagnostics (Mannheim); Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Agar-Agar	Roth (Karlsruhe)
Albumin vom Rinderserum (BSA)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Roth (Karlsruhe)
Ampicillin Natriumsalz	Roth (Karlsruhe)
Chloramphenicol	Roth (Karlsruhe)
Citifluor Montagelösung	Plano GmbH (Wetzlar)
<i>complete</i> Proteaseinhibitor	Roche Diagnostics (Mannheim)
Cytidin-5'-triphosphat	Roche Diagnostics (Mannheim); Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Digitonin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Dithio-DL-threitol (DTT)	AppliChem (Darmstadt)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Guanosin-5'-triphosphat	Roche Diagnostics (Mannheim); Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Harnstoff	Roth (Karlsruhe)
Hefeextrakt (Lyophilisat)	Roth (Karlsruhe)
Hefeextrakt (Paste)	DHW GmbH (Hamburg)
Imidazol	Fluka (Buchs, Schweiz); AppliChem(Darmstadt)
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	AppliChem (Darmstadt)
Kaliumacetat	AppliChem (Darmstadt)
Kanamycinsulfat	Roth (Karlsruhe)

Chemikalie (Fortsetzung)	Hersteller/Bezugsquelle (Fortsetzung)
L-[2,3- <sup>3</sup> H]Prolin	Amersham (Little Chalfont, UK)
L-Glutathion oxidiert (GSSG)	AppliChem (Darmstadt)
L-Glutathion reduziert (GSH)	AppliChem (Darmstadt)
Luminol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Magermilchpulver	Roth (Karlsruhe)
Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin	Wacker Biotech (Kempten)
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth (Karlsruhe)
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe)
n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranosid (DDM)	Antrace (Maumee, USA)
Nonylphenyl-polyethylene glycol (Nonidet <sup>TM</sup> P 40)	AppliChem (Darmstadt)
p-Cumarinsäure	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Phosphoenolpyruvat Monokaliumsalz	Fluka (Buchs, Schweiz)
Polyethylenglycol <i>tert</i> -octylphenylether (Triton <sup>®</sup> X-100)	AppliChem (Darmstadt)
Polyethylenglycol 8000 (PEG 8000)	AppliChem (Darmstadt)
Polyoxyethylen 20 cetyl ether (Brij <sup>®</sup> 58)	Fluka (Buchs, Schweiz)
Polyoxyethylen 20 sorbitanmonolaurat (Tween <sup>®</sup> 20)	Roth (Karlsruhe)
Polyoxyethylen 20 stearyl ether (Brij <sup>®</sup> 78)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Polyoxyethylen 23 lauryl ether (Brij <sup>®</sup> 35)	Fluka (Buchs, Schweiz)
RNAguard <sup>TM</sup> (RNase Inhibitor)	Amersham Bioscience (Piscataway, USA)
RNase-ExitusPlus <sup>TM</sup>	AppliChem (Darmstadt)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth (Karlsruhe)
tRNA (von <i>E. coli</i> MRE 600)	Roche Diagnostics (Mannheim)
Trypton/Pepton aus Casein	Roth (Karlsruhe)
Uridin-5'-triphosphat	Roche Diagnostics (Mannheim); Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Alle proteinogenen L-Aminosäuren wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen, außer Glyzin (Fluka, Buchs, Schweiz und Roth, Karlsruhe).

Hier nicht aufgeführte, gängige Substanzen wurden von den Firmen Roth, Sigma-Aldrich, Merck bzw. AppliChem bezogen. Für die Herstellung aller verwendeter Lösungen und Puffersysteme wurden ausschließlich Chemikalien mit dem Reinheitsgrad p.A. und deionisiertes Wasser verwendet.

## 2.2. Puffer, Lösungen und Medien

### 2.2.1. Allgemeine Puffer und Lösungen

**Tab. 2.2** Verwendete Puffer und Lösungen für den allgemeinen Laborbedarf

Puffer	Zusammensetzung/Bezugsquelle
2x RNA-Ladepuffer	Fermentas (St. Leon-Rot)
2x SDS-Probenpuffer (6 M Urea)	100 mM Tris pH 8; 6 M Harnstoff; 0,02 % Bromphenolblau; 100 mM $\beta$ -Mercaptoethanol; 5 % SDS; 15 % Glycerin
2x SDS-Probenpuffer (8 M Urea) (nicht reduzierend)	100 mM Tris pH 8; 8 M Harnstoff; 0,02 % Bromphenolblau; 10 % SDS
6x DNA-Probenpuffer	30 % Glycerin; 0,25 % (w/v) Bromphenolblau
Aufnahmepuffer	25 mM MES/Tris pH 6; 140 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 1,8 mM $\text{CaCl}_2$ ; 0,8 mM $\text{MgSO}_4$ ; 5 mM D-(+)-Glukose
Barth-Medium (Lagerpuffer für <i>Xenopus laevis</i> Oozyten)	5 mM HEPES/NaOH pH 7,4; 100 mM NaCl; 1 mM KCl; 1 mM $\text{CaCl}_2$ ; 10000 U/ml Penicillin; 10 mg/ml Streptomycin
<i>complete</i> Proteaseinhibitor (50x)	1 Tablette gelöst in 200 $\mu\text{l}$ $\text{H}_2\text{O}$
D-MEM: F12 (1:1) Glutamax <sup>TM</sup> I	Invitrogen (Karlsruhe)
ECL 1	100 mM Tris pH 8,5; 2,5 mM Luminol; 0,9 mM p-Cumarinsäure
ECL 2	100 mM Tris pH 8,5; 0,02 % $\text{H}_2\text{O}_2$
Entfärber für Polyacrylamidgele	10 % (v/v) Essigsäure
Entwickler- und Fixiererlösung Kodak <sup>TM</sup> Processing chemicals für Western Blot	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Färbelösung für Polyacrylamidgele	10 % (v/v) Essigsäure; 10 mg/ml Coomassie <sup>®</sup> Brilliantblau G-250
Fixierlösung für Polyacrylamidgele	10 % (v/v) Essigsäure; 25 % (v/v) 2-Propanol
Fixierlösung für Immunfluoreszenz	4 % p-Formaldehyd; 0,05 % Triton <sup>®</sup> X-100 in PBS
Lysispuffer (HRPE-Zellen)	0,2 M NaOH; 1 % SDS
Lysispuffer (Oozyten)	20 mM Tris/HCl pH 7,4; 100 mM NaCl; 1 % Triton X-100; 1x <i>complete</i> Proteaseinhibitor
ORi PAT	10 mM MES/Tris pH 6,5; 100 mM NaCl; 2 mM KCl; 1 mM $\text{CaCl}_2$ ; 1 mM $\text{MgCl}_2$
PBS	1,5 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 8 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 135 mM NaCl; 3 mM KCl
Ponceau-Färbelösung	3 % Trifluoressigsäure; 0,2 % Ponceau S
Puffer für denaturierende Agarosegelelektrophorese	5 mM Natriumacetat pH 7; 20 mM MOPS
S30 A-Puffer	10 mM Tris-Acetat pH 8,2; 14 mM Magnesiumacetat; 6 mM KCl; 6 mM $\beta$ -Mercaptoethanol
S30 B-Puffer	10 mM Tris-Acetat pH 8,2; 14 mM Magnesiumacetat; 6 mM KCl; 1 mM DTT; 100 $\mu\text{M}$ PMSF
S30 C-Puffer	10 mM Tris-Acetat pH 8,2; 14 mM Magnesiumacetat; 600 $\mu\text{M}$ Kaliumacetat; 500 $\mu\text{M}$ DTT
Sammelgelpuffer für Polyacrylamidgel	1,8 M Tris pH 6,8

Puffer (Fortsetzung)	Zusammensetzung/Bezugsquelle (Fortsetzung)
Solubilisierungspuffer	100 mM Tris pH 8; 20 mM SDS; 1 mM EDTA; 100 mM DTT
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris pH 8; 100 mM EDTA; 1 M Essigsäure
TBT-Puffer	50 mM Tris pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,2 % Tween® 20
Trenngelpuffer für Polyacrylamidgele	1,25 M Tris pH 8,8
Tris-Glyzin Puffer (Laufpuffer für SDS-PAGE)	25 mM Tris; 192 mM Glyzin; 0,1 % SDS
Trocknungslösung für Polyacrylamidgele	45 % Ethanol; 5 % Glycerin
Western Blot-Transferpuffer	20 mM Tris; 150 mM Glyzin; 0,05 % SDS; 20 % Methanol

## 2.2.2. Stammlösungen und Medien für die Bakterienkultivierung

Tab. 2.3 Kulturmedien

Medien	Zusammensetzung
LB-Medium	10 g/l Trypton/Pepton; 5 g/l Hefeextrakt (Lyophilisat); 5 g/l NaCl; autoklaviert verwendet
LB-Agar Platten	10 g/l Trypton; 5g/l Hefeextrakt (Lyophilisat); 10 g/l NaCl; 15 g/l Agar; 1g/l Glukose; Lösung autoklavieren und nach Abkühlen unter 60 °C Zugabe der entsprechenden Antibiotika-Stammlösung
SOC-Medium	20 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt (Lyophilisat); 10 g/l NaCl; 0,19 g/l KCl; Lösung Autoklavieren dann Zugabe von: 10 ml/l Glukose (40 %) und 10 ml/l Magnesium-Lösung (1 M MgSO <sub>4</sub> , 1 M MgCl <sub>2</sub> )
TB-Medium	24 g/l Hefeextrakt (Lyophilisat); 12 g/l Trypton; 2,13 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 12,54 g/l K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,4 % (v/v) Glycerin
2x YPTG-Medium	10 g/l Hefeextrakt (Lyophilisat); 16 g/l Trypton/Pepton; 5 g/l NaCl; 3 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 9,12 g/l K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 19,8 g/l D-(+)-Glukose

Tab. 2.4 Verwendete Lösungen für eine *fed-batch* Fermentation in einem Biostat ED Bioreaktor

Fermentationslösungen	Zusammensetzung für 6 l
Hefeextrakt-Vollmedium	300 g Hefeextrakt (Paste); 3 g Ammoniumchlorid gelöst in 5 l ddH <sub>2</sub> O
Glukose-Lösung	30 g D-(+)-Glukose gelöst in 250 ml ddH <sub>2</sub> O
Magnesiumsulfat-Lösung	4,1 g MgSO <sub>4</sub> gelöst in 250 ml ddH <sub>2</sub> O
di-Kaliumhydrogenphosphat-Lsg.	66 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> gelöst in 500 ml ddH <sub>2</sub> O
<i>feeding</i> -Lösung	300 g/l Hefeextrakt, 125 g/l D-(+)-Glukose
pH-Regulatorlösungen	10 % (m/v) Kaliumhydroxid 10 % (v/v) Phosphorsäure

**Tab. 2.5** Verwendete Antibiotika-Stammlösungen für Bakterienkulturen

Antibiotika	Zusammensetzung
Ampicillin	100 mg/ml (gelöst in H <sub>2</sub> O)
Chloramphenicol	34 mg/ml (gelöst in EtOH)
Kanamycin	50 mg/ml (gelöst in H <sub>2</sub> O)

Die Antibiotika-Stammlösungen wurden den Kulturmedien im Verhältnis 1:1000 zugesetzt. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe einer 1 M IPTG-Stammlösung (gelöst in H<sub>2</sub>O) induziert.

### 2.2.3. Stammlösungen für die zellfreie Expression

**Tab. 2.6** Übersicht über die zur Herstellung des 4 mM Aminosäure-Mix (AS-Mix) und des RCWMDE-Mix benötigten Aminosäure-Stammlösungen

Aminosäure	Konzentration	gelöst in	Bemerkung
L-Alanin	100 mM	H <sub>2</sub> O	
L-Arginin	100 mM	H <sub>2</sub> O	
L-Asparagin	100 mM	H <sub>2</sub> O	Lösen im Ultraschallbad
L-Asparaginsäure	100 mM	H <sub>2</sub> O	Lösen durch Erwärmen (bis max. 75 °C)
L-Cystein	100 mM	100 mM HEPES pH 7,4	
L-Glutamin	100 mM	H <sub>2</sub> O	
L-Glutaminsäure	100 mM	H <sub>2</sub> O	Lösen durch Erwärmen (bis max. 75 °C), Ultraschallbad und Zugabe von KOH
Glyzin	100 mM	H <sub>2</sub> O	
L-Histidin	100 mM	H <sub>2</sub> O	
L-Isoleucin	100 mM	H <sub>2</sub> O	
L-Leucin	100 mM	H <sub>2</sub> O	
L-Lysin	100 mM	H <sub>2</sub> O	
L-Methionin	100 mM	100 mM HEPES pH 7,4	
L-Prolin	100 mM	H <sub>2</sub> O	
L-Phenylalanin	100 mM	H <sub>2</sub> O	
L-Serin	100 mM	H <sub>2</sub> O	
L-Threonin	100 mM	H <sub>2</sub> O	
L-Tryptophan	100 mM	100 mM HEPES pH 8	Lösen durch Erwärmen (bis max. 75 °C), Ultraschallbad
L-Tyrosin	20 mM	H <sub>2</sub> O	Lösen durch Erwärmen (bis max. 75 °C), Ultraschallbad
L-Valin	100 mM	H <sub>2</sub> O	

Für die Herstellung des 4 mM Aminosäure-Mix (AS-Mix) (50 ml) wurden je 2 ml der 100 mM Aminosäure-Stammlösungen und 10 ml der 20 mM Tyrosin-Stammlösung zusammen gegeben.



Der RCWMDE-Mix (je 16,7 mM) bestand aus jeweils 2 ml der 100 mM Aminosäure-Stammlösung von L-Arginin, L-Cystein, L-Tryptophan, L-Methionin, L-Asparaginsäure und L-Glutaminsäure.

**Tab. 2.7** Übersicht über die zur Herstellung des 75x NTP-Mix benötigten Nukleotid-Stammlösungen

Nukleotid	Konzentration	gelöst in	Bemerkung
ATP	360 mM	H <sub>2</sub> O, pH 7	Lösen durch Zugabe von NaOH
CTP	240 mM	H <sub>2</sub> O, pH 7	Lösen durch Zugabe von NaOH
GTP	240 mM	H <sub>2</sub> O, pH 7	Lösen durch Zugabe von NaOH
UTP	240 mM	H <sub>2</sub> O, pH 7	Lösen durch Zugabe von NaOH

Für die Herstellung des 75x NTP-Mix wurden die Nukleotid-Stammlösungen im Verhältnis 1:1:1:1 gemischt.

**Tab. 2.8** Weitere Stammlösungen für die zellfreie Expression

Substanz	Konzentration	gelöst in	Bemerkung
tRNA	40 mg/ml	H <sub>2</sub> O	
Acetylphosphat	1 M	H <sub>2</sub> O, pH 7	Lösen durch Zugabe von KOH, als Suspension verwendet
Phosphoenolpyruvat	1 M	H <sub>2</sub> O, pH 7	Lösen durch Zugabe von KOH, als Suspension verwendet
5-Formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolsäure	10 mg/ml	H <sub>2</sub> O	
DTT	0,5 M	H <sub>2</sub> O	
HEPES-KOH pH 8	2,5 M	H <sub>2</sub> O	
Magnesiumacetat	1 M	H <sub>2</sub> O	
Kaliumacetat	4 M	H <sub>2</sub> O	
PEG 8000	40 %	H <sub>2</sub> O	
NaN <sub>3</sub>	10 %	H <sub>2</sub> O	
<i>complete</i> Protease-Inhibitor	50x	H <sub>2</sub> O	1 Tablette gelöst in 200 µl

### 2.3. Standards und Kit Systeme

**Tab. 2.9** DNA-, RNA- und Proteinstandards

Standards	Hersteller/Bezugsquelle
1 kb DNA-Standard	New England BioLabs (Frankfurt a.M.)
<i>LMW Elektrophoresis Calibration Kit</i>	Amersham (Little Chalfont, UK)
<i>Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder</i>	Fermentas (St. Leon-Rot)
<i>PageRuler™ Prestained Protein Ladder</i>	Fermentas (St. Leon-Rot)
RiboRuler™ RNA-Standard	Fermentas (St. Leon-Rot)

**Tab. 2.10** Kit Systeme

Kit Systeme	Hersteller/Bezugsquelle
Endo Free Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
MEGAclear™ Kit	Ambion (Austin, USA)
mMESSAGE mMACHINE® SP6 Kit	Ambion (Austin, USA)
Nanofectin Kit	PAA (Pasching, AUT)
NucleoBond® Finalizer	Macherey-Nagel (Düren)
NucleoBond® Xtra Maxi	Macherey-Nagel (Düren)
NucleoBond® Xtra Midi	Macherey-Nagel (Düren)
NucleoSpin® Extract II	Macherey-Nagel (Düren)
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
QIAprep PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Fermentas (St. Leon-Rot)

## 2.4. Enzyme und Antikörper

**Tab. 2.11** Enzyme

Enzyme	Hersteller/Bezugsquelle
<i>AatII</i>	New England BioLabs (Frankfurt a.M.)
<i>BsaI</i>	New England BioLabs (Frankfurt a.M.)
<i>BglII</i>	New England BioLabs (Frankfurt a.M.)
<i>EcoRI</i>	New England BioLabs (Frankfurt a.M.)
<i>NdeI</i>	New England BioLabs (Frankfurt a.M.)
<i>NotI</i>	New England BioLabs (Frankfurt a.M.)
Peptid: N-Glykosidase F (PNGase F)	New England BioLabs (Frankfurt a.M.)
Phusion DNA-Polymerase	New England BioLabs (Frankfurt a.M.)
Pyruvat Kinase	Roche (Mannheim)
<i>SpeI</i>	New England BioLabs (Frankfurt a.M.)
T4 DNA-Ligase	New England BioLabs (Frankfurt a.M.)
<i>XbaI</i>	New England BioLabs (Frankfurt a.M.)
<i>XhoI</i>	New England BioLabs (Frankfurt a.M.)

**Tab. 2.12** Antikörper

Antikörper	Hersteller/Bezugsquelle
polyklonaler <b>Alexa Fluor® 488 anti-Kaninchen</b> Antikörper aus Ziege (IgG; 2 mg/ml)	Invitrogen (Karlsruhe)
polyklonaler <b>anti-HA-tag</b> Antikörper aus Kaninchen (0,5 mg/ml)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
monoklonaler <b>anti-HA-tag</b> Antikörper (Maus IgG <sub>2a</sub> ; 0,2 mg/ml)	Santa Cruz (Heidelberg)
monoklonaler <b>anti-His-tag</b> Antikörper (Maus IgG; 0,2 mg/ml)	Qiagen (Hilden)

Antikörper (Fortsetzung)	Hersteller/Bezugsquelle (Forts.)
polyklonaler <b>anti-hPAT1-PEP1</b> Antikörper aus Kaninchen (PEP1-Peptid: <sup>173</sup> ANGTTNN(Abu)HNNETVILTPIMDSR <sup>195</sup> ); (0,75 mg/ml)	PSL GmbH (Heidelberg)
polyklonaler <b>anti-hPAT1-PEP2</b> Antikörper aus Kaninchen (PEP2-Peptid: <sup>242</sup> RIPDPSHLPLVAP <sup>254</sup> ); (1,1 mg/ml)	PSL GmbH (Heidelberg)
polyklonaler <b>HRP-konjugierter anti-Kaninchen</b> Antikörper aus Ziege (IgG; 200µg/500µl)	Santa Cruz (Heidelberg)
polyklonaler <b>HRP-konjugierter anti-Maus</b> Antikörper aus Ziege (IgG; 200µg/500µl)	Santa Cruz (Heidelberg)
monoklonaler <b>HRP-konjugierter anti-T7-tag</b> Antikörper (Maus IgG)	Novagen (Madison, USA)

## 2.5. Plasmide und Oligodesoxynukleotide

**Tab. 2.13** Verwendete Expressionsplasmide. Die Vektorkarten bzw. Sequenzen der Plasmide sind im Anhang aufgeführt.

Plasmide	Antibiotikaresistenz	Hersteller/Bezugsquelle
pET21a	Ampicillin	Novagen (Madison, USA)
pET28a	Kanamycin	Novagen (Madison, USA)
pET41b	Kanamycin	Novagen (Madison, USA)
pETSUMO adapt <sup>2</sup>	Kanamycin	Dr. E. Bosse-Doenecke (MLU Halle)
pSPORT1	Ampicillin	Invitrogen (Karlsruhe)
pNKS	Ampicillin	Prof. G. Schmalzing (RWTH, Aachen)

**Tab. 2.14** Übersicht über die für die Klonierung verwendeten PCR-*primer*. Die *primer* wurden von den Firmen MWG Biotech (Ebersberg) oder Metabion (Martinsried) bezogen.

Primer	Schnittstelle	Sequenz (5' – 3')	Schmelztemperatur T <sub>m</sub>
HA-PAT1_5'AatII	<i>AatII</i>	CATGACGTCATGTATCCGTACGATGTTCCCT GATTATGCGGGTATGTCCACGCAGAGA	73 °C
PAT1_5'AatII	<i>AatII</i>	GTACGACGTCATGTCCACGCAGAGACTTC	64 °C
PAT1_5'BglII	<i>BglII</i>	CAGTAGATCTATGTCCACGCAGAGACTTCG	63 °C
PAT1_5'NdeI	<i>NdeI</i>	GTAATACCATATGTCCACGCAGAGACTTCG	62 °C
PAT1_5'SpeI	<i>SpeI</i>	CAGTACTAGTATGTCCACGCAGAGAC	60 °C
PAT1_3'XbaI	<i>XbaI</i>	CTAGTCTAGACTATATGAAGGCACAGGTG GA	62 °C
PAT1_3'XhoI	<i>XhoI</i>	CATGCTCGAGCTATATGAAGGCACAGG	61 °C

<sup>2</sup> Das Plasmid pETSUMO adapt wurde durch Einfügen einer DNA-Sequenz aus zwei synthetischen Oligonukleotiden in den Vektor pETSUMO der Firma Invitrogen hergestellt. Die eingeführte DNA-Sequenz enthielt Konsensussequenzen für verschiedene Restriktionsenzyme.

**Tab. 2.14** Fortsetzung

<b>Primer</b>	<b>Schnittstelle</b>	<b>Sequenz (5' – 3')</b>	<b>Schmelztemperatur <math>T_m</math></b>
PAT1_3' XhoI oS	<i>XhoI</i>	CGTACTCGAGTATGAAGGCACAGGTGGAA TTG	64 °C
SumoPAT1_5' BsaI	<i>BsaI</i>	CAGGTCTCATGGTATGTCCACGCAGAG	63 °C
Wobble-PAT1_5' NdeI	<i>NdeI</i>	GATCCATATGTCWACTCAACGTCTWCGGA ATGAAGACTACCACG	68 °C
PAT1-oS_3' XhoI	<i>XhoI</i>	GATCCTCGAGTATGAAGGCACAGGTGG	63 °C
PEPT2_5' NdeI	<i>NdeI</i>	GCGGTACCATATGAATCCTTTCCAGAA AAATG	61 °C
PEPT2_3' XhoI	<i>XhoI</i>	GATCCTCGAGTCAGAGTTTTGTCTTCTT GG	62 °C
PEPT2_5' BamHI	<i>BamHI</i>	GATCGGATCCATGAACCCTTTCCAGAA AAATG	62 °C
Wobble-PEPT2_5' NdeI	<i>NdeI</i>	GATCCATATGAATCCWTTTCAAAAAAA TGAGTCCAAG	60 °C
PEPT2-oS_3' XhoI	<i>XhoI</i>	GATCCTCGAGTCAGAGTTTTGTCTTCTT GG	60 °C

**Tab. 2.15** Übersicht über die zur Herstellung der Cystein- und Glykosylierungsmutanten von hPAT1 verwendeten Mutagenese-primer. Die primer wurden von der Firma MWG Biotech (Martinsried) bezogen.

<b>Mutagenese-primer</b>	<b>Sequenz (5' – 3')</b>
PAT1_C180S for	CCAATGGGACCACCAATAACAGCCACAACAATGAGACG
PAT1_C180S rev	CGTCTCATTGTTGTGGCTGTTATTGGTGGTCCCATTGG
PAT1_C180A for	GGGACCACCAATAACGCCCAACAACAATGAGACGG
PAT1_C180A rev	CCGTCTCATTGTTGTGGGCGTTATTGGTGGTCCC
PAT1_C329S for	CCCTCAACCTGCCCAATTCATGGCTGTACCAGTCAGTTAAG
PAT1_C329S rev	CTTAACTGACTGGTACAGCCATGAATTGGGCAGGTTGAGGG
PAT1_C329A for	CCCTCAACCTGCCCAACGCATGGCTGTACCAGTCAGTTAAG
PAT1_C329A rev	CTTAACTGACTGGTACAGCCATGCGTTGGGCAGGTTGAGGG
PAT1_C473S for	CCATCTTCATCAATTCCACCAGTGCCTTCATATAGGG
PAT1_C473S rev	CCCTATATGAAGGCACTGGTGGAAATTGATGAAGATGG
PAT1_C473A for	CCATCTTCATCAATTCCACCGCTGCCTTCATATAGGG
PAT1_C473A rev	CCCTATATGAAGGCAGCGGTGGAAATTGATGAAGATGG
PAT1_N174Q for	GTGATAGAAGCGGCCCAAGGGACCACCAATAAC
PAT1_N174Q rev	GTTATTGGTGGTCCCTTGGGCGCTTCTATCAC
PAT1_N183Q for	CAATAACTGCCACAACCAAGAGACGGTGATTCTG
PAT1_N183Q rev	CAGAATCACCGTCTCTTGGTTGTGGCAGTTATTG
PAT1_N470Q for	GCTCCCATCTTCATCCAATCCACCTGTGCCTTC
PAT1_N470Q rev	GAAGGCACAGGTGGATTGGATGAAGATGGGAGC

**Tab. 2.16** Übersicht über die hergestellten und verwendeten Expressionskonstrukte. Die Charakteristika der Plasmide und *primer* sind in Tab. 2.13 bzw. Tab. 2.14 aufgeführt.

Konstrukt	Plasmid	Verwendete <i>primer</i>	Charakteristika	Expressionssystem
T7-hPAT1-(His) <sub>10</sub>	pET21a	PAT1_5' BglII PAT1_3' XhoIoS	Expression von hPAT1 mit N-terminalem T7- <i>tag</i> und C-terminalem Histidin- <i>tag</i>	<i>E. coli</i> / Zellfreie Expression
(His) <sub>6</sub> -hPAT1	pET28a	PAT1_5' NdeI PAT1_3' XhoI	Expression von hPAT1 mit N-terminalem Histidin- <i>tag</i>	<i>E. coli</i>
hPAT1-(His) <sub>8</sub>	pET41b	Wobble-PAT1_5' NdeI PAT1-oS_3' XhoI	DNA-Sequenz mit degeneriertem 5'-Bereich; Expression von hPAT1 mit C-terminalem Histidin- <i>tag</i>	<i>E. coli</i>
GST-hPAT1-(His) <sub>8</sub>	pET41b	PAT1_5' SpeI PAT1_3' XhoIoS	Expression von hPAT1 mit N-terminalem GST- <i>tag</i> und C-terminalem Histidin- <i>tag</i>	<i>E. coli</i>
(His) <sub>6</sub> -SUMO-hPAT1	pETSUMO adapt	SumoPAT1_5' BsaI PAT1_3' XhoI	Expression von hPAT1 als SUMO-Fusionsprotein (N-terminal), N-terminaler Histidin- <i>tag</i>	<i>E. coli</i>
pSPORT-hPAT1	pSPORT1	(Metzner <i>et al.</i> 2008)	-	HRPE-Zellen
pSPORT-HA-hPAT1	pSPORT1	(Metzner <i>et al.</i> 2008)	Expression von hPAT1 mit N-terminalem HA- <i>tag</i>	HRPE-Zellen
pNKS-hPAT1	pNKS	PAT1_5' AatII PAT1_3' XbaI	-	<i>Xenopus laevis</i> Oozyten
pNKS-HA-hPAT1	pNKS	HA-PAT1_5' AatII PAT1_3' XbaI	Expression von hPAT1 mit N-terminalem HA- <i>tag</i>	<i>Xenopus laevis</i> Oozyten
(His) <sub>6</sub> -hPEPT2	pET28a	PEPT2_5' NdeI PEPT2_3' XhoI	Expression von hPEPT2 mit N-terminalem Histidin- <i>tag</i>	<i>E. coli</i>
hPEPT2-(His) <sub>8</sub>	pET41b	Wobble-PEPT2_5' NdeI PEPT2-oS_3' XhoI	DNA-Sequenz mit degeneriertem 5'-Bereich; Expression von hPEPT2 mit C-terminalem Histidin- <i>tag</i>	<i>E. coli</i>
(His) <sub>6</sub> -SUMO-hPEPT2	pETSUMO adapt	PEPT2_5' BamHI PEPT2_3' XhoI	Expression von hPAT1 als SUMO-Fusionsprotein (N-terminal), N-terminaler Histidin- <i>tag</i>	<i>E. coli</i>

## 2.6. Organismen

**Tab. 2.17** Bakterien-Stämme

<i>E. coli</i>	Genotyp
BL21 (DE3) c <sup>+</sup> RIL	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) dcm<sup>+</sup>Tet<sup>f</sup> galλ (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam<sup>r</sup>]</i>
BL21 (DE3) C41	Variante von BL21 (DE3), enthält mind. eine uncharakterisierte Mutation; F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm (DE3)</i>
BL21 (DE3) C43	Variante von BL21 (DE3) C41, enthält mind. zwei uncharakterisierte Mutationen; F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm (DE3)</i>
BL21 Star <sup>TM</sup> (DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm rne131 (DE3)</i>
Rosetta <sup>TM</sup> (DE3) pLysS	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm (DE3) pLysSRARE (Cam<sup>R</sup>)</i>
Rosetta <sup>TM</sup> 2(DE3) pLysS	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm (DE3) pLysSRARE2 (Cam<sup>R</sup>)</i>
Rosetta R3(DE3)	Phagen resistente Variante von BL21 (DE3) mit pRARE (Cam <sup>R</sup> ) des Stammes Rosetta <sup>TM</sup> 2(DE3); entwickelt und zur Verfügung gestellt vom Structural Genomics Consortium der Oxford University, UK
HMS 174 (DE3)	F <sup>-</sup> <i>recA1 hsdR(r<sub>K12</sub><sup>-</sup> m<sub>K12</sub><sup>+</sup>) (Rif<sup>R</sup>)</i>
T7 Express (DE3)	<i>fhuA2 lacZ::T7 gene1 [lon] ompT gal sulA11 R(mcr-73::miniTn10--TetS)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10--TetS) endA1 Δ(mcrC-mrr)114::IS10</i>
A19	<i>Rna-19 gdhA2 his-95<sup>a</sup> relA1 spoT1 metB1</i>
TOP 10	F <sup>-</sup> <i>mcrA Δ(mr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZ ΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galK rpsL(StrR) endA1 nupG</i>

**Tab. 2.18** Eukaryotische Zellen

Eukaryotische Zellen	Bezugsquelle
HRPE ( <i>human retinal pigment epithelium</i> )	V. Ganapathy (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical College of Georgia, Augusta, USA), isoliert aus Retinapigmentepithel (Del Monte & Maumenee 1980)
<i>Xenopus laevis</i> Oozyten	gehalten am Julius-Bernstein-Institut für Physiologie (Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg), präpariert durch Frau Schmidt

Zur Transfektion von HRPE-Zellen wurde das rekombinant modifizierte Vaccinia Virus Ankara (rMVA; GSF-Institut für Molekulare Virologie, München) verwendet.

## 2.7. Geräte und Verbrauchsmaterialien

**Tab. 2.20** Geräte

Gerät	Hersteller
ÄKTA Explorer 100	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Bioreaktor Biostat ED (10 Liter) mit Prozessleitsystem MCFSwin und Mess- und Steuersystem C-DCU	B. Braun Biotech (Melsungen)
CASY <sup>®</sup> Zellzähler	Schärfe System GmbH (Reutlingen)
CD- Spektrometer Jasco J 816	Jasco GmbH (Groß-Umstadt)
Flüssigszintillationszähler Tri-Carb 2100 TR	United Technologies Packard (Frankfurt)
Elektroporationsgerät Gene Pulser II	Biorad (München)
Gaulin-Hochdruckhomogenisator Lab 40	APV (Lübeck)
Gaulin-Hochdruckhomogenisator Lab 60	APV (Lübeck)
Konfokales Laser- <i>scanning</i> Mikroskop Nikon ECLIPSE TE2000	Nikon GmbH (Düsseldorf)
Mikroskop Axiovert 25	Zeis (Jena)
Oozyten-Spannungsklemmen-Verstärker OC-725C	Warner Instruments (Hamden, USA)
SDS-Gelapparat Mighty Small	GE Healthcare (Freiburg)
Spannungsquelle EPS300, EPS 600	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Thermocycler Mastercycler Gradient	Eppendorf (Hamburg)
UV/Vis Spektrometer DU 640	Beckmann (München)
Western Blot-Apparatur Semiphor Hoefer	GE Healthcare (Freiburg)
Zellkultur Inkubator Hera cell	Heraeus Instruments (Hanau)
Zentrifuge Avanti J-25	Beckmann (München)
Zentrifuge Bifuge fresco	Heraeus Instruments (Hanau)

Des Weiteren wurden Geräte der Standardlaborausstattung genutzt.

**Tab. 2.19** Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
BD Falcon <sup>™</sup> Culture Slides (1,7 cm <sup>2</sup> Wachstumsfläche)	BD Biosciences (Erembodegem, Belgien)
Dialysegefäße D-Tube <sup>™</sup> -Dialyzer Mini, Midi, Maxi (MWCO 12–14 kDa)	Novagen (Madison, USA)
Elektroporationsküvetten	Peqlab (Erlangen)
EZ-Link <sup>®</sup> Maleimid-PEG <sub>11</sub> -Biotin	Thermo Scientific (Rockford, USA)
Filme zur Detektion von Chemilumineszens	Roche Applied Science (Mannheim)
Glaskapillare GB 150F-8P 0,86 x 1,5 x 80 mm <i>with filament</i>	Science Product (Hofheim)
<i>High Capacity</i> Neutravidin <sup>®</sup> Agarose Beads	Thermo Scientific (Rockford, USA)
Ni-NTA His <i>Bind Resin</i>	Qiagen (Hilden)
Objektträger mit Vertiefung	Plano GmbH (Wetzlar)
PVDF Membran	Millipore (Schwalbach)
Quarzglasküvetten	Hellma (Mühlheim)
Zellkulturflasche 75 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-one (Frickenhausen)
Zellkultur Multiwellplatte 24- <i>well</i>	Greiner Bio-one (Frickenhausen)

## 3 METHODEN

### 3.1. Mikrobiologische Methoden

#### 3.1.1. Kultivierung und Lagerung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in LB-Medium unter kontinuierlichem Schütteln oder auf LB-Agarplatten bei 37 °C. Benötigte Antibiotika wurden vor Gebrauch in der gewünschten Konzentration zugegeben.

Für die Herstellung von Glycerinkulturen zur Dauerlagerung wurden 700 µl einer *E. coli*-Übernachtskultur mit 300 µl Glycerin (50 % (v/v)) versetzt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80 °C gelagert.

#### 3.1.2. Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Herstellung kompetenter Zellen wurden 2 ml einer Übernachtskultur des Bakterienstammes zu 200 ml LB-Medium gegeben und bei 37 °C inkubiert bis eine OD<sub>600nm</sub> von 0,6–0,8 erreicht wurde. Nun wurde die Kultur für 30 min auf Eis gelagert. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 15 min bei 4000 x g und 4 °C. Das entstandene Pellet wurde drei Waschschritten mit eiskaltem 10 % Glycerin (v/v) unterzogen (1, ½ und ¼ Volumen des Zellanzuchtvolumens). Abschließend wurde das Pellet in 500 µl 10 % Glycerin (v/v) aufgenommen, und in 50 µl Aliquots bei –80 °C gelagert.

#### 3.1.3. Transformation von *E. coli*

Das Einbringen von Plasmid-DNA in *E. coli*-Stämme wurde mittels Elektroporation durchgeführt (Dower *et al.* 1988). Dazu wurde ein Aliquot von 50 µl elektrokompetenter Zellen mit 1–100 ng Plasmid-DNA versetzt und bei 1,8 kV, 25 µF, 200Ω elektroporiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml SOC-Medium versetzt und für 45 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Danach wurden verschiedene Mengen der Zellsuspension zur Selektion auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.



## 3.2. Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1. Plasmidpräparation

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte je nach Maßstab mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit, NucleoBond® Xtra Mini Kit, NucleoBond® Xtra Midi Kit und NucleoBond® Xtra Maxi Kit. Für die Verwendung von Plasmid-DNA in der Zellkultur wurde das EndoFree Plasmid Maxi Kit genutzt. Es wurde jeweils nach der den Kits beiliegenden Vorschrift verfahren.

### 3.2.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde spektralphotometrisch bestimmt. Die gemessene Absorption bei 260 nm wird für die Konzentrationsbestimmung von Desoxyribonukleinsäuren mit dem Faktor 0,05 und für die Quantifizierung von Ribonukleinsäuren mit dem Faktor 0,04 multipliziert. Dies ergibt die Konzentration in µg/µl.

### 3.2.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode, mit der es möglich ist, schnell und gezielt DNA-Fragmente (*template*-DNA) zu amplifizieren. Durch den Einsatz entsprechender Oligonukleotide (*primer*) können zusätzliche Restriktionsenzymststellen und Nukleotidsequenzen in das PCR-Produkt eingeführt werden (Mullis & Faloona 1987). PCR-Reaktionen wurden mit der thermostabilen Phusion™ Hot Start High-Fidelity DNA-Polymerase durchgeführt. Ein Reaktionsansatz von 50 µl enthielt je 200 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 0,5 µM beider *primer*, 10 ng Plasmid-DNA, 5 µl des 10 fach konzentrierten Reaktionspuffers und 1 Einheit Phusion DNA-Polymerase. Die Reaktion wurde in sterilen 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Für die Polymerase-Kettenreaktion wurde folgendes Programm in 30 Zyklen (Programmpunkt 2–4) durchlaufen:

- |              |          |   |
|--------------|----------|---|
| 1) 1 min     | 98 °C    | Denaturierung der <i>template</i> -DNA  |
| 2) 7 sec     | 98 °C    | Denaturierung der <i>template</i> -DNA  |
| 3) 20 sec    | 45–70 °C | Binden der PCR- <i>primer</i> an die <i>template</i> -DNA ( <i>annealing</i> ) <sup>3</sup> |
| 4) 25–50 sec | 72 °C    | Polymerasereaktion ( <i>extension</i> ) <sup>4</sup>  |
| 5) 10 min    | 72 °C    | Vervollständigung angefangener Polymerasereaktionen ( <i>final extension</i> )              |

<sup>3</sup> Die Schmelztemperatur der *primer* wurde mit dem Programm *Oligonucleotide Properties Calculator* berechnet (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>). Die *primer*-spezifische Temperatur des *annealings* lag 3 °C über der niedrigeren Schmelztemperatur der *primer*.

<sup>4</sup> Die Dauer der Polymerasereaktion wurde in Abhängigkeit von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments gewählt (20 sec/kb).

Die PCR-Ansätze wurden mit dem QIAprep PCR Purification Kit oder NucleoSpin® Extract II entsprechend den Angaben des Herstellers gereinigt.

### 3.2.4. Zielgerichtete Mutagenese

Für den gezielten Aminosäureaustausch wurde das *Quikchange*-Verfahren in Anlehnung an das QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene angewendet. Grundlage für die Mutagenese ist eine PCR-Reaktion, in der die eingesetzten *primer* die entsprechende Mutation (Basenaustausch) enthalten. Als *template* wurde ein Plasmid genutzt, in dem sich die DNA-Sequenz des Proteins befand, in das die gewünschte Mutation eingeführt werden sollte. PCR-Reaktionen wurden mit der *PfuUltra*® High-Fidelity DNA-Polymerase (Stratagene) durchgeführt. Ein Reaktionsansatz von 50 µl enthielt je 200 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 125 ng beider *primer*, 10 ng Plasmid-DNA, 5 µl des 10 fach konzentrierten Reaktionspuffers und 2,5 Einheiten *PfuUltra*® DNA-Polymerase. Die Reaktion wurde in sterilen 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Es wurde folgendes PCR-Programm in 16 Zyklen (Programmpunkt 2–4) durchlaufen:

1) 30 sec	95 °C	Denaturierung der <i>template</i> -DNA
2) 30 sec	95 °C	Denaturierung der <i>template</i> -DNA
3) 1 min	55 °C	Binden der <i>primer</i> an die <i>template</i> -DNA ( <i>annealing</i> )
4) 4–6 min	68 °C	Polymerasereaktion ( <i>extension</i> ) <sup>5</sup>

Um das Ausgangsplasmid aus dem Ansatz zu entfernen wurde 1 µl *DpnI* (NEB) zugegeben und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Ein spezifischer Abbau des Ausgangsplasmids mit diesem Enzym ist dadurch möglich, dass das Enzym nur methylierte DNA schneidet. Die Methylierung erfolgt nur in *E. coli*. Die durch die PCR-Reaktion synthetisierten Plasmide, die die Mutation enthalten, sind nicht methyliert. Danach wurde 1 µl der Mutagenesereaktion für eine Transformation von elektrokompenten *E. coli* Zellen eingesetzt.

### 3.2.5. Restriktionsverdau von Nukleinsäuren

Für eine Restriktionsanalyse wurden 200 ng Plasmid in einem Volumen von 10 µl mit 5–10 Einheiten (0,5 µl) der entsprechenden Restriktionsendonukleasen und 1 µl des 10 fach konzentrierten Reaktionspuffers gemäß den Angaben des Herstellers verdaut. Der Ansatz

<sup>5</sup> Die Dauer der Polymerasereaktion wurde in Abhängigkeit von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments gewählt (1 min/kb).

wurde für vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz mit 2 µl 6x DNA-Probenpuffers versetzt und in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Im Falle eines präparativen Restriktionsverdau wurden 5 µg Plasmid in einem Volumen von 50 µl unter Verwendung von 25–50 Einheiten (2,5 µl) der entsprechenden Restriktionsendonukleasen und 5 µl des 10-fach konzentrierten Reaktionspuffers verdaut. Es erfolgte eine Inkubation bei 37 °C für vier Stunden. Um die eingesetzten Restriktionsenzyme zu deaktivieren wurde entsprechend den Angaben des Herstellers verfahren. Danach wurde der gesamte Ansatz mit 5 µl 6x DNA-Probenpuffers versetzt und in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Isolierung der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel (3.2.6.1. und 3.2.7.).

### **3.2.6. Agarosegelelektrophorese**

#### *3.2.6.1. Native Agarosegelelektrophorese (Auftrennung von DNA)*

Für die Auftrennung von DNA wurden 1 %ige Agarosegele verwendet. Dafür wurde die Agarose in 1x TAE-Puffer unter Erwärmung gelöst und nach Zugabe von 0,001 % (v/v) Ethidiumbromid in eine Gelkammer gegossen. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V und 150 mA für 45 min. Die DNA wurde mittels UV-Licht am Transilluminator detektiert.

#### *3.2.6.2. Denaturierende Agarosegelelektrophorese (Auftrennung von RNA)*

Für die Auftrennung von RNA wurden 1 %ige Agarosegele verwendet. Hierfür wurde die Agarose in 50 mM MOPS pH 7; 5 mM Natriumacetat suspendiert und aufgekocht. Danach erfolgte die Zugabe von 0,001 % (v/v) Ethidiumbromid. Nachdem die Lösung bis zur Handwärme abgekühlt war, wurde eine Formaldehyd-Konzentration von 6 % (v/v) eingestellt. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese 1:1 mit 2x RNA-Ladepuffer gemischt und für 10 min bei 70 °C inkubiert. Bis zum Auftragen wurden die Proben auf Eis gelagert. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V und 150 mA für zwei Stunden. Die RNA wurde mittels UV-Licht am Transilluminator detektiert.

### **3.2.7. Elution von DNA aus Agarosegelen**

Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die gewünschten Banden unter UV-Licht zügig mit einem Skalpell ausgeschnitten. Zur Elution der DNA aus dem Agarosegel wurden das QIAquick Gel Extraction Kit und das NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II Kit gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

### 3.2.8. Ligation von DNA-Fragmenten

Zum Einbringen von einem DNA-Fragment (*insert*) in einen linearisierten Vektor müssen die jeweiligen Enden kovalent über eine Phosphodiesterbindung verknüpft werden. Diese Reaktion wird durch die T4 DNA-Ligase in einem ATP-haltigen Puffer katalysiert. Um die Integration des *inserts* in den Vektor zu begünstigen, wurde ein 5 facher molarer Überschuss an *insert* eingesetzt. Zur Mengenabschätzung von Vektor und *insert* wurden diese elektrophoretisch aufgetrennt und aus den Bandenintensitäten die Mengen im Vergleich zu einem Standard abgeschätzt. Zur Bestimmung der für die Ligation einzusetzenden Mengen wurde Gleichung 3.1 verwendet, wobei für die Menge des Vektors ein fester Mindestwert zwischen 200 und 400 ng vorgegeben wurde:

$$m(\textit{insert}) = \frac{5 \cdot N(\textit{insert}) \cdot m(\textit{Vektor})}{N(\textit{Vektor})} \quad (\text{Gl. 3.1})$$

$m(\textit{insert})$	Menge des eingesetzten <i>inserts</i> [ng]
$m(\textit{Vektor})$	Menge des eingesetzten Vektors [ng]
$N(\textit{insert})$	Anzahl der bp des eingesetzten <i>inserts</i>
$N(\textit{Vektor})$	Anzahl der bp des eingesetzten Vektors

Es erfolgte die Zugabe von 10 fach Ligationspuffer und 200 Einheiten Enzym. Daraus ergaben sich Ligationsansätze zwischen 10 und 20  $\mu\text{l}$ , die über Nacht bei 15 °C inkubiert wurden. Anschließend wurde 1  $\mu\text{l}$  der Ligation in elektrokompente *E. coli* Zellen transformiert.

### 3.2.9. cRNA-Synthese

Zur Synthese von cRNA wurde eine *in vitro* Transkription mit linearisierter Plasmid-DNA durchgeführt. Zur Herstellung hPAT1-spezifischer cRNA wurden die Plasmide pNKS-hPAT1 und pNKS-HA-hPAT1 (siehe Kapitel 2.5, Tab. 2.16) als *template* für die Transkriptionsreaktion genutzt. Für die Linearisierung wurden 20  $\mu\text{g}$  Plasmid für einen präparativen Restriktionsverdau eingesetzt und unter Verwendung der Restriktionsendonuklease *NotI* wie unter Punkt 3.2.5. beschrieben verdaut. Anschließend erfolgte die Reinigung der linearisierten DNA mit dem NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II Kit, wobei mit 30  $\mu\text{l}$  RNase-freiem Wasser eluiert wurde. Zur *in vitro* Transkription wurde das mMESSAGING mMACHINE<sup>®</sup> SP6 Kit verwendet. 3  $\mu\text{g}$  linearisierte Plasmid-DNA, 6  $\mu\text{l}$  Puffer, 6  $\mu\text{l}$  SP6-Polymerase, 30  $\mu\text{l}$  NTP-Mix und Wasser (ad 60  $\mu\text{l}$ ) wurden gemischt und für vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Um die Ausgangs-DNA aus dem Ansatz zu entfernen, wurden 3  $\mu\text{l}$  DNase zugegeben und es wurde für weitere 15 min bei 37 °C inkubiert. Die cRNA wurde unter Verwendung des MEGAclean<sup>™</sup> Kit gereinigt. Zur

Elution der an *spin columns* gebundenen RNA wurden 50 µl Elutionspuffer auf 95 °C erwärmt, auf die Säule pipettiert und für 1 min inkubiert. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt (1 min, 13000 rpm). Das resultierende Eluat wurde erneut auf die Säule gegeben, 10 min bei 70 °C inkubiert und anschließend wurde erneut zentrifugiert (1 min, 13000 rpm). Die erhaltene cRNA wurde aliquotiert (3–4 µl) und bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C gelagert. Um auf RNase-Verunreinigung zu prüfen, wurde ein Aliquot über Nacht bei Raumtemperatur gelagert. Am darauffolgenden Tag wurden jeweils 200 ng der bei Raumtemperatur und der bei –80 °C gelagerten cRNA auf ein denaturierendes Agarosegel (3.2.6.2.) aufgetragen. Waren in beiden Proben vergleichbare Bandenintensitäten zu beobachten, konnte eine RNase-Verunreinigung ausgeschlossen werden.

### 3.3. Expression von Proteinen in verschiedenen Expressionssystemen

#### 3.3.1. Rekombinante Expression in *E. coli*

##### 3.3.1.1. Expressionstest

Für die Herstellung rekombinanter Proteine in *E. coli* wurden zur Ermittlung der Bedingungen für die beste Ausbeute zunächst verschiedene Parameter, wie Wachstumsdauer und -temperatur, Induktionsstärke und -dauer und verwendeter *E. coli*-Stamm im kleinen Maßstab getestet. Dafür wurde ein Kulturvolumen von 50 bis 100 ml gewählt. Zunächst wurde eine Vorkultur (5 ml LB-Medium + 1 % Glukose) mit entsprechenden Antibiotika mit einer Einzelkolonie inokuliert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Gleichzeitig wurde die Hauptkultur ebenfalls über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Hauptkultur mit den entsprechenden Antibiotika versetzt und mit 1/100 Volumen der Vorkultur angeimpft. Bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bis 0,8 wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 0,1 bis 1 mM IPTG induziert. Unmittelbar vor IPTG-Zugabe wurde 1 ml der Kultur entnommen und die OD<sub>600</sub> bestimmt. Die Probe wurde zentrifugiert (1 min, 13000 rpm, 4 °C), der Überstand verworfen und das Pellet bis zur Analyse bei –20 °C gelagert. Des Weiteren wurden Proben 1 h, 2 h, 3 h und 4 h nach Induktion entnommen und wie zuvor beschrieben verarbeitet. Zur Analyse der Proben wurden die Zellpellets mit SDS-Probenpuffer (6 M Urea) versetzt und für 3 h bei 40 °C schüttelnd inkubiert. Das Volumen an Probenpuffer (6 M Urea) wurde entsprechend der zuvor ermittelten OD<sub>600</sub> gewählt:  $V_{\text{Probenpuffer}} (\mu\text{l}) = \text{OD}_{600} \cdot 100$ . Zur Verminderung der Viskosität der Lösung wurde durch mehrfaches Aufziehen in eine

Hamilton Spritze DNA und RNA fragmentiert. Für eine Western Blot-Analyse wurden jeweils 5 µl der Proben auf ein 10–15 %iges SDS-Gel aufgetragen.

### 3.3.1.2. Proteinexpression im Schüttelkolben (T7-Polymerase)

Zur Expression der T7-Polymerase im Schüttelkolben wurden vier 5 l-Schüttelkolben mit einem Kulturvolumen von je 1 l LB-Medium verwendet. Zuerst wurde eine Vorkultur (50 ml LB-Medium mit 200 µg/ml Ampicillin) mit einer Einzelkolonie inokuliert und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Um eine Übertragung der in das Medium sezernierten β-Lactamase von der Vorkultur in die Hauptkultur zu verhindern, wurde die Vorkultur abzentrifugiert (10 min, 6000 x g, 4 °C). Das Pellet wurde in der gleichen Menge frischem Medium resuspendiert. Jeder der 5 l-Schüttelkolben wurde mit je 12 ml der Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 in Gegenwart von 200 µg/ml Ampicillin bei 37 °C kultiviert. Die Proteinexpression wurde mit 1 mM IPTG induziert. Nach der Induktion erfolgte eine erneute Ampicillinzugabe (200 µg/ml). Fünf Stunden nach Induktion wurden die Zellen für 15 min bei 6000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet (16 g) wurde in 120 ml 30 mM Kaliumphosphat pH 8; 10 mM EDTA; 50 mM NaCl; 5 % Glycerin; 10 mM β-Mercaptoethanol resuspendiert. Die Lagerung bis zur Proteinreinigung erfolgte bei –80 °C.

### 3.3.1.3. Fed-batch Fermentation

Die Fermentation wurde in einem Biostat ED Bioreaktor mit einem digitalen Mess- und Regelsystem durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte im *fed-batch* Verfahren auf Hefeextrakt-Vollmedium. Zunächst wurde das Hefeextrakt-Vollmedium (Kapitel 2.2.2.) für 30 min bei 121 °C im Fermenter autoklaviert. Anschließend erfolgte die Zugabe der separat autoklavierten Lösungen von Glukose, Magnesiumsulfat und di-Kaliumhydrogenphosphat. Dem vollständigen Medium wurden die benötigten Antibiotika zugesetzt. Durch Nutzung der automatischen Kaskadenregelung wurden eine gleichmäßige Belüftung und ein konstanter pH-Wert von 7 gewährleistet. Der minimale Sauerstoffpartialdruck wurde auf einen Wert von 30 % eingestellt. Für die Vorkultur wurden 200 ml mit Antibiotikum versetztes LB-Medium mit einer Einzelkolonie des Expressionsklons inokuliert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zum Animpfen wurde die gesamte Vorkultur in den Fermenter überführt. Das Startvolumen der Fermentation betrug 6 l. Nach Erreichen einer optischen Dichte von 10 wurde in regelmäßigen Abständen die Glukosekonzentration im Medium (gemessen mit Glukosenachweisstäbchen) kontrolliert. Nach vollständigem Verbrauch der Glukose wurde das *feeding* gestartet. Durch Zugabe von IPTG wurde bei einer OD<sub>600</sub> zwischen 50 und 60 die

Proteinexpression induziert. Sollte die Expression bei einer anderen Temperatur als 37 °C stattfinden, wurde erst nach Regelung und Erreichen der gewünschten Temperatur induziert. Für eine Western Blot-Analyse wurden Proben vor und nach der Induktion entnommen und wie unter 3.3.1.1. beschrieben aufbereitet. Nach 4 h wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (20 min, 6000 x g, 4 °C). Das Zellpellet wurde bei –80 °C gelagert. Wurde Ampicillin als Antibiotikum verwendet, wurde die Vorkultur abzentrifugiert und in frischem LB-Medium aufgenommen. Des Weiteren wurde in diesem Fall während der Fermentation alle zwei Stunden erneut Ampicillin zum Medium gegeben.

### 3.3.2. Zellfreie Expression

#### 3.3.2.1. Kommerzielles zellfreies Proteinexpressions Kit

Zu Beginn der Arbeiten zur zellfreien Expression wurde hPAT1 mit Hilfe eines Proteinsynthese Kits von Qiagen synthetisiert. Für analytische Ansätze (50 µl) wurde das EasyXpress Protein Synthesis Kit und für präparative Ansätze (1 ml) das EasyXpress Protein Synthesis Maxi Kit entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

#### 3.3.2.2. Nicht-kommerzielles, eigenes zellfreies Expressionssystem

Das in diesem Abschnitt beschriebene zellfreie Expressionssystem ist nicht kommerziell erhältlich und wurde auf der Grundlage der von Christian Klammt und Daniel Schwarz entwickelten Methode etabliert (Klammt *et al.* 2004; Klammt *et al.* 2006; Schwarz *et al.* 2007b; Schwarz *et al.* 2007a). Der Vorteil eines selbst zusammengestellten Expressionssystems liegt neben günstigeren Kosten in der Variabilität in der Zugabe der einzelnen Komponenten. Um große Mengen an Protein zu erhalten, muss der Reaktionsansatz für jedes Protein optimiert werden. In einem kommerziellen Kit sind viele Komponenten in definierten Konzentrationen bereits zu einem Reaktionsgemisch zusammengefasst, und können somit nicht mehr variiert werden.

#### Komponenten des zellfreien Expressionssystems

Die zellfreie Expression wurde basierend auf einem *E. coli* Extrakt im *continuous exchange cell free* Expressionsmodus durchgeführt (Punkt 4.2.). Im kommenden Abschnitt soll auf die Zusammensetzung und die Funktion der verwendeten Zusätze eingegangen werden. Die Hauptkomponente des in dieser Arbeit verwendeten zellfreien Expressionssystems stellte der *E. coli* S30-Extrakt dar (Präparation, Punkt 3.3.2.3.). Er beinhaltet alle essentiellen Komponenten, die für den Translationsprozess benötigt werden, wie z.B. Ribosomen, Aminoacyl-

tRNA-Synthetasen und alle Translationsfaktoren für Initiation, Elongation und Freisetzung der Polypeptidkette. Des Weiteren sind die Acetat-Kinase und *E. coli*-Lipide bzw. Membranfragmente (ca. 100 µg/ml S30-Extrakt) enthalten. Endogene mRNAs wurden während der Präparation entfernt. Eine weitere Grundkomponente des gekoppelten Transkription/Translationssystems ist die RNA-Polymerase. In dem hier verwendeten System wurde jedoch nicht die endogene RNA-Polymerase aus *E. coli* selbst verwendet, sondern die des T7-Bakteriophagen in Kombination mit dem spezifischen T7-Promoter (Präparation, Punkt 3.3.1.2. und 3.6.). Der Vorteil hierbei besteht darin, dass allein die RNA des gewünschten Gens hergestellt wird, und andere eventuell noch vorhandene Gene unter einem nichtviralen Promoter nicht transkribiert werden. Somit wird eine Hintergrundexpression weitestgehend unterdrückt. Außerdem entstehen durch die enorme Prozessivität der T7-Polymerase insgesamt viel größere Mengen an RNA. Als *template* für die Transkription können infolgedessen alle Plasmide verwendet werden, die das Gen unter Kontrolle des T7-Promoters stellen, wie z.B. die pET- (Novagen) oder die pIVEX-Expressionsvektoren (Roche Biosciences). Um optimale Reaktionsbedingungen für die T7-Polymerase zu gewährleisten, musste DTT als reduzierende Substanz zugesetzt werden, da die Polymerase durch Oxidation inhibiert werden kann (Schwarz *et al.* 2007a). Jedoch können reduzierende Bedingungen andererseits die Bildung von Disulfidbrücken im Protein unterdrücken. Deshalb wurde in einigen Ansätzen anstatt DTT das Redox-*shuffling* System aus reduziertem und oxidiertem Glutathion (GSH/GSSG) verwendet. Dabei ist in Gegenwart eines reduzierenden Reagenz (GSH) gleichzeitig die Bildung von Disulfidbrücken möglich.

Als Substrate für Transkription und Translation wurden dem Ansatz Nukleosidtriphosphate, tRNAs und ein Mix aus den 20 proteinogenen Aminosäuren zugesetzt. Da die Aminosäuren Arginin, Cystein, Tryptophan, Methionin, Glutamat und Aspartat durch Enzyme des Extrakts abgebaut werden (Kim & Swartz 2000; Kim & Choi 2001), wurde ein Mix aus diesen Aminosäuren zusätzlich zum Ansatz gegeben. Um die mRNA und das exprimierte Protein im Ansatz zu stabilisieren und vor Abbau zu schützen, wurden ein RNase Inhibitor (RNAsin) und ein Proteaseinhibitor (*complete*) zugesetzt. Ein charakteristisches Merkmal der Proteinbiosynthese bei Prokaryoten ist die Initiation der Translation durch eine N-Formylmethionyl-tRNA. Als Substrat für die Formylierung des Start-Methionins wurde 5-Formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolsäure (Folinsäure) im Reaktionsansatz bereitgestellt. Das benötigte Enzym (Transformylase) ist bereits im Extrakt enthalten.



Um eine langanhaltende Reaktion zu gewährleisten, muss ein effizientes Energie-Regenerationssystem zur Verfügung stehen. Während der Translation anfallendes AMP und GDP wurden durch Phosphoenolpyruvat und Acetylphosphat und die entsprechenden Enzyme Pyruvat-Kinase und Acetat-Kinase wieder in ihre Triphosphate überführt. Die Acetat-Kinase ist bereits im S30-Extrakt enthalten, so mussten lediglich Phosphoenolpyruvat, Acetylphosphat und die Pyruvat-Kinase dem Ansatz zugesetzt werden. Diese stellen allerdings einen erheblichen Kostenfaktor dar.

Weiterhin enthielt der Ansatz als Puffersubstanz HEPES sowie Kalium-Acetat und Magnesium-Acetat für ein geeignetes Ionen-Milieu. Dabei sind  $K^+$  und  $Mg^{2+}$  wichtig, einerseits um negative Ladungen zu kompensieren und andererseits um die Aktivität von Enzymen, wie z.B. der Pyruvat-Kinase, zu gewährleisten. Die Konzentration beider Ionen ist extrem kritisch und korreliert innerhalb eines engen Konzentrationsoptimums mit hohen Proteinausbeuten (Schwarz *et al.* 2007b). Das Polymer Polyethylenglykol imitierte die Viskosität des Cytoplasmas, stabilisierte die mRNA und kann makromolekulare *crowding*-Effekte innerhalb einer zellfreien Umgebung induzieren (Schwarz *et al.* 2007a).

Die zellfreie Proteinexpression mit diesem System wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl im analytischen als auch im präparativen Maßstab durchgeführt. Der analytische Maßstab wurde genutzt um den Einfluss verschiedener Komponenten auf die Expression von hPAT1 zu untersuchen. Danach wurde ein präparativer Ansatz unter den zuvor als optimal getesteten Bedingungen durchgeführt.

Alle benötigten Komponenten wurden auf Eis aufgetaut und bis zum Gebrauch auf Eis gelagert. Zunächst wurde der Mastermix (FRM) entsprechend Tabelle 3.1 angefertigt und gründlich aber vorsichtig gemischt. Das für den Reaktionsmix (RM) benötigte Volumen wurde in ein separates Gefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

Das verbleibende Volumen wurde als Basis für den *feeding*-Mix (FM) verwendet. Wie in Tabelle 3.2 angegeben, wurden entsprechende Volumina an S30 C-Puffer, Aminosäuremix (AS-Mix) und Wasser bzw. Zusätzen zugegeben (präparativer Maßstab). Für einen analytischen Ansatz wurden dem FM nur der S30 C-Puffer und AS-Mix zugesetzt und danach wurde er zu 10 gleichen Teilen á 1130 µl aufgeteilt. Jeder Ansatz wurde individuell auf 1190 µl aufgefüllt. Die so hergestellten FM wurden für 30 min bei 30 °C inkubiert.

**Tab. 3.1 Zusammensetzung des Mastermix (FRM) für die zellfreie Expression im analytischen und präparativen Maßstab.** \* Konzentration der  $Mg^{2+}$ - und  $K^+$ -Ionen wird zusätzlich durch 22 mM  $K^+$  von AcP, 67 mM  $K^+$  von PEP, 50 mM  $K^+$  von HEPES/KOH, 0,21 mM  $K^+$  bzw. 4,9 mM  $Mg^{2+}$  vom S30-Extrakt beeinflusst, \*\* Anstelle von DTT wurde in einigen Ansätzen ein Redox-*shuffling* System aus GSH und GSSG eingesetzt.

Konzentration (Stammlösung)	Komponente	Konzentration im Ansatz	Analytischer Maßstab [ $\mu$ l]	Präparativer Maßstab [ $\mu$ l]
10 %	NaN <sub>3</sub>	0,05 %	64,4	184
40 %	PEG 8000	2 %	642,6	1835
4 M	KOAc	300 mM *	517	1477
1 M	Mg(OAc) <sub>2</sub>	17 mM *	130	371
2,5 M	HEPES pH 8	90 mM	452,2	1292
50x	<i>complete</i>	1x	257,6	735
20 mM	5-Formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolsäure	0,2 mM	128,8	368
0,5 M	DTT **	2 mM	51,8	148
0,25 M	GSSG **	1 mM	51,8	148
-	GSH **	5 mM	19,75 mg	56,27
75x	NTP-Mix	1x	172,2	492
1 M	PEP	20 mM	257,6	736
1 M	AcP	20 mM	257,6	736
4 mM	AS-Mix	-	1556	4446
16,7 mM	RCWMDE-Mix	1 mM	770	2200

**Tab. 3.2 Zusammensetzung des *feeding*-Mix (FM) und Reaktionsmix (RM) für die zellfreie Expression im analytischen und präparativen Maßstab.** FRM – Mastermix für *feeding*- und Reaktionsmix (Tab. 3.1).

Konzentration (Stammlösung)	Komponente	Konzentration im Ansatz	Analytischer Maßstab [ $\mu$ l]		Präparativer Maßstab [ $\mu$ l]	
			FM	RM	FM	RM
	FRM		4867	286	13906	816
4 mM	AS-Mix	FM: 1,42 mM RM: 0,9 mM	2268		6480	
100 %	S30 C-Puffer	37 %	4165		11900	
10 mg/ml	Pyruvat-Kinase	0,04 mg/ml		2,8		8
40 mg/ml	tRNA	1 mg/ml		15		43
0,6 mg/ml	T7-RNA Polymerase	45 $\mu$ g/ml		50		143
27,6 U/ $\mu$ l	RNAsin	0,276 U/ $\mu$ l		7		20
0,9 $\mu$ g/ $\mu$ l	DNA	15 $\mu$ g/ml		13		37
100 %	S30 Extrakt	35 %		245		700
	H <sub>2</sub> O/Zusätze		-	-	1714	234
<b>Summe</b>			<b>10 x 1130</b>	<b>10 x 61,8</b>	<b>34000</b>	<b>2000</b>

Währenddessen wurde der RM entsprechend Tabelle 3.2 vervollständigt. Im Fall eines analytischen Ansatzes wurde auch hier wieder auf die Zugabe von Wasser/Zusätzen verzichtet. Stattdessen wurde der Ansatz wieder zu 10 gleichen Teilen (10 x 61,8  $\mu$ l) aliquotiert und jedes Aliquot individuell auf je 70  $\mu$ l aufgefüllt. Der RM wurde in das entsprechende

Reaktionsgefäß überführt (analytischer Maßstab – D-Tube-Dialyzer Mini; präparativer Maßstab – D-Tube-Dialyzer Maxi). Nach Präinkubation des FM wurde dieser in die entsprechenden Vorrichtungen (analytischer Maßstab – 2 ml Eppendorf Tube; präparativer Maßstab – 50 ml Falcon Tube) gegeben. Nun wurden die Reaktionsgefäße in die Vorrichtung eingesetzt und verschlossen. Für eine optimale Durchmischung des FM und um einen schnellen Stoffaustausch zwischen FM und RM zu ermöglichen, wurde in das Außenkompartiment (2 ml Eppendorf Tube oder 50 ml Falcon Tube) ein Rührstab eingesetzt. Die Ansätze wurden unter Rühren für 20–24 h bei 30 °C inkubiert. Im Falle des präparativen Maßstabs wurde der FM nach 5–6 h gegen einen Frischen ausgewechselt.

### 3.3.2.3. Präparation des S30-Extraktes

Als Basis für die zellfreie Expression diente ein prokaryotischer Zellextrakt, der aus dem *E. coli* Stamm K12 A19 präpariert wurde. Für die Fermentation wurde als Kulturmedium entweder TB-Medium oder 2x YPTG-Medium verwendet. Der gesamte Fermentationsprozess wurde mit antibiotikafreien Kultivierungsmedien durchgeführt. Für eine Vorkultur wurden 60 ml LB-Medium aus einer Glycerinkultur angeimpft. Diese wurde über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert und diente als Inokulum für eine 6 l *fed-batch* Fermentation. Die Fermentation erfolgte bei 37 °C, pH 7 und einer O<sub>2</sub>-Sättigung > 30 %. Die Zellen wurden bis zur mittleren logarithmischen Phase kultiviert (OD<sub>600</sub> ~ 2,5–3,5) und danach innerhalb von 45 min auf unter 10 °C abgekühlt. Nun wurde die Biomasse für 20 min bei 6370 x g zentrifugiert. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt und alle verwendeten Zentrifugenbecher und Puffer wurden bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Das Zellpellet wurde nun in 100 ml S30 A-Puffer resuspendiert und für 10 min bei 8000 x g zentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde noch zweimal wiederholt, wobei beim letzten Mal für 30 min zentrifugiert wurde. Anschließend wurde das Zellpellet gewogen und mit dem entsprechenden Volumen an S30 B-Puffer versetzt (1 ml/1 g Zellen) und resuspendiert. Danach erfolgte der Zellaufschluss mittels Hochdruckdispersion an einer *French Press* (1 x 2,3 kbar). Das Zellysate wurde für 30 min bei 30000 x g zentrifugiert. Danach wurden die oberen 2/3 des Überstandes abgenommen und erneut zentrifugiert (30000 x g, 30 min). Nun wurden wieder die oberen 2/3 des Überstandes abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Mit Hilfe einer 4 M NaCl-Lösung wurde eine NaCl-Konzentration von 400 mM eingestellt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 45 min im Wasserbad bei 42 °C. Die nun trübe Lösung wurde bei 4 °C einmal für zwei Stunden und danach über Nacht gegen das 60 fache

Volumen an S30 C-Puffer dialysiert. Abschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 30 min bei 30000 x g. Der klare Überstand wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Alternativ wurde der Überstand zuvor auf die Hälfte seines Volumens mit Hilfe von Amicon Konzentratoren (10 kDa *cut-off*) aufkonzentriert.

### 3.3.3. Heterologe Expression in HRPE-Zellen

#### 3.3.3.1. Zellkultur

HRPE-Zellen wurden in D-MEM: F12-Medium (*Dulbecco's modified Eagles medium*) unter Zugabe von 10 % FBS (*fetal bovine serum*, Biochrom, Berlin) und 1 % Streptomycin/Penicillin (Invitrogen, Karlsruhe) kultiviert. Die Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup> Zellkultur-Flaschen mit 12 ml Medium bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung und Wasserdampfsättigung in einem Zellzuchtinkubator kultiviert. Das Medium wurde 24 h nach Passagieren und dann alle zwei Tage gewechselt. Zum Passagieren wurde zunächst das Medium entfernt und durch 5 ml PBS ersetzt. Nach 5 Minuten Inkubation wurden die Zellen mit 3 ml Trypsin für 1–2 min inkubiert, um Zell-Zell-Verbindungen zu lösen und das Ablösen von der Kunststoffoberfläche zu erleichtern. Anschließend wurde die Trypsinlösung abgesaugt und die Zellen durch Klopfen der Flasche gegen den Handballen vom Boden gelöst. Die Zellen wurden in 10 ml Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde am Casy<sup>®</sup> Zellzähler bestimmt. Im Falle einer Weiterkultivierung in 75 cm<sup>2</sup> Flaschen wurden 3 Millionen Zellen pro Flasche ausgesät und mit Medium auf 12 ml aufgefüllt. Für die Transfektion in 24 *well* Platten, 6 *well* Platten oder BD Falcon™ *Culture Slides* wurden 500000, 1,6 Millionen bzw. 300000 Zellen entsprechend ausgesät und in 1, 2 bzw. 1 ml Medium kultiviert.

#### 3.3.3.2. Heterologe Expression

Zur Expression des H<sup>+</sup>-Aminosäure-Cotransporters hPAT1 in der eukaryotischen Zelllinie HRPE wurde das Vaccinia Virus Expressionssystem genutzt. In diesem Expressionssystem wird in einem ersten Schritt das Gen für die T7-Polymerase durch Infektion der Zellen mit dem rekombinanten modifizierten Vaccinia Virus Ankara (rMVA) eingebracht. Im zweiten Schritt wird ein Plasmid (pSPORT-hPAT1 oder pSPORT-HA-hPAT1 (siehe Kapitel 2.5., Tab. 2.16)), welches das Gen des Transporters unter Kontrolle eines T7-Promoters trägt, in die Zellen transfiziert. So wird die Expression des Proteins durch die T7-Polymerase ermöglicht.

22–24 Stunden nach Aussaat der Zellen in 24 *well* Platten, 6 *well* Platten oder *Culture Slides* wurde die Zellzahl pro *well* ermittelt. Entsprechend der Zellzahl wurde ein Volumen an Viruslösung ( $15 \times 10^8$  IU/ml) entsprechend 4 IU/Zelle pro *well* eingesetzt. Dafür wurde die Virusarbeitslösung aufgetaut und dreimal für eine Minute im Ultraschallbad behandelt jeweils unterbrochen durch kurzes Vortexen. Die Viruslösung wurde auf 150  $\mu$ l/*well* (24 *well* Platte), 600  $\mu$ l/*well* (6 *well* Platte) oder 150  $\mu$ l/*well* (*Culture Slides*) mit Medium aufgefüllt, auf die Zellen gegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert.

Für die nachfolgende Transfektion wurde das Nanofectin Kit von PAA genutzt. Entsprechend Tabelle 3.3 wurden eine Nanofectin/NaCl-Lösung und eine DNA/NaCl-Lösung hergestellt. Beide Lösungen wurden vorsichtig durch leichtes Vortexen gemischt und anschließend kurz zentrifugiert. Danach wurde die Nanofectin/NaCl-Lösung im Verhältnis 1:1 zur DNA/NaCl-Lösung getropft, kurz gemischt (Vortex) und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach den erforderlichen Inkubationszeiten für die Viruslösung und die DNA/Nanofectin-Lösung wurden nun die in Tabelle 3.4 angegebenen Volumina an Medium und DNA/Nanofectin-Lösung zu der Viruslösung auf die Zellen gegeben.

Die Zellen wurden für 3 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die gesamte Lösung abgesaugt und 1 ml/*well* (24 *well* Platte), 2 ml/*well* (6 *well* Platte) oder 1 ml/*well* (*Culture Slides*) frisches Medium auf die Zellen gegeben und bei 37 °C inkubiert.

**Tab. 3.3 Zusammensetzung der Nanofectin/NaCl- und DNA/NaCl-Lösung.** Es wurde eine 150 mM NaCl-Lösung verwendet.

Kultivierungsgefäß	DNA [ $\mu$ g/ <i>well</i> ]	NaCl [ad $\mu$ l/ <i>well</i> ]	Nanofectin [ $\mu$ l/ <i>well</i> ]	NaCl [ad $\mu$ l/ <i>well</i> ]
<i>Culture Slides</i>	1	50	3,2	50
24 <i>well</i> Platten	1	50	3,2	50
6 <i>well</i> Platten	3	100	9,6	100

**Tab. 3.4 Entsprechend den Kultivierungsgefäßen zu verwendende Volumina an Medium und DNA/Nanofectin-Lösung.**

Kultivierungsgefäß	Medium [ $\mu$ l/ <i>well</i> ]	DNA/Nanofectin [ $\mu$ l/ <i>well</i> ]
<i>Culture Slides</i>	250	100
24 <i>well</i> Platten	250	100
6 <i>well</i> Platten	1200	200

### 3.3.4. Heterologe Expression in *Xenopus laevis* Oozyten

#### 3.3.4.1. Einführung in die Methode

Die Oozyten des afrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) werden seit Beginn der 50er Jahre zu Versuchszwecken verwendet. 1971 gelang es Gurdon und Mitarbeitern erstmals durch Injektion von exogener mRNA in *X. laevis* Oozyten Proteine in diesen effizient und funktional zur Expression zu bringen (Gurdon *et al.* 1971). Bald darauf erfolgten die ersten Expressionen von Liganden-gesteuerten Ionenkanälen und Neurotransmitter-Rezeptoren, wie den Acetylcholin- und Adrenalinrezeptor (Barnard *et al.* 1982; Kobilka *et al.* 1987; Sumikawa *et al.* 1981). 1987 konnten Hediger und Mitarbeiter den Na<sup>+</sup>-abhängigen Glukose-transporter als ersten Vertreter einer SLC-Familie in *X. laevis* Oozyten exprimieren (Hediger *et al.* 1987). Nach der Klonierung des humanen H<sup>+</sup>-Aminosäure-Cotransporters hPAT1 im Jahr 2003 folgte auch dessen Expression in *Xenopus* Oozyten nach Mikroinjektion der entsprechenden RNA (Boll *et al.* 2003b).

Die Wachstumsphase der Oozyten während der Oogenese besteht aus 6 Stadien (Dumont 1972). Für die heterologe Expression sind Oozyten der Entwicklungsstadien 5 und 6 zu verwenden. Charakteristische Merkmale dieser Stadien sind die Größe von etwa 1,0 bzw. 1,3 mm und die strenge Polarität. Der animalische Pol ist aufgrund seines hohen Melaningehaltes dunkel gefärbt. Die vegetale Hälfte ist weniger stark pigmentiert und erscheint dadurch heller.

Die genetische Information wird in diesem Expressionssystem mechanisch durch Mikroinjektion eingebracht (Gurdon 1973). Neben der Injektion von cRNA eignen sich die Oozyten auch zur *in vivo*-Transkription von heterogener DNA, die durch Mikroinjektion in den Nukleus gelangt. Aufgrund einer großen Anzahl freier und an das endoplasmatische Retikulum gebundener Ribosomen besitzen die Oozyten eine hohe translationale Kapazität. Die zelluläre Antwort steigt meist langsam, aber stetig über ca. 0,5 bis 2 Wochen. Des Weiteren kann die Oozyte posttranslationale Modifizierungen (N-Glykosylierung, Phosphorylierung, Azetylierung) durchführen und befördert das Protein in das richtige Kompartiment. Signalsequenzen werden abgespalten und oligomere Proteine korrekt zusammengesetzt. Diese Eigenschaften sind insbesondere für die funktionelle Expression von Membranproteinen von größter Bedeutung (Sigel 1990). So können Ionenkanäle, Rezeptoren oder Transporter exprimiert und ihre Funktion mittels Mikroelektroden oder *Patch-Clamp* Pipetten analysiert werden. Des Weiteren können exprimierte Proteine präpariert und biochemisch charakterisiert werden.

### 3.3.4.2. cRNA-Injektion

Zur Injektion wurden nur Oozyten des Reifestadiums V oder VI verwendet<sup>6</sup>. Als Methode zur Injektion wurde die Druckinjektion genutzt, wobei zum Ansaugen und Herausdrücken der cRNA-Lösung eine Mikroinjektionspumpe verwendet wurde. Dazu wurde eine Glaskapillare über einer Glühwendel fein ausgezogen, luftblasenfrei mit Mineralöl gefüllt und in die Mikropumpe eingespannt. Mit einer Pinzette wurde die noch verschmolzene Spitze der Kapillare abgebrochen, so dass das Mineralöl ausgepumpt und die cRNA-Lösung aufsaugt werden konnte. Um eine Verdunstung oder Degradation durch RNase-Kontamination zu vermeiden, wurde die RNA-Lösung unter einem sterilen Mineralölfilm aufgesaugt. Die Injektionskanüle wurde in der vegetalen Hälfte kurz unterhalb des Äquators auf die Oberfläche der Oozyte aufgesetzt und unter leichtem Druck in die Oozyte eingestochen. Soweit nicht anders angegeben, wurden 23 nl einer cRNA-Lösung mit einer Konzentration von 1,1 µg/µl injiziert (Präparation der cRNA siehe Kapitel 3.2.9.). Die Injektionskapillare wurde weitere 3–5 Sekunden in der Oozyte belassen, damit ein Druckausgleich stattfinden und kein Injektat entlang des Stichkanals hinauslaufen konnte. Die injizierten Oozyten wurden bis zur weiteren Verwendung in Barth-Medium bei 19 °C aufbewahrt. Es erfolgte ein täglicher Mediumwechsel, wobei stark geschädigte Zellen verworfen wurden. Eine leicht veränderte Pigmentierung der animalen Hälfte (dunkle Hälfte) sollte nicht unbedingt als Degradation gedeutet werden, da sich dies vielmehr als Zeichen einer guten Expression herausstellte.

## 3.4. Isolierung und Reinigung von hPAT1 nach rekombinanter Expression in *E. coli*

### 3.4.1. Zellaufschluss und *inclusion body*-Präparation

Zur Isolierung der *inclusion bodies*<sup>7</sup> wurden die Zellen mittels Hochdruckdispersion aufgeschlossen. Dazu wurde das Zellelett in 20 ml pro 5 g Zellen eines Puffers mit 0,1 M Tris/HCl pH 7; 1 mM EDTA homogenisiert. Um die Stabilität der bakteriellen Zellwand zu schwächen, wurde Lysozym (1,5 mg/ml Zellsuspension) zum Ansatz gegeben. Zusätzlich wurde zum Abbau der DNA eine Spatelspitze DNase zugesetzt und mit Hilfe einer 1 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung eine Endkonzentration von 3 mM MgCl<sub>2</sub> eingestellt. Die resuspendierten Zellen wurden für 30 min

<sup>6</sup> Die operative Entnahme und Präparation der Oozyten wurde freundlicherweise von Frau Schmidt (Julius-Bernstein-Institut, Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) durchgeführt.

<sup>7</sup> Als *inclusion bodies* werden funktionslose Aggregate bezeichnet, die aus fehlerhaft bzw. unvollständig gefalteten Proteinen bestehen. Diese Ablagerungen werden oft bei der rekombinanten Expression von Proteinen, insbesondere bei im nativen Zustand disulfidverbrückten Proteinen, in *E. coli* als Folge der Überexpression beobachtet (Rudolph & Lilie 1996).

bei Raumtemperatur inkubiert. Nun erfolgte der Zellaufschluss in einem Gaulin-Homogenisator (Gaulin Micron Lab 40, APV Homogeniser GmbH, Lübeck) für drei Passagen bei 600 bar. Bei Bedarf wurde nochmal mit DNase verdaut. Anschließend wurden 0,5 Volumen eines Puffers mit 0,1 M Tris/HCl pH 7; 20 mM EDTA; 150 mM NaCl; 6 % (v/v) Triton X-100 zugegeben und es wurde für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Zur Separierung der *inclusion bodies* wurde die Suspension für 30 min bei 38400 x g und 4 °C zentrifugiert. Die erhaltenen Pellets wurden in einem Puffer mit 0,1 M Tris/HCl pH 7; 1 mM EDTA mit Hilfe des Ultraturrax resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt. Das erhaltene *inclusion body*-Pellet wurde bei -20 °C gelagert.

### 3.4.2. Solubilisierung von *inclusion bodies*

Zur Solubilisierung wurden die *inclusion bodies* in 1 ml pro 10 mg eines Puffers mit 0,1 M Tris/HCl pH 8; 20 mM SDS; 100 mM DTT; 1 mM EDTA unter Rühren über Nacht bei Raumtemperatur aufgenommen. Um unlösliche Bestandteile abzutrennen, wurde das Solubilisat anschließend zentrifugiert (38400 x g, 30 min, 20 °C). Für die nachfolgende Reinigung über immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatografie mussten DTT und EDTA aus dem Solubilisierungsansatz entfernt werden. Durch Reduzierung bzw. Komplexbildung der Ni<sup>2+</sup>-Ionen würde ansonsten die Bindung des Zielproteins verhindert werden. Die solubilisierten *inclusion bodies* wurden 3–4 mal gegen das 10–20 fache Volumen an Puffer mit 50 mM Natriumphosphat pH 5,5; 10 mM SDS über drei Tage dialysiert. Der niedrige pH-Wert wurde gewählt, um Cysteinreste im reduzierten Zustand zu halten. Abschließend wurde der pH-Wert des Dialysats mit 5 M NaOH auf 8,0 angehoben und für 30 min bei 20 °C und 38400 x g zentrifugiert.

### 3.4.3. Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatografie (IMAC)

Die Isolierung von hPAT1 aus dem *inclusion body*-Solubilisat erfolgte mittels Metallchelataffinitätschromatografie über Ni-NTA Säulenmaterial. Zunächst wurde das Säulenmaterial in einen Säulenkörper überführt und mit 10 Säulenvolumen (SV) Bindepuffer (50 mM Natriumphosphat pH 8; 10 mM SDS) äquilibriert. Anschließend wurde das Material in Bindepuffer aufgenommen und zum *inclusion body*-Solubilisat gegeben und für 2–3 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurde die Suspension mit Hilfe einer Pumpe in den Säulenkörper transferiert. Um unspezifisch gebundene Proteine abzutrennen wurde mit



10 SV Bindepuffer gewaschen. Die Elution erfolgte durch Senken des pH-Wertes mit 10 SV Elutionspuffer 50 mM Natriumphosphat pH 4; 10 mM SDS.

### **3.5. Isolierung und Reinigung von hPAT1 nach zellfreier Expression**

Zur Fraktionierung der Reaktionsansätze in einen löslichen und einen unlöslichen Teil wurde der Reaktionsmix dem Reaktionsgefäß entnommen und für 90 min bei 16000 x g und 4 °C zentrifugiert.

#### **3.5.1. Unlösliche Expression**

Das nach Zentrifugation erhaltene Pellet wurde zur Solubilisierung in einem Puffer mit 100 mM Tris/HCl pH 8; 20 mM SDS; 1 mM EDTA; 100 mM DTT aufgenommen und über Nacht bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Im Falle einer analytischen Reaktion wurde das Pellet mit 40 µl versetzt, im Falle einer präparativen Reaktion mit 3 ml. Für eine nachfolgende Reinigung mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie (Ni-NTA) des im präparativen Maßstab exprimierten Proteins wurde das Solubilisat dreimal gegen je 1 l Puffer mit 50 mM Natriumphosphat pH 4; 10 mM SDS bei Raumtemperatur dialysiert. Der niedrige pH-Wert wurde gewählt, um Cysteine im reduzierten Zustand zu halten. Nun wurde das Dialysat für 30 min bei 13000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde, wenn nicht anders angegeben, eine IMAC wie unter 3.4.3. beschrieben, durchgeführt.

#### **3.5.2. Lösliche Expression**

Der Überstand der Zentrifugation (Kapitel 3.5.) wurde für die nachfolgende Reinigung mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie über Ni-NTA Säulenmaterial gegen einen Puffer (Bindepuffer) mit 50 mM Natriumphosphat pH 8; 0,1 % (w/v) Brij 35; 5 mM GSH; 1 mM GSSG dialysiert. Die Dialyse erfolgte durch zweimaligen Pufferwechsel gegen das 500 fache Volumen über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurde die Probe zentrifugiert (30 min, 13000 rpm, 4 °C) und der Überstand zur Reinigung verwendet. Zur Elution wurde ein Puffer mit 50 mM Natriumphosphat pH 8; 0,1 % (w/v) Brij 35; 5 mM GSH; 1 mM GSSG; 500 mM Imidazol verwendet. Die Reinigung über die Ni-NTA wurde prinzipiell wie unter Punkt 3.4.3. beschrieben, durchgeführt.

Um eine Reduktion nicht gebundener Ni-Ionen durch GSH zu verhindern, mussten diese zunächst vor der Reinigung durch mehrere Waschstufen mit Wasser (20 SV), GSH/GSSG-

freiem Elutionspuffer (10 SV) und GSH/GSSG-freiem Bindepuffer (20 SV) von der Säule entfernt werden.

### **3.6. Isolierung und Reinigung der T7-Polymerase**

Zur Reinigung der T7-Polymerase wurden die resuspendierten Zellen aus 3.3.1.2. bei Raumtemperatur aufgetaut und durch Passieren einer French<sup>®</sup> Press mit 2,3 kbar aufgeschlossen. Zelltrümmer und lösliche Fraktion wurden in einem Zentrifugationsschritt (20000 x g, 30 min, 4 °C) separiert. Die lösliche Fraktion (Überstand) wurde für eine Anionenaustauschchromatographie (Q-Sepharose) eingesetzt. Dafür wurde das Säulenmaterial (~ 40 ml) zuvor mit 200 ml Äquilibrationpuffer (30 mM Kaliumphosphat pH 8,0; 1 mM EDTA; 50 mM NaCl; 5 % Glycerin; 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) äquilibriert. Anschließend wurde der Überstand der Zentrifugation auf das Säulenmaterial aufgetragen. Es folgte ein Waschschritt mit 100 ml Äquilibrationpuffer. Die Elution erfolgte durch einen Salzgradienten von 50–500 mM NaCl in Äquilibrationpuffer über 100 min bei einer Flussrate von 4–5 ml/min.

### **3.7. Proteinanalytik**

#### **3.7.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Auftrennung von Proteinen und die Abschätzung ihrer Molekulargewichte erfolgten durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach der Methode von Laemmli (Laemmli 1970). Das im Probenpuffer und Gel enthaltene stark anionische Detergenz SDS bindet und denaturiert die Proteine, sodass die entstehenden SDS-Protein-Komplexe eine negative Nettoladung erhalten. Somit unterscheiden sich die verschiedenen Proteine nicht mehr durch ihre Ladung sondern lediglich durch ihre Größe. Man unterscheidet zwischen nicht-reduzierender und reduzierender SDS-PAGE, wobei bei letzterer Methode ein Reduktionsmittel (100 mM DTT oder  $\beta$ -Mercaptoethanol) im Probenpuffer enthalten ist, um Disulfidbrücken vollständig zu reduzieren.

##### *3.7.1.1. SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen*

Für Standardanalysen wurden Vertikalgele (8 cm x 10 cm x 0,75 mm) mit 10- oder 12,5 %igen Trenngelen eingesetzt. Die Proben wurden 1:1 mit 2x SDS-Probenpuffer (6 M Urea) versetzt und für 30 min bei 60 °C inkubiert. Die Elektrophorese wurde bei 30 mA pro

Gel und 200 V für 50–60 min durchgeführt. Zur Visualisierung der aufgetrennten Proteine wurde das Gel in Coomassie-Färbelösung inkubiert.

Um Molekulargewichtsunterschiede zwischen den einzelnen Glykosylierungsvarianten von hPAT1 zu untersuchen, wurden 7,5 %ige Vertikalgele (10 cm x 10 cm x 0,75 mm) verwendet. Die Elektrophorese wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 20 mA/Gel, 200 V, 2 h. Anschließend wurde das Laufverhalten der Varianten in Western Blot-Experimenten analysiert.

#### 3.7.1.2. SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen

Zur Analyse der Disulfidverbrückung in hPAT1 wurde die Mobilität der verschiedenen Proteinvarianten im SDS-Gel unter nicht-reduzierenden Bedingungen mit der unter reduzierenden Bedingungen verglichen. Ein schnelleres Laufverhalten einer Variante unter nicht-reduzierenden Bedingungen kann durch eine kompaktere Struktur, die durch Ausbildung einer Disulfidbrücke entsteht, erklärt werden.

Für diese Untersuchung wurden die verschiedenen Proteinvarianten von hPAT1 in *X. laevis* Oozyten exprimiert. Fünf Tage nach Injektion wurden pro Variante je 20 Oozyten mit 400 µl Lysispuffer versetzt und durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren lysiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (15 min, 16000 x g, 4 °C) wurde der Überstand mit 50 mM Iodacetamid versetzt. Die dadurch stattfindende irreversible Carbamoylmethylierung der Thiolgruppen verhindert weitere Reaktionen mit freien Thiolen während der Probenaufbereitung. Nachdem der Überstand in zwei gleich große Aliquots aufgeteilt wurde, wurde eine Probe mit 100 mM DTT und die andere mit entsprechender Menge Wasser versetzt. Beide Proben wurden 1:1 mit nicht-reduzierendem 2x SDS-Probenpuffer (8 M Urea) versetzt und sofort auf ein 7,5 %iges SDS-Gel (10 cm x 10 cm x 0,75 mm) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 20 mA/Gel und 200 V für 2 h durchgeführt.

#### 3.7.2. Western Blot

Für die Western Blot-Analyse wurden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine mit dem *Semidry-blotting* Verfahren nach Khyse-Anderson (Kyhse-Andersen 1984) auf eine Polyvinylidendifluorid- (PVDF) Membran übertragen. Vor Benutzung wurde die Membran für 30 sec in Methanol äquilibriert und anschließend für mindestens 15 min in Wasser inkubiert. Die Membran wurde kurz mit Transferpuffer benetzt und unter das Gel zwischen drei Lagen Whatman-Papier gelegt. Danach erfolgte der Transfer für 90 min bei einer Stromstärke von 2 mA/cm<sup>2</sup> und 40 V. Anschließend wurde die Membran für 1–2 Minuten mit Ponceau-

Färbelösung inkubiert. Die angefärbten Markerbanden wurden nachgezeichnet. Die Detektion der transferierten Proteine erfolgte über spezifische Antikörper-Reaktionen. Dazu wurde die Membran zunächst für 30 min in 5 % Milchpulver (w/v) in TBT-Puffer (5 % Milchpulver/TBT) geblockt. Nach über Nacht Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper in der jeweils geeigneten Konzentration (Tab. 3.5) in 5 % Milchpulver/TBT bei 4 °C folgten drei Waschschrte mit TBT-Puffer für jeweils 10 Minuten. Danach wurde für eine Stunde bei 4 °C mit dem HRP- (*horseradish peroxidase*) konjugierten sekundären Antikörper in 5 % Milchpulver/TBT inkubiert. Die Membran wurde nun erneut für 5 x 10 min mit TBT-Puffer gewaschen. Die Detektion erfolgte durch Chemilumineszenz. Dafür wurden ECL-Lösung 1 und 2 im Verhältnis 1:1 gemischt und für 1 min auf die Membran gegeben. Danach wurden die mit ECL-Lösung inkubierten Membranen je nach Signalstärke für 5 sec bis 2 h auf Röntgenfilme aufgelegt.

**Tab. 3.5 Eingesetzte Konzentration der verwendeten Antikörper in der Western Blot-Analyse**

Antikörper	Eingesetzte Konzentration
<b>anti-HA</b> Antikörper aus Maus	1:1000
<b>anti-His</b> Antikörper aus Maus	1:1000
<b>anti-hPAT1-PEP1</b> Antikörper aus Kaninchen	1:2000
<b>anti-hPAT1-PEP2</b> Antikörper aus Kaninchen	1:2000
<b>HRP-konjugierter anti-Kaninchen</b> Antikörper aus Ziege	1:2000
<b>HRP-konjugierter anti-Maus</b> Antikörper aus Ziege	1:2000
<b>HRP-konjugierter anti-T7</b> Antikörper aus Maus	1:10000

### 3.7.3. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration von Proteinlösungen wurde spektrometrisch ermittelt. Die Absorption der verdünnten Lösung eines Proteins bei einer Wellenlänge von 280 nm entspricht nach dem Lambert-Beerschen Gesetz einer definierten Konzentration:

$$A_{280} = \epsilon_{280} \cdot c \cdot d$$

$A_{280}$	Absorption bei 280 nm
$\epsilon_{280}$	Extinktionskoeffizient bei 280 nm in $M^{-1} \cdot cm^{-1}$
$c$	Proteinkonzentration in M
$d$	Schichtdicke der Küvette in cm

Der jeweilige Extinktionskoeffizient wurde mittels ProtParam (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) nach der Methode von Gill und von Hippel (Gill & von Hippel 1989) berechnet.

### 3.7.4. Massenspektrometrische Analyse

Die Massenspektrometrische Analyse von Proteinproben wurde von Frau Dr. Schierhorn (Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung) bzw. von Herrn Dr. Ihling (Institut für Pharmazie, MLU Halle) durchgeführt. Die zu analysierenden Proben wurden einer SDS-PAGE unterzogen. Das Gel wurde mittels Coomassielösung angefärbt und entsprechende Proteinbanden wurden aus dem Gel ausgeschnitten. Es folgte ein Proteaseverdau mit Trypsin allein oder mit einem Gemisch aus Trypsin und GluC und die Analyse der Fragmente. Der Grund für den Einsatz eines Proteasegemisches war, dass Trypsin allein für hPAT1 sehr große Peptide liefert, die schwer detektierbar sind. Die Proben wurden sowohl mit MALDI-MS (Matrixassistierte Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie) als auch mit ESI-MS (Elektronen-sprayionisations-Massenspektrometrie) untersucht.

### 3.7.5. Circular dichroismus-Spektroskopie

Zur Analyse der Sekundärstruktur der exprimierten Proteine wurden Fern-UV-CD Spektren im Wellenlängenbereich von 190 nm bis 260 nm aufgenommen. Die Spektren wurden bei einer Proteinkonzentration von 130 µg/ml in einer 1 mm Quarzglasküvette bei 20 °C aufgenommen. Von den Proteinspektren wurde das entsprechende Pufferspektrum abgezogen. Die gemessenen Signale (Elliptizität  $\Theta$ ) wurden in molare Elliptizitäten ( $\Theta_{MRW}$ ) umgewandelt (Gl. 3.2), die sich auf das durchschnittliche Molekulargewicht einer Aminosäure des Proteins bezieht.

$$\Theta_{MRW} = \frac{\Theta \cdot 100 \cdot MW}{c \cdot d \cdot N_A} \quad (\text{Gl. 3.2})$$

$\Theta_{MRW}$	molare Elliptizität in $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$
$\Theta$	gemessene Elliptizität in deg
MW	Molekulargewicht in Da
c	Proteinkonzentration in mg/ml
d	Schichtdicke in cm
$N_A$	Anzahl der Aminosäuren

## 3.8. Transportstudien

### 3.8.1. Transportuntersuchungen an transfizierten HRPE-Zellen

Die Transportaktivität von hPAT1 und den verschiedenen Varianten wurde durch Aufnahme von Tritium-markiertem L-Prolin (L-[2,3-<sup>3</sup>H]Prolin) in HRPE-Zellen quantifiziert. Die Messungen wurden 21 h nach Transfektion mit den Expressionsplasmiden pSPORT-hPAT1 oder pSPORT-HA-hPAT1 in 24 *well* Platten durchgeführt. L-[2,3-<sup>3</sup>H]Prolin (49 Ci/mmol) wurde in einer Konzentration von 20 nM im Aufnahmepuffer eingesetzt.

Zunächst wurde das Medium abgesaugt und zweimal mit Spülpuffer gewaschen. Dann wurden 300  $\mu$ l/*well* Aufnahmepuffer auf die Zellen gegeben und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgenommen und die Zellen wurden viermal mit eiskaltem Spülpuffer gewaschen. Um die Zellen zu lysieren, wurden 500  $\mu$ l/*well* Lysispuffer für mindestens 15 min zugegeben. Die Zellen wurden mechanisch resuspendiert und in Szintillationsröhrchen überführt. Nach Zugabe von 2,8 ml Szintillationsflüssigkeit wurden die Proben für 25–30 Sekunden gevortext und in einem Flüssigszintillations-Counter Tri-Carb-2100 bei RT vermessen. Als Standard wurden 25  $\mu$ l Aufnahmepuffer mit 2,8 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und analog zu den Proben behandelt und vermessen.

Um den Einfluss von DTT auf die Transportfunktion von hPAT1 zu untersuchen, wurden transfizierte HRPE-Zellen vor der Transportmessung für 20 min in DTT-haltigem Puffer (25 mM HEPES/Tris pH 7,5; 140 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,8 mM MgSO<sub>4</sub>; 5 mM Glukose; 10 mM DTT) inkubiert. Anschließend erfolgte die Transportuntersuchung wie oben beschrieben, nur mit der Ausnahme, dass der Aufnahmepuffer und Spülpuffer 10 mM DTT enthielten. Die erzielten Daten wurden wie unter Punkt 3.11. beschrieben ausgewertet.

### 3.8.2. Transportuntersuchungen an injizierten *Xenopus laevis* Oozyten

Für Transportmessungen wurde die Zwei-Elektroden-Spannungsklammer-Technik 5 bis 6 Tage nach cRNA-Injektion bei Raumtemperatur durchgeführt. Die für die Messung benötigten Kapillaren wurden aus Borosilikat-Glas gezogen und mit einer 3 M KCl-Lösung gefüllt. Der Widerstand der Messelektroden lag zwischen 0,8 und 1,4  $\text{M}\Omega$ . Während der Messung wurde die Oozyte in einer Durchflusskammer unter kontinuierlichem Fluss mit einer modifizierten Oozyten-Ringerlösung (ORi PAT pH 6,5) umspült. Alle Messungen wurden bei einem Membranpotential von  $-60$  mV durchgeführt. Zur Messung der Transportaktivität wurde für

die Dauer einer Aufzeichnungsspur (6 Sekunden) die gewünschte Substanz in ORi PAT pH 6,5 appliziert. Schnelle und reproduzierbare Lösungswechsel wurden durch mehrere Computer-gesteuerte Magnetventile erreicht, die ein modifiziertes U-Rohr-System kontrollieren (Bretschneider & Markwardt 1999). Die erzeugten Ströme wurden durch einen Spannungsklemmenverstärker (OC-725C, Hamden, USA) verstärkt.

Um die pH-Abhängigkeit der Transportaktivität zu ermitteln, wurden Glyzin-Lösungen verschiedener pH-Werte (5,0–8,0) appliziert (10 mM Mes/Tris oder HEPES/Tris; 100 mM NaCl; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM CaCl<sub>2</sub>; 2 mM KCl; 20 mM Glyzin). Für die Ermittlung der Michaelis-Konstante wurde der Strom in Gegenwart verschiedener Glyzin-Konzentrationen (0–100 mM) in ORi PAT pH 6,5 bestimmt. Um den Einfluss des reduzierenden Reagens DTT auf die Transportfunktion von hPAT1 zu analysieren, wurden cRNA-injizierte Oozyten vor der Transportmessung für 20 min in DTT-haltigem Barth-Medium (10 mM DTT) bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte die Transportuntersuchung wobei die Oozyten-Ringerlösung (ORi PAT pH 6,5) ebenfalls 10 mM DTT enthielt. Die erzielten Daten wurden wie unter Punkt 3.11. beschrieben ausgewertet.

### **3.9. Immunfluoreszenz-Mikroskopie**

#### **3.9.1. Immunfluoreszenz-Untersuchung an transfizierten HRPE-Zellen**

Immunfluoreszenz-Untersuchungen an transfizierten HRPE-Zellen wurden sowohl in 6 *well* Platten mit Deckgläschen als auch in BD Falcon™ *Culture Slides* durchgeführt. Für die Kultivierung in 6 *well* Platten wurden vor der Zellaussaat Deckgläschen in 70 %igem Ethanol gespült, abgeflammt und in die *wells* gelegt.

Alle folgenden Arbeits- und Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. 21 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Zum Fixieren und Permeabilisieren wurden die Zellen mit eiskalter Fixierlösung (4 % PFA; 0,05 % Triton X-100 in PBS) für 20 min inkubiert. Danach wurde zweimal mit PBS gewaschen und für 5 min mit 0,1 M NH<sub>4</sub>Cl in PBS inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS wurden die Präparate mit 5 % BSA in PBS für 10 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (polyklonaler anti-HA Antikörper aus Kaninchen, 1:1600 in 5 % BSA/PBS, 2 h in feuchter Kammer). Nachdem dreimal für je 5 min mit PBS gewaschen wurde, erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Alexa Fluor® 488 anti-Kaninchen Antikörper, 1:500 in 5 % BSA/PBS, 1 h in dunkler feuchter Kammer). Nach drei

weiteren Waschschrritten mit PBS wurden die Zellkerne mit DAPI angefärbt (10 µg/ml in PBS, 10 min im Dunkeln). Bei Verwendung von Deckgläschen in 6 *well* Platten wurden zunächst 100 µl CitiFluor Montagelösung auf einen Objektträger gegeben. Danach wurden die Deckgläschen vorsichtig aus den *wells* mit einer Pinzette entnommen und mit der Zellseite nach unten auf den Objektträger gelegt. Im Fall der BD Falcon™ *Culture Slides* wurden die Kammern vom Objektträger gelöst, 150 µl CitiFluor Montagelösung je Probenbereich zugegeben und ein Deckgläschen darauf gelegt. Die Immunfluoreszenzpräparate wurden zum Aushärten über Nacht im Dunkeln bei 4 °C aufbewahrt. Die Auswertung erfolgte an einem konfokalen Laser-scanning Mikroskop.

### 3.9.2. Immunfluoreszenz-Untersuchung an injizierten *Xenopus laevis* Oozyten

Die Präparation der Oozyten erfolgte 5–6 Tage nach Injektion in 24 *well* Platten. Je Proteinvariante wurden 10 Oozyten präpariert. Zunächst wurden die Oozyten zur Fixierung in einer Ethanol/Essigsäure-Lösung (95:5 (v/v)) für 1,5 h bei 4 °C inkubiert. Danach wurde einmal kurz und dreimal für je 15 min mit 5 % BSA in PBS (BSA/PBS) gewaschen. Nun erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (polyklonaler anti-HA Antikörper aus Kaninchen, 1:1600 in BSA/PBS, über Nacht in feuchter Kammer oder polyklonaler anti-hPAT1-PEP2 Antikörper aus Kaninchen, 1:1000 in BSA/PBS, über Nacht in feuchter Kammer bei 4 °C). Nun wurde wieder einmal kurz und dreimal für je 15 min mit BSA/PBS gewaschen. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Alexa Fluor® 488 anti-Kaninchen Antikörper, 1:500 in BSA/PBS) im Dunkeln für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach einem kurzen und vier weiteren Waschschrritten á 10 min mit BSA/PBS wurden die Oozyten auf einen Objektträger mit Vertiefung überführt und mit CitiFluor Montagelösung und einem Deckgläschen luftblasenfrei bedeckt. Die Präparate wurden zum Aushärten über Nacht bei 4 °C gelagert. Die Auswertung erfolgte an einem konfokalen Laser-scanning Mikroskop. Fluoreszenzintensitäten wurden mit Hilfe der Aida 2.1 Image Software (Raystad, Straubenhardt) analysiert. Dafür wurden 11 gleich große Membransegmente einer Oozyte quantifiziert. Es sind Mittelwerte einschließlich Standardfehler von 5–6 Oozyten dargestellt.

### 3.10. Biotinylierung freier SH-Gruppen

Für die Biotinylierung freier SH-Gruppen von Proteinen wurde das Maleimid-PEG<sub>11</sub>-Biotin Reagens verwendet. Die Maleimidgruppe, die durch einen langen hydrophilen Polyethylenglykol-*spacer* mit einem Biotinmolekül verbunden ist, reagiert im pH-Wert Bereich von



6,5–7,5 spezifisch mit freien (reduzierten) Sulfhydrylgruppen unter Ausbildung einer Thioetherbindung. Das Biotinmolekül bindet mit einer hohen Affinität an Avidin oder Streptavidin. So können Proteine, die durch das Maleimid-PEG<sub>11</sub>-Biotin Reagens markiert wurden, durch Bindung an immobilisiertes Avidin, Streptavidin oder Neutravidin isoliert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden Biotinylierungsversuche ausschließlich an *Xenopus laevis* Oozyten durchgeführt. Fünf Tage nach cRNA-Injektion wurden pro Proteinvariante 20 Oozyten mit 0,5 mg/ml Maleimid-PEG<sub>11</sub>-Biotin in Biotinylierungspuffer (5 mM HEPES/NaOH pH 7,4; 100 mM NaCl; 1 mM KCl; 1 mM CaCl<sub>2</sub>; 1 mM MgCl<sub>2</sub>) für eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Danach wurde sechsmal für je 5 min bei Raumtemperatur mit Biotinylierungspuffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 20 µl/Oozyte Lysispuffer durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren lysiert. Das Lysat wurde zentrifugiert (15 min, 16000 x g, 4 °C) und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. 10 µl wurden für eine Western Blot-Analyse mit 50 µl SDS-Probenpuffer versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C gelagert (Lysatprobe). 350 µl des restlichen Überstandes wurden mit 50 µl Neutravidin Agarose *beads* gemischt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Neutravidin Agarose *beads* wurden zuvor dreimal mit 200 µl Lysepuffer gewaschen. Am nächsten Tag wurden die Reaktionsgefäße kurz zentrifugiert (1 min, 16000 x g), die Überstände abgenommen und die *beads* dreimal mit 200 µl Lysispuffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Lysispuffer durch 30 µl 2 x SDS-Probenpuffer (6 M Urea) ersetzt. Zur Elution der gebundenen Proteine wurden die *beads* für 20 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurden 5 µl der Lysatprobe und 30 µl des Eluats für eine nachfolgende Western Blot-Analyse auf ein 10 %iges SDS-Gel aufgetragen.

### 3.11. Deglykosylierung

Für die enzymatische Deglykosylierung von Glykoproteinen wurde die Peptid: N-Glykosidase F (PNGase F) verwendet. Dieses Enzym spaltet zwischen dem Asparagin und der innersten Zuckerkomponente von N-Glykanen, dem N-Acetylglucosamin. Da die Spezifität dieses Enzyms bezüglich des Glykans sehr gering ist, eignet sich die PNGase F besonders gut um Zuckerketten unbekannter Zusammensetzung abzuspalten.

Um den Glykosylierungsstatus von hPAT1 zu untersuchen, wurden verschiedene Proteinvarianten in Oozyten exprimiert. Fünf Tage nach Injektion wurden pro Variante je 20 Oozyten mit 400 µl Lysispuffer versetzt und durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren lysiert. Das

Lysat wurde zentrifugiert (15 min, 16000 x g, 4 °C) und der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. 16 µl des Überstands wurden mit 2 µl PNGase F (500 U/µl) und 2 µl G7-Puffer (NEB: 0,5 M Natriumphosphat pH 7,5) versetzt und bei 37 °C für 3 h inkubiert. Parallel wurde für jede Variante ein zweiter Ansatz mitgeführt in dem das Enzym durch Wasser ersetzt wurde. Anschließend wurde der gesamte Ansatz mit 100 µl 2x SDS-Probenpuffer (6 M Urea) versetzt. Für eine Western Blot-Analyse wurden jeweils 5 µl auf ein 7,5 %iges SDS-Gel (10 x 10 cm) aufgetragen.

### 3.12. Datenauswertung

Die mathematische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Programme Microsoft® Excel (Office 2007, Microsoft Cooperation, USA) und Sigma Plot (Version 10, Systat Software GmbH, Erkrath).

#### *Transportuntersuchungen an transfizierten HRPE-Zellen*

Zur Bestimmung der Transportaktivität von hPAT1 wurde die Aufnahme von Tritium-markiertem L-Prolin (L-[2,3-<sup>3</sup>H]Prolin) in HRPE-Zellen gemessen. Aus der gemessenen Radioaktivität (dpm) wurde die Aufnahme von L-[2,3-<sup>3</sup>H]Prolin in [fmol/400000 Zellen pro 10 min] berechnet. Dabei entsprach der gemessene Standard einer Stoffmenge an L-[2,3-<sup>3</sup>H]Prolin von 500 fmol. Zunächst wurde die Gesamtstoffmenge an L-[2,3-<sup>3</sup>H]Prolin berechnet, die in 10 min von den Zellen aufgenommen wurde (Gl. 3.3).

$$n_{\text{Probe}} = \frac{n_{\text{Standard}} \cdot Z_{\text{Probe}}}{Z_{\text{Standard}}} \quad (\text{Gl. 3.3})$$

$n_{\text{Probe}}$	Stoffmenge an L-[2,3- <sup>3</sup> H]Prolin in der Probe [fmol]
$n_{\text{Standard}}$	Stoffmenge an L-[2,3- <sup>3</sup> H]Prolin im Standard [fmol]
$Z_{\text{Probe}}$	Radioaktivität in der Probe [dpm]
$Z_{\text{Standard}}$	Radioaktivität im Standard [dpm]

Danach wurde die berechnete Gesamtstoffmenge über Gleichung 3.4 auf 400000 Zellen normiert. Dies ergab die L-[2,3-<sup>3</sup>H]Prolin-Aufnahme in [fmol/400000 Zellen pro 10 min].

$$\text{L-[2,3-}^3\text{H]Prolin-Aufnahme} = \frac{n_{\text{Probe}} \cdot 400000 \text{ Zellen}}{N} \quad (\text{Gl. 3.4})$$

$n_{\text{Probe}}$	Stoffmenge an L-[2,3- <sup>3</sup> H]Prolin in der Probe [fmol]
$N$	bestimmte Zellzahl (vor Transfektion)

Es wurden Mittelwerte einschließlich der Standardfehler aus vier Einzelmessungen ( $n = 4$ ) graphisch dargestellt.

*Transportuntersuchungen an injizierten Xenopus laevis Oozyten*

Die durch elektrophysiologische Messungen erzielten Daten wurden mittels einer am Julius-Bernstein-Institut für Physiologie (MLU Halle-Wittenberg) entwickelten Software gespeichert und analysiert (SP-Analyzer von T. Böhm). Die Transportaktivität ergab sich aus der Differenz der Ströme in An- und Abwesenheit der applizierten Substanz. Die Messwerte sind jeweils als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (S.E.M.) von 6 bis 8 Oozyten aus je zwei verschiedenen Oozytenpräparationen dargestellt.

Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz der Differenz von Mittelwerten wurde der t-Test herangezogen. Das Signifikanzniveau  $\alpha$  lag bei 0,01 bzw. 0,001. Die verwendeten Symbole bei statistischen Auswertungen entsprechen folgenden  $P$ -Werten: \*  $P < 0,01$ ; \*\*  $P < 0,001$ . Auswertungen mit  $P > 0,05$  wurden als statistisch nicht signifikant klassifiziert. Zur Bestimmung der Affinität von Glyzin zum Transportsystem (Michaelis-Konstante,  $K_t$ -Wert) wurde der induzierte Strom in Gegenwart verschiedener Glyzin-Konzentrationen (0–100 mM) ermittelt. Mit Hilfe der Michaelis-Menten Gleichung (Gl. 3.5) wurden der  $K_t$ - und der  $I_{\max}$ -Wert berechnet.

$$I [\text{nA}] = \frac{I_{\max} [\text{nA}] \cdot S [\text{mM}]}{K_t [\text{mM}] + S [\text{mM}]} \quad (\text{Gl. 3.5})$$

## 4 ERGEBNISSE & DISKUSSION

### 4.1. Rekombinante Expression von hPAT1 in *E. coli*

Da Membranproteine in ihrer natürlichen Umgebung oft in sehr geringen Konzentrationen vorkommen, ist die heterologe Überexpression eine wichtige Methode zur Gewinnung großer Proteinmengen. Sie stellt häufig einen essentiellen Schritt in der Strukturaufklärung dar (Grisshammer & Tate 1995). Aufgrund verschiedener Vorteile wie u.a. geringe Kosten, einfache Manipulation, schnelles Zellwachstum und eine große Auswahl an Expressionsvektoren und Stämmen sollte der humane H<sup>+</sup>-Aminosäure-Cotransporter hPAT1 im Rahmen dieser Arbeit rekombinant in *E. coli* exprimiert werden. In diesem System können zwei verschiedene Expressionsstrategien verfolgt werden: (1) funktionelle Expression des Membranproteins in die *E. coli*-Membran oder (2) Expression des Membranproteins als cytoplasmatische Aggregate (Einschlusskörperchen oder *inclusion bodies*). Oft ist die funktionelle Expression jedoch mit toxischen Effekten für die Wirtszelle verbunden und die resultierenden Proteinmengen sind relativ gering (Bannwarth & Schulz 2003; Grisshammer & Tate 1995). Dies kann durch Expression des Membranproteins als *inclusion bodies* umgangen werden. Im Vergleich zur löslichen Expression und Integration in die Membran kann die Expressionsrate durch Expression als *inclusion bodies* um den Faktor 1000 bis 10000 erhöht werden (Kiefer 2003). Des Weiteren ermöglicht die *inclusion body*-Expression bessere Reinigungsergebnisse, da die unlöslichen Aggregate einfach zu isolieren sind und das exprimierte Protein meist eine ihrer Hauptkomponente darstellt. Diese Vorteile sollten für die Expression des H<sup>+</sup>-Aminosäure-Cotransporters hPAT1 genutzt werden. Diese Strategie wurde bisher für viele lösliche (nicht-membranständige) Proteine, jedoch recht selten für Membranproteine angewendet. Dennoch konnten bereits einige Membranproteine, wie z.B. der olfaktorischer G-Protein gekoppelte Rezeptor OR5 aus Ratte und der humane spannungsabhängige Anionenkanal VDAC1 nach unlöslicher Expression erfolgreich in ihre funktionelle Form renaturiert werden (Bayhuber *et al.* 2008; Kiefer *et al.* 1996).

Die Entwicklung und Optimierung von Expressionsprotokollen ist ein wichtiger und essentieller Schritt bei der heterologen Überexpression. So können die Auswahl des *E. coli* Stammes oder geringste Veränderungen der Kultivierungsbedingungen einen großen Einfluss auf die Proteinausbeute haben (Junge *et al.* 2008; Wang *et al.* 2003). Eine der wichtigsten Optimierungsmöglichkeiten liegt in der Wahl des Expressionsvektors. Die große Vielfalt an

Vektoren ermöglicht die Expression des Zielproteins mit verschiedenen *tags* am N- oder C-Terminus, wodurch die Reinigung und Detektion erheblich erleichtert werden. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, das Zielprotein als N- oder C-terminales Fusionsprotein mit anderen Proteinen zu exprimieren. Die Expressionsrate eines Proteins ist häufig von vielen Faktoren abhängig und eine Vorhersage optimaler Expressionsbedingungen ist sehr schwierig. Daher kann die Suche nach den idealen Expressionsbedingungen nur durch systematisches Ausprobieren erfolgen und unter Umständen sehr zeitaufwendig sein. Trotz vieler Optimierungsmöglichkeiten wird jedoch nicht jedes Gen in *E. coli* erfolgreich zur Expression gebracht. Dies kann u.a. durch die Instabilität der mRNA, durch eine ineffiziente Translation der mRNA oder durch unterschiedliche *codon usage* von Herkunfts- und Wirtsorganismus begründet werden (Grishammer & Tate 1995; Jana & Deb 2005). Bereits exprimiertes Protein kann auch durch Degradation durch Wirtsproteasen wieder abgebaut werden oder eine toxische Wirkung haben, so dass die Wirtszellen absterben und eine Proteinproduktion auf diesem Wege nicht gelingt.

#### 4.1.1. Klonierung der hPAT1-cDNA in verschiedene *E. coli*-Expressionsvektoren

Um den humanen H<sup>+</sup>-Aminosäure-Cotransporter hPAT1 rekombinant in *E. coli* exprimieren zu können, musste die DNA-Sequenz zunächst in einen Expressionsvektor kloniert werden. Dafür wurde die codierende Sequenz mittels PCR aus dem pSPORT1-hPAT1-Plasmid (Metzner *et al.* 2008) amplifiziert und mit Hilfe der beschriebenen molekularbiologischen Methoden in verschiedene Expressionsvektoren inseriert. Die für die Herstellung der jeweiligen Expressionskonstrukte verwendeten *primer* sind in Tabelle 2.16 des Material-Teils aufgeführt. Durch analytischen Restriktionsverdau und anschließende Sequenzierung wurde die Richtigkeit der codierenden und angrenzenden Vektorsequenz bestätigt.

**Tab. 4.1** Verwendete *E. coli*-Expressionskonstrukte und die damit verbundene Expressionsstrategie.

Expressionsvektor	Expressionskonstrukt	Expressionsstrategie
pET28a	(His) <sub>6</sub> -hPAT1	Expression mit N-terminalem Histidin- <i>tag</i>
pET41b	hPAT1-(His) <sub>8</sub>	Expression mit C-terminalem Histidin- <i>tag</i>
pETSUMO adapt	(His) <sub>6</sub> -SUMO-hPAT1	Expression als SUMO-Fusionsprotein (N-terminal), N-terminaler Histidin- <i>tag</i>
pET21a	T7-hPAT1-(His) <sub>10</sub>	Expression mit N-terminalem T7- <i>tag</i> und C-terminalem Histidin- <i>tag</i>
pET41b	GST-hPAT1-(His) <sub>8</sub>	Expression als N-terminales GST-Fusionsprotein mit C-terminalem Histidin- <i>tag</i>

Originalsequenz	5' ATG TCC ACG CAG AGA CTT... 3'
Primersequenz	5'...ATG TCA ACT CAA CGT CTT... 3'
Expressionsklon	5' ATG TCA ACT CAA CGT CTT... 3'

**Abb. 4.1 Klonierungsstrategie für das hPAT1-(His)<sub>8</sub>-Konstrukt.** Die *primer*-Sequenz enthält stille Mutationen um den Adenin/Thymin-Gehalt zu erhöhen. Der resultierende Expressionsklon ist dargestellt. Eingeführte stille Mutationen sind rot hervor gehoben.

Um ein hohes Expressionsniveau zu erreichen und damit die Bildung von *inclusion bodies* zu begünstigen, wurden Expressionsvektoren der pET-Serie verwendet. In diesen steht die Expression des Zielproteins unter der Kontrolle eines T7 Promoters. In Tabelle 4.1 sind die in dieser Arbeit hergestellten und untersuchten Expressionskonstrukte und die damit verfolgten Expressionsstrategien aufgeführt.

Eine Besonderheit bei der Klonierung des hPAT1-(His)<sub>8</sub>-Konstrukts bestand in der Verwendung eines speziellen 5'-*primers*. Aus der Literatur ist bekannt, dass insbesondere die Struktur des 5'-Bereichs der mRNA einen großen Einfluss auf die Initiation der Translation hat (Puri *et al.* 1999). Sekundärstrukturen in diesem Bereich können sich ungünstig auswirken. Um potentielle Haarnadelstrukturen (*hairpins*) zu vermeiden, sollte durch Einführen von stillen Mutationen der Anteil an Adenin und Thymin in den ersten 18 Basen nach dem Startcodon erhöht werden. Der aus dieser Klonierungsstrategie resultierende Klon ist in Abbildung 4.1 dargestellt.

#### 4.1.2. Expressionsstudien von hPAT1 mit N- oder C-terminalem Histidin-*tag*

Die Klonierung der codierenden Sequenz von hPAT1 in den Expressionsvektor pET28a ermöglichte die Expression des Transporters mit einem 6-fachen N-terminalem Histidin-*tag* ((His)<sub>6</sub>-hPAT1). Der Histidin-*tag* erleichtert nicht nur die Reinigung des Proteins über eine immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie, sondern kann auch für Detektion geringster Mengen an exprimiertem Protein mittels Western Blot-Analyse (anti-His-*tag* Antikörper) genutzt werden. Um verschiedene Expressionsbedingungen zu testen, wurde die Proteinexpression zunächst im kleinen Maßstab (50–100 ml) durchgeführt. Dafür wurde das Expressionskonstrukt in diverse *E. coli*-Expressionstämme transformiert. Die Expression des Transporters wurde außerdem bei unterschiedlichen Temperaturen getestet. Zudem wurde die Induktion der Proteinexpression durch verschiedene IPTG-Konzentration variiert. Um eine basale Expression vor Induktion zu vermeiden, wurde für alle Expressionsanalysen

LB-Medium verwendet, welches mit 1 % Glukose<sup>8</sup> versetzt wurde. In Tabelle 4.2 sind alle getesteten Expressionsbedingungen aufgeführt.

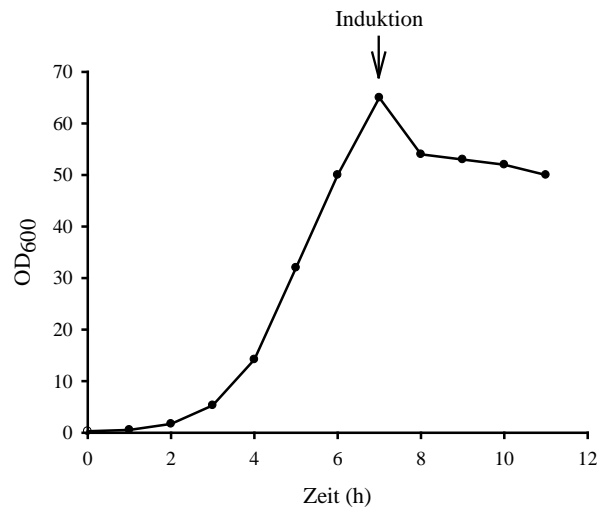
Für alle getesteten Bedingungen konnten sowohl im Coomassie-gefärbten SDS-Gel als auch in der Western Blot-Analyse keine charakteristischen Expressionsbanden im Bereich um 53 kDa beobachtet werden. Dennoch wurde mit dem Expressionskonstrukt (His)<sub>6</sub>-hPAT1 im Stamm Rosetta™ (DE3) pLysS eine Fermentation bei 40 °C nach dem *fed-batch* Verfahren durchgeführt. Untersuchungen zur rekombinanten Expression des G-Protein gekoppelten Rezeptors *Glucagon-like peptide-1*-Rezeptor (GLP1-Rezeptor) haben gezeigt, dass unter Umständen nur mit Hilfe einer Fermentation genügend Zellmaterial und damit Zielprotein für eine Detektion im SDS-Gel produziert werden kann. Allerdings gelingt dies nur nach Anreicherung durch eine *inclusion body*-Isolierung und anschließender Reinigung mittels Affinitätschromatographie (Schröder-Tittmann 2009).

Die Kontrolle des Zellwachstums erfolgte durch stündliche Messung der OD<sub>600</sub> während der Zellkultivierung. Die zeitabhängige Zunahme dieses Parameters ist in der Wachstumskurve in Abbildung 4.2 dargestellt. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte bei einer OD<sub>600</sub> von 63 mit 1 mM IPTG. Vier Stunden nach Induktion wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet. Die Zellfeuchtmasse betrug 550 g. Auffällig ist die starke Abnahme der optischen Dichte kurz nach Induktion mit IPTG. Bis zum Ende der Fermentation sank die OD<sub>600</sub> stetig bis auf einen Wert von 50. Ein Übergang der Wachstumsphase in ein Plateau nach Induktion ist ein charakteristisches Indiz für die Produktion von Fremdprotein. Das Absterben der

**Tab. 4.2 Getestete Expressionsbedingungen für das Expressionskonstrukt (His)<sub>6</sub>-hPAT1.** Die Zellen wurden in LB-Medium, welches mit 1 % Glukose (w/v) versetzt wurde, kultiviert.

<b><i>E. coli</i> Stamm</b>	<b>Temperatur</b>	<b>IPTG-Konzentration</b>
BI21 (DE3) pLysS	17 °C, 25 °C, 37 °C	0,1 mM; 1 mM
BI21 (DE3) c <sup>+</sup> RIL	20 °C, 37 °C, 42 °C	1 mM
BL21 (DE3) C41	17 °C, 25 °C, 37 °C	0,1 mM; 1 mM
BL21 (DE3) C43	17 °C, 25 °C, 37 °C 42 °C	0,1 mM; 1 mM 1 mM
Rosetta™ (DE3) pLysS	17 °C, 25 °C, 37 °C 42 °C	0,1 mM; 1 mM 1 mM
HMS 174 (DE3)	37 °C	1 mM
BI21 Star™ (DE3)	17 °C, 25 °C, 37 °C	1 mM

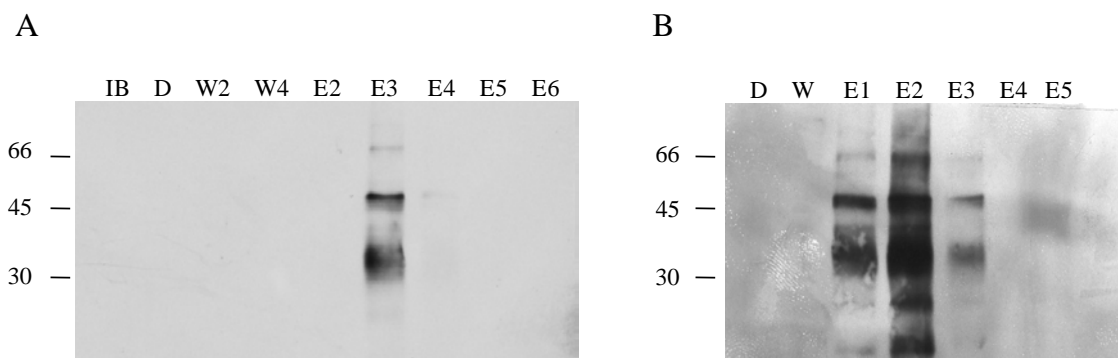
<sup>8</sup> Wenn die Glukosekonzentration im Medium abnimmt, wird eine andere Kohlenstoffquelle wie z.B. Glycerol verwendet. Dadurch wird die cAMP-Konzentration innerhalb der Zelle erhöht, wodurch die Transkription der T7 RNA-Polymerase stimuliert wird (Grossman *et al.* 1998). Eine basale Expression vor Proteininduktion, ausgelöst durch Glukose-Mangel im Medium, kann gerade bei toxischen Proteinen wie Membranproteinen zur Plasmidinstabilität führen.



**Abb. 4.2** Wachstumskurve von Rosetta™ (DE3) pLysS mit dem Expressionskonstrukt (His)<sub>6</sub>-hPAT1 während der Fermentation im Hefeextrakt Vollmedium bei 40 °C.

Zellen nach Induktion ist charakteristisch für die Expression von toxischen Proteinen und konnte auch bei der Expression von anderen Membranproteinen beobachtet werden (Miroux & Walker 1996).

Für eine *inclusion body*-Präparation wurden 290 g Zellen mittels Hochdruckdispersion aufgeschlossen. 1,3 g *inclusion bodies* wurden über Nacht solubilisiert und anschließend über eine Affinitätschromatographie (Ni-NTA) aufgereinigt. Im Coomassie-gefärbten SDS-Gel konnte keine Proteinbande in den Elutionsfraktionen beobachtet werden. Im Western Blot jedoch ist in Elutionsfraktion drei eine Bande im Bereich des 50 kDa Molekularmassenstandards erkennbar (Abb. 4.3 A). Die diffuse Bande bei ~ 35 kDa könnte eine verkürzte Proteinvariante



**Abb. 4.3** Reinigung von (His)<sub>6</sub>-hPAT1 mittels Ni-NTA. Für die zuvor erfolgte Solubilisierung wurden (A) 1,3 g *inclusion bodies* und (B) 4,4 g *inclusion bodies* verwendet. IB – *inclusion body*-Isolat, D – Durchlauf, W – Waschfraktion, E – Elutionsfraktion. Die Detektion erfolgte durch Western Blot-Analyse mittels anti-His Antikörper.



darstellen. Um die Ausbeute an affinitätsgereinigtem (His)<sub>6</sub>-hPAT1 zu erhöhen, wurden nun 4,4 g *inclusion bodies* für eine Solubilisierung mit anschließender Affinitätschromatographie (Ni-NTA) eingesetzt. Aber auch hier konnte im SDS-Gel keine spezifische Bande im Bereich um 50 kDa erkannt werden. Erst im Western Blot wurden in drei Elutionsfraktionen Proteinbanden im erwarteten Molekularmassenbereich detektiert (Abb. 4.3 B).

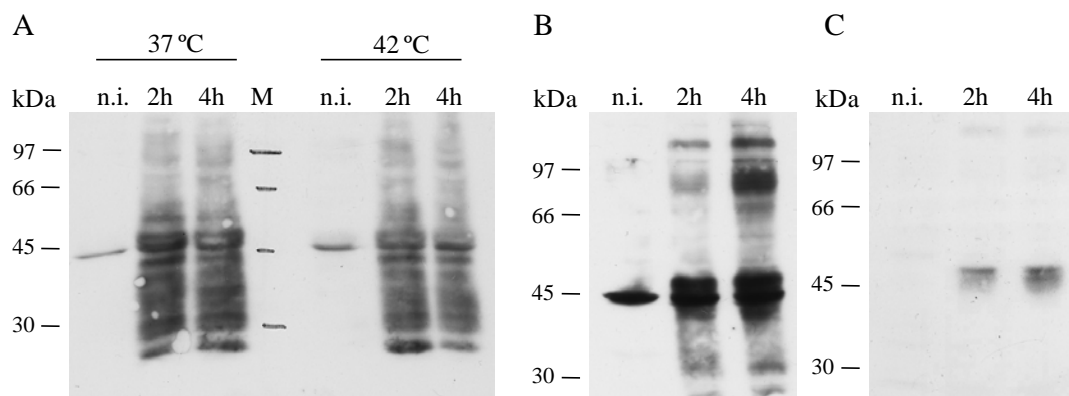
Da auf diesem Weg ebenfalls nur unzureichende Proteinausbeuten erhalten wurden, wurde im Folgenden der Einfluss der Position des His-tag untersucht. Dazu wurde die codierende Sequenz nun in den Expressionsvektor pET41b kloniert, der die Expression des Transporterproteins mit einem 8-fachen C-terminalem Histidin-tag (hPAT1-(His)<sub>8</sub>) ermöglicht. Zusätzlich wurde der 5'-Bereich der cDNA hinsichtlich potentieller Sekundärstrukturen in der mRNA optimiert. Um dieses Konstrukt auf Expression zu testen wurde es in verschiedene *E. coli* Stämme transformiert. Alle getesteten Kultivierungsbedingungen sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst. Jedoch konnte sowohl im Coomassie-gefärbten SDS-Gel als auch im Western Blot für keine Bedingung eine charakteristische Expressionsbande im erwarteten Molekularmassenbereich beobachtet werden. Dennoch wurde aus den zuvor erwähnten Gründen eine *fed-batch* Fermentation des Expressionskonstrukts im *E. coli* Stamm HMS 174 (DE3) bei 37 °C durchgeführt. Daraufhin folgte eine *inclusion body*-Isolierung aus 200 g Zellen mit anschließender Solubilisierung und Reinigung des exprimierten Proteins über eine Affinitätschromatographie (Ni-NTA). In den Elutionsfraktionen konnte jedoch kein Protein nachgewiesen werden.

**Tab. 4.3 Getestete Expressionsbedingungen für das Expressionskonstrukt hPAT1-(His)<sub>8</sub>.** Allen Kultivierungsmedien wurde 1 % Glukose (w/v) zugesetzt.

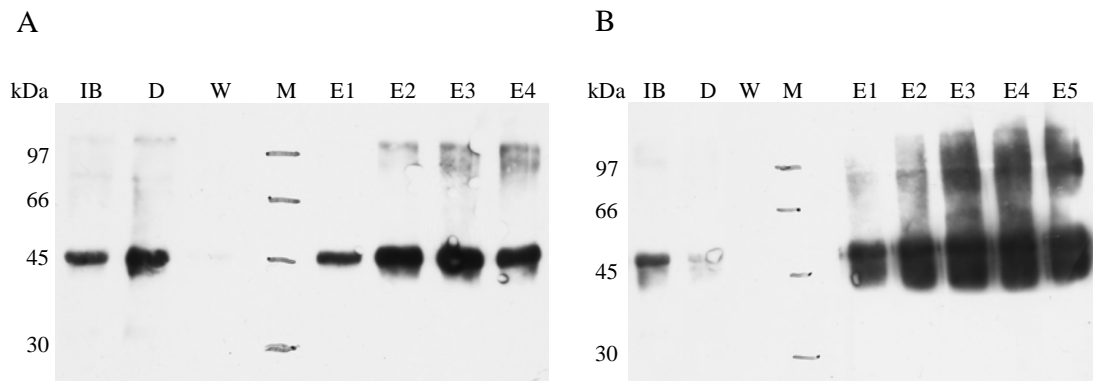
<i>E. coli</i> Stamm	Temperatur	IPTG-Konzentration	Medium
BI21 (DE3) pLysS	17 °C, 25 °C, 37 °C	0,1 mM; 1 mM	LB-Medium
BI21 (DE3) c <sup>+</sup> RIL	20 °C, 37 °C, 39,5 °C	1 mM	LB-Medium
BI21 (DE3) C41	17 °C, 25 °C, 37 °C	0,1 mM; 1 mM	LB-Medium
BI21 (DE3) C43	17 °C, 37 °C	0,1 mM; 1 mM	LB-, TB- und 2xYT-Medium
	25 °C	0,1 mM; 1 mM	LB-Medium
	39,5 °C	1 mM	LB-Medium
Rosetta™ (DE3) pLysS	17 °C, 25 °C, 37 °C	0,1 mM; 1 mM	LB-Medium
	39,5 °C	1 mM	LB-Medium
HMS 174 (DE3)	20 °C, 37 °C, 39,5 °C	1 mM	LB-Medium
BI21 Star™ (DE3)	17 °C, 25 °C, 37 °C	1 mM	LB-Medium
T7 Express (DE3)	37 °C	1 mM	LB-Medium

### 4.1.3. Expression von hPAT1 mit N-terminalem T7-tag

Ein kritischer Schritt in der Proteinexpression stellt die Initiation der Translation dar. Diese ist stark von den ersten Codons der zu translatierenden mRNA abhängig. Codon-optimierte N-terminale *tags* können die Initiation der Translation unter Umständen erleichtern. Der T7-tag besteht aus 11 Aminosäuren, die durch eine Sequenz aus dem 5' untranslatierten Bereich vom Gen10 des T7 Bakteriophagen kodiert sind. Dieses Gen kodiert ein Capsidprotein des Bakteriophagen. Durch Klonierung der Transporter DNA-Sequenz in den pET21a-Vektor, kann das Protein mit einem N-terminalen T7-tag und einem C-terminalen 10-fach Histidin-tag exprimiert werden. Auch für dieses Konstrukt ermöglicht der Histidin-tag die Reinigung des Transporters über eine Affinitätschromatographie (Ni-NTA). Zudem können sowohl der His-tag als auch der T7-tag zur Detektion in einer Western Blot-Analyse genutzt werden (anti-His-tag Antikörper und anti-T7-tag Antikörper). Ein erster Expressionstest dieses Konstrukts in *E. coli* Bl21 (DE3)  $c^+$  RIL bei 37 °C und 42 °C in LB-Medium (+ 1 % Glukose (w/v)) zeigte nach Induktion mit 1 mM IPTG zusätzliche Expressionsbanden im Vergleich zur Probe vor Induktion (Abb. 4.4 A). Daraufhin wurde eine Fermentation dieses Expressionsklons bei 37 °C durchgeführt. Western Blot-Untersuchungen des Gesamtzelllysats von Proben nach Proteininduktion zeigen auch hier deutlich zusätzliche Expressionsbanden im Molekularmassenbereich um 50 kDa (Abb. 4.4 B und C). Aus 200 g Zellen wurden *inclusion bodies* isoliert und anschließend solubilisiert. In den Elutionsfraktionen der nachfolgenden Affinitätschromatographie konnten im Coomassie-gefärbten SDS-Gel keine Banden beobachtet werden. Die Western Blot-Analyse zeigte, dass sich ein Großteil des Proteins im Durchlauf befand und nicht an das Säulenmaterial gebunden hatte (Abb. 4.5 A).



**Abb. 4.4 Gesamtzelllysatproben aus der Expression von T7-hPAT1-(His)<sub>10</sub> in *E. coli* Bl21 (DE3)  $c^+$  RIL.** (A) Expressionstest bei 37 und 42 °C. (B und C) Fermentation im Hefeextrakt Vollmedium bei 37 °C. Die Detektion erfolgte durch Western Blot-Analyse mittels (A und B) anti-T7 Antikörper und (C) anti-His Antikörper. n.i. – Zelllysatsprobe vor Induktion; 2h, 4h – Zelllysatsprobe 2h bzw. 4h nach Induktion.



**Abb. 4.5** Reinigung von T7-hPAT1-(His)<sub>10</sub> mittels Ni-NTA (A) in Abwesenheit von Harnstoff und (B) in Anwesenheit von 8 M Harnstoff. IB – inclusion body-Isolat, D – Durchlauf, W – Waschfraktion, E – Elutionsfraktion. Die Detektion erfolgte durch Western Blot-Analyse mittels anti-T7 Antikörper.

Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen wäre, dass der C-terminale Histidin-tag nicht frei zugänglich war und daher nicht an das Ni-NTA-Säulenmaterial binden konnte. Um das Protein vollständig zu entfalten, wurde der gesammelte Durchlauf mit 8 M Harnstoff versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Lösung erneut mit Ni-NTA-Säulenmaterial inkubiert. Der Western Blot von Fraktionen dieser zweiten Affinitätschromatographie ergab, dass diesmal ein Großteil an Produkt an das Material gebunden hatte (Abb. 4.5 B). Jedoch war die Gesamtausbeute zu gering, sodass man auch für dieses Expressionskonstrukt kein Protein in den Elutionsfraktionen im Coomassie-gefärbten SDS-Gel detektieren konnte.

#### 4.1.4. Expressionsstudien von hPAT1 mit N-terminalen Fusionsproteinen

Eine Begünstigung der Initiation der Translation kann auch durch Fusion eines gut in *E. coli* exprimierenden Proteins an den N-Terminus des Zielproteins erreicht werden. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit sowohl die Fusion von hPAT1 mit dem SUMO-Protein als auch mit der Glutathion-S-Transferase (GST) auf Expression untersucht.

##### *Das Expressionskonstrukt (His)<sub>6</sub>-SUMO-hPAT1*

Durch Insertion der codierenden Sequenz des Transporters in den pETSUMO adapt Vektor konnte das Protein mit einem 6-fachen Histidin-tag gefolgt vom SUMO-Protein (*Small Ubiquitin-like Modifier*) am N-Terminus exprimiert werden. Ein großer Vorteil dieses Expressionssystems liegt in der Abspaltbarkeit des Fusionspartners (His-SUMO). Die SUMO-Protease erkennt nicht, wie andere Proteasen, die Konsensussequenz einer Schnittstelle,

sondern hochspezifisch die Tertiärstruktur des SUMO-Proteins und liefert so das Zielprotein mit einem nativen N-Terminus. Zudem besteht nicht die Gefahr, dass die Protease zusätzlich innerhalb der Sequenz des Zielproteins schneidet.

Für die Expression dieses Konstrukts wurden die in Tabelle 4.4 aufgeführten Bedingungen getestet. Für keine Bedingung konnte eine spezifische Expressionsbande detektiert werden. Daher wurde eine Fermentation des Konstrukts (His)<sub>6</sub>-SUMO-hPAT1 in *E. coli* B121 (DE3) C43 bei 17 °C durchgeführt. Für eine erste *inclusion body*-Präparation wurden 300 g Zellen aufgeschlossen (Ausbeute: 1 g *inclusion bodies*). In den Elutionsfraktionen der nachfolgenden Affinitätschromatographie konnte jedoch kein Transporterprotein nachgewiesen werden. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurden in einem zweiten Versuch 500 g Zellen für eine *inclusion body*-Präparation verwendet (Ausbeute: 4 g *inclusion bodies*). Doch auch hier konnte kein Protein gewonnen werden.

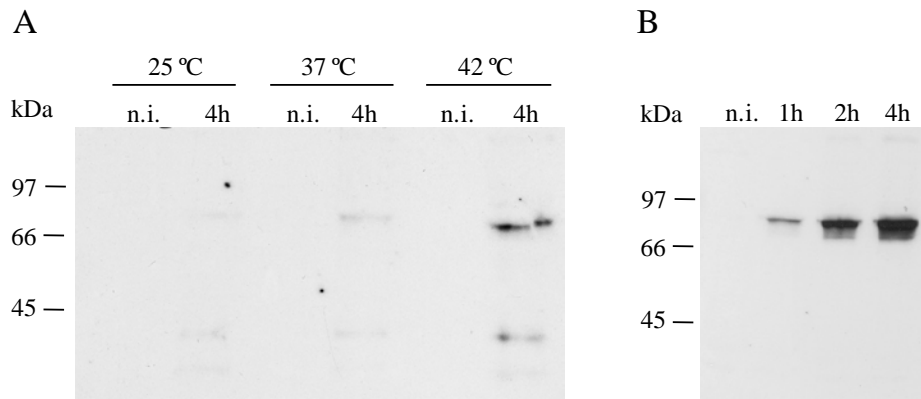
Um auszuschließen, dass Proteindegradation während der Lagerung des Zellpellets nach der Fermentation bei –20 bzw. –80 °C für die geringen Proteinausbeuten verantwortlich ist, wurde in einem Versuch direkt im Anschluss der Fermentation, ohne Zwischenlagerung der Zellen mit der *inclusion body*-Präparation fortgefahren (600 g Zellen; Ausbeute: 5 g *inclusion bodies*). Doch auch dies führte nicht zum gewünschten Erfolg.

**Tab. 4.4** Getestete Expressionsbedingungen für das Expressionskonstrukt (His)<sub>6</sub>-SUMO-hPAT1. Die Zellen wurden in LB-Medium, welches mit 1 % Glukose (w/v) versetzt wurde, kultiviert.

<i>E. coli</i> Stamm	Temperatur	IPTG-Konzentration
B121 (DE3) c <sup>+</sup> RIL	20 °C, 37 °C, 39 °C	1 mM
B121 (DE3) C43	20 °C, 37 °C, 39 °C	1 mM
Rosetta™ (DE3) pLysS	20 °C, 37 °C, 39 °C	1 mM
HMS 174 (DE3)	20 °C, 37 °C, 39 °C	1 mM
B121 Star™ (DE3)	17 °C, 25 °C, 37 °C	1 mM

#### *Das Expressionskonstrukt GST-hPAT1-(His)<sub>8</sub>*

Das Expressionskonstrukt wurde durch Klonierung der cDNA-Sequenz von hPAT1 in den Vektor pET41b erhalten. Bei Verwendung der Restriktionsenzymstellen für *SpeI* und *XhoI* kann hPAT1 mit dem erhaltenen Konstrukt mit einem N-terminalen GST-tag und einem C-terminalen 8-fachen Histidin-tag exprimiert werden. Der Histidin-tag wurde zur späteren Reinigung aus dem *inclusion body*-Isolat genutzt. Um dieses Konstrukt auf Expression zu testen, wurde es in den *E. coli* Stamm B121 (DE3) c<sup>+</sup> RIL transformiert und bei 25, 37 und 42 °C



**Abb. 4.6 Gesamtzellysatsproben aus der Expression von GST-hPAT1-(His)<sub>8</sub> in *E. coli* BL21 (DE3) c<sup>+</sup> RIL.** (A) Expressionstest bei 25, 37 und 42 °C. (B) Fermentation im Hefeextrakt Vollmedium bei 42 °C. Die Detektion erfolgte durch Western Blot-Analyse mittels anti-His Antikörper. n.i. – Zellysatsprobe vor Induktion; 1h, 2h, 4h – Zellysatsproben 1h, 2h bzw. 4h nach Induktion.

kultiviert. Das Molekulargewicht der Glutathion-S-Transferase beträgt 25 kDa. Zusammen mit den 53 kDa von hPAT1 ergibt sich für das Fusionsprotein ein theoretisches Gesamtmolekulargewicht von 78 kDa. In Abbildung 4.6 A ist die Western Blot-Analyse von Zellysatsproben vor und nach der Induktion dargestellt. Bei einer Kultivierung bei 42 °C kann in der LySATprobe nach Induktion mit 1 mM IPTG eine Expressionsbande bei ca. 80 kDa identifiziert werden. Daraufhin wurde mit diesem Expressionsklon eine Fermentation bei 42 °C durchgeführt. In Lysatproben aus der Fermentation konnte diese Expressionsbande reproduziert werden (Abb. 4.6 B). Nach einer *inclusion body*-Isolierung aus 250 g Zellen wurde das Isolat einer Affinitätschromatographie unterzogen. Wie bei der Reinigung des Expressionskonstrukts T7-hPAT1-(His)<sub>10</sub> wurde das GST-Fusionsprotein per Western Blot im Durchlauf der Ni-NTA-Säule detektiert. Durch Versetzen des Durchlaufs mit 8 M Harnstoff, um einen eventuell verborgenen Histidin-*tag* frei zugänglich zu machen, und einer erneuten Affinitätschromatographie konnte das Protein jedoch auch nicht an das Ni-NTA-Material gebunden werden.

Somit konnte der Transporter weder durch Fusion mit dem SUMO-Protein noch mit der Glutathion-S-Transferase in den benötigten Mengen in *E. coli* exprimiert werden.

#### 4.1.5. Rekombinante Expression des humanen H<sup>+</sup>-Peptid-Cotransporters hPEPT2

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die rekombinante Expression eines weiteren eukaryotischen Membranproteins untersucht. Der H<sup>+</sup>-Peptid-Cotransporters hPEPT2 wird u.a. in epithelialen Zellen des proximalen Tubulus der Niere exprimiert und ist für die Reabsorption von Di- und

Tripeptiden aus dem Primärharn ins Blut verantwortlich. Neben den natürlich vorkommenden Substraten erkennt und transportiert hPEPT2 auch pharmakologisch aktive Peptidomimetika aufgrund ihrer peptidähnlicher Grundstruktur (z.B.  $\beta$ -Lactam Antibiotika) (Biegel *et al.* 2006; Ganapathy *et al.* 1995; Luckner & Brandsch 2005).

Mit Hilfe der beschriebenen molekularbiologischen Methoden wurde die cDNA-Sequenz des  $H^+$ -Peptid-Cotransporters hPEPT2 in die *E. coli* Expressionsvektoren pET28a, pET41b und pETSUMO adapt kloniert (Kapitel 2, Tab. 2.16). Diese Vektoren ermöglichen die Expression des Transporters mit einem 6-fachen N-terminalen Histidin-*tag* ((His)<sub>6</sub>-hPEPT2), 8-fachen C-terminalem Histidin-*tag* (hPEPT2-(His)<sub>8</sub>) bzw. als N-terminale Fusion mit dem SUMO-Protein und N-terminalem Histidin-*tag* ((His)<sub>6</sub>-SUMO-hPEPT2). Alle drei Expressionskonstrukte wurden in verschiedene *E. coli*-Stämme transformiert und durch Variation der Kultivierungsbedingungen auf Expression überprüft (Tab. 4.5). Lediglich für hPEPT2-(His)<sub>8</sub> konnte im *E. coli* Stamm B121 (DE3) c<sup>+</sup> RIL bei 17 und 25 °C eine charakteristische Expressionsbande mittels Western Blot identifiziert werden. Für alle anderen Konstrukte konnte unter den getesteten Bedingungen keine Expression nachgewiesen werden. Daraufhin wurde hPEPT2-(His)<sub>8</sub> im *E. coli* Stamm B121 (DE3) c<sup>+</sup> RIL bei 25 °C fermentiert. Aus 500 g Zellmaterial wurden *inclusion bodies* isoliert (Ausbeute: 1,2 g). Diese wurden solubilisiert und einer Affinitätschromatographie (Ni-NTA) unterzogen. In den Elutionsfraktionen konnte jedoch kein Protein nachgewiesen werden.

Somit konnte hPEPT2 bisher nicht erfolgreich in *E. coli* exprimiert werden.

**Tab. 4.5** Getestete Expressionsbedingungen für die verschiedenen Expressionskonstrukte von hPEPT2. Die Zellen wurden in LB-Medium, welches mit 1 % Glukose (w/v) versetzt wurde, kultiviert. Die Proteininduktion erfolgte mit 1 mM IPTG.

Expressionskonstrukt	<i>E. coli</i> Stamm	Temperatur
(His) <sub>6</sub> -hPEPT2	B121 (DE3) c <sup>+</sup> RIL	37 °C
	Rosetta™ (DE3) pLysS	37 °C
	B121 (DE3) C43	37 °C
	HMS 174 (DE3)	37 °C
	T7 Express (DE3)	17 °C, 25 °C, 37 °C
hPEPT2-(His) <sub>8</sub>	B121 (DE3) c <sup>+</sup> RIL	17 °C, 25 °C, 37 °C
	Rosetta™ (DE3) pLysS	17 °C, 25 °C, 37 °C
	B121 (DE3) C43	17 °C, 25 °C, 37 °C
	HMS 174 (DE3)	17 °C, 25 °C, 37 °C
	T7 Express (DE3)	25 °C, 37 °C
(His) <sub>6</sub> -SUMO-hPEPT2	B121 (DE3) c <sup>+</sup> RIL	17 °C, 25 °C, 37 °C
	B121 (DE3) C43	17 °C, 25 °C, 37 °C
	HMS 174 (DE3)	17 °C, 25 °C, 37 °C
	T7 Express (DE3)	17 °C, 25 °C, 37 °C

#### 4.1.6. Diskussion der Ergebnisse zur rekombinanten Expression in *E. coli*

In der hier vorliegenden Arbeit sollten der humane H<sup>+</sup>-Aminosäure-Cotransporter hPAT1 und der humane H<sup>+</sup>-Peptid-Cotransporter hPEPT2 rekombinant in *E. coli* exprimiert werden. Dafür wurde die jeweilige codierende Sequenz in verschiedene Vektoren der pET-Serie kloniert. Die pET-Vektoren besitzen einen T7 Promoter der als starker Promoter gilt. Dadurch wird eine hohe Expressionsrate erzielt und die Expression der Transporterproteine als *inclusion bodies* begünstigt (Lilie *et al.* 1998; Weickert *et al.* 1996). Für verschiedene G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) konnte gezeigt werden, dass die Expression unter Kontrolle von starken Promotoren in einer hohen Ausbeute an *inclusion bodies* resultiert (Bane *et al.* 2007; Michalke *et al.* 2009). Die alleinige Nutzung eines starken Promoters für die Expression der hier untersuchten Transporter ergab jedoch keine zufriedenstellenden Ausbeuten an *inclusion bodies*. Deshalb wurden verschiedene Expressionskonstrukte erzeugt, die die Expression mit verschiedenen *tags* (N-terminaler His-*tag*, C-terminaler His-*tag* oder N-terminaler T7-*tag*) oder auch als Fusionsproteine (N-terminale Fusion mit SUMO oder der Glutathion-S-Transferase) ermöglicht. Da bekannt ist, dass die Expressionsrate eines Proteins wesentlich vom verwendeten Stamm abhängt (Arechaga *et al.* 2000), wurde jedes Konstrukt in verschiedenen *E. coli* Stämmen untersucht.

Ein Optimierungsansatz lag in der Nutzung von *E. coli* Stämmen, die Zusatzplasmide enthalten, die für bestimmte tRNAs codieren (Tab. 4.6). Damit sollte das Problem der unterschiedlichen *codon usage*<sup>9</sup> in *E. coli*- und humanen Zellen umgangen werden. Mit dieser Strategie konnten bereits viele eukaryotische Proteine erfolgreich im Prokaryoten *E. coli* exprimiert werden (Peti & Page 2007). Eine Sequenzanalyse von hPAT1 ergab, dass 64 der 473 Aminosäuren (13 %) durch Triplets kodiert werden, die in *E. coli* weniger häufig vorkommen. Die entsprechenden tRNAs stehen daher unter Umständen nicht in ausreichender Menge zur Verfügung. Auch bei Verwendung der Stämme B121 (DE3) c<sup>+</sup> RIL und Rosetta™ (DE3) pLysS werden nur für 31 dieser Positionen zusätzliche tRNAs gebildet. Für die restlichen 33 Triplets bleibt das Problem der *codon usage* bestehen. Dies könnte eine mögliche Ursache für die geringen Proteinausbeuten darstellen. Eine Lösungsmöglichkeit wäre der Einsatz eines synthetischen Gens, in der die Nukleotidsequenz hinsichtlich der *codon usage* auf *E. coli* optimiert wird. Für den *Glucagon-like peptide-1* Rezeptor wurde gezeigt, dass das Protein erst

---

<sup>9</sup> 64 mögliche Triplets codieren für 20 Aminosäuren, woraus folgt, dass mehrere Basen-Triplets für die gleiche Aminosäure codieren. *Codon usage* beschreibt die Tatsache, dass einige Triplets von verschiedenen Spezies unterschiedlich häufig verwendet werden.

**Tab. 4.6 *E. coli* Expressionsstämme die ein Plasmid (pRARE) tragen, das für zusätzliche, in *E. coli* selten vorkommende tRNAs codiert.**

<i>E. coli</i> Stamm	zusätzliche tRNA
BL21 (DE3) c <sup>+</sup> RIL	AGG/AGA (Arginin) AUA (Isoleucin) CUA (Leucin)
Rosetta™ (DE3) pLysS	AGG/AGA (Arginin) AUA (Isoleucin) CUA (Leucin) CCC (Prolin) GGA (Glyzin)

nach Verwendung eines synthetischen Gens in *E. coli* zur Expression gebracht werden konnte (Schröder-Tittmann 2009).

Für das Expressionskonstrukt (His)<sub>6</sub>-hPAT1 wurde während einer Fermentation nach Induktion der Proteinexpression ein Absinken der OD<sub>600</sub> beobachtet (Punkt 4.1.2., Abb. 4.2). Miroux und Walker konnten nach Überexpression verschiedener Transporterproteine, wie z.B. des Oxoglutarat-Malat Transporters OGCP, des Phosphat Carriers, der ADP/ATP Translokase (alle aus Rind) oder des Alanin-H<sup>+</sup> Carriers aus *Bacillus* PS3, ähnliche toxische Effekte beobachten (Miroux & Walker 1996). Durch Selektionsanalysen konnte eine Mutante des *E. coli* Stammes BL21 (DE3) identifiziert werden, die OGCP ohne toxische Effekte in hohen Ausbeuten als *inclusion bodies* exprimiert. Diese Mutante wurde als BL21 (DE3) C41 bezeichnet. Jedoch war eine Expression aller untersuchten Membranproteine in diesem Stamm nicht möglich, so dass mit BL21 (DE3) C41 eine zweite Selektionsrunde durchgeführt wurde. Die daraus resultierende und exprimierende Mutante wurde als BL21 (DE3) C43 bezeichnet. Alle untersuchten Transportproteine konnten in hohen Ausbeuten entweder in BL21 (DE3) C41 oder C43 exprimiert werden. Die Arbeiten von Miroux und Walker zeigen, dass die Toxizität während einer Proteinüberexpression wahrscheinlich durch die Entkopplung von Transkription und Translation verursacht wird. Die Transkription durch die T7 Polymerase erfolgt siebenmal schneller als durch die *E. coli* RNA Polymerase, wodurch ein Missverhältnis zwischen Transkriptions- und Translationsgeschwindigkeit entsteht. Dies führt zur Akkumulation von ungeschützter und dadurch instabiler mRNA. In den mutierten BL21 (DE3) Stämmen konnte eine verringerte mRNA-Konzentration in der Zelle nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass die Mutation entweder die Aktivität oder aber die Menge der exprimierten T7 Polymerase verringert. Zusätzlich zu dieser Mutation begünstigt im Stamm C43



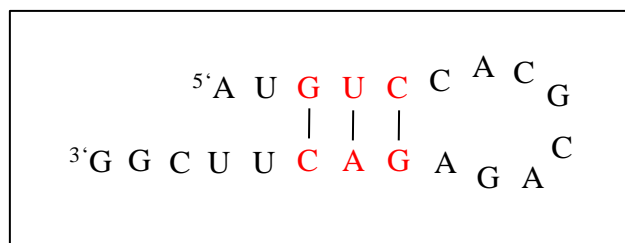
eine weitere Mutation die Faltung und Insertion von Membranproteinen in die Membran. Die Untereinheit B der F-ATPase aus Rind wurde im Stamm C41 als *inclusion bodies* und in C43 in der Membran exprimiert. Später konnten Arechaga *et al.* zeigen, dass die Expression der F-ATPase Untereinheit B mit einer Ausbildung von intrazellulären Membranstrukturen einhergeht (Arechaga *et al.* 2000). Durch Nutzung der Stämme C41 und C43 gelang es, verschiedene toxische Proteine zu exprimieren (Dumon-Seignovert *et al.* 2004). Auch andere Membranproteine wie GPCRs wurden in B121 (DE3) C43 in hohen Ausbeuten als *inclusion bodies* exprimiert (Michalke *et al.* 2009). Für die humanen H<sup>+</sup>-Cotransporter hPAT1 und hPEPT2 erwiesen sich diese Stämme jedoch nicht als geeignet.

Um eine mögliche mRNA Degradation innerhalb der *E. coli*-Zelle zu minimieren, wurde der Stamm B121 Star™ (DE3) in Expressionsanalysen getestet. Dieser enthält eine Mutation im *rne* Gen, das für die RNase E kodiert. Sie ist eine Proteinkomponente im „Degradasom“ und an der rRNA Reifung und mRNA Degradation beteiligt (Grunberg-Manago 1999; Lopez *et al.* 1999). Die *rne131* Mutante kodiert eine um 477 Aminosäuren C-terminal verkürzte Proteinvariante, der die mRNA Degradationsfunktion fehlt (Kido *et al.* 1996; Lopez *et al.* 1999). Dadurch erlangen die mRNA-Moleküle innerhalb der Zelle eine erhöhte Stabilität. Doch auch dieser Stamm führte nicht zum gewünschten Erfolg. So konnte hPAT1 auch in diesen Zellen nicht exprimiert werden. Da jedoch in *E. coli* nicht nur eine, sondern eine Vielzahl an RNasen für mRNA-Degradation verantwortlich ist, kann eine mRNA-Instabilität als Ursache für die fehlende Expression nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Es ist bekannt, dass neben der Wahl verschiedener *E. coli* Expressionsstämme auch die Variation der Kultivierungsbedingungen einen entscheidenden Einfluss auf die Expressionsrate eines Membranproteins hat (Grisshammer & Tate 1995). Daher wurden in Expressionsanalysen verschiedene Temperaturen, Induktorkonzentrationen und Kultivierungsmedien analysiert. Die Variation der Induktorkonzentration und Kultivierungsmedien resultierten jedoch nicht in einer gesteigerten Expression. Die Expressionsanalyse bei verschiedenen Temperaturen allerdings zeigte für das Expressionskonstrukt GST-hPAT1-(His)<sub>8</sub> in B121 (DE3) c<sup>+</sup> RIL eine erhöhte Expression bei 42 °C im Vergleich zu 37 und 25 °C (Abb. 4.6). Ähnliche Effekte konnten bei der Expression des humanen GLP1-Rezeptors in *E. coli* als *inclusion bodies* beobachtet werden (Schröder-Tittmann 2009). Nur durch Kultivierung der Zellen bei 42 °C konnte der Rezeptor in *E. coli* exprimiert werden. Im Gegensatz zum GLP1-Rezeptor wurde hPAT1 nach Fermentation leider nicht in ausreichenden Mengen aus den Zellen isoliert.

In der Literatur ist beschrieben, dass insbesondere die Initiation der Translation einen großen Einfluss auf die Syntheserate eines Proteins hat (Shine & Dalgarno 1974; Steitz 1969). So können neben den bisher erläuterten „äußeren“ Faktoren auch intrinsische Faktoren wie potentielle mRNA-Sekundärstrukturen im 5'-Bereich der RNA einen negativen Einfluss auf die Expressionsrate ausüben. Die Ausbildung von Haarnadelstrukturen (*hairpins*) im Bereich der Ribosomenbindungsstelle und des Startcodons AUG können diese essentiellen Bereiche für das Ribosom unzugänglich machen und dadurch die Initiation der Translation erschweren (Looman *et al.* 1986). Durch Optimierung der Nukleotidsequenz der Translationsinitiationsregion und der ersten Codons des Zielproteins wird möglicherweise eine höhere Expression erzielt (Karnik *et al.* 1987). So erhielten Karnik und Mitarbeiter eine verbesserte Translation des Bakterio-Opsin Gens, nachdem sie den Anteil an Adenin und Thymin der ersten Codons der N-terminalen Aminosäuren erhöhten. Ähnliche Effekte konnten Barnes *et al.* bei der Expression der Cytochrom P450 17 $\alpha$ -Hydroxylase aus Rind beobachten (Barnes *et al.* 1991). Auch hier resultierte der Austausch von Guanin und Cytosin gegen Adenin und Thymin in den ersten sieben Codons in einer erhöhten Proteinsynthese. Eine Sekundärstrukturanalyse der ersten 21 Nukleotide bzw. sieben Codons der hPAT1 mRNA ergab, dass sich unmittelbar im Bereich des Startcodons AUG möglicherweise ein *hairpin* ausbildet (Abb 4.7). Durch Einführen von stillen Mutationen in die cDNA-Sequenz wurde der Adenin/Thymin-Gehalt erhöht und die potentielle Ausbildung eines *hairpins* unterdrückt (Expressionskonstrukt hPAT1-(His)<sub>8</sub>; Abb. 4.1 Klon 1). Doch auch dieses Konstrukt konnte in *E. coli* nicht zur Expression gebracht werden.

Eine problematische Initiation der Translation kann alternativ auch durch Fusion des Zielproteins mit einem gut exprimierten Protein oder einer optimierten *tag*-Sequenz gelöst werden (Dou *et al.* 1992). Pompejus und Mitarbeiter haben gezeigt, dass die Fusion des Bakterio-Opsin Gens mit einem modifizierten *lacZ* Gen zu einer hohen Ausbeute an Fusionsprotein als



**Abb. 4.7 Sekundärstrukturanalyse des 5'-Bereichs der hPAT1 mRNA.** Basen, die möglicherweise an der *hairpin*-Ausbildung beteiligt sind, sind rot markiert.

*inclusion bodies* führt (Pompejus *et al.* 1993). In der hier vorliegenden Arbeit wurden als Fusionspartner die gut exprimierten, löslichen Proteine Glutathion-S-Transferase (GST) und SUMO verwendet. Für die Expression von G-Protein gekoppelten Rezeptoren konnte durch eine N-terminale GST-Fusion die Proteinausbeute um den Faktor 1000 bis 10000 erhöht werden (Kiefer 2003). Zuo *et al.* haben gezeigt, dass durch eine N-terminale Fusion des SARS-Coronavirus M-Proteins<sup>10</sup> mit SUMO das Fusionsprotein in großer Ausbeute als *inclusion bodies* exprimiert wurde. Im Vergleich dazu konnte das M-Protein mit einem N-terminalen His-tag nur in sehr geringen Mengen produziert werden (Zuo *et al.* 2005). Für den humanen H<sup>+</sup>-Aminosäure-Cotransporter hPAT1 und den humanen H<sup>+</sup>-Peptid-Cotransporter hPEPT2 führten diese Strategien leider nicht zum gewünschten Erfolg. Die Proteine konnten nicht in ausreichenden Mengen exprimiert werden.

Wie schon erwähnt, kann auch durch einen optimierten N-terminalen tag die Initiation der Translation verbessert werden. Für einige G-Protein gekoppelte Rezeptoren erwies sich der N-terminale T7-tag als essentiell für eine effiziente Expression in einem zellfreien Expressionssystem basierend auf einem *E. coli*-Lysat (Schwarz *et al.* 2007b). Auch bei der rekombinanten Herstellung von humanem Trypsinogen in *E. coli* konnte das Protein nur durch den N-terminalen T7-tag in großen Mengen produziert werden. Ohne Fusion blieb eine Expression aus (Hohenblum *et al.* 2004). Die N-terminale Fusion von hPAT1 mit dem T7-tag führte zu einer geringen Expression des Transporters. Für nachfolgende Charakterisierungen war die Ausbeute aber zu klein.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte hPAT1 in *E. coli* rekombinant hergestellt werden. Trotz unterschiedlichster Expressionsstrategien und der Nutzung verschiedenster Expressionsstämme ist es nicht gelungen, hPAT1 in größeren Mengen zu exprimieren. Keine der Vorteile der einzelnen *E. coli* Stämme führten zu einer nennenswerten Erhöhung der Expressionsrate des Transporters. Wahrscheinlich sind die Ursachen der fehlenden Expression sehr viel komplexer und es treffen mehrere ungünstigen Faktoren wie unterschiedliche *codon usage*, Entkopplung von Transkription und Translation, mRNA-Degradation, Proteintoxizität u.s.w. zusammen. Deshalb wurde im Folgenden versucht, hPAT1 in einem zellfreien Expressionssystem zu exprimieren.

---

<sup>10</sup> Das SARS-Coronavirus ist der Auslöser für die Atemwegserkrankung *Severe Acute Respiratory Syndrome* (SARS). Das SARS-Coronavirus M-Protein ist ein 25 kDa Membranprotein (3 Transmembranhelices), das in der Virushülle vorkommt.

## 4.2. Zellfreie Expression des humanen H<sup>+</sup>-Aminosäure-Cotransporters hPAT1

Die Nutzung von zellfreien Expressionssystemen ermöglicht die rekombinante Expression von Membranproteinen ohne die oft beobachteten, für die Physiologie eines Wirtsorganismus toxischen oder inhibitorischen Nebeneffekte. Dadurch wird die Expression von zytotoxischen, schlecht exprimierten oder instabilen Proteinen ermöglicht. Zudem erlaubt die offene Natur dieses Expressionssystems die direkte Zugabe von Komponenten, wie z.B. Protease-Inhibitoren, Liganden oder Kofaktoren, durch die die translatierten Proteine stabilisiert werden können.

Das Prinzip der zellfreien Proteinsynthese wurde bereits Mitte der 50er Jahren entwickelt (Littlefield *et al.* 1955). 1961 gelang es Nierenberg und Matthaei erstmals in einem zellfreien Translationssystem durch Zugabe von exogener mRNA Proteine zu exprimieren. In einem gekoppelten Transkriptions-/Translationssystem verwendeten DeVries und Zubay DNA statt mRNA als *template* für die Proteinbiosynthese (DeVries & Zubay 1967). Seitdem wurden die zellfreien Expressionssysteme ständig weiterentwickelt. Anfänglich wurde die Reaktion in einem einfachen Gefäß durchgeführt (*batch*-Verfahren). Die Expressionsrate ist dabei zu Beginn sehr hoch, nimmt aber schon in den ersten 20 bis 60 Minuten schnell wieder ab (Kigawa *et al.* 1995; Kigawa *et al.* 1999; Kim & Swartz 1999). Die limitierte Reaktionsdauer liegt hauptsächlich am schnellen Verbrauch an Energie und Ressourcen bei gleichzeitiger Akkumulation von inhibitorischen Nebenprodukten wie anorganischem Phosphat<sup>11</sup> (Kim & Swartz 2000). Wegen der geringen Ausbeuten wurde dieses System lange Zeit nur für analytische Zwecke genutzt. Erst die Entwicklung von kontinuierlichen Systemen mit Unterteilung in eine Reaktionskammer und ein Energiereservoir ermöglichte die Expression größerer Proteinmengen. Dabei werden hochmolekulare Komponenten der Reaktion (Ribosomen, tRNAs, Translationsfaktoren, Aminoacyl-tRNA-Synthetasen und andere Enzyme) in der Reaktionskammer gehalten. Gleichzeitig werden inhibierende Reaktionsprodukte abgeführt und niedermolekulare Substrate (Aminosäuren, Nukleotide und Energiesubstrate) kontinuierlich unter Fluss (*continuous flow*, CF) (Spirin *et al.* 1988) oder durch Diffusion (*continuous exchange*, CE) (Kim & Choi 1996) zugeführt. Die Kammern sind durch eine Ultrafiltrations-

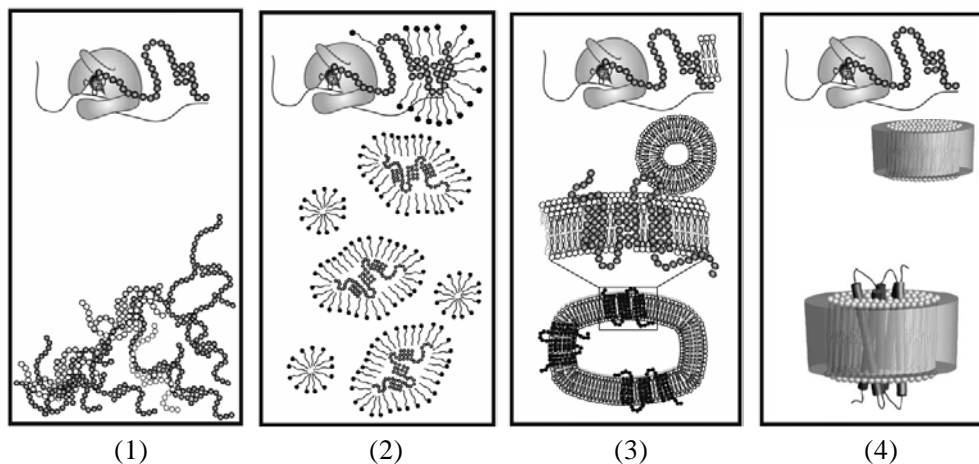
---

<sup>11</sup> Anorganisches Phosphat bildet vor allem mit Magnesiumionen stabile Komplexe. Dadurch sinkt die effektive Magnesiumkonzentration während der Reaktion. Da Mg<sup>2+</sup> als Kofaktor in verschiedenen Prozessen der Translation (Aminoacylierung der tRNA (Thiebe 1975), Formierung des ternären Initiationskomplexes (Favaudon & Pochon 1976) und Stabilität der Ribosomen (Bonincontro *et al.* 1993)) benötigt wird, stellt die Komplexbildung von Mg<sup>2+</sup> durch anorganisches Phosphat einer der Hauptgründe für die geringe Reaktionsdauer dar.

membran bzw. durch eine Dialysemembran getrennt. Die Reaktionsdauer des CE-Expressionssystems konnte so auf 20 Stunden verlängert und die Ausbeute erheblich gesteigert werden (bis auf mehrere mg Protein pro ml Reaktionsvolumen) (Junge *et al.* 2008). Aufgrund der besseren Reproduzierbarkeit und Handhabbarkeit sowie einer verlängerten Reaktionsdauer und höheren Ausbeuten wird derzeit neben dem *batch*-Verfahren überwiegend das *continuous exchange cell free* (CECF) Expressionssystem verwendet.

Die Grundkomponente eines zellfreien Expressionssystems stellt der Rohzellextrakt dar. Dieser beinhaltet die Ribosomen, Translationsfaktoren und Enzyme, die für die Proteinbiosynthese benötigt werden. Endogene mRNA-Moleküle und niedermolekulare Substanzen werden während der Extrakt-Präparation entfernt. Die gängigsten und meist verwendeten Systeme basieren auf dem S30-Extrakt<sup>12</sup> aus *E. coli*, einem Extrakt aus Weizenkeimlingen oder einem Kaninchen-Retikulozyten-Lysat. Sie unterscheiden sich hinsichtlich Produktivität, Kosten sowie Qualität des hergestellten Proteins. Hier spielen die richtige Faltung und die Ausbildung korrekter Disulfidbrücken sowie die Einführung posttranslationaler Modifikationen eine Rolle (Endo & Sawasaki 2006).

Für die zellfreie Expression von Membranproteinen können verschiedene Strategien verfolgt werden (Abb. 4.8): (1) das Protein kann unlöslich als Präzipitat sowie löslich in Gegenwart von (2) Detergenzien, (3) Liposomen oder (4) Nanodiscs<sup>TM</sup> exprimiert werden.



**Abb. 4.8** Verschiedene Strategien der zellfreien Expression von Membranproteinen. (1) Expression als Präzipitat. (2) Lösliche Expression in Gegenwart von Detergenzien. (3) Lösliche Expression in Gegenwart von Liposomen. (4) Lösliche Expression in Gegenwart von Nanodiscs<sup>TM</sup>. Modifiziert nach Schwarz *et al.* (Schwarz *et al.* 2007a).

<sup>12</sup> Der S30-Extrakt wird durch Zentrifugation (Sedimentation) eines *E. coli*-Lysats bei 30.000 x g gewonnen.

Die Präzipitate unlöslich exprimierter Membranproteine können nicht mit *inclusion bodies* der *in vivo*-Expression verglichen werden. Die Präzipitate der zellfreien Synthese sind schnell und effektiv in milden Detergenzien solubilisierbar (Klammt *et al.* 2004). *Inclusion bodies* hingegen können nur durch stark denaturierende Detergenzien wie SDS oder Substanzen wie Guanidiniumchlorid oder Harnstoff in Lösung gebracht werden. Des Weiteren ist eine Renaturierung der solubilisierten *inclusion bodies* erforderlich. Die Solubilisierung der zellfrei produzierten Präzipitate kann unter Umständen schon in funktionellem und richtig gefaltetem Protein resultieren, wie z.B. bei der Expression des Multi-*drug* Transporters EmrE aus *E. coli* (Elbaz *et al.* 2004; Klammt *et al.* 2004) oder des humanen Histamin-1 Rezeptors (Kamonchanok *et al.* 2008). Dieser Befund kann jedoch nicht verallgemeinert werden. Für den Nukleosid-Transporter Tsx aus *E. coli* (Klammt *et al.* 2005) und den humanen Endothelin-B Rezeptor konnte nach Solubilisierung keine Funktionalität nachgewiesen werden (Klammt *et al.* 2007). Als für dieses Verfahren besonders gut geeignet haben sich die Detergenzien LMPG<sup>13</sup>, DPC<sup>14</sup> und DDM<sup>15</sup> erwiesen (Elbaz *et al.* 2004; Klammt *et al.* 2004). Außerdem sind diese Detergenzien in nachfolgenden Strukturanalysen mittels NMR-Spektroskopie gut einsetzbar (Krueger-Koplin *et al.* 2004).

Falls die Solubilisierung der Präzipitate nicht in funktionellem Protein resultiert, stellt die zellfreie Expression in Gegenwart von Detergenzien eine gute Alternative dar. Das Vorhandensein einer künstlichen hydrophoben Umgebung verhindert die Aggregation der naszierenden Polypeptidkette direkt am Ribosom und führt zur Bildung von Proteinmicellen. Besonders gute Ergebnisse haben die Brij-Derivate (Polyoxyethylen-Ether), Triton X-100 oder DDM (Klammt *et al.* 2005) ergeben. Für  $\beta$ -OG<sup>16</sup> und CHAPS<sup>17</sup> konnte ein inhibierender Effekt nachgewiesen werden (Klammt *et al.* 2005). Die Art des Detergenz und dessen Konzentration haben einen großen Einfluss auf die Qualität und Ausbeute des Proteins, und stellen daher einen essentiellen Optimierungspunkt dar.

Eine dritte Variante ist die Expression in Gegenwart von Liposomen. Hier können entweder vorgefertigte Liposomen einer bekannten Lipidzusammensetzung oder präparierte Vesikelfraktionen aus Zelllysaten eingesetzt werden. Ein Vorteil dieser Methode gegenüber der herkömmlichen *in vitro* Rekonstitution ist, dass die Membranproteine vorwiegend in einer *inside*

---

<sup>13</sup> LMPG – 1-Myristoyl-2-hydroxy-sn-Glycerol-3-(phosphor-rac-(1-glycerol))

<sup>14</sup> DPC – Dodecylphosphocholin

<sup>15</sup> DDM – *n*-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid

<sup>16</sup>  $\beta$ -OG – *n*-Octyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid

<sup>17</sup> CHAPS – 3-((3-Cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-Propansulfonat

*out* Orientierung eingebaut werden, da die Proteinsynthese außerhalb der Vesikel stattfindet. Als erstes Beispiel konnten Kalmbach und Mitarbeiter Bakteriorhodopsin während der Reaktion *in situ* in Liposomen integrieren (Kalmbach *et al.* 2007). Dennoch wird dieser Expressionsmodus bisher recht selten angewendet, da die Ausbeuten gegenüber den anderen Techniken relativ gering sind (Schwarz *et al.* 2008).

Eine sehr neue Methode zur zellfreien Synthese ist die Expression und gleichzeitige Insertion von Membranproteinen in Nanodiscs<sup>TM18</sup>. Für verschiedene Membranproteine (EmrE, 5-Hydroxytryptamin-Rezeptor, Bakteriorhodopsin) konnte nach Koexpression von integralem Membranprotein und MSP in Gegenwart von Phospholipiden eine spontane Assemblierung von Nanodiscs gezeigt werden. Dadurch wurde die Löslichkeit des Membranproteins stark erhöht (Cappuccio *et al.* 2008). Eine andere Möglichkeit ist, schon vorgefertigte Nanodiscs mit zum Reaktionsansatz zu geben. Auch mit dieser Methode konnten mehrere Membranproteine mit höherer Löslichkeit und Ausbeuten um 300 µg/ml exprimiert werden (Katzen *et al.* 2008).

Aufgrund der Automatisierbarkeit und der Möglichkeit, viele Ansätze parallel durchzuführen, findet vor allem die zellfreie Expression im *batch*-Format eine Hauptanwendung in Hochdurchsatz (*high throughput*)-Verfahren, wie dem *screening* genomischer Bibliotheken oder der Konstruktion und dem *screening* von Protein-Bibliotheken (Rungpragayphan *et al.* 2003; Spirin 2004). Des Weiteren werden *screenings* einer großen Anzahl von Mutanten oder von technisch hergestellten Proteinen möglich. Die Verwendung von PCR-Produkten als *template* (Martemyanov *et al.* 1997) und die schnelle Proteinexpression innerhalb weniger Stunden gewährleisten den Hochdurchsatz.

Die zellfreie Expression kann außerdem sehr effektiv zur Herstellung von Proteinen zur Strukturaufklärung eingesetzt werden. Da in diesem System eine vollständige Kontrolle über die Aminosäurezusammensetzung besteht, können radioaktiv markierte Aminosäuren für NMR-Untersuchungen oder unnatürliche Aminosäuren wie Selenocystein für Röntgenkristallographie viel effektiver in das Zielprotein eingebracht werden (Klammt *et al.* 2006). Die Expression in Minimalmedium oder die Verwendung auxotropher Stämme und die damit verbundenen Schwierigkeiten, wie schlechtes Wachstum und geringe Ausbeuten in *in vivo* Systemen können somit umgangen werden.

---

<sup>18</sup> Bei der Nanodisc-Technologie werden künstliche diskoidale Partikel aus einem *Membrane Scaffold Protein* (MSP) und Phospholipiden hergestellt. Diese sind der natürlichen Umgebung von Membranproteinen sehr ähnlich und stabilisieren die Proteine damit in wässriger Lösung.

Obwohl die zellfreie Expression schon seit einigen Jahrzehnten im analytischen Maßstab angewendet wurde, ist die Gewinnung größerer Mengen an Protein erst durch Entwicklung neuer Protokolle und Reaktionssysteme (CECF) in den letzten Jahren möglich geworden. Für die Herstellung löslicher Proteine zur Strukturanalyse wird die zellfreie Expression bereits als Routinetechnik angewendet (Endo & Sawasaki 2003; Sawasaki *et al.* 2002; Vinarov *et al.* 2004; Yokoyama 2003). Für Membranproteine dagegen wurde sie erst in den letzten 6 Jahren etabliert. Dennoch gelang es bereits, einige Membranproteine im zellfreien System in akzeptablen Mengen herzustellen (Klammt *et al.* 2006; Schwarz *et al.* 2008). 2007 konnte sogar die erste Kristallstruktur eines zellfrei produzierten Membranproteins, und zwar die des EmrE aufgeklärt werden (Chen *et al.* 2007b). Ein weiterer Aspekt ist, dass verschiedene pro- und eukaryotische Membranproteine, die eine geringe oder gar keine Expression in *E. coli* gezeigt haben, nun erfolgreich zellfrei in einem *E. coli* Extrakt hergestellt werden konnten (Ishihara *et al.* 2005; Klammt *et al.* 2004).

Trotz der vielen positiven Entwicklungen der vergangenen Jahre ist die zellfreie Expression hinsichtlich ihrer Effizienz der *in vivo* Expression weiterhin unterlegen. Dennoch, die exakte Kontrolle zahlreicher Expressionsparameter, sehr kurze Reaktionszeiten und die relativ einfache Reaktionsführung machen die zellfreie Expression zumindest für einige Anwendungen (X-ray und NMR) und für einzelne Proteine zu einer echten Alternative zu *in vivo* Expressionssystemen.

In der vorliegenden Arbeit sollte der humane H<sup>+</sup>-Aminosäure-Cotransporter hPAT1 zellfrei in einem *E. coli*-Extrakt hergestellt werden. In den folgenden Kapiteln wird die Entwicklung der zellfreien Expression des Transporters erläutert. Anfänglich wurden kommerzielle Synthesekits getestet. Nachdem mit diesen gute Ergebnisse erzielt wurden, wurde ein *continuous exchange cell free* Expressionssystem für hPAT1 etabliert. Das Protein wurde sowohl als Präzipitat als auch löslich in Gegenwart von Detergenzien exprimiert.

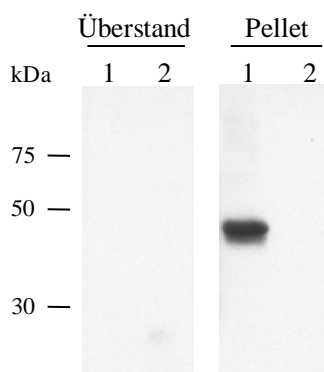
#### 4.2.1. Vorversuche zur zellfreien Expression

Um die Expression des humanen H<sup>+</sup>-Aminosäure-Cotransporters hPAT1 in einem zellfreien Expressionssystem zu überprüfen, wurde zunächst das EasyXpress Protein Synthesis Kit von Qiagen verwendet. Dieses basiert auf einem *E. coli*-Extrakt und wird im *batch*-Format durchgeführt. Für erste Untersuchungen wurde das Expressionskonstrukt hPAT1-(His)<sub>8</sub> (Punkt 4.1.1.) in analytischen Ansätzen (50 µl) auf Expression getestet. Dafür wurde 1 µg Plasmid eingesetzt und der gesamte Reaktionsansatz wurde für 2 h bei 37 °C inkubiert. Danach



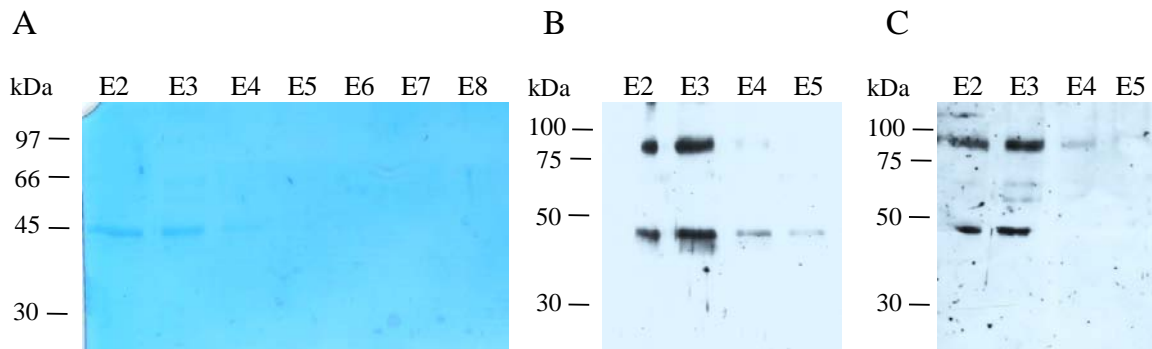
erfolgte ein 10 minütiger Zentrifugationsschritt (16000 x g), um in eine lösliche und unlösliche Fraktion zu unterteilen. Das Pellet wurde mit 50 µl 2x SDS-Probenpuffer (6M Urea) versetzt und für 3 h bei 40 °C inkubiert. Zum Überstand wurden ebenfalls 50 µl Probenpuffer gegeben. Die Western Blot-Analyse in Abbildung 4.9 zeigt eine Expressionsbande unterhalb der 50 kDa Markerbande in der unlöslichen Fraktion. Im Überstand und in einer parallel mitgeführten Negativkontrolle, die keine Plasmid-DNA enthielt, konnte kein Protein nachgewiesen werden, sodass die detektierte Expressionsbande hPAT1 darstellen sollte. Das Molekulargewicht des Transporters beträgt zwar 53 kDa, aber aufgrund der bekannten Anomalie im Laufverhalten von Membranproteinen in SDS-Polyacrylamidgelen, migriert das Protein schneller als die entsprechende Molekulargewichtsmarkerbande<sup>19</sup>.

Nachdem gezeigt wurde, dass die Expression des Transporters im zellfreien System prinzipiell möglich ist, wurde ein präparativer Ansatz (1 ml) unter Verwendung des EasyXpress Protein Synthesis Maxi Kit durchgeführt. Der Ansatz enthielt 20 µg Plasmid-DNA und wurde für 4 h bei 37 °C inkubiert. Am Ende der Reaktion konnte ein weißer Niederschlag beobachtet werden, der typisch für die zellfreie Expression in Abwesenheit von Detergenzien ist, und als Zeichen guter Expression gedeutet werden kann (Schwarz *et al.* 2007a). Das Präzipitat wurde durch einen Zentrifugationsschritt von der löslichen Fraktion getrennt, wie unter Punkt 3.5.1. beschrieben aufbereitet und einer Affinitätschromatographie



**Abb. 4.9 Zellfreie Expression von hPAT1-(His)<sub>8</sub> im analytischen Maßstab unter Verwendung des EasyXpress Protein Synthesis Kit von Qiagen.** Der Reaktionsansatz wurde nach Reaktionsende durch Zentrifugation in eine lösliche (Überstand) und unlösliche (Pellet) Fraktion separiert. 1 – Ansatz mit pET41b-hPAT1-(His)<sub>8</sub>, 2 – Negativkontrolle (Ansatz ohne Plasmid). Die Detektion erfolgte durch Western Blot-Analyse mittels anti-His Antikörper.

<sup>19</sup> Durch die Anlagerung des anionischen Detergens SDS wird die Eigenladung der Proteine überdeckt, sodass Proteinmicellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseinheit entstehen (1,4 g SDS pro 1 g Protein). Aufgrund des hohen Anteils an hydrophoben Bereichen in Membranproteinen wird die Bindung von SDS an das Protein begünstigt. Damit erhalten Membranproteine eine erhöhte negative Nettoladung, wodurch die Mobilität im Gel bzw. im elektrischen Feld beschleunigt wird.



**Abb. 4.10 Zellfreie Expression von hPAT1-(His)<sub>8</sub> im präparativen Maßstab unter Verwendung des EasyXpress Protein Synthesis Maxi Kit von Qiagen.** Nachdem das Präzipitat solubilisiert wurde, erfolgte die Reinigung mittels Ni-NTA. Es sind Elutionsfraktionen (E) der Ni-NTA dargestellt. **(A)** Coomassie-gefärbtes SDS-Gel. **(B)** Western Blot-Analyse mittels anti-His Antikörper. **(C)** Western Blot-Analyse mittels spezifischem anti-hPAT1 Antikörper.

(Ni-NTA) unterzogen. Abbildung 4.10 A zeigt die Elutionsfraktionen der Ni-NTA. In den Elutionsfraktionen zwei und drei konnte im Coomassie-gefärbten SDS-Gel eine Proteinbande bei ca. 45 kDa detektiert werden. Die Identität des Transporters wurde durch Western Blot-Analyse mit Hilfe eines His-*tag* Antikörpers und eines spezifischen PAT1-Antikörpers bestätigt (Abb. 4.10 B und C). Die Banden im Molekularmassenbereich um 100 kDa stellen vermutlich Dimere des Proteins dar. Die Konzentration in E3 betrug 150 µg/ml (2,8 µM). Die Gesamtausbeute der Reaktion lag damit bei ca. 170 µg Protein. Die erzielte Ausbeute ist durchaus vergleichbar mit Ergebnissen für die zellfreie Expression anderer Vertreter der *solute carrier* Familie. In einem nicht-kommerziellen Expressionssystem basierend auf einem *E. coli*-Lysat konnten die organischen Kationen- und Anionen Transporter OCT1, OCT2 und OAT1 der Ratte in Mengen zwischen 120–360 µg in einem vergleichbaren Reaktionsvolumen hergestellt werden (Keller *et al.* 2008; Koepsell 2007).

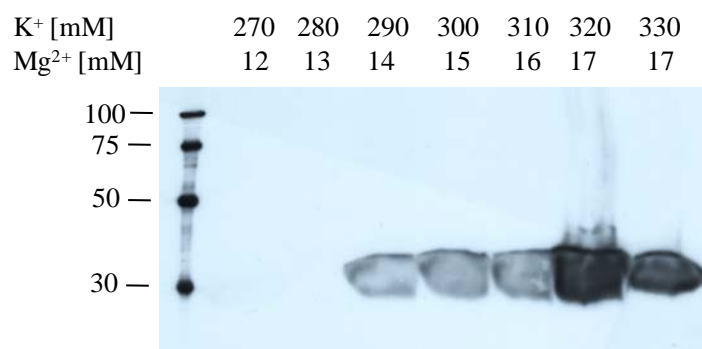
Aufgrund dieser vielversprechenden Ergebnisse wurde auf der Grundlage der Protokolle der von Klammt und Schwarz entwickelten Methode (Klammt *et al.* 2004; Klammt *et al.* 2006; Schwarz *et al.* 2007b; Schwarz *et al.* 2007a) ein *continuous exchange cell free* Expressionssystem etabliert, um hPAT1 unabhängig von den kostenintensiven kommerziellen Kits in größeren Mengen zellfrei herzustellen.

#### 4.2.2. Etablierung eines nicht-kommerziellen, eigenen Expressionssystems

Zunächst musste die Grundkomponente, der S30-Extrakt, wie unter Punkt 3.3.2.3. beschrieben, hergestellt werden. In einem analytischen Reaktionsansatz wurde mit Hilfe eines Testproteins die Funktionalität des hergestellten Extrakts getestet. Als Testplasmid wurde der

pIVEX-GFP Vektor genutzt, der für GFP (*Green Fluorescent Protein*) mit einem C-terminalen (His)<sub>6</sub>-tag codiert. Da die Konzentration der K<sup>+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-Ionen wichtige Parameter für die Aktivität solcher Extrakte sind, wurden gleichzeitig in parallel durchgeführten analytischen Ansätzen die optimalen Konzentrationen der Ionen ermittelt. Dazu wurde durch Zugabe entsprechender Mengen an Mg(OAc)<sub>2</sub> bzw. KOAc die Mg<sup>2+</sup>-Konzentration von 12 mM bis 17 mM und die K<sup>+</sup>-Konzentration von 270 mM bis 330 mM variiert. In Abbildung 4.11 ist die Western Blot-Analyse der einzelnen Reaktionsansätze dargestellt. Für fünf der getesteten sieben Reaktionsbedingungen konnte eine Expression von GFP nachgewiesen werden, wobei die höchste Ausbeute in Gegenwart von 17 mM Mg<sup>2+</sup>- und 320 mM K<sup>+</sup>-Ionen beobachtet werden konnte. Daher wurden in allen nachfolgenden Experimenten diese Ionen-Konzentrationen eingestellt.

Diese ersten Versuche zur zellfreien Expression mit einem eigenem Expressionssystem wurden zunächst mit einer käuflich zu erwerbenden T7-Polymerase durchgeführt. Um die Synthese noch kosteneffizienter zu gestalten, wurde auch die T7-Polymerase selbst präpariert. Dazu wurde *E. coli* B121 mit dem Plasmid pAR1219 (Li *et al.* 1999) kultiviert und die T7-Polymerase entsprechend Punkt 3.6. über eine Q-Sepharose gereinigt. Um die Elutionsfraktionen zu identifizieren, welche die Polymerase enthielten, wurden die gesammelten Fraktionen durch eine SDS-PAGE analysiert. Vier relevante Elutionsfraktionen (je 8 ml) wurden vereinigt, dialysiert, mit Hilfe von Amicon Konzentrationsröhrchen (30 kDa *cut off*) auf die Hälfte des Volumens aufkonzentriert und anschließend 1:1 mit Glycerin versetzt. Im Anschluss daran wurde die Funktionalität der Polymerase überprüft. Dafür wurde wieder die

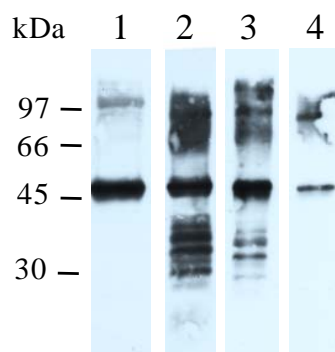


**Abb. 4.11 Optimierung der Konzentration von K<sup>+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-Ionen.** Testexpression von GFP (27 kDa) im selbst präparierten S30-Extrakt. Western Blot-Analyse mittels anti-His Antikörper.

Expression von GFP als Testprotein in analytischen Ansätzen untersucht. Es wurde ein Ansatz mit gekaufter und ein zweiter mit der selbst hergestellten T7-Polymerase versetzt. Die Western Blot-Analyse zeigte, dass in beiden Ansätzen ähnliche Mengen an GFP exprimiert wurden. Damit ist die Aktivität beider Polymeraselösungen vergleichbar. In den nachfolgenden Experimenten wurde daher die kommerzielle Polymerase durch die selbst präparierte ersetzt.

Im nächsten Schritt sollte geprüft werden, ob unter Verwendung des etablierten Systems die Expression von hPAT1 möglich ist. Da in diesem System für verschiedene GPCRs die N-terminale Fusion mit einem T7-tag positive Auswirkung auf die Expression zeigte (Klammt *et al.* 2007), wurde das Expressionskonstrukt T7-hPAT1-(His)<sub>10</sub> in analytischen Ansätzen verwendet. Nach Reaktionsende wurden die Ansätze zentrifugiert, um in lösliche und unlösliche Fraktion zu unterteilen. Im Western Blot konnte mittels anti-His Antikörper in der Pelletfraktion eine Bande bei ca. 45 kDa detektiert werden (Abb. 4.12). Dieses Ergebnis wurde mit einem anti-T7 Antikörper sowie mit den spezifischen hPAT1 Antikörpern anti-hPAT1-PEP1 und anti-hPAT1-PEP2 bestätigt. Dabei zeigte sich eine sehr unterschiedliche Spezifität der verwendeten Antikörper bzw. das Auftreten von möglicherweise Abbauprodukten. Im Überstand konnte kein Protein nachgewiesen werden. Die Expression von Membranproteinen in zellfreien Systemen als Präzipitat ist typisch und ist durch den hohen Anteil an hydrophoben Transmembransegmenten bedingt.

Nachdem gezeigt wurde, dass die Expression von hPAT1 im nicht-kommerziellen, eigenem zellfreien Expressionssystem möglich ist, sollte als nächstes die Reaktion so optimiert werden, dass im präparativen Ansatz größere Mengen an Protein hergestellt werden können.



**Abb. 4.12 Expression von T7-hPAT1-(His)<sub>10</sub> im selbst präparierten S30-Extrakt (unlösliche Fraktion).** Western Blot-Analyse mittels (1) anti-His Antikörper, (2) anti-T7 Antikörper, (3) anti-hPAT1-PEP1 und (4) anti-hPAT1-PEP2.

### 4.2.3. Optimierung der zellfreien Expression von hPAT1<sup>20</sup>

Der offene Charakter zellfreier Expressionssysteme ermöglicht, wie erwähnt, die Variation einer Vielzahl von Reaktionsparametern. Daher kann die Expression individuell auf die Bedürfnisse eines bestimmten Proteins angepasst werden. Der humane H<sup>+</sup>-Aminosäure-Cotransporter hPAT1 sollte sowohl als Präzipitat als auch löslich in möglichst großen Mengen exprimiert werden. Zunächst wurden grundlegende Komponenten variiert, die für beide Expressionsmodi von Bedeutung sind. Für die lösliche Expression wurde darüber hinaus der Einfluss verschiedener Detergenzien auf die Expression analysiert. Für beide Modi wurden anschließend Reaktionen im präparativen Maßstab durchgeführt. In allen Optimierungsreaktionen wurde das Expressionskonstrukt T7-hPAT1-(His)<sub>10</sub> verwendet.

#### *Optimierung grundlegender Komponenten (analytischer Maßstab)*

Ausgangspunkt für die Optimierung der Expression von hPAT1 war das Standardprotokoll für die zellfreie Expression von Membranproteinen von Schwarz und Mitarbeitern (Schwarz *et al.* 2007a). Ein Standardansatz hatte die in Tabelle 4.7 aufgeführte Zusammensetzung. Um die Expression zu optimieren wurden die Konzentrationen der Komponenten auf der rechten Seite variiert. Die Konzentrationen der auf der linken Seite aufgeführten Komponenten wurden nicht verändert. In diesem Standardansatz stehen im Reaktionsmix (RM) noch 3,5 µl und im *feeding*-Mix (FM) noch 60 µl Reaktionsvolumen zur Verfügung, um weitere Komponenten dem System zuzuführen, oder die Konzentration bereits vorhandener Komponenten zu erhöhen. Aufgrund des begrenzten Gesamtreaktionsvolumens musste an manchen Stellen auch zur Erhöhung der Konzentration einer Komponente die Konzentration einer anderen Komponente verringert werden.

Ein erster Optimierungspunkt stellte die selbst präparierte T7-Polymerase dar. Da von diesem Enzym lediglich die Konzentration und nicht die Aktivität bekannt war, wurde die Polymerase zu Beginn im gleichen Volumen wie die zuvor verwendete kommerzielle Variante eingesetzt (10,5 µl). In parallel durchgeführten analytischen Ansätzen wurde die Polymerasekonzentration schrittweise von 90 µg/ml auf 0,9 µg/ml verringert. Erst nachdem die Konzentration um 99 % gesenkt wurde, konnte eine leichte Abnahme der Expression beobachtet werden. So wurde eine Konzentration von 30 µg/ml als ausreichend bewertet. Das durch die

---

<sup>20</sup> Die in diesem Kapitel aufgeführten Ergebnisse wurden teilweise von Michael Jähme im Rahmen seiner Diplomarbeit erzielt (Jähme 2008).

**Tab. 4.7 Konzentration der Komponenten in einem Standardansatz zur zellfreien Expression von Membranproteinen nach Schwarz *et al.* (Schwarz *et al.* 2007a).** Dieser Ansatz stellte den Ausgangspunkt für nachfolgende Optimierungsreaktionen dar. FM – *feeding*-Mix, RM – Reaktionsmix.

Konzentration konstant		Konzentration variiert	
NaN <sub>3</sub>	0,05 %	KOAc	320 mM
PEG8000	2 %	Mg(OAc) <sub>2</sub>	17 mM
HEPES	90 mM	DTT	2 mM
Proteaseinhibitor <i>complete</i>	0,5x	AS-Mix	1,25 mM im FM
Folinsäure	200 mM		0,5 mM im RM
RCDWME-Mix	1 mM	tRNA	0,52 mM
ATP	1,2 mM	T7-Polymerase	90 µg/ml
GTP, CTP, UTP	0,8 mM	S30-Extrakt	35 % (v/v)
Pyruvat-Kinase	40 µg/ml	Plasmid-DNA	13,5 µg/ml
RNase-Inhibitor	0,28 U/µl	PEP	20 mM
		AcP	20 mM

reduzierte T7-Polymerasemenge freiwerdende Volumen wurde mit S30-Extrakt ersetzt und dessen Anteil damit von 35 % auf 45 % erhöht. Dadurch wurde versucht, die Entkopplung von Transkription und Translation zu verhindern und die Effektivität zu erhöhen<sup>21</sup>.

Ein weiterer wichtiger Ansatzpunkt zur Optimierung war die Aktivität des S30-Extrakts. Diese ist ein Hauptfaktor für eine effiziente zellfreie Expression, hängt jedoch stark von der Durchführung der Präparation ab (Yamane *et al.* 2005). Aus diesem Grund wurde zusätzlich zu dem Ersten ein neuer Extrakt präpariert und innerhalb eines Standardreaktionsansatzes mit dem alten Extrakt verglichen. Eine Analyse der Expression von hPAT1 ergab, dass die Synthese im neuen Extrakt deutlich gesteigert werden konnte. Der Grund hierfür lag wahrscheinlich in der Verwendung unterschiedlicher Kultivierungsmedien während der Extraktfermentation. Für den alten Extrakt wurden die *E. coli* Zellen in TB-Medium, für den neuen in 2x YTPG-Medium angezogen. Dieses Medium besitzt höhere Phosphat- und Glukose-Konzentrationen. Da Phosphat und Glukose Inhibitoren von Phosphatasen sind, wird der Abbau von Nukleotiden und Phosphoenolpyruvat während der Reaktion reduziert (Kim & Choi 2001). Somit ist die effektive Konzentration der Energiesubstrate höher und infolgedessen auch die Expression erhöht.

<sup>21</sup> Wie bereits in Punkt 4.1.6. für die *in vivo* Expression beschrieben, verläuft die Transkription durch die T7-Polymerase siebenmal schneller als durch *E. coli* Polymerasen. Wird diese RNA nicht für die Translation weiterverwendet führt dies zur Akkumulation von ungeschützter mRNA und resultiert schließlich in deren Abbau. Durch Verringerung der T7-Polymerasekonzentration wurde die Menge an mRNA-Molekülen reduziert, und durch Erhöhung des S30-Extrakts wurden die Komponenten für die Translation (Ribosomen und Translationsfaktoren) im Ansatz gesteigert. So wurde versucht ein mögliches Missverhältnis zwischen gebildeter mRNA und den Komponenten der Translationsmaschinerie auszugleichen.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Plasmid-DNA Konzentration im Expressionsansatz einen positiven Effekt hat. Schon eine Erhöhung um nur 13 % brachte eine Steigerung der Expressionsrate.

Der Einfluss der tRNA-Konzentration sowie der AcP- und PEP-Konzentration erwies sich als eher gering. Eine Verfünffachung der tRNA-Konzentration im Ansatz führte nur zu einer geringfügigen Steigerung der Expression. Für AcP und PEP wurde die Konzentration von 20 mM auf 30 mM erhöht. Dies brachte jedoch keine deutliche Expressionszunahme.

Besonders kritisch für die Expression sind die Konzentrationen der Aminosäuren. Im Standardansatz beträgt die Konzentration jeder Aminosäure 0,5 mM im RM und 1,25 mM im FM. Um die Expression eines Proteins zu optimieren, kann die Konzentration jeder einzelnen Aminosäure an die Zusammensetzung des Proteins angepasst werden (Klammt *et al.* 2004). So wurde entsprechend der Primärsequenz von hPAT1 ein spezifischer Aminosäuremix zusammengestellt. Die prozentuale Häufigkeit jeder Aminosäure in der hPAT1-Sequenz wurde auf den Aminosäuremix übertragen. Dabei wurde die Gesamtkonzentration von 80 mM im Aminosäuremix<sup>22</sup> beibehalten. Es zeigte sich jedoch, dass die Reaktion unter Einsatz des optimierten Aminosäuremix völlig inhibiert wurde. Der Grund hierfür könnte eine nun zu geringe Konzentration einzelner Aminosäuren sein. Für eine erfolgreiche Expression scheint eine Mindestkonzentration für jede Aminosäure erforderlich zu sein. Hinzu kommt, dass verschiedene Aminosäuren durch Enzyme des Extrakts abgebaut werden, und damit die Konzentration nochmals verringert wird (Calhoun & Swartz 2006).

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob DTT durch ein Redox-*shuffling* System bestehend aus reduziertem und oxidiertem Glutathion (GSH/GSSG) im Ansatz ersetzt werden kann. Reduzierende Bedingungen im Reaktionsansatz sind für die Aktivität der T7-Polymerase nötig, da diese durch Oxidation inhibiert werden kann (Schwarz *et al.* 2007b). Jedoch können unter reduzierenden Bedingungen keine Disulfidbrücken im produzierten Protein ausgebildet werden. Durch Einsatz einer Kombination aus oxidiertem und reduziertem Glutathion sollten zum einen optimale Bedingungen für die T7-Polymerase geschaffen und zum anderen die Ausbildung von Disulfidbrücken im Protein ermöglicht werden. Da der Transporter 13 Cysteinseitenketten besitzt, sollte das Redox-*shuffling* System auch eine korrekte Ausbildung von eventuell im nativen Protein vorhandenen Disulfidbrücken ermöglichen und eine Aggregation durch falsch gebildete Disulfidbrücken verhindern (Goerke & Swartz

---

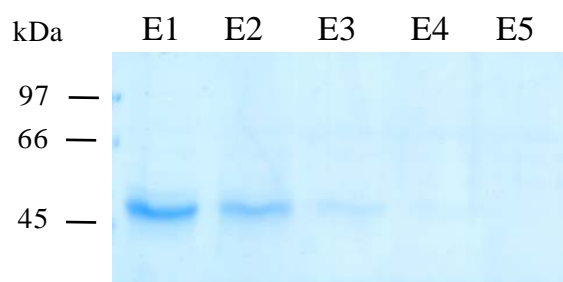
<sup>22</sup> Die Konzentration jeder Aminosäure im Mix beträgt 4 mM. Somit beträgt die Gesamtkonzentration aller 20 Aminosäuren 80 mM.

2008; Rudolph & Lilie 1996). Expressionsanalysen zeigten, dass die Synthese von hPAT1 unter beiden Bedingungen vergleichbar war. Somit konnte für nachfolgende Reaktionen DTT durch GSH/GSSG ersetzt werden, ohne dass die Aktivität der Polymerase beeinträchtigt wurde.

Einen weiteren Ansatzpunkt für eine Expressionssteigerung stellt der *feeding*-Mix dar. Dieser steht über eine Dialysemembran mit dem Reaktionsmix in Verbindung und liefert verbrauchte Energiesubstrate und Aminosäuren nach. Des Weiteren wird der Reaktionsinhibitor anorganisches Phosphat aus dem RM in den FM verdünnt. Im Laufe der Reaktion wird jedoch die Kapazität des FM aufgebraucht. Aus diesem Grund wurde innerhalb einer Versuchsreihe getestet, wie sich ein Wechsel des FM nach sieben Stunden auf die Expressionsrate von hPAT1 auswirkt. Eine Expressionsanalyse ergab, dass der Wechsel gegen einen frischen FM einen positiven Effekt auf die Syntheserate hatte.

#### *Präparative unlösliche Expression*

Im Anschluss an die Optimierungsversuche wurde eine zellfreie Expression im präparativen Maßstab angesetzt. Dafür wurde der neu präparierte und aktivere S30-Extrakt verwendet. Des Weiteren wurde gegenüber dem Standardansatz die Konzentration der Aminosäuren (1,42 mM im FM; 0,88 mM im RM), der tRNA (1 mg/ml) und der Plasmid-DNA (20 µg/ml) erhöht. Damit die Transkription nicht zum limitierenden Schritt wird, wurde die T7-Polymerase in einer Konzentration von 45 µg/ml, anstatt 30 µg/ml eingesetzt. Zudem wurde ein *feeding*-Wechsel nach sechs Stunden durchgeführt. Nach Ende der Reaktion wurde der Reaktionsansatz zentrifugiert und das Pellet wurde analog zu *inclusion bodies* der *in vivo* Expressionsversuche in einem SDS-haltigen Solubilisierungspuffer aufgenommen. Anschließend wurde der Transporter über eine Affinitätschromatographie aus dem Solubilisat isoliert (Abb. 4.13).



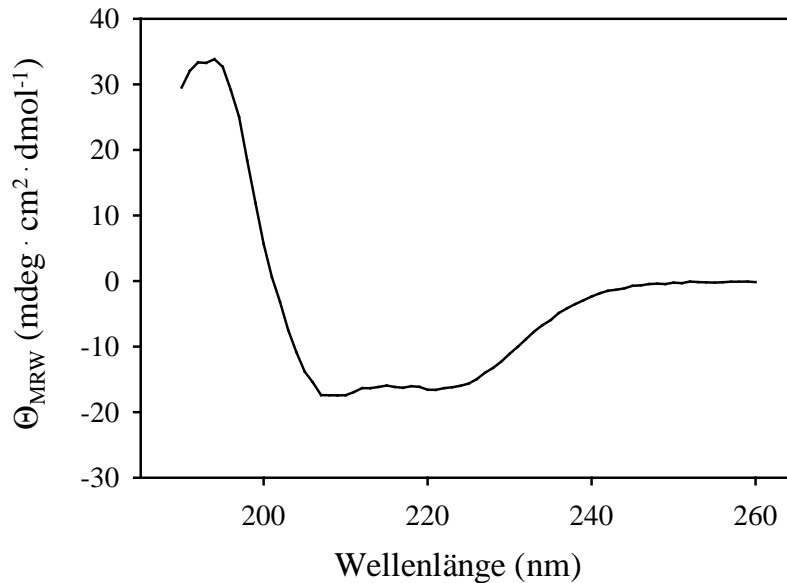
**Abb. 4.13 SDS-PAGE der Reinigung von T7-hPAT1-(His)<sub>10</sub> nach unlöslicher Expression.** E – Elutionsfraktion.



Die Konzentration der Hauptelutionsfraktion betrug 130  $\mu\text{g/ml}$ . Die Gesamtausbeute dieses 2 ml-Reaktionsansatzes lag bei etwa 150  $\mu\text{g}$ . Im Vergleich zu anderen Membranproteinen, die mit diesem System exprimiert wurden, sind die erzielten Ausbeuten gering. Für die humanen GPCRs Neuropeptid  $Y_4$ -Rezeptor und Melatonin 1B-Rezeptor konnten 3 mg bzw. 1 mg Protein pro Milliliter Reaktionsmix erreicht werden. GPCRs besitzen sieben Transmembrandomänen (TMD), im Gegensatz zu den meisten *drug*-Transportern, die oft bis zu 12 TMD enthalten. Obwohl bekannt ist, dass die Expressionsrate unabhängig von der Anzahl der TMD ist (Tate 2001), haben jüngere Untersuchungen gezeigt, dass durchaus eine solche Korrelation bei der Expression von Membranproteinen in zellfreien Expressionssystemen bestehen kann (Keller *et al.* 2008). Als erste Vertreter der eukaryotischen *drug*-Transporter konnten die organischen Anionen- und Kationen-Transporter rOCT1, rOCT2 und rOAT1 im präparativen Maßstab zellfrei hergestellt werden. Die Ausbeuten lagen zwischen 120–360  $\mu\text{g}$  pro Milliliter Reaktionsmix und damit unter denen für GPCRs (Keller *et al.* 2008).

Trotz der vergleichsweise geringen Konzentration an zellfrei exprimierten hPAT1 wurde eine biophysikalische Charakterisierung mittels CD-Spektroskopie versucht. Das Fern-UV-CD-Spektrum eines Proteins zwischen 190 und 260 nm wird durch dessen Gehalt an Sekundärstrukturen, also  $\alpha$ -Helizes und  $\beta$ -Faltblätter, charakterisiert. Das hier erhaltene Spektrum zeigt mit einem Minimum bei 209 und 222 nm eine typische Charakteristik für  $\alpha$ -helikale Strukturen (Abb. 4.14). Eine Analyse des Spektrums mittels der *CDPro-Software* ergab, dass der Transporter in SDS-Mizellen bereits ca. 50 %  $\alpha$ -helikale Anteile aufwies. Ähnliche, für  $\alpha$ -helikale Strukturen typische CD-Spektren wurden auch für die prokaryotischen *drug*-Transporter SugE und TehA in Gegenwart von SDS erhalten (Klammt *et al.* 2004). Vermutlich wird dieser Anteil durch Transmembranbereiche repräsentiert, die in Gegenwart von SDS dazu tendieren,  $\alpha$ -helikale Strukturen zu bilden. So konnte für den Kalium-Kanal KcsA gezeigt werden, dass die durch NMR-Untersuchungen ermittelten  $\alpha$ -helikalen Sekundärstrukturen in SDS weitgehend mit denen in der Kristallstruktur gefundenen übereinstimmen (Chill *et al.* 2006; Doyle *et al.* 1998).

Auf dem Weg zum nativen Protein musste der in SDS-Mizellen vorliegende Transporter nun im nächsten Schritt durch Renaturierung in seine native Konformation überführt werden. Die *in vitro* Rückfaltung erfolgte durch Pulsrenaturierung nach dem Prinzip von Rozema und Gellman (Rozema & Gellman 1996). Dafür wurde die Proteinlösung in einen Rückfaltungspuffer (50 mM Natriumphosphat pH 8; 0,1 % (m/v) Brij 35; 1 mM EDTA; 20 mM Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin; 5 mM GSH; 1 mM GSSG; 750 mM Arginin) bis zu einer Endkonzentration von

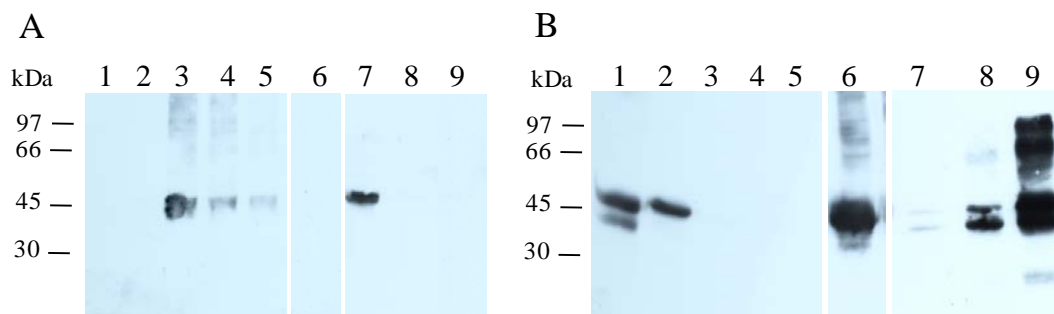


**Abb. 4.14 Fern-UV-CD-Spektrum von T7-hPAT1-(His)<sub>10</sub> in 50 mM Natriumphosphat, 10 mM SDS pH 4,5.**

40 µg/ml verdünnt. Nach 24 stündiger Inkubation des Rückfaltungsansatzes bei Raumtemperatur erfolgte eine Dialyse für sechs Stunden gegen einen Puffer mit 50 mM Natriumphosphat pH 8; 0,1 % (m/v) Brij 35. Anschließend wurde zur Abtrennung vorhandener Aggregate eine Ultrazentrifugation durchgeführt (60 min, 60000 rpm, 4 °C, Rotor TLA100.4 Beckmann). Dieser Rückfaltungsversuch war jedoch nicht erfolgreich, da im Überstand der Ultrazentrifugation kein Protein nachgewiesen werden konnte. Für ein *screening* verschiedener Rückfaltungsbedingungen war die Ausbeute zu gering. Daher wurde nach anderen Möglichkeiten gesucht, um natives Protein zu erhalten. Alternativ zur *in vitro* Rückfaltung des in SDS solubilisierten Pellets können präzipitierte Membranproteine aus der zellfreien Expression auch durch Solubilisierung in milden Detergenzien in die native Konformation gebracht werden. Wie bereits zu Beginn des Kapitels erwähnt, konnte der prokaryotische *drug*-Transporter EmrE durch DDM solubilisiert werden und zeigte danach volle Aktivität. Auch die Präzipitate der eukaryotischen *drug*-Transporter OCT1, OCT2 und OAT1 konnten durch LMPG solubilisiert und funktionell rekonstituiert werden. Diese Möglichkeit der nativen Solubilisierung wurde auch in dieser Arbeit für hPAT1 in einem analytischen Ansatz überprüft. So konnte gezeigt werden, dass die Solubilisierung in einem Natriumphosphat-Puffer mit 0,1 % Brij 35 effektiver war als durch den zuvor genutzten Tris-Puffer mit SDS.

*Test verschiedener Detergenzien für die lösliche Expression (analytischer Maßstab)*

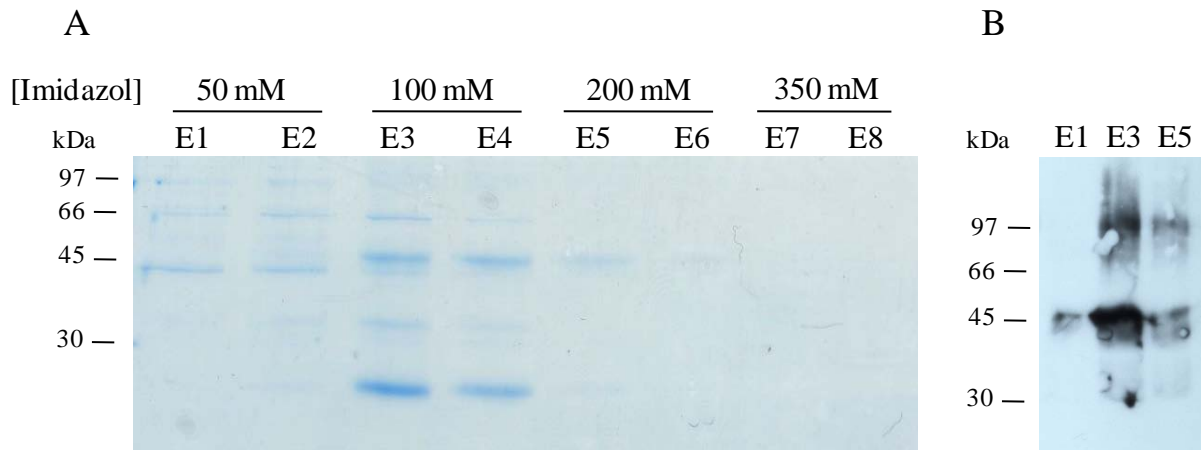
Um hPAT1 in löslicher Form im zellfreien System zu exprimieren, wurde der Einfluss von verschiedenen Detergenzien getestet. Als Ausgangspunkt wurde der für die unlösliche Expression optimierte Ansatz verwendet. DTT wurde dabei durch das Redox-*shuffling* System bestehend aus GSH/GSSG (5 mM/1 mM) ersetzt. Nach Ende der Reaktion wurde der Ansatz zentrifugiert um ihn in eine lösliche und eine unlösliche Fraktion zu unterteilen. Wie in Abbildung 4.15 zu erkennen, führen nur Digitonin und die Brij-Detergenzien zu einer löslichen Expression des Transporters. Am günstigsten erwies sich dabei eine Expression in Anwesenheit von 0,1 % Brij 35 oder 0,4 % Digitonin. In Gegenwart von DDM, Triton X-100, Tween 20 und DMPC wurde hPAT1 nur in der unlöslichen Fraktion detektiert. Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen für andere eukaryotische Membranproteine. So wurden die GPCRs humaner Endothelin B-Rezeptor und Vasopressin Rezeptor 2 aus Schwein besonders gut in Anwesenheit von Digitonin und der Brij-Detergenzien in löslicher Form exprimiert (Klammt *et al.* 2005; Klammt *et al.* 2007). Im Gegensatz dazu konnte der prokaryotische *drug*-Transporter EmrE löslich in Gegenwart von DDM exprimiert werden (Elbaz 2004).



**Abb. 4.15 Einfluss von Detergenzien auf die lösliche Expression von T7-hPAT1-(His)<sub>10</sub>.** (A) lösliche Fraktionen. (B) unlösliche Fraktionen. Western Blot-Analyse mittels anti-His Antikörper. 1 – ohne Detergenz; 2 – 0,1 % DDM; 3 – 0,1 % Brij 35; 4 – 1 % Brij 58; 5 – 1 % Brij 78; 6 – 4 mg/ml DMPC; 7 – 0,4 % Digitonin; 8 – 0,2 % Triton X-100; 9 – 1 % Tween 20.

*Präparative lösliche Expression in Gegenwart von Brij 35*

Für eine lösliche Expression von hPAT1 im präparativen Maßstab wurde das kostengünstige Brij 35 in einer Endkonzentration von 0,1 % (m/v) eingesetzt. Um den Transporter zu isolieren, wurde nach Ende der Reaktion die lösliche Fraktion einer Affinitätschromatographie (Ni-NTA) unterzogen. Die Elution erfolgte durch einen Puffer, der 500 mM Imidazol enthielt. Eine Analyse der Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE zeigte jedoch, dass diese Reinigung sehr ineffektiv war. In allen Elutionsfraktionen waren zahlreiche Proteinbanden zu erkennen. Mittels Western Blot-Analyse konnte hPAT1 in den Elutionsfraktionen detektiert werden.



**Abb. 4.16** Reinigung von T7-hPAT1-(His)<sub>10</sub> nach löslicher Expression in Gegenwart von 0,1 % Brij 35. Die Elution erfolgte mittels Imidazol-Stufengradient. (A) SDS-PAGE. (B) Western Blot-Analyse mittels anti-hPAT1-PEP2. E – Elutionsfraktion.

Um die Reinigung effektiver zu gestalten, wurden in einem zweiten Versuch die Reinigungsbedingungen verändert. Die lösliche Fraktion wurde vor der Reinigung gegen einen Puffer dialysiert der 500 mM NaCl und 10 mM Imidazol enthielt (50 mM Natrimphosphat pH 8; 0,1 % (w/v) Brij 35; 5 mM GSH; 1 mM GSSG; 500 mM NaCl; 10 mM Imidazol). Damit sollten die unspezifischen Bindungen anderer Proteine des Extraktes an das Säulenmaterial reduziert werden. Des Weiteren wurde nicht mehr durch eine Stoßelution mit 500 mM Imidazol eluiert, sondern ein Imidazol-Stufengradient über fünf Imidazol-Konzentrationen verwendet. Diese Reinigungsstrategie erwies sich als effektiver. Sowohl das SDS-Gel als auch ein Western Blot zeigten, dass hPAT1 spezifisch bei einer Konzentration von 100 mM Imidazol eluierte (Abb. 4.16). Die Identität des Transporters konnte auch über Massenspektrometrie bestätigt werden. Dennoch waren zusätzliche Banden in den hPAT1-spezifischen Elutionsfraktionen zu erkennen. Nachfolgende spezifische Proteinkonzentrationsbestimmungen und Charakterisierungen waren aus diesem Grund für den löslich exprierten hPAT1 nicht möglich. In der Literatur sind die aufgetretenen Probleme bei der Reinigung von mit diesem System löslich exprierten Membranproteinen nicht beschrieben. Der Vasopressin Rezeptor 2 konnte in Gegenwart von 0,1 % Brij 35 gereinigt und für eine Analyse durch CD-Spektroskopie eingesetzt werden (Klammt *et al.* 2005).

#### 4.2.4. Zusammenfassung der Ergebnisse der zellfreien Expression und Ausblick

Es ist gelungen ein Expressionssystem zu etablieren, in dem der humane H<sup>+</sup>-Aminosäure-Cotransporter hPAT1 zellfrei exprimiert werden kann. Ausgehend von einem Standardprotokoll für die zellfreie Expression wurde die Synthese des Transporters durch Variation verschiedener Komponenten deutlich gesteigert. So konnte der Transporter im unlöslichen Expressionsmodus nach Solubilisierung und Reinigung mit einer Ausbeute von 75 µg pro Milliliter Reaktionsmix erhalten werden. Eine erste biophysikalische Charakterisierung mittels CD-Spektroskopie folgte und ergab einen  $\alpha$ -helikalen Anteil von etwa 50 %, ein typischer Befund für ein Transmembranprotein in SDS. Auch wenn die erhaltenen Ausbeuten unter denen für GPCRs liegen, zeigen Untersuchungen der eukaryotischen *drug*-Transporter rOCT1, rOCT2 und rOAT1, dass eine Rekonstitution in Liposomen und die Durchführung von Funktionstests erfolgreich sein können (Keller *et al.* 2008).

Um eine nachträgliche *in vitro* Renaturierung des in SDS-solubilisierten Präzipitats zu umgehen, sollte in zukünftigen Versuchen eine Solubilisierung in verschiedenen milden Detergenzien versucht werden. Erste Untersuchungen dazu haben bereits gezeigt, dass die Solubilisierung in Brij 35 möglich ist. Des Weiteren könnte die Verwendung von LMPG untersucht werden. Für rOCT1, rOCT2 und rOAT1 resultierte die Solubilisierung in diesem Detergenz in einer funktionellen Rekonstitution der Transporter (Keller *et al.* 2008).

Um hPAT1 in löslicher Form zu exprimieren, wurden verschiedene Detergenzien getestet. Der Transporter konnte nur in Gegenwart von Digitonin und Brij 35 in Lösung synthetisiert werden. Für einen präparativen Ansatz wurde Brij 35 gewählt. Dabei zeigte sich jedoch, dass die Reinigung sehr ineffektiv war. In den Elutionsfraktionen waren neben hPAT1 noch weitere Proteine enthalten, wodurch eine spektralphotometrische Quantifizierung und eine biophysikalische Charakterisierung nicht möglich waren. Um die Reinigung zu optimieren, könnte der Transporter in einem zweiten Reinigungsschritt über den N-terminalen T7-*tag* isoliert werden. Die Affinitätsreinigung erfolgt dabei über immobilisierte anti-T7 Antikörper. Zur Elution wird das T7-Peptid eingesetzt.

Um die Ausbeute noch weiter zu erhöhen, könnten zusätzliche Optimierungsversuche unternommen werden. Ein Ansatzpunkt wäre, den S30-Extrakt aus einem anderen *E. coli*-Stamm zu präparieren. Zum Beispiel erhält man durch Verwendung des Stammes B121 (DE3) Star RNase E-defiziente und Chaperon-angereicherte Extrakte (Jun *et al.* 2008). Erfolgt die Präparation des Extraktes aus *E. coli* KC6, bekommt man einen Extrakt der defizient an Enzymen ist, die für den Abbau von bestimmten Aminosäuren verantwortlich sind (Calhoun &

Swartz 2006). Aber auch veränderte Fermentationsbedingungen können zu einer Aktivitätssteigerung führen. So wird durch Fermentation von *E. coli* K12 A19 bei 42 °C in einem Aminosäure-angereicherten Medium ein Extrakt gewonnen, der durch das schnellere Wachstum der Zellen mehr Ribosomen enthält (Yamane *et al.* 2005).

Im Gegensatz zur *in vivo* Expression in *E. coli*, konnten mit dem in dieser Arbeit etablierten zellfreien Expressionssystem akzeptable Mengen des Transporterproteins hergestellt werden. Die Ursachen für die stark abweichenden Effizienzen beider Expressionssysteme können sehr vielfältig sein. Zum einen wird die mRNA im zellfreien System durch Zugabe von RNase-Inhibitoren vor Abbau geschützt. Zum anderen werden die exprimierten Proteine durch Zugabe von Protease-Inhibitoren im Reaktionsmix stabilisiert. Ein weiterer möglicher Grund könnte die unterschiedliche *codon usage* zwischen *E. coli* und humanen Zellen sein. Es ist anzunehmen, dass die tRNAs im zellfreien System im Überschuss vorliegen. Damit stellt die Konzentration der kritischen tRNA-Moleküle nicht mehr den limitierenden Faktor der Translationsreaktion dar.

Die Vorteile des zellfreien Expressionssystems, insbesondere der offene Charakter und die damit verbundene vollständige Kontrolle über viele Reaktionsparameter, wurden anhand der Expression des humanen H<sup>+</sup>-Aminosäure-Cotransporters nochmals verdeutlicht.

### 4.3. Identifizierung einer essentiellen Disulfidbrücke in hPAT1

In diesem Teil der Arbeit sollte die Funktion extrazellulärer Cysteinseitenketten im humanen  $H^+$ -Aminosäure-Cotransporter hPAT1 untersucht und die Existenz von Disulfidbrücken überprüft werden. Disulfidbrücken<sup>23</sup> stellen eine typische posttranslationale Modifizierung bei Eukaryoten dar und werden in sezernierten Proteinen oder in den extrazellulären Bereichen von Membranproteinen ausgebildet. Die Knüpfung von Disulfidbindungen erfolgt enzymkatalysiert durch die Proteindisulfidisomerase im endoplasmatischen Retikulum innerhalb einer Thiol-Disulfid-Austauschreaktion. Disulfidbrücken sind für viele Membranproteine wichtig, um deren dreidimensionale Struktur (Tertiärstruktur) auszubilden und zu stabilisieren. Die kovalente Bindung ist dabei deutlich stabiler als nicht-kovalente Wechselwirkungen wie z.B. Wasserstoffbrückenbindungen oder hydrophobe Wechselwirkungen. Die exakte Ausbildung der Tertiärstruktur ist wiederum essentiell für die Stabilität, die Funktion, den intrazellulären Transport (*trafficking*) und die Plasmamembranlokalisation von Membranproteinen.

Wichtig für die Bildung einer Disulfidbrücke ist der Abstand der zu verknüpfenden Cysteinseitenketten. Die beiden Schwefelatome müssen für den Thiol-Disulfid-Austausch in einer definierten Entfernung zu einander stehen. Dieser kritische, maximale Abstand zwischen zwei kovalent verknüpften Cysteinseitenketten kann auch für die Aufklärung der Tertiär- und Quartärstruktur eines Proteins genutzt werden. Somit kann die Analyse von Disulfidverbrückungen innerhalb eines Proteins andere abstandsmessende Methoden, wie z.B. den Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer und den nuklearen Overhauser-Effekt der NMR-Spektroskopie ergänzen (Wedemeyer *et al.* 2000).

Für eine Vielzahl von Vertretern der größten Gruppe der Membranproteine, der G-Protein gekoppelten Rezeptoren, wurden funktionell wichtige intramolekulare Disulfidbrücken nachgewiesen. So konnten für den humanen *Glucagon-like peptide-1* Rezeptor und für den humanen Parathormon-Rezeptor allein in der N-terminalen extrazellulären Domäne drei Disulfidbrücken identifiziert werden (Bazarsuren *et al.* 2002; Grauschopf *et al.* 2000). Zusätzlich ist die erste extrazelluläre Schleife mit der zweiten über eine Disulfidbindung verbrückt. Für die *solute carrier* dagegen sind in der Literatur relativ wenige Untersuchungen zu diesem Thema zu finden. Disulfidbrücken konnten im Serotonin-Transporter SERT und im Dopamin-Transporter DAT nachgewiesen werden (Chen *et al.* 1997; Chen *et al.* 2007a). Diese scheinen

---

<sup>23</sup> Die Knüpfung einer kovalenten Bindung zwischen zwei Schwefelatomen zweier Cysteinseitenketten in einem Protein wird als intramolekulare Disulfidbrücke bezeichnet. Eine intermolekulare Disulfidbrücke besteht zwischen Cysteinresten zweier Proteine.

jedoch für die Transportfunktion nicht essentiell zu sein. Im Gegensatz dazu wurde für den Na<sup>+</sup>/Glukose-Cotransporter SGLT1 schon früh die Existenz einer funktionell wichtigen Disulfidbrücke vermutet. Turner und George haben bereits zu Beginn der 80er Jahre gezeigt, dass die Inkubation von Bürstensaummembranvesikeln der äußeren Nierenrinde von Kaninchen mit dem reduzierenden Reagens DTT zu einer veränderten Affinität und Bindungscharakteristik des nicht-transportierten Inhibitors Phlorizin führt (Turner & George 1983; Turner & George 1984). Später untersuchten Gagnon und Mitarbeiter den Einfluss von DTT auf die Funktion des in *X. laevis* Oozyten exprimierten SGLT1 und konnten den Effekt bestätigen. Durch Mutagenesestudien wurde schließlich eine Disulfidbrücke identifiziert (Gagnon *et al.* 2006).

Eine weitere wichtige Aufgabe von Disulfidbrücken ist die Stabilisierung von Membranproteinen in der Plasmamembran. Für den Typ IIa Na<sup>+</sup>/Phosphat-Cotransporter zeigten Lambert *et al.*, dass durch Inkubation mit dem reduzierenden Reagens TCEP nicht nur die Funktion des Transporters inhibiert, sondern auch die Menge an Protein in der Plasmamembran reduziert wurde (Lambert *et al.* 2000). Die Reduktion einer Disulfidbrücke führte zu einer Konformationsänderung innerhalb des Proteins. Dies löste wiederum eine Internalisierung und eine Degradation in Lysosomen aus. Ähnlich stabilisierende Effekte einer intramolekularen Disulfidbindung beobachteten Wakabayashi und Mitarbeiter für den humanen ABC-Transporter ABCG2 (Wakabayashi *et al.* 2007).

Eine Disulfidbindung kann auch an der Oligomerisierung von Proteinen beteiligt sein. So wurde eine intermolekulare Verbrückung für den Serotonin-Transporter der Ratte und den ABC-Transporter ABCG2 (Jess *et al.* 1996; Kage *et al.* 2005) nachgewiesen.

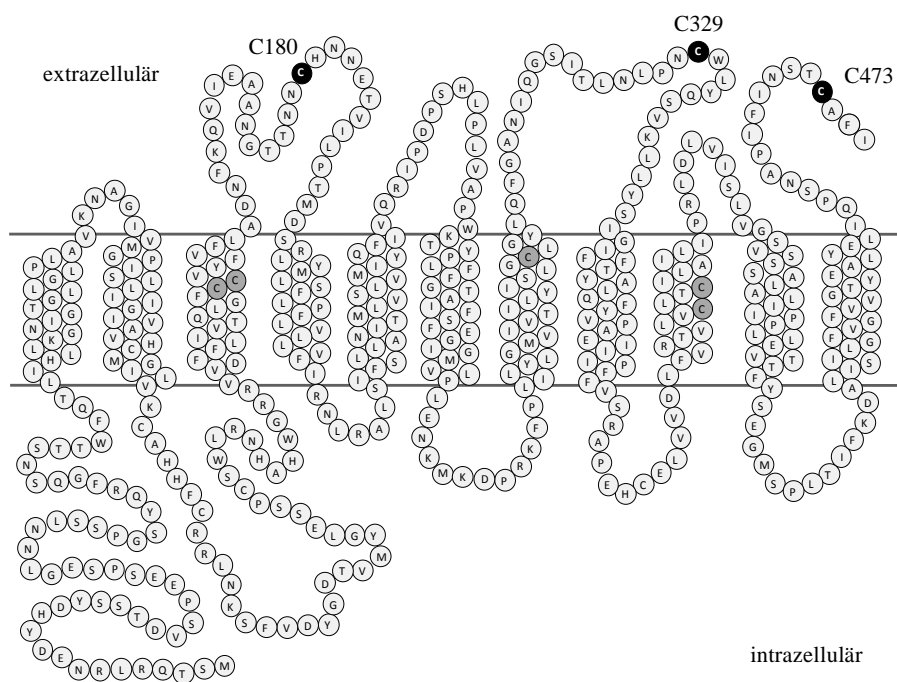
Demgegenüber haben einzelne Cysteinseitenketten, auch ohne Beteiligung an einer Disulfidbindung, wichtige Funktionen für den intrazellulären Transport und das *targeting* des Proteins zur Plasmamembran (Chen *et al.* 1997; Henriksen *et al.* 2005; Pajor *et al.* 1999). Des Weiteren wurde für die organischen Kationen-Transporter rOCT1, rOCT2 (Sturm *et al.* 2007) und den H<sup>+</sup>/organische Kationen Antiporter MATE1 (*multidrug and toxin extrusion*) (Asaka *et al.* 2007) gezeigt, dass Cysteinseitenketten innerhalb von Transmembrandomänen essentiell für die Substratbindung sind.

In der Aminosäuresequenz des hPAT1-Proteins befinden sich 13 Cysteinreste. Gegenwärtig werden in der Literatur zwei Topologie-Modelle für hPAT1 diskutiert (Boll *et al.* 2003b; Chen *et al.* 2003). Bezieht man sich auf das 11-Transmembrandomänen-Modell, verfügt



hPAT1 extrazellulär über drei Cysteinseitenketten (C180, C329 und C473) (Abb. 4.17). Fünf weitere Cysteinreste befinden sich in Transmembrandomänen drei, sieben und neun. Die verbleibenden fünf Cysteinreste sind in den intrazellulären Schleifen lokalisiert. Von den drei putativ extrazellulär gelegenen Cysteinresten sind C180 und C329 hoch konserviert und konnten an analogen Positionen anderer Spezies (Ratte, Maus und Kaninchen) und den Paralogen (hPAT2 und hPAT3) des Aminosäure-Transporters identifiziert werden (Abb. 4.18). Cystein 473 ist nicht konserviert und ist nur im humanen PAT1 vorhanden.

Für die Untersuchungen wurden Mutanten des Transportproteins hergestellt, in denen die Cysteinreste durch Alanin- bzw. Serinreste ausgetauscht wurden. Anschließend sollten die Mutanten funktionell und biochemisch analysiert werden. Für diese Charakterisierungen wurden das Wildtypprotein (nicht-mutierter Transporter) und die Varianten zum einen heterolog mit Hilfe des Vaccinia-Virus-Expressionssystems in HRPE-Zellen exprimiert. Zum anderen erfolgte die Charakterisierung in cRNA-injizierten *X. laevis* Oozyten. Die Klonierung des eukaryotischen Expressionsplasmids pSPORT1-hPAT1 wurde durch Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe Membrantransport im Biozentrum der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Kristin Natho und Linda Laug) durchgeführt. Die Charakterisierung des damit



**Abb. 4.17 Zwei-Dimensionales Topologiemodell des humanen PAT1.** Die in dieser Studie untersuchten putativ extrazellulären Cysteinreste sind schwarz dargestellt. Cysteinreste in den Transmembrandomänen sind grau hervorgehoben. Entnommen aus der Dissertation von Linda Laug (Metzner 2007).

	Extrazelluläre Schleife 2			Extrazelluläre Schleife 4			C-Terminus		
	170	180	190	320	330	340	460	470	
hPAT1	I			I			I		
hPAT1	IEAANGTTNN	CHNNETVILTP		GSITLNLNPN	CWLYQSVKLLYS		IQPSNAPIFINST	CAFI	
rPAT1	IEAANGTTTN	CNNNETVILTP		GSITLNLNPN	CWLYQSVKLLYS		IQPSHSDSSTNST	SAFI	
mPAT1	IEAANGTTTN	CNNNVTVIPTP		GSITLNLNPN	CWLYQSVKLLYS		IQPSHSDSSTNST	SAFI	
rbPAT1	IEAANGTTS	DCHNNETVVLTP		GSITLNLNPN	CWLYQSVKLLYS		IQPSNAPIFINST	SAYV	
hPAT2	VEAVNSTTNN	CYSNETVILTP		ASISLNLNPN	CWLYQSVKLLYI		LKSEDSHPFSNST	TFVR	
hPAT3	VEEAHVTSNI	CQPREILTLTP		ASITLNLNPN	CWLYQSVKLMYS		LPQPIHSMANST	GVHA	

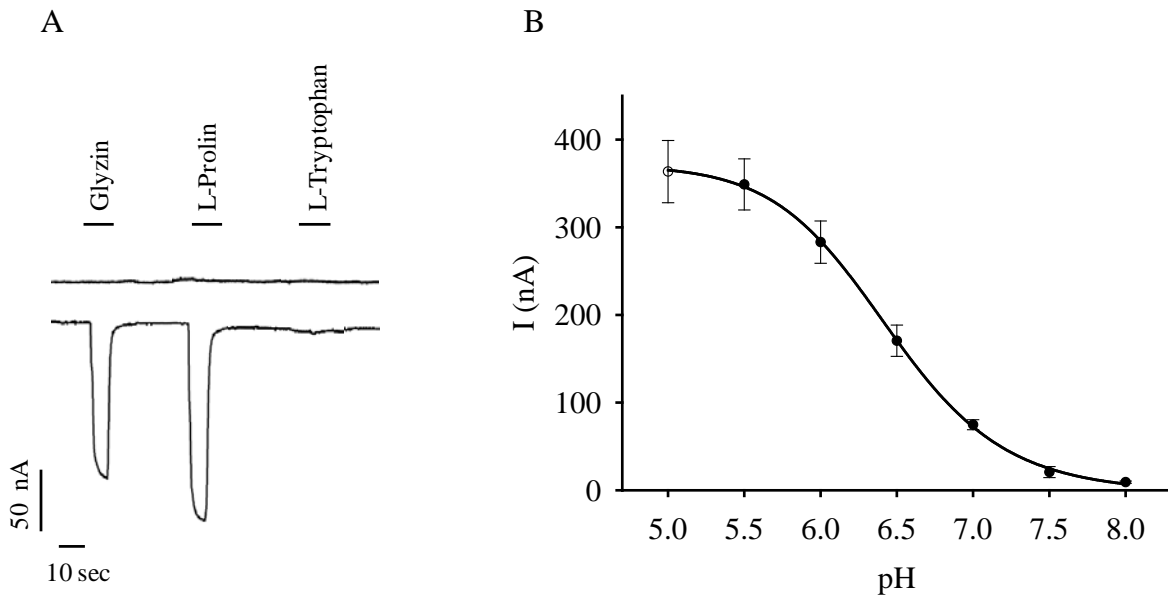
**Abb. 4.18 Partielles Aminosäuresequenz-Alignment der extrazellulären Schleifen 2 und 4 sowie des C-Terminus von PAT1 aus Mensch (hPAT1), Maus (mPAT1), Ratte (rPAT1), Kaninchen (rbPAT1) und den humanen Paralogen PAT2 sowie PAT3.** Die für diese Arbeit relevanten Cysteinreste sind eingerahmt. Die Nummerierung bezieht sich nur auf die Aminosäuresequenz des humanen PAT1.

heterolog in HRPE-Zellen exprimierten Transporters wurde umfassend in Metzner *et al.* untersucht, wobei die Funktionalität bestätigt werden konnte (Metzner *et al.* 2008). Die Charakterisierung des hPAT1-Transportsystems in *X. laevis* Oozyten wird im folgenden Kapitel näher beschrieben.

#### 4.3.1. Klonierung der hPAT1 cDNA in den Oozytenexpressionsvektor pNKS und anschließende Bestimmung der Transportcharakteristika

Mit Hilfe der beschriebenen molekularbiologischen Methoden wurde die codierende Sequenz des Transporters mittels PCR aus dem Vektor pSPORT1-hPAT1 (Metzner *et al.* 2008) amplifiziert und in den Oozyten-Expressionsvektor pNKS inseriert (siehe Kapitel 2.5, Tab. 2.16 und 2.14). Danach erfolgte die cRNA-Präparation wie im Methodenteil beschrieben (Kapitel 3.2.9.).

In hPAT1-cRNA-injizierten *X. laevis* Oozyten induzierten die prototypischen Substrate Glyzin und Prolin in einer Konzentration von 20 mM und bei einem extrazellulären pH-Wert von 6,5 spezifische Ströme in Höhe von 130 und 170 nA (Abb. 4.19 A). Tryptophan dagegen, als Inhibitor des hPAT1-spezifischen Aminosäuretransports (Metzner *et al.* 2005), konnte keinen Strom in cRNA-injizierten Oozyten auslösen. In Oozyten, die als Kontrollgruppe mit Wasser injiziert wurden, wurden keine Ströme durch die applizierten Aminosäuren detektiert. Des Weiteren zeigte der Transport von Glyzin eine starke Abhängigkeit von einem nach innen gerichteten pH-Gradienten (Abb. 4.19 B). Bei extrazellulären pH-Werten von 8 und 7,5 war

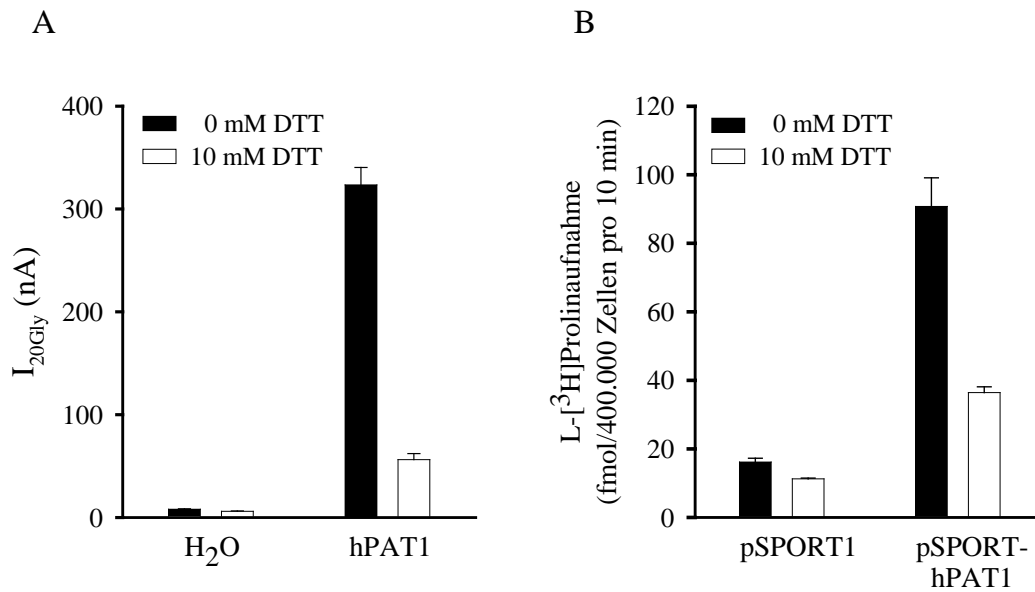


**Abb. 4.19 Funktionelle Charakterisierung von hPAT1 im *X. laevis* Expressionssystem.** (A) Repräsentative Darstellung der durch Applikation verschiedener Aminosäuren induzierten Ströme in hPAT1-exprimierenden *X. laevis* Oozyten (untere Spur). Die Aminosäuren waren in einer Konzentration von 20 mM in ORi PAT pH 6,5 gelöst. Die obere Aufzeichnungsspur repräsentiert den in Wasser-injizierten Oozyten gemessenen Strom nach Applikation der Aminosäuren. (B) hPAT1-exprimierende Oozyten wurden mit 20 mM Glycizin in ORi PAT bei verschiedenen pH-Werten inkubiert. Die induzierten Ströme I wurden aus der Differenz der gemessenen Ströme in An- und Abwesenheit von Glycizin berechnet. Es sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von sieben Oozyten aus je zwei verschiedenen Oozytenpräparationen dargestellt.

die Aufnahme von Glycizin sehr gering. Mit steigender  $H^+$ -Konzentration erhöhte sich die Transportrate, und erreichte bei pH 5,5 und 5,0 ein Maximum. Die Michaelis-Konstante ( $K_t$ ), als Maß für die Affinität eines Substrats zum Transportsystem, war für Glycizin mit  $11,4 \pm 1,2$  mM vergleichbar mit Angaben aus der Literatur (Boll *et al.* 2002; Boll *et al.* 2003a; Foltz *et al.* 2005). Somit konnte auch im *X. laevis* Oozyten-Expressionssystem die Funktionalität des Transporters bestätigt werden.

#### 4.3.2. Einfluss von DTT auf die Transportfunktion von hPAT1

Nach der Charakterisierung des Transporters im *X. laevis* Oozyten-Expressionssystem wurden hPAT1-exprimierende HRPE-Zellen und *X. laevis* Oozyten für 20 Minuten mit 10 mM DTT bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Bestimmung der Transportaktivität durch Aufnahme von Tritium-markiertem L-Prolin in die HRPE-Zellen bzw. durch elektrophysiologische Messungen mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklammer-Technik an Oozyten.



**Abb. 4.20 Einfluss des reduzierenden Reagens DTT auf die Transportaktivität von hPAT1.** (A) Wasser-injizierte (H<sub>2</sub>O) und hPAT1 cRNA-injizierte (hPAT1) *X. laevis* Oozyten wurden für 20 min bei Raumtemperatur in Barth's Medium mit (10mM) und ohne DTT (0 mM) inkubiert. Danach wurde der durch 20 mM Glyzin in ORi PAT pH 6,5 induzierte Strom in An- bzw. Abwesenheit von DTT (10 mM) ermittelt. Die induzierten Ströme I<sub>20Gly</sub> wurden aus der Differenz der gemessenen Ströme in An- und Abwesenheit der Aminosäure berechnet. Mittelwert ± S.E.M. von n = 6 Oozyten aus je zwei verschiedenen Oozytenpräparationen. (B) Mit Leervektor pSPORT1 und pSPORT1-hPAT1 (hPAT1) transfizierte HRPE-Zellen wurden für 20 min bei Raumtemperatur mit (10 mM) und ohne DTT (0 mM) behandelt. Die Aufnahme von L-[<sup>3</sup>H]Prolin (20 nM) wurde in An- bzw. Abwesenheit von 10 mM DTT bei pH 6,0 über 10 min bestimmt. Mittelwert ± S.E.M., n = 4.

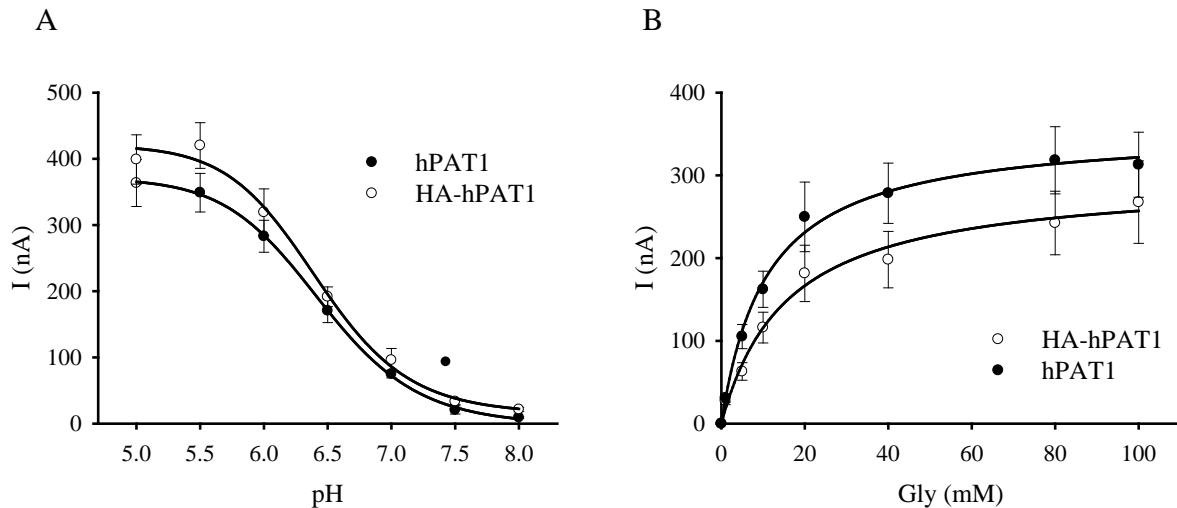
In Abbildung 4.20 ist deutlich zu erkennen, dass die Transportaktivität in beiden Systemen durch DTT-Behandlung stark inhibiert wird. Unter reduzierenden Bedingungen war der Transport von Glyzin in hPAT1-exprimierenden Oozyten auf ca. 15 % des Stromes in unbehandelten Oozyten verringert (Abb. 4.20 A). Als Kontrolle wurden Wasser-injizierte Oozyten verwendet. Die L-[<sup>3</sup>H]Prolinaufnahme in hPAT1 exprimierenden HRPE-Zellen war, im Vergleich zu unbehandelten Zellen, auf ca. 40 % gesenkt (Abb. 4.20 B). Als Kontrolle wurden mit Leervektor pSPORT1-transfizierte HRPE-Zellen mitgeführt. Somit konnte in zwei verschiedenen Expressionssystemen unabhängig voneinander gezeigt werden, dass DTT einen inhibierenden Effekt auf die Transportfunktion von hPAT1 besitzt. Diese Ergebnisse deuten auf die Existenz einer funktionell wichtigen Disulfidbrücke hin. Unterstützt wird diese Vermutung durch Befunde aus der Literatur. Der inhibierende Effekt von DTT auf die Transportfunktion von SGLT1 wurde durch die Reduktion der Disulfidbrücke erklärt (Gagnon *et al.* 2006). Auch für G-Protein gekoppelte Rezeptoren, wie z.B. *Gonadotropin-releasing* Hormon Rezeptor und Melanocortin-1 Rezeptor, wurden solche Beobachtungen beschrieben (Cook & Eidne 1997; Frändberg *et al.* 2001).

### 4.3.3. Untersuchung der Transportaktivität und Oberflächenexpression von Cystein-Einzelmutanten

Im nächsten Schritt sollten die für die Transportfunktion essentiellen Cysteinreste in hPAT1 identifiziert werden. Dazu wurden Mutagenesestudien durchgeführt. Mit Hilfe solcher Untersuchungen konnten z.B. für DAT und SERT Cysteinreste ermittelt werden, die an einer Disulfidbrücke beteiligt sind (Chen *et al.* 1997; Chen *et al.* 2007a). Des Weiteren ermöglicht diese Methode die Identifizierung funktionell wichtiger Cysteinseitenketten, wie es beispielsweise für rOCT1, rOCT2 und MATE1 gezeigt wurde (Sturm *et al.* 2007; Asaka *et al.* 2007).

Die extrazellulären Cysteinreste C180, C329 und C473 wurden in hPAT1 durch zielgerichtete Mutagenese jeweils durch Alanin bzw. Serin ersetzt. Die erhaltenen Einzelmutanten wurden als C180A, C180S, C329A, C329S, C473A und C473S bezeichnet. Um die Detektion des Proteins in nachfolgenden Western Blot- und Immunfluoreszenz-Analysen zu erleichtern, wurde das Wildtyptransportprotein (nicht-mutiert) und alle Einzelmutanten mit einem N-terminalen Hämagglutinin (HA)-tag exprimiert (HA-hPAT1). Für die Klonierung des Wildtyp-Transporters wurde die codierende Sequenz mittels PCR aus dem Vektor pSPORT1-HA-hPAT1 (Metzner *et al.* 2008) amplifiziert und in den Oozyten-Expressionsvektor pNKS inseriert (siehe Kapitel 2.5, Tab. 2.16 und 2.14). Dieses Konstrukt diente als *template* für die nachfolgenden Mutagenese-Reaktionen (siehe Kapitel 2.5, Tab. 2.15 und Kapitel 3.2.4)

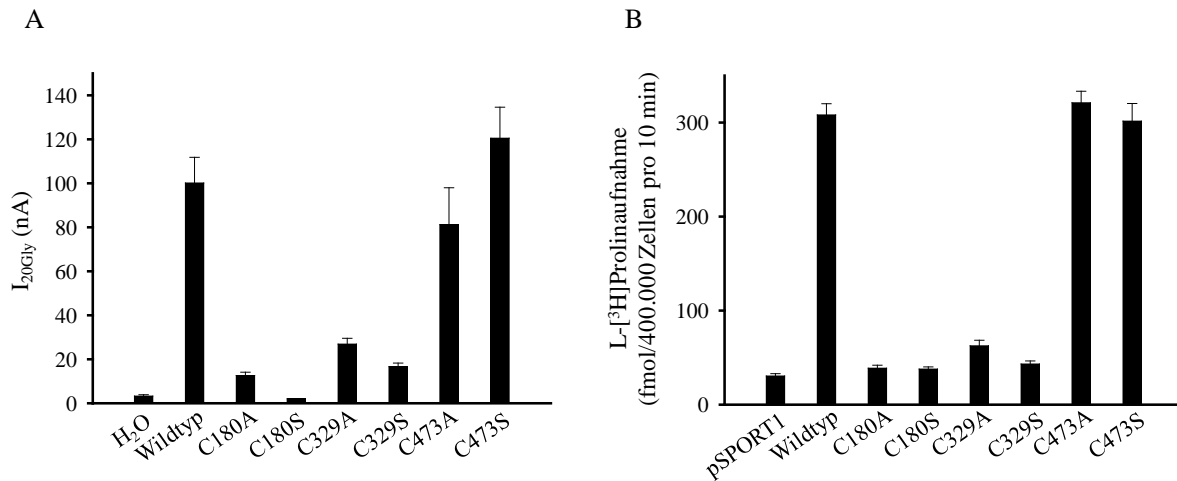
Für den heterolog in HRPE-Zellen exprimierten Transporter wurde bereits gezeigt, dass Transporteigenschaften wie Aktivität, Affinität und Substratspezifität durch das Einführen eines HA-tags nicht beeinflusst werden (Metzner *et al.* 2008). Für das *X. laevis* Oozyten-Expressionssystem sind Experimente zur pH-Abhängigkeit und der Transportaktivität von hPAT1 und HA-hPAT1 in Abbildung 4.21 dargestellt. Bei beiden Transportervarianten wird der Glyzintransport durch einen nach innen gerichteten H<sup>+</sup>-Gradienten stimuliert. Des Weiteren ist der Transport in beiden Fällen mit vergleichbaren Maximalströmen von 312 ± 40 nA (hPAT1) und 268 ± 50 nA (HA-hPAT1) sättigbar. Die ermittelten K<sub>t</sub>-Werte von 11,4 ± 1,2 mM für hPAT1 und 12,4 ± 1,7 mM für HA-hPAT1 sind nahezu identisch. Somit hat die Fusion eines HA-tags an den N-Terminus des Proteins keinen Einfluss auf die Transportfunktion. In allen nachfolgenden Experimenten wurde ausschließlich mit dem Fusionsprotein HA-hPAT1 gearbeitet.



**Abb. 4.21 Funktionelle Charakterisierung von HA-hPAT1 und hPAT1 im *X. laevis*-Expressions-system.** (A) hPAT1- und HA-hPAT1-exprimierende Oozyten wurden mit 20 mM Glyzin in ORi PAT bei verschiedenen pH-Werten inkubiert. Die induzierten Ströme I wurden aus der Differenz der gemessenen Ströme in An- und Abwesenheit von Glyzin berechnet. Es sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von sieben gemessenen Oozyten aus je zwei verschiedenen Oozytenpräparationen dargestellt. (B) hPAT1- und HA-hPAT1-exprimierende Oozyten wurden in ORi PAT pH 6,5 mit verschiedenen Glyzinkonzentrationen inkubiert. Die induzierten Ströme I wurden aus der Differenz der gemessenen Ströme in An- und Abwesenheit von Glyzin berechnet. Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von  $n = 6$  Oozyten von je zwei verschiedenen Oozytenpräparationen.

Nach Bestimmung der Transportcharakteristika des Wildtypproteins erfolgte die Untersuchung der Funktion der generierten Cystein-Einzelmutanten in cRNA-injizierten Oozyten und cDNA-transfizierten HRPE-Zellen. Mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklammer-Technik wurde für den Wildtyp und für jede Einzelmutante der durch Glyzin induzierte Strom ermittelt (Abb. 4.22 A). Wasser-injizierte Oozyten dienten als Kontrolle. Der Austausch der konservierten Cysteinreste an Position 180 und 329 führte zu einer deutlich verringerten Transportaktivität der entsprechenden Proteinvarianten. Die Ströme der C180A-, C180S-, C329A- und C329S-Mutanten waren, bezogen auf den Wildtyp, auf 13 %, 2 %, 27 % und 17 % reduziert. Die Substitution des nicht-konservierten Cysteinrestes an Position 473 hatte dagegen nur einen geringen Einfluss auf die Transportaktivität von hPAT1. Die Glyzin-induzierten Ströme der Mutanten C473A und C473S waren mit denen des Wildtyptransporters vergleichbar.

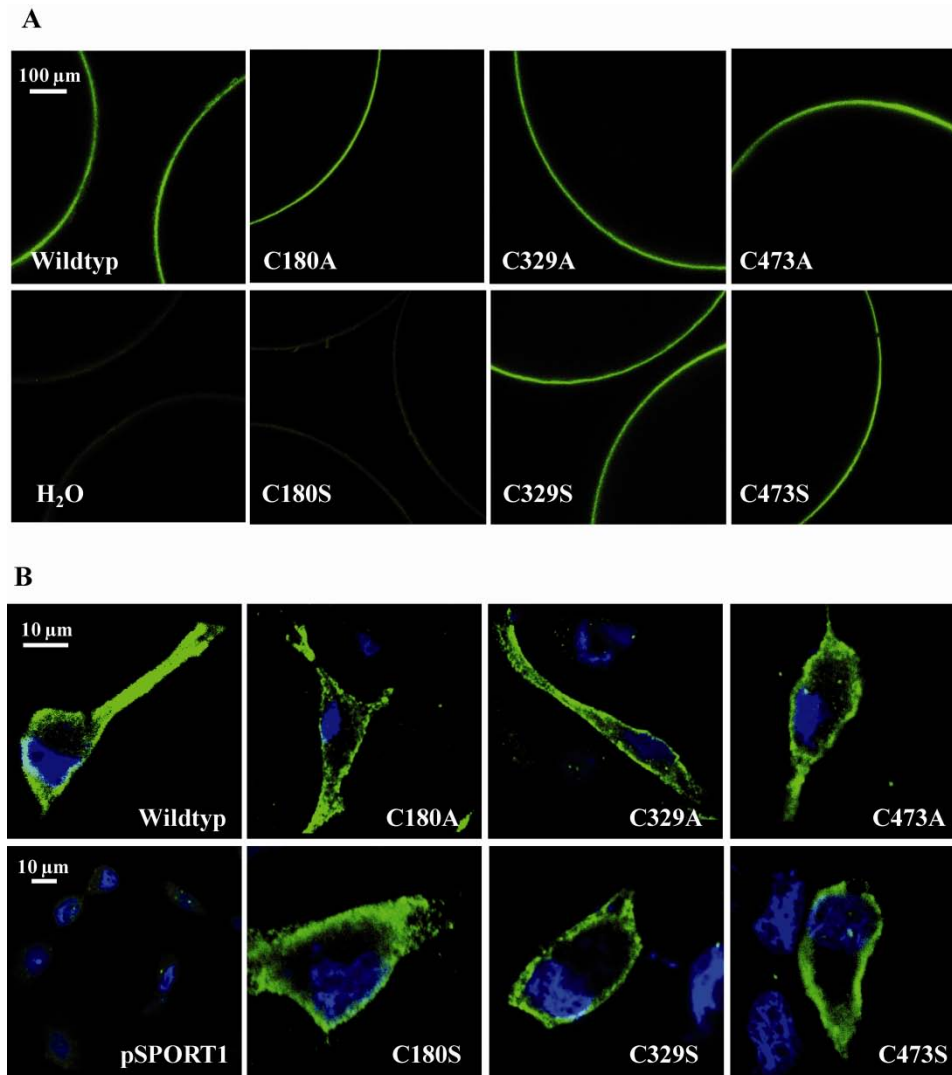
Ähnliche Ergebnisse wurden für die in HRPE-Zellen exprimierten Cystein-Mutanten erhalten (Abb. 4.22 B). Als Kontrolle wurden HRPE-Zellen verwendet, die mit dem Leervektor pSPORT1 transfiziert wurden. Hier resultierte der Austausch der konservierten Cysteinreste



**Abb. 4.22 Transportaktivität des Wildtyptransporters und der Cystein-Mutanten von HA-hPAT1.** (A) *X. laevis* Oozyten wurden mit der HA-hPAT1 cRNA des Wildtypproteins oder der Mutanten injiziert. Wasser-injizierte Oozyten (H<sub>2</sub>O) dienen als Kontrolle. Die durch 20 mM Glyzin induzierten Ströme  $I_{20\text{Gly}}$  wurden aus der Differenz der gemessenen Ströme in An- und Abwesenheit der Aminosäure berechnet. Mittelwert  $\pm$  S.E.M.,  $n = 5-6$  Oozyten aus je zwei verschiedenen Oozytenpräparationen. (B) L-[<sup>3</sup>H]Prolin-Aufnahme (20 nM, 10 min, pH 6,0) in Wildtyp- und Mutantexprimierenden HRPE-Zellen. Mit Leervektor pSPORT1 transfizierte HRPE-Zellen dienen als Kontrolle. Mittelwert  $\pm$  S.E.M.,  $n = 4$ .

an Position 180 und 329 in einem vollständigen Verlust der Aktivität. Die spezifische L-[<sup>3</sup>H]Prolinaufnahme der C180A-, C180S-, C329A- und C329S-Mutanten war mit der von Leervektor-transfizierten Zellen vergleichbar. Der Austausch des nicht konservierten Cysteinrestes C473 hatte keinen Einfluss auf die Transportaktivität.

Auch für andere Transporter der SLC-Superfamilie konnte ein Verlust der Transportaktivität nach ortsspezifischen Mutagenesestudien von Cysteinresten beobachtet werden. Für den Serotonin-Transporter SERT (SLC 6A4) (Chen *et al.* 1997) und den Dopamin-Transporter DAT (SLC 6A3) (Chen *et al.* 2007a) haben Untersuchungen der Einzelmutanten gezeigt, dass der Funktionsverlust auf eine verminderte Dichte der Proteine in der Plasmamembran zurückzuführen war. Um für die hPAT1-Mutanten ein verändertes *trafficking* innerhalb der Zelle oder eine fehlerhafte Insertion in die Membran auszuschließen, wurde die Plasmamembranexpression der Cystein-Einzelmutanten mittels Immunfluoreszenz-Analysen untersucht.



**Abb. 4.23 Immunfluoreszenz-Analyse des Wildtyptransporters und der Cystein-Mutanten von HA-hPAT1.** (A) *X. laevis* Oozyten wurden mit der HA-hPAT1 cRNA des Wildtypproteins und der Mutanten injiziert. Wasser-injizierte Oozyten (H<sub>2</sub>O) dienen als Kontrolle. Die Anfärbung erfolgte mittels eines primären anti-HA-tag Antikörpers aus Kaninchen und eines sekundären anti-Kaninchen Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 Antikörpers aus Ziege. (B) HRPE-Zellen wurden mit der HA-hPAT1 cDNA des Wildtypproteins- und der Mutanten transfiziert. Mit Leervektor pSPORT1 transfizierte HRPE-Zellen dienen als Kontrolle. Für die Anfärbung der Transporterproteine wurde ein primärer anti-HA-tag Antikörper aus Kaninchen und ein sekundärer anti-Kaninchen Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 Antikörper aus Ziege verwendet. Zellkerne wurden mittels DAPI (blau) detektiert.

In Abbildung 4.23 sind Immunfluoreszenzstudien an cRNA-injizierten *X. laevis* Oozyten und cDNA-transfizierten HRPE-Zellen dargestellt. Als Kontrolle wurden Wasser-injizierte Oozyten bzw. mit Leervektor pSPORT1 transfizierte HRPE-Zellen mitgeführt. In *X. laevis* Oozyten zeigten alle Cystein-Einzelmutanten, bis auf eine, eine membranständige Lokalisation. Die Intensität der Immunfluoreszenz der C180S-Mutante war mit der von Kontroll-Oozyten vergleichbar. Somit könnte der Aktivitätsverlust dieser Mutante hypothetisch durch eine vermin-



derte Plasmamembranexpression erklärbar sein. Interessanterweise hatte der Austausch des Cysteinrestes an Position 180 gegen Alanin keine Auswirkungen auf die Lokalisierung des Proteins. Ähnliche Beobachtungen wurden von Karnik und Mitarbeitern für den G-Protein gekoppelten Rezeptor Rhodopsin beschrieben (Karnik *et al.* 1988). Sie haben gezeigt, dass der Austausch eines konservierten Cysteinrests gegen Serin die Rezeptorfaltung und Stabilität erheblich beeinträchtigte. Wahrscheinlich sind diese Effekte durch die hohe Hydrophilie der Serinseitenkette bedingt.

Die Immunfluoreszenz-Analyse der in HRPE-Zellen exprimierten Cystein-Mutanten ergab eine membranständige Lokalisation für alle Proteinvarianten.

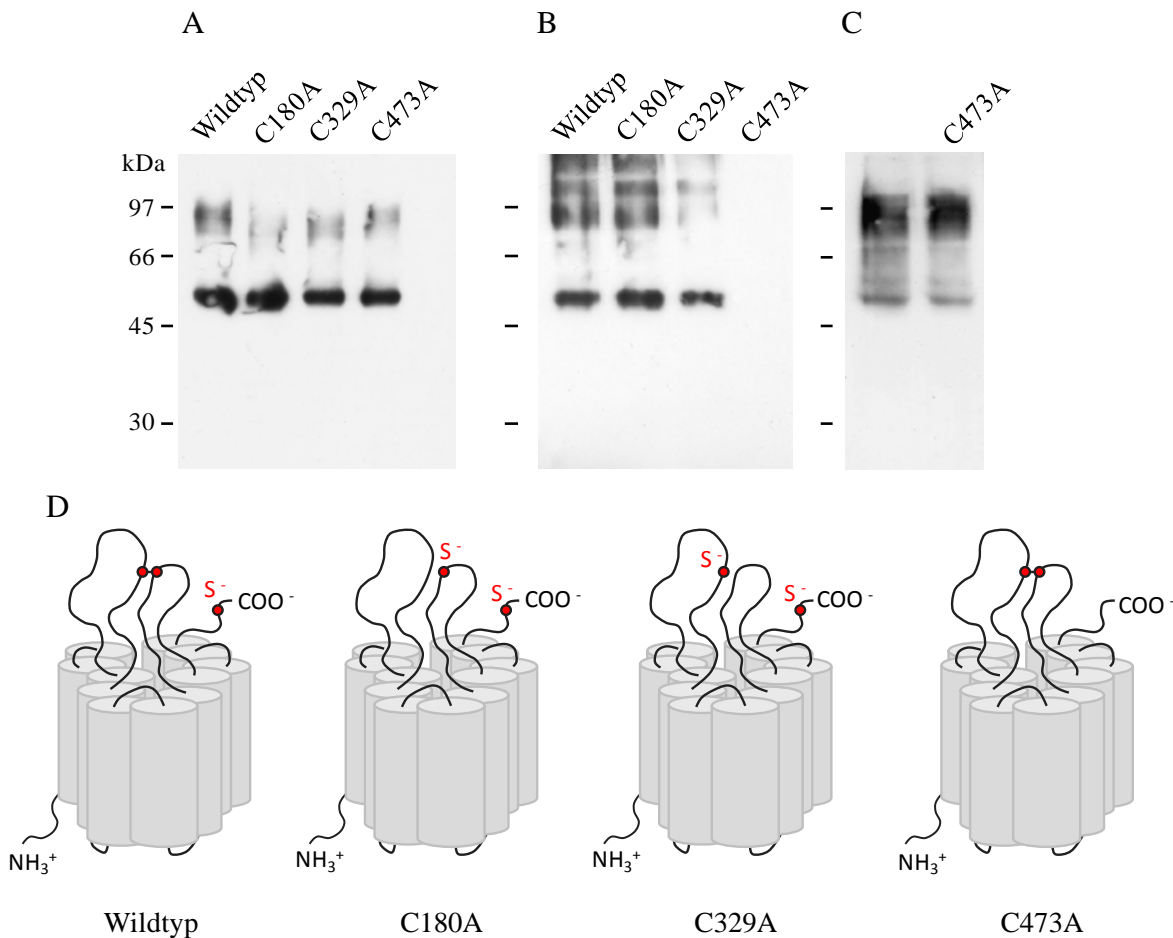
Diese Untersuchungen zeigen, dass der Verlust der Transportaktivität der Cystein-Mutanten C180A, C180S, C329A und C329S nicht durch eine Misslokalisierung der mutierten Proteine innerhalb der Zelle verursacht wird. Diese Ergebnisse und insbesondere die Tatsache, dass nur der Austausch der hoch konservierten Cysteinreste 180 und 329 zu einem Aktivitätsverlust führen, deuten auf eine Disulfidverbrückung zwischen C180 und C329 hin (Dorn *et al.* 2009b).

#### 4.3.4. Nachweis einer Disulfidbrücke in hPAT1

##### *Zelloberflächenbiotinylierung freier SH-Gruppen der Cystein-Einzelmutanten*

Im folgenden Abschnitt wurden an cRNA-injizierten Oozyten Biotinylierungsstudien mit einem Membran-impermeablen thiolreaktiven Maleimid-PEG<sub>11</sub>-Biotin Reagens durchgeführt. Durch die Maleimidgruppe ist eine spezifische Markierung von freien Sulfhydrylgruppen in Zelloberflächenproteinen möglich. Über das Biotinmolekül können die markierten Proteine durch Inkubation mit immobilisiertem Neutravidin isoliert werden.

Der H<sup>+</sup>-Aminosäure-Cotransporter hPAT1 verfügt über drei putativ extrazelluläre Cysteinreste. Unter der Annahme einer Disulfidverbrückung innerhalb von hPAT1 sollte für den Wildtyp eine Biotinylierung des Proteins über die dritte, freie Sulfhydrylgruppe stattfinden. In den Einzelmutanten würde eine Disulfidbindung zwischen den zwei verbleibenden Cysteinresten eine Markierung der Mutante mit Biotinylierungsreagens verhindern.



**Abb. 4.24 Oberflächenbiotinylierung freier Sulfhydrylgruppen im HA-hPAT1 Wildtyp und den Cystein-Mutanten mittels Maleimid-PEG<sub>11</sub>-Biotin.** (A) Lysat von biotinylierten Wildtyp- oder Mutanten-exprimierenden HA-hPAT1 Oozyten. Das Lysat Wasser-injizierter Oozyten (H<sub>2</sub>O) diente als Kontrolle. (B) Eluate der Neutravidin-beads, die zuvor mit den in (A) dargestellten Lysaten inkubiert wurden. (C) Wildtyp- und C473A-HA-hPAT1-exprimierende Oozyten wurden vor der Biotinylierung für 20 min mit 10 mM DTT inkubiert. Danach wurden die Lysate mit Neutravidin-beads inkubiert. In der Abbildung sind die Eluate der Neutravidin-beads dargestellt. Die Detektion der Proteine in (A), (B) und (C) erfolgte durch Western Blot-Analyse mittels anti-HA-tag Antikörper. (D) Schematische Darstellung des Wildtypproteins und der Cystein-Einzelmutanten.

Für die Biotinylierungsexperimente wurden *X. laevis* Oozyten mit den cRNAs der entsprechenden Einzelmutanten injiziert. Nach Biotinylierung freier Sulfhydrylgruppen wurden die Oozyten lysiert und die markierten Membranproteine wurden über Neutravidin-beads isoliert. In Abbildung 4.24 A und B sind die Oozytenlysate und die Eluate der beads dargestellt<sup>24</sup>. Als

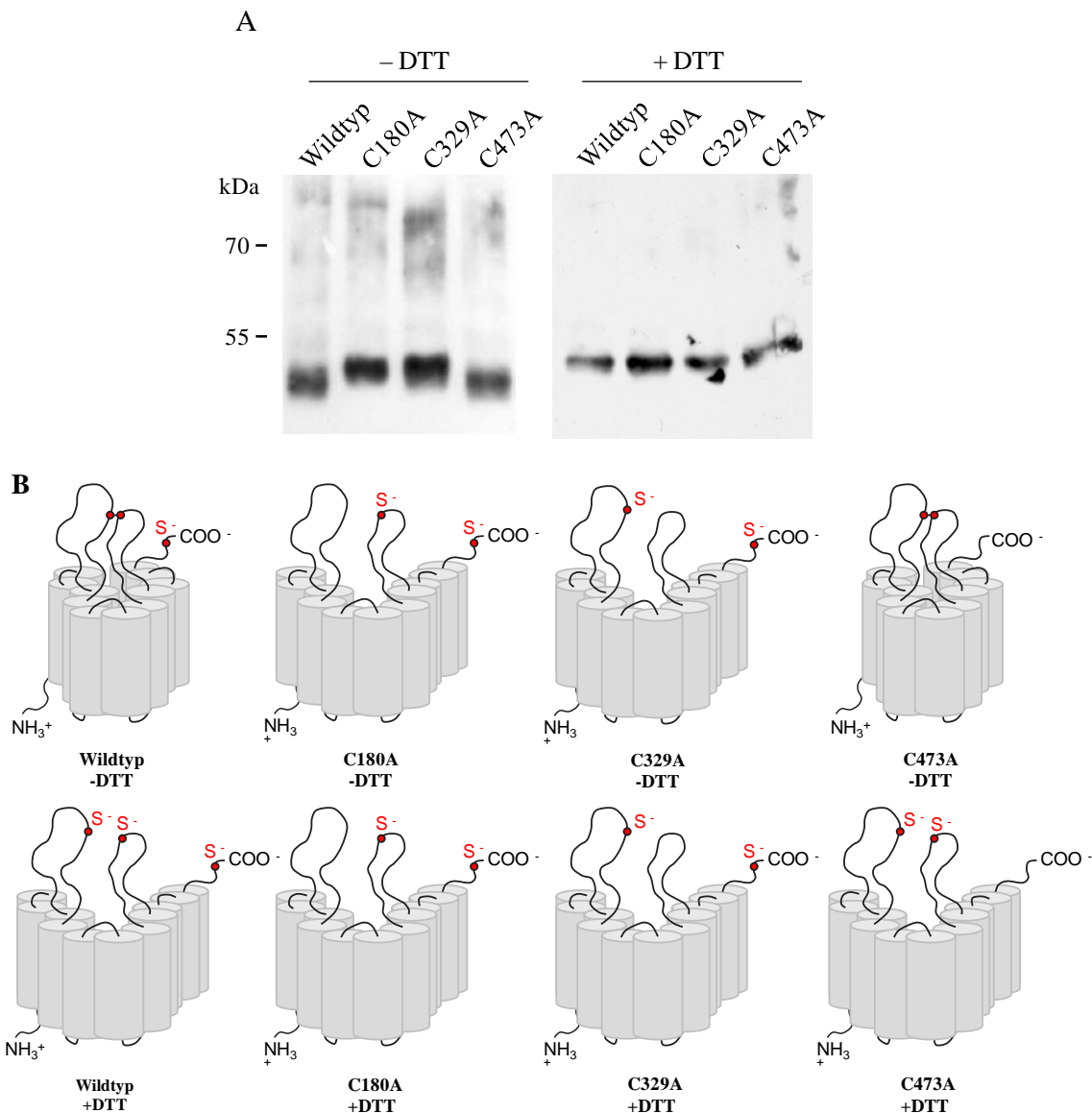
<sup>24</sup> Die in Abbildung 4.24 dargestellten ausgedehnten Banden im Bereich des 97 kDa Molekularmassenstandards repräsentieren höchstwahrscheinlich Dimere und Trimere des hPAT1 Proteins (53 kDa), die durch Aggregation während der Probenpräparation entstehen. Die Ablösung des Biotin-Proteinkomplexes vom Avidinmolekül durch Erwärmung auf bis zu 95 °C ist dabei entscheidend. Da Aggregation durch höhere Temperaturen begünstigt wird, führt wahrscheinlich diese notwendige Probenpräparation zu den beobachteten Aggregaten.

Kontrolle wurde in Abbildung 4.24 A das Lysat von Wasser-injizierten Oozyten aufgetragen. Wie erwartet erfolgte eine Biotinylierung des Wildtyptransporters. Des Weiteren wurden freie Sulfhydrylgruppen in den Cystein-Mutanten C180A und C329A nachgewiesen. Nur für die Mutante C473A konnte keine Biotinylierung gezeigt werden. Entweder sind die zwei verbleibenden Cysteinreste 180 und 329 in dieser Mutante für das Biotinylierungsreagens unzugänglich oder durch eine Disulfidbindung verbrückt. Um die erste Möglichkeit auszuschließen, wurden Wildtyp- und C473A-exprimierende Oozyten vor der Biotinylierungsreaktion für 20 Minuten mit 10 mM DTT reduziert. Die Western Blot-Analyse der Eluatfraktionen zeigt, dass unter diesen Bedingungen eine Markierung freier Sulfhydrylgruppen in der C473A-Mutante möglich ist (Abb. 4.24 C). Somit sind die Cysteinreste C180 und C329 prinzipiell für das Biotinylierungsreagens frei zugänglich. Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 4.24 D die Cystein-Einzelmutanten entsprechend der erhaltenen Biotinylierungsergebnisse schematisch dargestellt. Das Fehlen von markierbaren Sulfhydrylgruppen in der Cystein-Einzelmutante C473A deutet stark auf die Existenz einer Disulfidbrücke zwischen C180 und C329 hin. Des Weiteren kann aufgrund der Biotinylierung des Wildtyptransporters eine Dimerisierung über eine intermolekulare Disulfidbindung über den dritten Cysteinrest ausgeschlossen werden.

#### *SDS-PAGE der Cystein-Einzelmutanten unter nicht-reduzierten und reduzierten Bedingungen*

In den nachfolgenden Experimenten wurde die Mobilität der Cystein-Einzelmutanten in einem SDS-Polyacrylamidgel unter nicht-reduzierenden (oxidierenden) und reduzierenden Bedingungen untersucht. Dafür wurden wieder *X. laevis* Oozyten mit den entsprechenden cRNAs der Einzelmutanten injiziert. Die Oozyten wurden lysiert und das Lysat wurde, wie unter Punkt 3.7.1. beschrieben, sowohl unter nicht-reduzierenden als auch unter reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt.

Abbildung 4.25 A zeigt die Western Blot-Analyse der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Unter nicht-reduzierenden Bedingungen migrieren der Wildtyptransporter und die Mutante C473A schneller als unter reduzierenden Bedingungen. Die erhöhte Mobilität eines Proteins in der SDS-PAGE kann auf eine kompaktere Struktur, z.B. unter oxidierenden Bedingungen, durch Ausbildung einer Disulfidbindung, zurückgeführt werden. So wird vermutlich im Wildtyp und auch in der Mutante C473A eine Disulfidbrücke ausgebildet.



**Abb. 4.25 SDS-PAGE des HA-hPAT1 Wildtyptransporters und der Cystein-Mutanten unter nicht-reduzierenden (-DTT) und reduzierenden (+DTT) Bedingungen.** (A) Lysat von Wildtyp- oder Mutanten-exprimierenden HA-hPAT1 Oozyten wurden unter nicht-reduzierenden und reduzierenden Bedingungen in einem 7,5 %igen SDS-Gel separiert. (B) Schematische Darstellung des Wildtypproteins und der Cystein-Einzelmutanten unter nicht-reduzierenden (-DTT) und reduzierenden Bedingungen (+DTT).

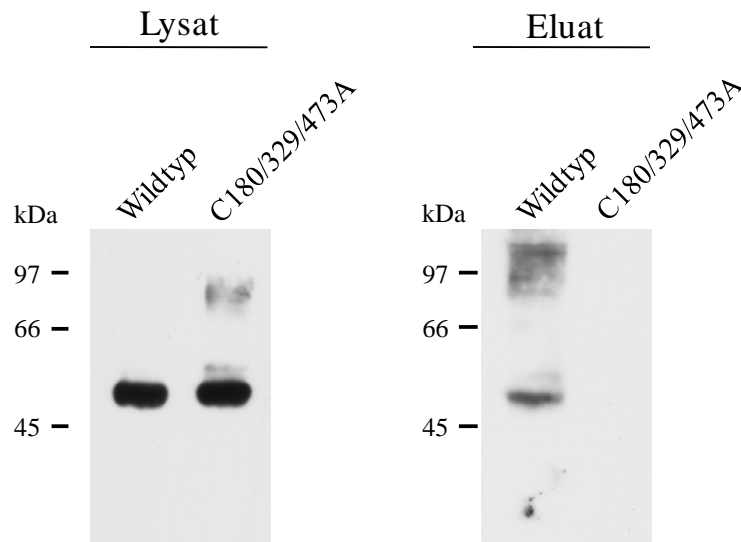
Für die Mutanten C180A und C329A kann kein Unterschied im Laufverhalten unter nicht-reduzierenden und reduzierenden Bedingungen beobachtet werden. Die Proteinbanden migrieren auf der Höhe der Wildtypproteinbande unter reduzierenden Bedingungen, was auf den Verlust einer Disulfidbrücke in diesen Proteinvarianten hinweist. Die schematische Darstellung der Cystein-Einzelmutanten in Abbildung 4.25 B veranschaulicht die vermutliche Verbrückung in hPAT1 und erklärt die verschiedenen Mobilitäten unter den getesteten

Bedingungen. Die Ergebnisse dieses Versuchs zeigen, dass hPAT1 eine Disulfidverbrückung zwischen den Cysteinresten C180 und C329 enthält und stimmen mit den Befunden aus den Biotinylierungsstudien überein (Dorn *et al.* 2009b).

#### *Zelloberflächenbiotinylierung freier SH-Gruppen einer Cystein-Dreifachmutante*

Die Ergebnisse der beiden zuvor beschriebenen Versuche zeigen sehr deutlich, dass C180 und C329 an der Ausbildung von Disulfidbindungen beteiligt sein müssen. Mit Hilfe dieser Versuche kann aber nicht mit Sicherheit bewiesen werden, dass die Bindung genau zwischen diesen Cysteinresten besteht. Die Ergebnisse des Biotinylierungsassays und der SDS-PAGE lassen auch das Szenario zu, dass sowohl C180 als auch C329 jeweils mit einem Cysteinrest aus dem Transmembranbereich eine Disulfidbindung eingehen (Abb. 4.17). Auch für eine solche Verknüpfung der Cysteinreste würde man die beobachteten Ergebnisse erhalten. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde über zielgerichtete Mutagenese eine Dreifach-Cysteinmutante hergestellt (C180/329/473A), in der alle drei putativ extrazellulären Cysteinreste gegen Alaninreste substituiert wurden. Würden C180 und C329 tatsächlich je eine Bindung mit einem der Cysteinreste in den Transmembrandomänen eingehen, sollten in der Dreifach-Mutante die entsprechenden Partnercysteine freie Sulfhydrylgruppen bereit stellen. Damit wäre auch eine Biotinylierung der Dreifachmutante möglich.

Um diese Hypothese zu prüfen wurden *X. laevis* Oozyten mit der cRNA der Dreifach-Cysteinmutante injiziert und anschließend mit Maleimid-PEG<sub>11</sub>-Biotin Reagens inkubiert. Als Kontrolle wurden Wildtyp-exprimierende Oozyten mitgeführt. Die Eluatfraktionen der Neutravidin-*pulldown* Experimente in Abbildung 4.26 zeigen, dass nur das Wildtypprotein biotinyliert werden konnte. Für die Dreifachmutante wurde keine Proteinbande im Eluat detektiert. Um auszuschließen, dass die fehlende Oberflächenbiotinylierung durch eine verminderte Plasmamembranlokalisation der Dreifachmutante verursacht wird, wurde diese mittels Immunfluoreszenz analysiert. Diese Untersuchung zeigte, dass die Dreifachmutante, analog zum Wildtypprotein, in der Plasmamembran exprimiert wird. Damit beweist die fehlende Oberflächenbiotinylierung der Dreifachmutante, dass die Sulfhydrylgruppen der Cysteinreste in den Transmembrandomänen nicht frei zugänglich sind und somit keine potentiellen Partner für Disulfidbrücken für C180 und C329 darstellen.



**Abb. 4.26 Oberflächenbiotinylierung freier Sulfhydrylgruppen in HA-hPAT1 Wildtyp und der Cystein-Dreifachmutante mittels Maleimid-PEG<sub>11</sub>-Biotin.** Die Lysate von biotinylierten Wildtyp- und Dreifachmutante-exprimierenden HA-hPAT1 Oozyten wurden mit Neutravidin-*beads* inkubiert. Die Analyse der Lysat- und Eluatfraktionen erfolgte durch Western Blot mittels anti-HA-*tag* Antikörper.

#### 4.3.5. Zusammenfassung der Ergebnisse

In diesem Abschnitt der Arbeit sollte die Funktion der putativ extrazellulären Cysteinreste C180, C329 und C473 in hPAT1 und die Existenz einer potentiellen Disulfidbindung untersucht werden. In einem ersten Versuch wurde gezeigt, dass die Transportaktivität des Wildtyptransporters in zwei verschiedenen Expressionssystemen durch das reduzierende Reagens DTT stark inhibiert wird. Dieser Befund deutete auf das Vorhandensein einer funktionell wichtigen Disulfidbrücke hin. Die Expression der Cystein-Einzelmutanten in *Xenopus* Oozyten und HRPE-Zellen zeigte, dass die Mutanten C180A/S und C329A/S die typischen Substrate Prolin und Glyzin weder binden noch transportieren konnten. Der durch die Substitution der hoch konservierten Cysteinreste verursachte Funktionsverlust verdeutlicht die funktionelle oder strukturelle Bedeutung von Cysteinen in hPAT1 – einzeln oder als Teil einer Disulfidbrücke. Im Gegensatz dazu wurde für die Cystein-Mutanten C473A und C473S eine Wildtyp-ähnliche Funktionalität beobachtet. Durch Immunfluoreszenz-Studien konnte gezeigt werden, dass der Verlust der Transportfunktion nicht durch eine Fehllokalisierung der Proteine innerhalb der Zelle verursacht wird. Biochemische Charakterisierungen mittels Biotinylierung freier Sulfhydrylgruppen und SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden und reduzierenden Bedingungen der Cystein-Mutanten erbrachten letztlich den Beweis einer Disulfidverbrückung

zwischen den Cysteinresten 180 und 329. Des Weiteren konnte eine intermolekulare Disulfidbrücke ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Disulfidverbrückung der extrazellulären Schleife zwei und vier essentiell für die Transportfunktion von hPAT1 ist. Für das *trafficking* und die Membranlokalisierung des Transporters hat die Disulfidbindung keine Bedeutung (Dorn *et al.* 2009b).

Wie bereits erwähnt, wurden für hPAT1 zwei verschiedene Transmembrandomänen (TMD)-Modelle vorgeschlagen. Chen und Mitarbeiter gehen von einem 9 TMD-Modell aus (Chen *et al.* 2003), wohingegen Boll und Mitarbeiter die Organisation des Transporters in 11 TMD diskutieren (Boll *et al.* 2003b). Die untersuchten Cysteinreste C180, C329 und C473 sind im 11 TMD-Modell in den extrazellulären Schleifen lokalisiert. Im 9 TMD-Modell befinden sich C180 und C329 in den intrazellulären Schleifen und könnten im reduzierenden Milieu des Cytoplasmas keine Disulfidbindungen ausbilden. Damit stützen unsere Ergebnisse das 11 TMD-Modell für hPAT1.

Die Befunde liefern auch erste Informationen über die putative dreidimensionale Konformation von hPAT1. Die Disulfidbrücke zwischen C180 und C329 bringt sowohl die extrazellulären Schleifen zwei und vier als auch die Transmembrandomänen drei, vier, sieben und acht in räumliche Nähe zueinander. Der Verlust der Disulfidbrücke hat vermutlich einen funktionsentscheidenden Effekt auf die Tertiär-Struktur des Transporters. Substrate werden nicht mehr transportiert, möglicherweise nicht mehr gebunden. Damit wird die Funktion von Disulfidbrücken als essentielle Strukturbildner nochmals verdeutlicht. Es kann angenommen werden, dass die Disulfidverknüpfung in den extrazellulären Schleifen zwei und vier an der Bildung und Stabilisierung der putativen Bindungstasche und Translokations-Pore von hPAT1 beteiligt ist.

#### 4.4. Einfluss von N-Glykosylierungen auf die Transportaktivität und Oberflächenexpression von hPAT1

In diesem Teil der Arbeit sollte überprüft werden, ob hPAT1 *in vivo* an potentiellen N-Glykosylierungsstellen modifiziert wird. Danach sollte der Einfluss vorhandener Glykanstrukturen auf das *trafficking* und die Funktion des Transporters untersucht werden.

Die N-Glykosylierung stellt die häufigste kotranslationale Proteinmodifikation sezernierter und Membran-ständiger Proteine in eukaryotischen Zellen dar. Dabei wird eine komplexe Kohlenhydratstruktur kovalent an einen Asparaginrest geknüpft. Innerhalb der Konsensussequenz Asn-Xaa-Ser/Thr (Xaa ≠ Pro) fungiert die Amidgruppe des Asparagins als Akzeptor für das Oligosaccharid (Kornfeld & Kornfeld 1985).<sup>25</sup>

Die N-Glykosylierungsreaktion beginnt im Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) mit der Übertragung eines vorwiegend aus Mannoseresten bestehenden *core*-Oligosaccharids (GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>Glc<sub>3</sub>) auf Asparaginreste einer wachsenden Polypeptidkette. Das *core*-Oligosaccharid ist dabei an das Membranlipid Dolichol gebunden und wird mit Hilfe des Enzyms Oligosaccharyltransferase übertragen. Die glykosylierten Proteine gelangen danach über Transportvesikel in den Golgi-Apparat. In diesem Kompartiment erfolgt dann eine weitere Prozessierung des *core*-Oligosaccharids. Durch Abspaltung und erneutes Anbringen unterschiedlicher Zuckerreste (N-Acetylglucosamin, Galaktose, Fukose, Sialinsäure) entstehen die komplexen Glykanstrukturen.

Das Übertragen des *core*-Oligosaccharids GlcNAc<sub>2</sub>-Man<sub>9</sub>Glc<sub>3</sub> auf Asparaginreste, die Nutzung von Dolichol als Trägermolekül und die Erkennung von Asparaginresten in der Konsensussequenz Asn-Xaa-Ser/Thr (Xaa ≠ Pro) sind hoch konservierte Charakteristika der N-Glykosylierung vom niederen Eukaryoten wie der Bäckerhefe *S. cerevisiae* bis zum Menschen (Burda & Aebi 1999). Daher besitzen alle N-glykosylierten Proteine bis zum Verlassen des ERs die gleiche Kohlenhydratstruktur. Die Diversität der komplexen Glykanstrukturen wird durch die in den jeweiligen Kompartimenten des Golgi-Apparats vorhandenen Glykosidasen bzw. Glykosyltransferasen bestimmt (Helenius & Aebi 2001). Durch gewebe- oder entwicklungspezifische Expression von Glykosyltransferasen und Glykosidasen erhöht sich zusätzlich die Vielfalt der Oligosaccharidkomplexe. Dies ermöglicht eine Regulation und Variation

---

<sup>25</sup> Eine weitere Möglichkeit, Kohlenhydratketten kovalent an Proteine zu knüpfen, ist die O-Glykosylierung. Hier werden die Glykanstrukturen posttranslational im Golgi-Apparat an die OH-Funktion von Threonin und Serin angehängt. Für diese Art der Glykosylierung ist keine Konsensussequenz bekannt, vielmehr beruht sie auf strukturellen Präferenzen der umgebenden Peptidstruktur (Breloy *et al.* 2008). Im Vergleich zur N-Glykosylierung ist über die Funktion der O-Glykosylierung sehr wenig bekannt.

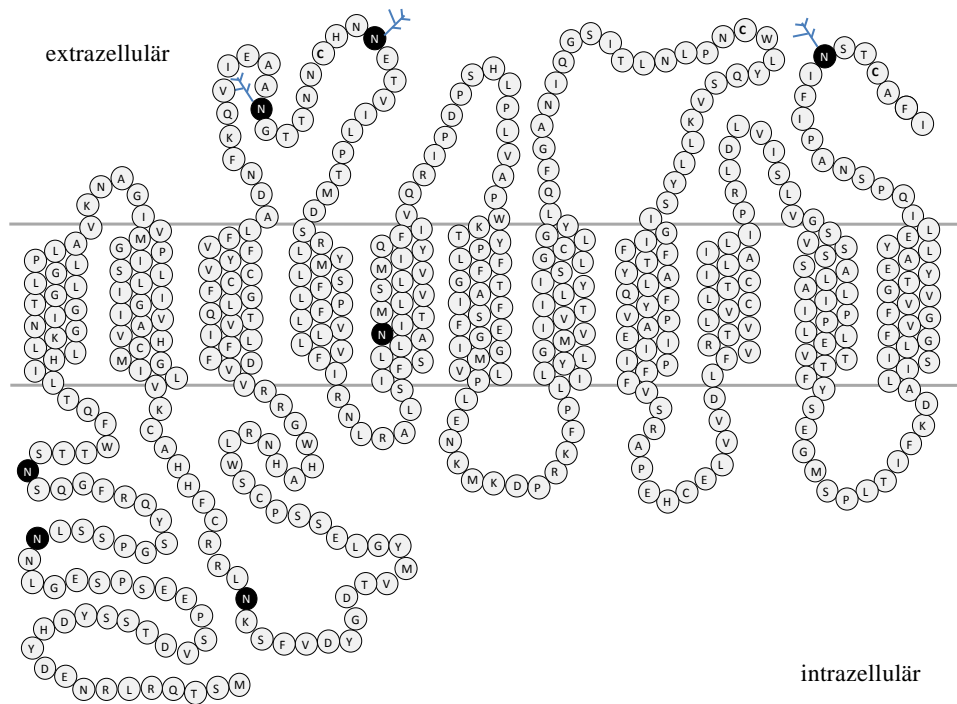


der Funktion von Glykoproteinen, ohne deren Aminosäuresequenz zu verändern. Die im Golgi-Apparat ablaufenden Modifikationen sind außerdem stark speziesspezifisch und können sogar innerhalb einer Art verschieden sein (Blutgruppen).

So vielfältig wie die Zusammensetzung der Glykanstrukturen ist auch die Funktion der Zuckerreste für Glykoproteine. Der Vergleich eines nativen Glykoproteins mit dessen deglykosylierter Variante hat gezeigt, dass die Glykanstruktur die Stabilität, Löslichkeit und Resistenz gegenüber Proteasen erhöht (Imberty & Perez 1995; Imperiali & O'Connor 1999; Kundra & Kornfeld 1999; Wormald & Dwek 1999). Eine wichtige Funktion kommt ihr auch bei dem intrazellulären Transport und der Sortierung von Proteinen zu. So erkennen und binden Mannose-spezifische Lektine im ER die Glykanstruktur und transportieren das Glykoprotein in den Golgi-Apparat (Hauri *et al.* 2000). Außerdem fungieren die Oligosaccharide als Sortierungssignale. Eine der bedeutendsten Funktionen von Glykanstrukturen ist jedoch die für die Faltung und Qualitätskontrolle von Glykoproteinen. An diesem Prozess ist maßgeblich das *core*-Oligosaccharid beteiligt, er findet demnach bereits im ER statt. Dabei kommt es zur Wechselwirkung der Glykanstrukturen mit den ER-residenten Lektin-Chaperonen Calnexin und Calreticulin. Zusammen mit der Proteindisulfidisomerase ERp57 wird im sogenannten Calnexin/Calretikulin-Zyklus die Aggregation von Faltungsintermediaten und eine Oligomerisierung unreifer Proteine inhibiert. Zudem werden unvollständig gefaltete Proteine nicht in den Golgi Apparat entlassen.

Der Einfluss der Glykosylierung auf die Funktionalität von Transportproteinen wird kontrovers diskutiert. Im Falle des Dopamin-Transporters behaupten Li *et al.*, dass die Glykanstrukturen einen Einfluss auf die Transportaktivität haben (Li *et al.* 2004). Für viele andere Transporter konnte dies aber nicht bestätigt werden. In den meisten Fällen ließ sich die veränderte Transportfunktion durch eine Misslokalisierung des Proteins innerhalb der Zelle erklären.

In der Aminosäuresequenz von hPAT1 befinden sich sieben Konsensussequenzen für N-Glykosylierungsstellen. Da die N-Glykosylierungsreaktion im ER und Golgi-Apparat abläuft, werden nur extrazellulär gelegene Asparaginseitenketten glykosyliert. Bezieht man sich auf das 11 TMD-Modell, verfügt hPAT1 extrazellulär über drei N-Glykosylierungsstellen (N174, N183 und N470) (Abb. 4.27). Diese drei Asparagine sind konserviert und können auch in PAT1 der Ratte und Maus identifiziert werden.



**Abb. 4.27 Zwei-Dimensionales Topologiemodell des humanen PAT1.** Asparaginreste innerhalb der Konsensussequenz Asn-Xaa-Ser/Thr (Xaa  $\neq$  Pro) sind schwarz dargestellt. Die putativ extrazellulär gelegenen N-Glykosylierungsstellen an Positionen 174, 183 und 470 sind durch schematisch dargestellte Glykanstrukturen (blau) markiert. Entnommen aus der Dissertation von Linda Laug (Metzner 2007).

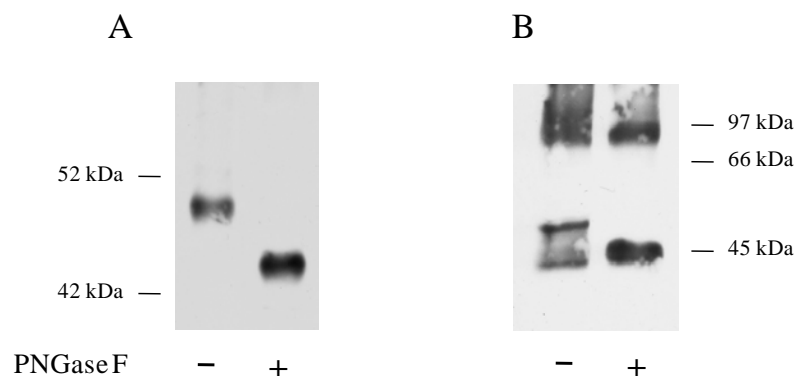
Um den Glykosylierungsstatus von hPAT1 aufzuklären, wurden Mutagenesestudien durchgeführt in denen die drei putativ extrazellulär gelegenen N-Glykosylierungsstellen N174, N183 und N470 einzeln und in verschiedenen Kombinationen gegen Glutaminreste ausgetauscht wurden (Dorn *et al.* 2009a). Für diese Studien wurden das Wildtyptransportprotein (nicht-mutiert) und alle Mutanten zur Detektion mit einem N-terminalen Hämagglutinin (HA)-tag exprimiert (HA-hPAT1). Die Charakterisierung dieses Fusionsproteins ist in Kapitel 4.3.3. beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass die Funktionalität des Transporters durch das Anbringen eines N-terminalen HA-tags nicht beeinflusst wird. Die Untersuchung der N-Glykosylierungsmutanten wurde in cRNA-injizierten *X. laevis* Oozyten durchgeführt (Jähme 2008).

#### 4.4.1. N-Glykosylierungsmuster von hPAT1

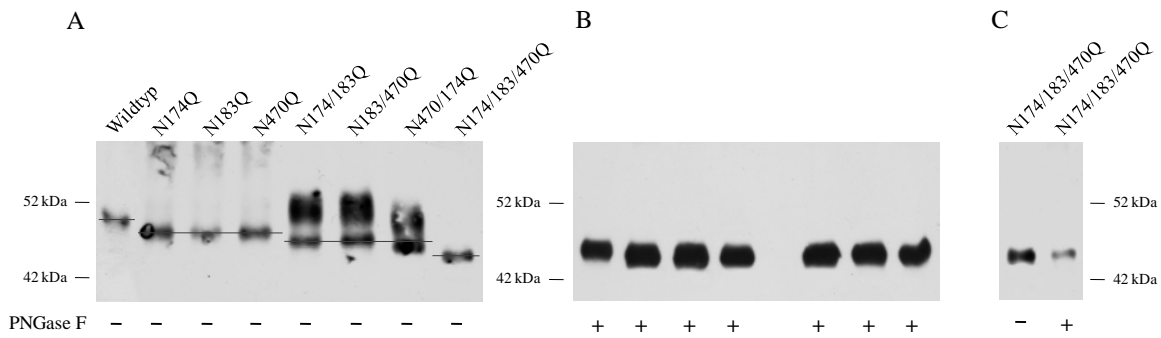
In einem ersten Experiment wurde das Lysat HA-hPAT1-exprimierender Oozyten mit dem Enzym Peptid: N-Glykosidase F (PNGase F) inkubiert. Dieses Enzym spaltet zwischen dem Asparaginrest in der Peptidsequenz und dem innersten Zuckermolekül (N-Acetylglucosamin) der Glykanstruktur. Dadurch sollten alle vorhandenen Zuckerketten vollständig entfernt und

das nicht-glykosylierte Protein erhalten werden. Je nach Komplexität beträgt das Molekulargewicht einer Oligosaccharidstruktur zwischen 1,5 und 2,5 kDa. Daher können Proteinglykosylierungen anhand von apparenten Molekulargewichtsunterschieden zwischen PNGase F-verdauten und -unverdauten Proteinen in der SDS-PAGE nachgewiesen werden. In Abbildung 4.28 A ist die Western Blot-Analyse von PNGase F-behandeltem Lysat im Vergleich zu unbehandeltem Oozyten-Lysat dargestellt. Im Lysat, das nicht mit PNGase F inkubiert wurde (–PNGase F), konnte eine Bande bei ca. 50 kDa detektiert werden. Nach Enzyminkubation (+PNGase F) lief die HA-hPAT1 spezifische Proteinbande bei ca. 45 kDa. Ein ähnliches Ergebnis wurde für das Lysat HA-hPAT1-exprimierender HRPE-Zellen erhalten. Auch hier konnte ein Molekularmassen-*shift* zwischen PNGase F-behandeltem und -unbehandeltem HA-hPAT1 beobachtet werden (Abb. 4.28 B). Diese Befunde zeigen deutlich, dass der Transporter *in vivo* glykosyliert ist.

Zur Identifizierung der *in vivo* genutzten N-Glykosylierungsstellen wurden über zielgerichtete Mutagenese Transportervarianten hergestellt, in denen die drei putativ extrazellulär gelegenen Asparaginreste N174, N183 und N470 durch Glutaminreste substituiert wurden. Zunächst wurden Einzelmutanten hergestellt. Die cRNAs der erhaltenen Glykosylierungs-Mutanten N174Q, N183Q und N470Q wurden in *X. laevis* Oozyten injiziert und die Lysate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Anhand Abbildung 4.29 A ist zu erkennen, dass die Substitution jedes einzelnen Asparaginrests in den drei untersuchten Glykosylierungs-Mutanten im Vergleich zum Wildtypprotein zu einer Verringerung des apparenten Molekulargewichts führte. Daher kann davon ausgegangen werden, dass alle drei potentiellen Glykosylierungsstellen auch tatsächlich glykosyliert werden.

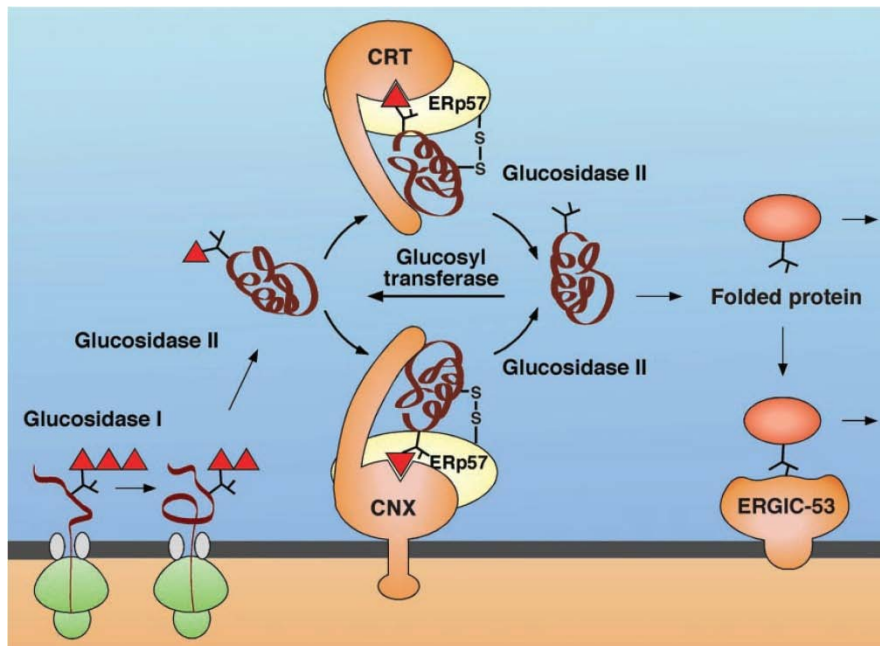


**Abb. 4.28 Inkubation von Lysaten HA-hPAT1-exprimierender (A) *X. laevis* Oozyten und (B) HRPE-Zellen mit (+) oder ohne (–) PNGase F.** Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch SDS-PAGE in (A) 7,5 %igen oder (B) 12 %igen SDS-Gelen. Die Proteine wurden durch Western Blot-Analyse mittels anti-HA-*tag* Antikörper detektiert.



**Abb. 4.29** Lysate von Wildtyp- und Glykosylierungs-Mutanten-exprimierenden *X. laevis* Oozyten. Die Lysate wurden mit (+) oder ohne (-) PNGase F inkubiert.

Im nächsten Schritt wurden zwei der drei Asparaginreste in verschiedenen Kombinationen durch Glutaminreste ersetzt (N174/183Q, N183/470Q und N470/174Q). Entsprechend des Verlustes einer weiteren Glykanstruktur zeigten die Doppelmutanten im Vergleich zu den Einzelmutanten eine zusätzliche Verschiebung der Banden zu kleineren Molekularmassen (Abb. 4.29 A). Interessanterweise war in den Lysaten der Doppelmutanten-exprimierenden Oozyten eine weitere Proteinbande bei höheren Molekulargewichten detektierbar. Diese konnte jedoch nicht in PNGase F-inkubierten Lysaten nachgewiesen werden (Abb. 4.29 B). Nach Enzyminkubation wurde für alle Doppelmutanten (und Einzelmutanten) eine definierte Proteinbande auf Höhe des PNGase F-behandelten Wildtyptransporters detektiert. Vermutlich handelt es sich bei den höher molekularen Proteinbanden um nicht prozessierte, unreife Glykosylierungsspezies von HA-hPAT1. Wie bereits erwähnt sind die Glykanstrukturen für die Qualitätskontrolle im ER von großer Bedeutung. Dabei hat der Calnexin/Calretikulिन-Zyklus eine entscheidende Bedeutung. Wie in Abbildung 4.30 dargestellt, wird die monoglykosylierte Form des Proteins durch die beiden ER-Lektine Calnexin (membrangebunden) oder Calreticulिन (löslich) gebunden. Während das noch ungefaltete Protein durch die Bindung an Lektine in Lösung gehalten wird, formen diese einen Komplex mit der Proteindisulfidisomerase ERp57, die für die Ausbildung von nativen Disulfidbrücken im Substratmolekül sorgt (Oliver *et al.* 1997; Oliver *et al.* 1999). Die Glucosidase II spaltet schließlich das dritte Glukosemolekül ab, wodurch sich die Bindung zu Calnexin bzw. Calreticulिन löst. Die UDP-Glukose: Glykoprotein-Glykosyltransferase ist ein weiteres Enzym des Qualitätskontrollsystems des ER und dient als Faltungssensor (Hammond & Helenius 1994). Es bindet spezifisch an Proteindomänen mit nicht korrekter Konformation (Ritter & Helenius 2000) und reglykosyliert das Protein, sodass es wieder durch Calnexin bzw. Calreticulिन gebunden wird. Glykoproteine durchlaufen diesen Zyklus solange, bis sie entweder korrekt gefaltet sind, oder nach



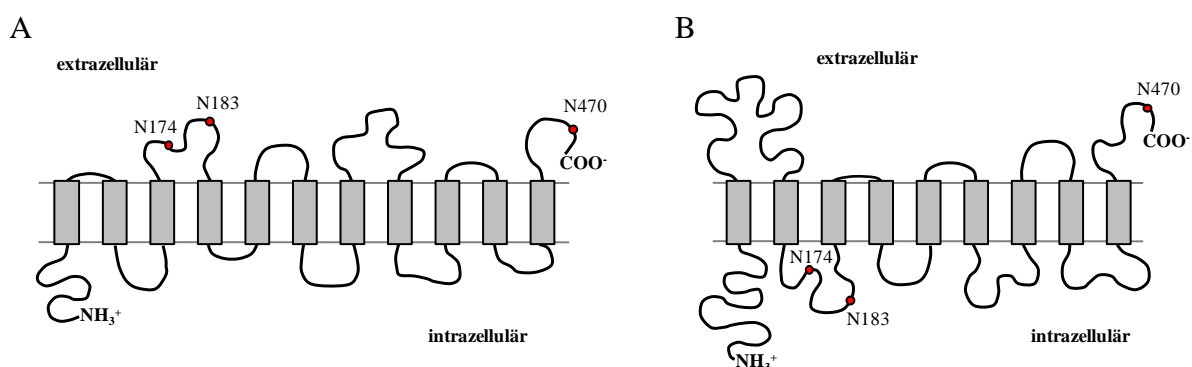
**Abb. 4.30 Der Calnexin/Calreticulin-Zyklus im ER-Lumen.** CRT – Calreticulin, CNX – Calnexin, ERp57 – Proteindisulfidisomerase, Dreieck (rot) – Glukosemolekül, ERGIC-53 – Mannose-spezifisches Lektin. Entnommen aus Helenius *et al.* (Helenius & Aebi 2001).

Ubiquitinylierung vom Proteasom im Cytosol degradiert werden (Plemper & Wolf 1999). Wahrscheinlich verhindert das Fehlen von zwei Oligosaccharidkomplexen in den hPAT1-Doppelmutanten teilweise die Bindung an Calnexin bzw. Calreticulin und dadurch den Eintritt in den Calnexin/Calreticulin-Zyklus. Das unvollständig gefaltete Glykoprotein mit einem Mannosereichen *core*-Oligosaccharid wird für die weitere Prozessierung nicht in den Golgi-Apparat entlassen und akkumuliert im ER. Die voluminösere Struktur des *core*-Oligosaccharids im Vergleich zu einer prozessierten Glykanstruktur könnte das Auftreten der zusätzlichen Proteinspezies in den Lysaten der Doppelmutanten-exprimierenden Oozyten erklären.

In einer weiteren Mutagenesestudie wurde eine Dreifachmutante von hPAT1 hergestellt, in der simultan alle drei potentiellen Glykosylierungsstellen gegen Glutaminreste ausgetauscht wurden (N174/183/470Q). Durch SDS-PAGE und anschließender Western Blot-Analyse wurde im Vergleich zu den Doppelmutanten entsprechend des Verlusts der letzten Glykanstruktur eine weitere Verringerung des apparenten Molekulargewichts beobachtet (Abb. 4.29 A). Der Verdau dieser Proteinvariante mit PNGase F resultierte in keinem weiteren Molekularmassen-*shift* (Abb. 4.29 C). Des Weiteren war die Mobilität der Dreifachmutante sowohl Enzym-behandelt als auch -unbehandelt mit der des PNGase F-verdauten Wildtyp-transporters vergleichbar (Abb. 4.29 B).

Diese Ergebnisse zeigen sehr deutlich, dass alle drei potentiellen Glykosylierungsstellen in hPAT1 bei Expression in *X. laevis* Oozyten tatsächlich glykosyliert werden und der Transporter neben diesen keine weiteren Glykanstrukturen besitzt (Dorn *et al.* 2009a). Diese Aussage kann allerdings nicht zwangsläufig auf den in anderen Zellsystemen bzw. den *in vivo* exprimierten Transporter übertragen werden. Es ist bekannt, dass sich der Glykosylierungsstatus von Proteinen in verschiedenen eukaryotischen Expressionssystemen unterscheidet (Gaudry *et al.* 2008; Lee *et al.* 2003; Wang *et al.* 2008). Für den Dopamin-Transporter wurde sogar gezeigt, dass dieser im Menschen abhängig von Zelltyp, Entwicklungsstufe und Gehirnregion unterschiedlich glykosyliert wird. Diese verschiedenen glykosylierten Varianten eines Proteins werden als Glykoformen bezeichnet. Im Falle des Dopamin-Transporters kann dadurch die Dopaminverfügbarkeit für Zellen in Abhängigkeit ihrer Umgebung reguliert werden (Li *et al.* 2004).

Obwohl der Befund der Glykosylierung von hPAT1 an den Positionen N174, N183 und N470 im *X. laevis* Oozyten-Modell nicht allgemein gültig sein muss, bestätigt dieses Ergebnis dennoch indirekt das 11 TMD-Modell. Die Glykosylierung von hPAT1 an den erwähnten Positionen setzt eine extrazelluläre Lokalisierung dieser Glykosylierungsstellen voraus. Diese wird nur durch eine Organisation des Transporters in 11 TMD realisiert (Abb. 4.31 A). Im 9 TMD-Modell ergäbe sich für N174 und für N183 eine intrazelluläre Lokalisierung (Abb. 4.31 B). Die Analyse des Glykosylierungsstatus des organischen Anionen-Transporters oatp 1a1 konnte in ähnlicher Weise zur Aufklärung seiner TMD-Topologie genutzt werden (Wang *et al.* 2008). So wurde eine 12 TMD-Topologie bestätigt wohingegen eine Organisation des Transporters in 10 TMD ausgeschlossen werden konnte.

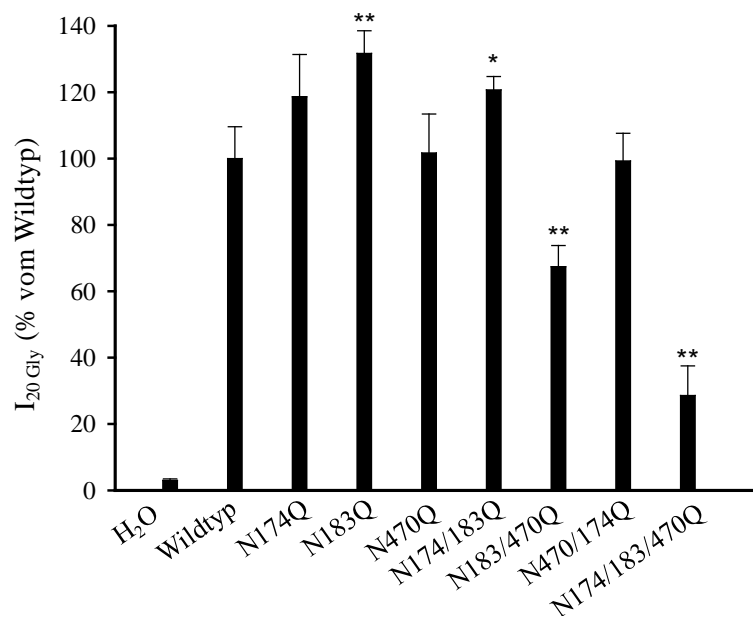


**Abb. 4.31 Schematische Darstellung des (A) 11 TMD-Topologie Modells und des (B) 9 TMD-Topologie Modells von hPAT1.** Die in dieser Arbeit untersuchten potentiellen N-Glykosylierungsstellen sind rot hervorgehoben.

#### 4.4.2. Untersuchung der Transportfunktion von N-Glykosylierungs-Mutanten

Nachdem der Glykosylierungsstatus von hPAT1 aufgeklärt wurde, wurde die Transportaktivität des Wildtyptransporters, der Einzel- und Doppelmutanten sowie der Dreifachmutante nach Expression in *X. laevis* Oozyten mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklammer-Technik bestimmt.

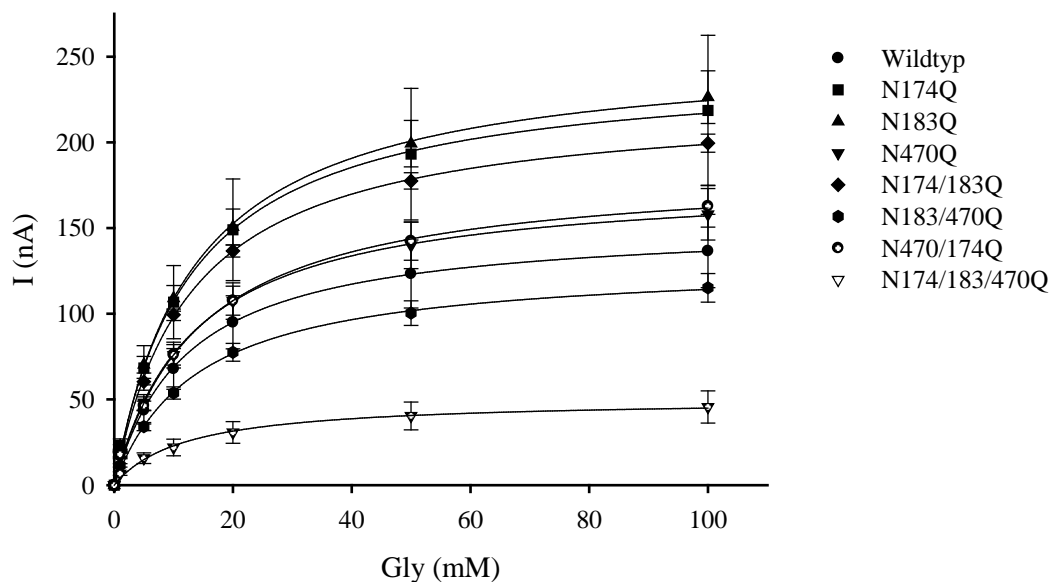
Anhand Abbildung 4.32 ist zu erkennen, dass der Verlust einer einzelnen Glykanstruktur an den Positionen N174 und N470 nur einen geringen Effekt auf die Transportrate typischer Substrate hatte. Der durch 20 mM Glyzin induzierte Strom war für die Einzelmutanten N174Q und N470Q vergleichbar mit dem des Wildtyptransporters. Die Einzelmutante N183Q zeigte mit 130 % ( $P < 0,001$ ), bezogen auf den Strom in Wildtyp-exprimierenden Oozyten, eine leicht erhöhte Glyzinaufnahme. Für die Doppelmutanten N174/183Q und N470/174Q waren die Transportraten im Vergleich zum vollständig glykosylierten hPAT1 kaum verändert. Die Ströme betragen 120 % bzw. 100 % des Wildtyp-vermittelten Glyzintransports. Dagegen erzeugte die dritte Doppelmutante N183/470Q nur 67 % ( $P < 0,001$ ) des Wildtyp-induzierten Glyzinstroms. Ebenso resultierte der Verlust aller drei vorhandenen Glykanstrukturen



**Abb. 4.32 Transportaktivität des HA-hPAT1 Wildtypproteins und der Glykosylierungs-Mutanten.** *X. laevis* Oozyten wurden mit den cRNAs des Wildtypproteins und der entsprechenden Mutanten injiziert. Wasser-injizierte Oozyten (H<sub>2</sub>O) dienen als Kontrolle. Die Transportmessungen wurden in ORi PAT pH 6,5 durchgeführt. Die durch 20 mM Glyzin induzierten Ströme  $I_{20\text{Gly}}$  wurden aus der Differenz der gemessenen Ströme in An- und Abwesenheit der Aminosäure berechnet. Die gemessenen Ströme der Glykosylierungs-Mutanten sind prozentual, bezogen auf den Strom des Wildtyps (100 % = 126 nA), dargestellt. Mittelwert  $\pm$  S.E.M. von  $n = 6-8$  Oozyten aus je zwei verschiedenen Oozytenpräparationen. \*  $P < 0,01$ ; \*\*  $P < 0,001$ .

in einer stark verringerten Transportaktivität. Der Glyzin-induzierte Strom der Dreifachmutante N174/183/470Q war auf 29 % ( $P < 0,001$ ) des Stroms des Wildtyptransporters reduziert. Im nächsten Schritt wurde für jede Glykosylierungs-Mutante die Michaelis-Konstante  $K_t$  ermittelt. In Abbildung 4.33 sind für den Wildtyptransporter und alle hPAT1-Mutanten die durch verschiedene Glyzinkonzentrationen induzierten Ströme dargestellt. Durch nicht-lineare Regression ergaben sich die in Tabelle 4.8 aufgeführten  $K_t$ -Werte für die untersuchten hPAT1-Varianten. Interessanterweise waren die erhaltenen Affinitäten für den Wildtyptransporter und alle Glykosylierungs-Mutanten vergleichbar.

Durch diese Ergebnisse wird deutlich, dass die einzelnen Glykanstrukturen an sich keinen Einfluss auf die Transportfunktion von hPAT1 haben. Nur der Verlust mehrerer Oligosaccharidkomplexe führte zu einer reduzierten Transportaktivität, wobei jedoch die Affinität nicht beeinflusst wurde. Die reduzierten Ströme der Doppelmutante N183/470Q und der Dreifachmutante N174/183/470Q werden möglicherweise durch eine verminderte Plasmamembranexpression von ansonsten voll funktionellen Transporterproteinen verursacht. Diese wiederum könnte durch Proteininstabilität oder eine verringerte Proteinbiosynthese sowie durch verändertes *trafficking* des Transporters zur Plasmamembran erklärt werden. Anhand der Western



**Abb. 4.33 Transportaktivität des HA-hPAT1 Wildtyptransporters und der Glykosylierungs-Mutanten in Abhängigkeit von der Glyzin-Konzentration.** Transportmessungen wurden an cRNA-injizierten *X. laevis* Oozyten mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklammer-Technik in ORi PAT pH 6,5 durchgeführt. Die durch Glyzin induzierten Ströme  $I$  wurden aus der Differenz der gemessenen Ströme in An- und Abwesenheit der Aminosäure berechnet. Mittelwert  $\pm$  S.E.M. von  $n = 8$  Oozyten aus je zwei verschiedenen Oozytenpräparationen.



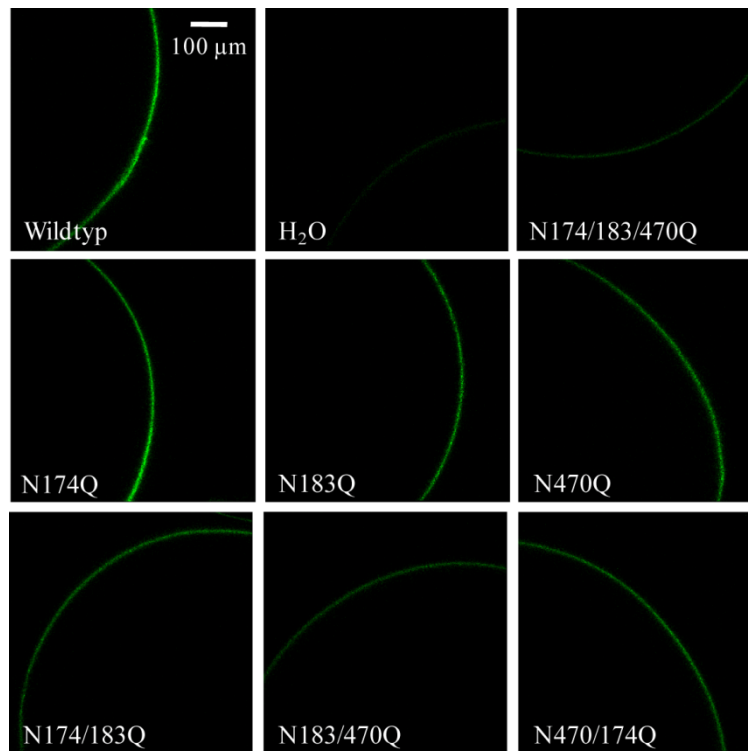
**Tab. 4.8 Michaelis-Konstanten  $K_t$  für den HA-hPAT1 Wildtyp und die Glykosylierungs-Mutanten.** Die ermittelten Konstanten wurden durch nicht-lineare Regression der in Abb. 4.33 dargestellten Abhängigkeit des gemessenen Stroms von der Glyzinkonzentration erhalten.

HA-hPAT1 - Variante	$K_t$ -Wert (mM)
Wildtyp	$13,2 \pm 1,0$
N174Q	$12,6 \pm 0,7$
N183Q	$13,4 \pm 0,7$
N470Q	$13,3 \pm 0,9$
N174/183Q	$12,9 \pm 0,6$
N183/470Q	$13,9 \pm 0,9$
N470/174Q	$14,3 \pm 1,1$
N174/183/470Q	$13,0 \pm 1,9$

Blot-Analysen von Lysaten cRNA-injizierter Oozyten (Abb. 4.30) sind jedoch für den Wildtyp und alle Glykosylierungs-Mutanten ähnliche Mengen an Protein detektierbar, sodass eine verringerte Proteinbiosynthese ausgeschlossen werden kann. Des Weiteren konnten auch keine Proteinbanden im Bereich kleinerer Molekulargewichte beobachtet werden. Daher ist auch eine Proteininstabilität, verursacht durch Degradation, nicht für die verminderte Plasmamembranlokalisation verantwortlich.

#### 4.4.3. Zelluläre Lokalisation der N-Glykosylierungs-Mutanten

Nachfolgend wurde die Oberflächenexpression des Wildtyptransporters und der Glykosylierungs-Mutanten mit Hilfe der konfokalen Laser-scanning Mikroskopie untersucht. Für alle Glykosylierungs-Einzelmutanten sowie für die Doppelmutanten N174/183Q und N470/174Q konnte eine membranständige Lokalisierung, die mit der des Wildtyptransporters vergleichbar war, gezeigt werden (Abb. 4.34). Dagegen wurde für die Doppelmutante N183/470Q und die Dreifachmutante N174/183/470Q eine schwächere Fluoreszenzintensität in der Plasmamembran beobachtet. Eine Quantifizierung der Intensitäten ergab jeweils eine um  $60 \pm 7 \%$  ( $P < 0,001$ ) bzw.  $75 \pm 5 \%$  ( $P < 0,001$ ) reduzierte Oberflächenexpression dieser Glykosylierungs-mutanten. Damit erklärt sich der geringere Substrattransport der Doppelmutante N183/470Q und der Dreifachmutante durch eine verringerte Expression der deglykosylierten Transporterproteine in der Plasmamembran.



**Abb. 4.34 Immunfluoreszenz-Analyse der Oberflächenexpression des Wildtypproteins und der Glykosylierungs-Mutanten von HA-hPAT1.** *X. laevis* Oozyten wurden mit der HA-hPAT1 cRNA des Wildtypproteins und der Mutanten injiziert. Wasser-injizierte Oozyten (H<sub>2</sub>O) dienen als Kontrolle. Die Anfärbung erfolgte mittels eines primären anti-HA-tag Antikörpers aus Kaninchen und eines sekundären Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 markierten anti-Kaninchen Antikörpers aus Ziege.

Diese Befunde stehen im Einklang mit der zuvor erwähnten Bedeutung von Glykanstrukturen für die Qualitätskontrolle im ER. Aufgrund der fehlenden Oligosaccharide wird vermutlich der Eintritt in den Calnexin/Calretikulin-Zyklus erschwert, wodurch ein Großteil der Transportervarianten unvollständig gefaltet im ER akkumuliert und nicht in den Golgi-Apparat entlassen wird. Für die Dreifachmutante N174/183/470Q kommt hinzu, dass durch den Verlust aller Glykanreste auch die Transport- und Sortierungssignale für eine korrekte Lokalisierung des Proteins fehlen. Demnach sind Glykosylierungen in hPAT1 für die Transportfunktion nicht essentiell. Sie sind vielmehr für das *trafficking* des Transporters zur Plasmamembran von Bedeutung (Dorn *et al.* 2009a).

Ähnliche Beobachtungen wurden u.a. auch für Glykosylierungs-Mutanten des Glyzin-Transporters GLYT1 (Olivares *et al.* 1995), des organischen Anionen-Transporters OAT1 (Tanaka *et al.* 2004) und des Serotonin-Transporters SERT (Tate & Blakely 1994) beschrieben. Auch hier zeigten die Glykosylierungs-defizienten Transportervarianten eine verminderte Transportaktivität, wobei die Affinitäten für die jeweiligen Substrate nicht verändert waren. Auch

in diesen Fällen konnte eine reduzierte Oberflächenexpression als Ursache für den Aktivitätsverlust identifiziert werden. Des Weiteren haben Untersuchungen von Glykoproteinen mit mehreren N-Glykosylierungsstellen ergeben, dass in manchen Fällen nicht alle Glykanstrukturen in gleichem Maße wichtig für den Faltungsprozess und den Exportmechanismus vom ER in den Golgi-Apparat sind. So ist zum Beispiel nur einer der sechs vorhandenen Oligosaccharidkomplexe im Hämagglutinin des Influenza Virus essentiell für die Faltung und den Export in den Golgi-Apparat (Hebert *et al.* 1997). Im Gegensatz dazu ist für manche Glykoproteine nicht ein spezifischer Glykanrest, sondern vielmehr die Anzahl der Oligosaccharidkomplexe wichtig für die korrekte Faltung. Mutagenesestudien des Transporters ABCB11 (*apical bile salt export pump*) haben gezeigt, dass die Substitution von ein oder zwei der vier vorhandenen N-Glykosylierungsstellen keinen Einfluss auf die Stabilität, das *trafficking* oder die Funktion des Transporters hatte. Wurden jedoch drei oder alle vier Glykanreste entfernt, waren eine erhöhte Degradation im Proteasom und eine intrazelluläre Retention des Proteins zu beobachten. Ein Vergleich von ABCB11-Mutanten mit verschiedenen Kombinationen substituierter N-Glykosylierungsstellen ergab, dass mindestens zwei Glykanreste vorhanden sein müssen, damit eine korrekte Faltung und das *trafficking* des Transporters zur Plasmamembran erfolgt (Mochizuki *et al.* 2007). Ähnliche Ergebnisse wurden auch für hPAT1 erhalten. Die Untersuchung der verschieden kombinierten Doppelmutanten hat gezeigt, dass nicht ein spezifischer Glykanrest essentiell ist. Für ein korrektes *trafficking* muss mindestens eine Glykosylierungsstelle im Protein vorhanden sein.

#### 4.4.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

In diesem Abschnitt der Arbeit wurde der Glykosylierungsstatus von hPAT1 und der Einfluss der Glykanstrukturen auf die Transportfunktion und das *targeting* innerhalb der Zelle untersucht. Die Inkubation von Lysaten hPAT1-exprimierender Oozyten und HRPE-Zellen mit PNGase F zeigte, dass der Transporter *in vivo* an einer oder mehreren der sieben vorhandenen potentiellen N-Glykosylierungsstellen mit Oligosacchariden modifiziert wird. Durch zielgerichtete Mutagenese und anschließender SDS-PAGE und Western Blot-Analyse der generierten Glykosylierungs-Mutanten konnte nachgewiesen werden, dass hPAT1 nach Expression in *X. laevis* Oozyten an den Positionen N174, N183 und N470 glykosyliert wird und keine weiteren Glykosylierungsstellen besitzt. Mit Hilfe dieser Ergebnisse konnte das 11 TMD-Topo-

logie-Modell für hPAT1 indirekt bestätigt werden. Dies deckt sich auch mit den Befunden zur Disulfidverbrückung des Transporters (Kapitel 4.3).

Die funktionelle Charakterisierung der Glykosylierungs-Mutanten ergab, dass keine der Glykanstrukturen essentiell für die Transportfunktion ist. Alle glykosylierungs-defizienten Transportervarianten zeigten Wildtyp-ähnliche  $K_t$ -Werte für das Modellsubstrat Glyzin. Die reduzierten Transportraten der Doppelmutante N183/470Q und der Dreifachmutante N174/183/470Q wurden durch eine verminderte Plasmamembranexpression verursacht. Demnach sind die Glykanstrukturen in hPAT1 für das *targeting* des Transporters von Bedeutung. Dabei ist nicht ein spezifischer Glykanrest wichtig, sondern vielmehr die Anzahl der Oligosaccharidkomplexe. Für eine korrekte Lokalisierung von hPAT1 muss mindestens ein Glykanrest am Protein verbleiben.

Zu erwähnen ist noch, dass mit den hier aufgeführten Methoden eine veränderte *turn-over* Rate<sup>26</sup> der Glykosylierungs-Mutanten nicht detektiert werden kann. Die dem Wildtyp gegenüber gesteigerten Transportaktivitäten der Glykosylierungs-Mutanten N174Q, N183Q und N174/183Q könnten beispielsweise durch eine Erhöhung der *turn-over* Rate dieser Mutanten erklärt werden. Der Verlust der Glykanreste führt möglicherweise zu einer größeren Flexibilität der Transporterproteine, sodass der jeweilige Konformationswechsel bei Substratbindung und -freisetzung schneller erfolgt, und dadurch eine höhere Transportrate beobachtet wird.

---

<sup>26</sup> Nach Bindung des Substrates an der extrazellulären Seite des Transportproteins erfolgt ein Konformationswechsel innerhalb des Proteins. Durch diese Strukturänderung wird die Bindungstasche für den intrazellulären Raum zugänglich und das Substrat wird aus der Bindungstasche in das Cytoplasma entlassen. Dadurch wird ein erneuter Konformationswechsel ausgelöst, wodurch die Substratbindungstasche wieder für den extrazellulären Bereich zugänglich wird. Die *turn-over* Rate bezeichnet den Wechsel der Zustände pro Zeiteinheit.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Der H<sup>+</sup>-Aminosäure-Cotransporter hPAT1 akzeptiert neben seinen physiologischen Substraten auch pharmazeutisch relevante Wirkstoffe als Substrate. Aufgrund seiner apikalen Lokalisation am Darmepithel stellt hPAT1 ein wichtiges Transportsystem für GABA-verwandte Wirkstoffe sowie andere *drugs* und *prodrugs* dar und erlaubt deren orale Administration. Detaillierte strukturelle Informationen zum Carrierprotein würde die Entwicklung neuer Therapeutika mit verbesserter oraler Verfügbarkeit erleichtern.

Um Vorarbeiten für zukünftige Strukturaufklärungen zu leisten, sollte der Transporter rekombinant in dafür ausreichenden Mengen hergestellt werden. Dazu wurde innerhalb dieser Arbeit die Expression von hPAT1 zunächst im *E. coli*-Expressionssystem durchgeführt. Des Weiteren wurden Protokolle und Methoden etabliert um hPAT1 in einem zellfreien System zu exprimieren. Mit dem Ziel, erste Hinweise auf strukturell und funktionell wichtige Aminosäuren zu erhalten, wurden durch zielgerichtete Mutagenesestudien extrazellulär gelegene Cysteinreste und N-Glykosylierungsstellen untersucht. Die wesentlichen Ergebnisse der Arbeit sind:

### Rekombinante Expression in *E. coli*

- Die cDNA von hPAT1 wurde in die Expressionsvektoren pET28a, pET41b, pETSUMO adapt und pET21a kloniert. Es wurden fünf verschiedene Expressionskonstrukte erhalten.
- Die hPAT1-Konstrukte wurden in acht verschiedenen *E. coli*-Stämmen auf Expression getestet. Es wurde der Einfluss verschiedener Temperaturen, Kultivierungsmedien und Induktorkonzentrationen analysiert.
- Für die Konstrukte (His)<sub>6</sub>-hPAT1, T7-hPAT1-(His)<sub>10</sub> und GST-hPAT1-(His)<sub>8</sub> konnte eine geringe Expression nachgewiesen werden. Für weiterführende Experimente waren die Proteinmengen jedoch nicht ausreichend.

### Zellfreie Expression

- Es ist gelungen, ein zellfreies Expressionssystem im *continuous exchange*-Modus zu etablieren.
- In diesem System konnte hPAT1 im unlöslichen Expressionsmodus mit einer Ausbeute von 75 µg pro Milliliter Reaktionsmix exprimiert werden.

- Mittels CD-Spektroskopie erfolgte eine erste biophysikalische Charakterisierung des in SDS-solubilisierten Transportproteins. Sie ergab einen  $\alpha$ -helikalen Anteil von etwa 50 %.
- Eine lösliche Expression von hPAT1 war in Gegenwart der Detergenzien Digitonin und Brij 35 möglich. In Anwesenheit von Brij 35 wurde ein präparativer Ansatz durchgeführt. Aufgrund der ineffektiven Reinigung waren eine anschließende spektralphotometrische Quantifizierung und eine biophysikalische Charakterisierung nicht möglich.

### **Zielgerichtete Mutagenese extrazellulärer Cysteinreste**

- Der Austausch der hoch konservierten Cysteinreste 180 und 329 in hPAT1 gegen Alanin- oder Serinreste führte jeweils zum vollständigen Verlust der Transportfunktion. Die Cystein-Mutanten C473A und C473S zeigten Wildtyp-ähnliche Transportaktivitäten.
- Für alle Cystein-Mutanten wurde über Immunfluoreszenz-Analysen eine membranständige Lokalisation nachgewiesen.
- Die biochemische Analyse der Cystein-Mutanten mittels dreier unabhängiger Experimente belegt die Existenz einer Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten 180 und 329.
- Die Disulfidbindung ist essentiell für die Transportfunktion von hPAT1.
- Diese Ergebnisse liefern erste strukturelle Informationen: Die Disulfidverbrückung zwischen C180 und C329 bringt sowohl die extrazellulären Schleifen zwei und vier als auch die Transmembrandomänen drei, vier, sieben und acht in räumliche Nähe zueinander.

### **Zielgerichtete Mutagenese von N-Glykosylierungsstellen**

- Die Inkubation von Lysaten hPAT1-exprimierender Oozyten und HRPE-Zellen zeigte, dass der Transporter *in vivo* glykosyliert wird. Im *X. laevis*-Expressionssystem wird hPAT1 an den Positionen N174, N183 und N470 glykosyliert.
- Die Glykanstrukturen sind für die Transportfunktion nicht essentiell. Alle glykosylierungs-defizienten hPAT1-Varianten zeigten Wildtyp-ähnliche  $K_t$ -Werte für Glyzin.

- Die Glykosylierung von hPAT1 ist für das *targeting* des Transporters innerhalb der Zelle von Bedeutung.
- Zusammen mit den Mutagenesestudien der Cysteinreste bestätigen diese Ergebnisse indirekt ein 11 TMD-Modell für hPAT1.

## Ausblick

Um die Proteinausbeuten des rekombinant hergestellten Transporters noch weiter zu steigern, könnten zukünftig folgende Experimente durchgeführt werden:

### Rekombinante Expression in *E. coli*

- Untersuchung der Expression des Transportproteins unter Verwendung einer synthetischen, auf die *codon usage* von *E. coli* optimierten Gensequenz.
- Lösliche Expression von hPAT1 durch Insertion in die *E. coli*-Membran unter Verwendung eines schwachen Promotors. Zur Isolierung des Membranproteins sollte anschließend eine gezielte Membranpräparation erfolgen.

### Zellfreie Expression

- Herstellung eines aktiveren S30-Extrakts unter Verwendung weiterer Präparationsprotokolle mit beispielsweise anderen *E. coli*-Stämmen.
- Erhöhung der T7-Polymerase-Aktivität durch Nutzung eines verbesserten Präparationsprotokolls.

Um andere für die Struktur und Funktion des Transporters essentiellen Aminosäuren bzw. Bereiche zu identifizieren, können weitere Mutagenesestudien durchgeführt werden:

- Identifizierung der Substratbindungsregion in hPAT1 durch Analyse von Chimären, hergestellt aus dem *low affinity, high capacity* H<sup>+</sup>-Aminosäure-Cotransporter hPAT1 und dem *high affinity, low capacity* H<sup>+</sup>-Aminosäure-Cotransporter hPAT2.
- Untersuchung konservierter Prolinreste in den Transmembranbereichen von hPAT1.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Anderson, C.M., Grenade, D.S., Boll, M., Foltz, M., Wake, K.A., Kennedy, D.J., Munck, L.K., Miyauchi, S., Taylor, P.M., Campbell, F.C., Munck, B.G., Daniel, H., Ganapathy, V. & Thwaites, D.T. (2004) H<sup>+</sup>/amino acid transporter 1 (PAT1) is the imino acid carrier: An intestinal nutrient/drug transporter in human and rat. *Gastroenterology* **127**, 1410-1422.
- Arechaga, I., Miroux, B., Karrasch, S., Huijbregts, R., de Kruijff, B., Runswick, M.J. & Walker, J.E. (2000) Characterisation of new intracellular membranes in *Escherichia coli* accompanying large scale over-production of the b subunit of F<sub>1</sub>F<sub>o</sub> ATP synthase. *FEBS Lett.* **482**, 215-219.
- Asaka, J., Terada, T., Tsuda, M., Katsura, T. & Inui, K. (2007) Identification of Essential Histidine and Cysteine Residues of the H<sup>+</sup>/Organic Cation Antiporter Multidrug and Toxin Extrusion (MATE). *Mol. Pharmacol.* **71**, 1487-1493.
- Bane, S.E., Velasquez, J.E. & Robinson, A.S. (2007) Expression and purification of milligram levels of inactive G-protein coupled receptors in *E. coli*. *Protein Expr. Purif.* **52**, 348-355.
- Bannwarth, M. & Schulz, G.E. (2003) The expression of outer membrane proteins for crystallization. *Biochim. Biophys. Acta* **1610**, 37-45.
- Barnard, E.A., Miledi, R. & Sumikawa, K. (1982) Translation of exogenous messenger RNA coding for nicotinic acetylcholine receptors produces functional receptors in *Xenopus* oocytes. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* **215**, 241-246.
- Barnes, H.J., Arlotto, M.P. & Waterman, M.R. (1991) Expression and enzymatic activity of recombinant cytochrome P450 17 $\alpha$ -hydroxylase in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 5597-5601.
- Bayrhuber, M., Meins, T., Habeck, M., Becker, S., Giller, K., Villinger, S., Vonnrhein, C., Griesinger, C., Zweckstetter, M. & Zeth, K. (2008) Structure of the human voltage-dependent anion channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 15370-15375.
- Bazarsuren, A., Grauschopf, U., Wozny, M., Reusch, D., Hoffmann, E., Schaefer, W., Panzner, S. & Rudolph, R. (2002) In vitro folding, functional characterization, and disulfide pattern of the extracellular domain of human GLP-1 receptor. *Biophys. Chem.* **96**, 305-318.
- Biegel, A., Knütter, I., Hartrodt, B., Gebauer, S., Theis, S., Luckner, P., Kottra, G., Rastetter, M., Zebisch, K., Thondorf, I., Daniel, H., Neubert, K. & Brandsch, M. (2006) The renal type H<sup>+</sup>/peptide symporter PEPT2: structure-affinity relationships. *Amino Acids* **31**, 137-156.
- Boll, M., Daniel, H. & Gasnier, B. (2004) The SLC36 family: proton-coupled transporters for the absorption of selected amino acids from extracellular and intracellular proteolysis. *Pflugers Arch.* **447**, 776-779.
- Boll, M., Foltz, M., Anderson, C.M., Oechsler, C., Kottra, G., Thwaites, D.T. & Daniel, H. (2003a) Substrate recognition by the mammalian proton-dependent amino acid transporter PAT1. *Mol. Membr. Biol.* **20**, 261-269.



- Boll, M., Foltz, M., Rubio-Aliaga, I. & Daniel, H. (2003b) A cluster of proton/amino acid transporter genes in the human and mouse genomes. *Genomics* **82**, 47-56.
- Boll, M., Foltz, M., Rubio-Aliaga, I., Kottra, G. & Daniel, H. (2002) Functional characterization of two novel mammalian electrogenic proton-dependent amino acid cotransporters. *J. Biol. Chem.* **277**, 22966-22973.
- Bonincontro, A., Briganti, G., Giansanti, A., Pedone, F. & Risuleo, G. (1993) Effects of magnesium ions on ribosomes: a fluorescence study. *Biochim. Biophys. Acta* **1174**, 27-30.
- Brandsch, M. (2006) Transport of L-proline, L-proline-containing peptides and related drugs at mammalian epithelial cell membranes. *Amino. Acids* **31**, 119-136.
- Breloy, I., Schwientek, T., Gries, B., Razawi, H., Macht, M., Albers, C. & Hanisch, F.G. (2008) Initiation of mammalian O-mannosylation *in vivo* is independent of a consensus sequence and controlled by peptide regions within and upstream of the  $\alpha$ -dystroglycan mucin domain. *J. Biol. Chem.* **283**, 18832-18840.
- Bretschneider, F. & Markwardt, F. (1999) Drug-dependent ion channel gating by application of concentration jumps using U-tube technique. *Methods Enzymol.* **294**, 180-189.
- Burda, P. & Aebi, M. (1999) The dolichol pathway of N-linked glycosylation. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**, 239-257.
- Calhoun, K.A. & Swartz, J.R. (2006) Total amino acid stabilization during cell-free protein synthesis reactions. *J. Biotechnol.* **123**, 193-203.
- Cappuccio, J.A., Blanchette, C.D., Sulchek, T.A., Arroyo, E.S., Kralj, J.M., Hinz, A.K., Kuhn, E.A., Chromy, B.A., Segelke, B.W., Rothschild, K.J., Fletcher, J., Katzen, F., Peterson, T.C., Kudlicki, W.A., Bench, G., Hoeprich, P.D. & Coleman, M.A. (2008) Cell-free co-expression of functional membrane proteins and apolipoprotein forming soluble nanolipoprotein particles. *Mol. Cell Proteomics.* **7**, 2246-2253.
- Chen, J.G., Liu-Chen, S. & Rudnick, G. (1997) External cysteine residues in the serotonin transporter. *Biochemistry* **36**, 1479-1486.
- Chen, R., Wei, H., Hill, E.R., Chen, L., Jiang, L., Han, D.D. & Gu, H.H. (2007a) Direct evidence that two cysteines in the dopamine transporter form a disulfide bond. *Mol. Cell Biochem.* **298**, 41-48.
- Chen, Y.J., Pornillos, O., Lieu, S., Ma, C., Chen, A.P. & Chang, G. (2007b) X-ray structure of EmrE supports dual topology model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 18999-19004.
- Chen, Z., Fei, Y.J., Anderson, C.M., Wake, K.A., Miyauchi, S., Huang, W., Thwaites, D.T. & Ganapathy, V. (2003) Structure, function and immunolocalization of a proton-coupled amino acid transporter (hPAT1) in the human intestinal cell line Caco-2. *J. Physiol* **546**, 349-361.
- Cherezov, V., Rosenbaum, D.M., Hanson, M.A., Rasmussen, S.G., Thian, F.S., Kobilka, T.S., Choi, H.J., Kuhn, P., Weis, W.I., Kobilka, B.K. & Stevens, R.C. (2007) High-resolution crystal structure of an engineered human  $\beta_2$ -adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* **318**, 1258-1265.
- Chill, J.H., Louis, J.M., Miller, C. & Bax, A. (2006) NMR study of the tetrameric KcsA potassium channel in detergent micelles. *Protein Sci.* **15**, 684-698.

- Cook, J.V. & Eidne, K.A. (1997) An intramolecular disulfide bond between conserved extracellular cysteines in the gonadotropin-releasing hormone receptor is essential for binding and activation. *Endocrinology* **138**, 2800-2806.
- Del Monte, M.A. & Maumenee, I.H. (1980) New technique for *in vitro* culture of human retinal pigment epithelium. *Birth Defects Orig. Artic. Ser.* **16**, 327-338.
- DeVries, J.K. & Zubay, G. (1967) DNA-directed peptide synthesis. II. The synthesis of the  $\alpha$ -fragment of the enzyme  $\beta$ -galactosidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **57**, 1010-1012.
- Dorn, M., Jaehme, M., Weiwad, M., Markwardt, F., Rudolph, R., Brandsch, M. & Bosse-Doenecke, E. (2009a) The role of *N*-glycosylation in transport function and surface targeting of the human solute carrier PAT1. *FEBS Lett.* **583**, 1631-1636.
- Dorn, M., Weiwad, M., Markwardt, F., Laug, L., Rudolph, R., Brandsch, M. & Bosse-Doenecke, E. (2009b) Identification of a disulfide bridge essential for transport function of the human proton-coupled amino acid transporter hPAT1. *J. Biol. Chem.* **284**, 22123-22132.
- Dou, D., Owolabi, J.B., Dey, S. & Rosen, B.P. (1992) Construction of a chimeric ArsA-ArsB protein for overexpression of the oxyanion-translocating ATPase. *J. Biol. Chem.* **267**, 25768-25775.
- Dower, W.J., Miller, J.F. & Ragsdale, C.W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**, 6127-6145.
- Doyle, D.A., Morais, C.J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T. & MacKinnon, R. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of  $K^+$  conduction and selectivity. *Science* **280**, 69-77.
- Dumon-Seignovert, L., Cariot, G. & Vuillard, L. (2004) The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). *Protein Expr. Purif.* **37**, 203-206.
- Dumont, J.N. (1972) Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morphol.* **136**, 153-179.
- Elbaz, Y., Steiner-Mordoch, S., Danieli, T. & Schuldiner, S. (2004) *In vitro* synthesis of fully functional EmrE, a multidrug transporter, and study of its oligomeric state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 1519-1524.
- Endo, Y. & Sawasaki, T. (2003) High-throughput, genome-scale protein production method based on the wheat germ cell-free expression system. *Biotechnol. Adv.* **21**, 695-713.
- Endo, Y. & Sawasaki, T. (2006) Cell-free expression systems for eukaryotic protein production. *Curr. Opin. Biotechnol.* **17**, 373-380.
- Favaudon, V. & Pochon, F. (1976) Magnesium dependence of the association kinetics of *Escherichia coli* ribosomal subunits. *Biochemistry* **15**, 3903-3912.
- Foltz, M., Mertl, M., Dietz, V., Boll, M., Kottra, G. & Daniel, H. (2005) Kinetics of bidirectional  $H^+$  and substrate transport by the proton-dependent amino acid symporter PAT1. *Biochem. J.* **386**, 607-616.
- Frändberg, P.A., Doufexis, M., Kapas, S. & Chhajlani, V. (2001) Cysteine residues are involved in structure and function of melanocortin 1 receptor: Substitution of a cysteine

- residue in transmembrane segment two converts an agonist to antagonist. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **281**, 851-857.
- Fredriksson, R., Nordström, K.J., Stephansson, O., Hägglund, M.G. & Schiöth, H.B. (2008) The solute carrier (SLC) complement of the human genome: Phylogenetic classification reveals four major families. *FEBS Lett.* **582**, 3811-3816.
- Gagnon, D.G., Bissonnette, P. & Lapointe, J.Y. (2006) Identification of a disulfide bridge linking the fourth and the seventh extracellular loops of the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. *J. Gen. Physiol* **127**, 145-158.
- Ganapathy, M.E., Brandsch, M., Prasad, P.D., Ganapathy, V. & Leibach, F.H. (1995) Differential recognition of  $\beta$ -lactam antibiotics by intestinal and renal peptide transporters, PEPT 1 and PEPT 2. *J. Biol. Chem.* **270**, 25672-25677.
- Ganapathy, V., Brandsch, M. & Leibach, F.H. (1994) Intestinal transport of amino acids and peptides. In: *Physiology of the gastrointestinal tract*. Edited by L.R. Johnson. New York: Raven Press, 1773-1794.
- Gaudry, J.P., Arod, C., Sauvage, C., Busso, S., Dupraz, P., Pankiewicz, R. & Antonsson, B. (2008) Purification of the extracellular domain of the membrane protein GlialCAM expressed in HEK and CHO cells and comparison of the glycosylation. *Protein Expr. Purif.* **58**, 94-102.
- Gill, S.C. & von Hippel, P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319-326.
- Goerke, A.R. & Swartz, J.R. (2008) Development of cell-free protein synthesis platforms for disulfide bonded proteins. *Biotechnol. Bioeng.* **99**, 351-367.
- Grauschopf, U., Lilie, H., Honold, K., Wozny, M., Reusch, D., Esswein, A., Schäfer, W., Rücknagel, K.P. & Rudolph, R. (2000) The N-terminal fragment of human parathyroid hormone receptor 1 constitutes a hormone binding domain and reveals a distinct disulfide pattern. *Biochemistry* **39**, 8878-8887.
- Grisshammer, R. & Tate, C.G. (1995) Overexpression of integral membrane proteins for structural studies. *Q. Rev. Biophys.* **28**, 315-422.
- Grossman, T.H., Kawasaki, E.S., Punreddy, S.R. & Osburne, M.S. (1998) Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. *Gene* **209**, 95-103.
- Grunberg-Manago, M. (1999) Messenger RNA stability and its role in control of gene expression in bacteria and phages. *Annu. Rev. Genet.* **33**, 193-227.
- Gurdon, J.B. (1973) The translation of messenger RNA injected in living oocytes of *Xenopus laevis*. *Acta Endocrinol. Suppl (Copenh)* **180**, 225-243.
- 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.
- Hammond, C. & Helenius, A. (1994) Quality control in the secretory pathway: retention of a misfolded viral membrane glycoprotein involves cycling between the ER, intermediate compartment, and Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* **126**, 41-52.

- Hauri, H., Appenzeller, C., Kuhn, F. & Nufer, O. (2000) Lectins and traffic in the secretory pathway. *FEBS Lett.* **476**, 32-37.
- Hebert, D.N., Zhang, J.X., Chen, W., Foellmer, B. & Helenius, A. (1997) The number and location of glycans on influenza hemagglutinin determine folding and association with calnexin and calreticulin. *J. Cell Biol.* **139**, 613-623.
- Hediger, M.A., Coady, M.J., Ikeda, T.S. & Wright, E.M. (1987) Expression cloning and cDNA sequencing of the Na<sup>+</sup>/glucose co-transporter. *Nature* **330**, 379-381.
- Helenius, A. & Aebi, M. (2001) Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* **291**, 2364-2369.
- Henderson, R., Baldwin, J.M., Ceska, T.A., Zemlin, F., Beckmann, E. & Downing, K.H. (1990) Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J. Mol. Biol.* **213**, 899-929.
- Henriksen, U., Fog, J.U., Litman, T. & Gether, U. (2005) Identification of intra- and intermolecular disulfide bridges in the multidrug resistance transporter ABCG2. *J. Biol. Chem.* **280**, 36926-36934.
- Hohenblum, H., Vorauer-Uhl, K., Katinger, H. & Mattanovich, D. (2004) Bacterial expression and refolding of human trypsinogen. *J. Biotechnol.* **109**, 3-11.
- Imberty, A. & Perez, S. (1995) Stereochemistry of the N-glycosylation sites in glycoproteins. *Protein Eng.* **8**, 699-709.
- Imperiali, B. & O'Connor, S.E. (1999) Effect of N-linked glycosylation on glycopeptide and glycoprotein structure. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 643-649.
- Ishihara, G., Goto, M., Saeki, M., Ito, K., Hori, T., Kigawa, T., Shirouzu, M. & Yokoyama, S. (2005) Expression of G protein coupled receptors in a cell-free translational system using detergents and thioredoxin-fusion vectors. *Protein Expr. Purif.* **41**, 27-37.
- Jaakola, V.P., Griffith, M.T., Hanson, M.A., Cherezov, V., Chien, E.Y., Lane, J.R., Ijzerman, A.P. & Stevens, R.C. (2008) The 2.6 angstrom crystal structure of a human A<sub>2A</sub> adenosine receptor bound to an antagonist. *Science* **322**, 1211-1217.
- Jähme, M. (2008) Optimierung der zellfreien Expression des humanen H<sup>+</sup>-Aminosäure-Cotransporters hPAT1 und Untersuchung des Einflusses potenzieller N-Glykosylierungen auf die Transportaktivität. *Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.*
- Jana, S. & Deb, J.K. (2005) Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**, 289-298.
- Jess, U., Betz, H. & Schloss, P. (1996) The membrane-bound rat serotonin transporter, SERT1, is an oligomeric protein. *FEBS Lett.* **394**, 44-46.
- Jun, S.Y., Kang, S.H. & Lee, K.H. (2008) Continuous-exchange cell-free protein synthesis using PCR-generated DNA and an RNase E-deficient extract. *Biotechniques* **44**, 387-391.
- Junge, F., Schneider, B., Reckel, S., Schwarz, D., Dötsch, V. & Bernhard, F. (2008) Large-scale production of functional membrane proteins. *Cell Mol. Life Sci.* **65**, 1729-1755.
- Kage, K., Fujita, T. & Sugimoto, Y. (2005) Role of Cys-603 in dimer/oligomer formation of the breast cancer resistance protein BCRP/ABCG2. *Cancer Sci.* **96**, 866-872.

- Kalmbach, R., Chizhov, I., Schumacher, M.C., Friedrich, T., Bamberg, E. & Engelhard, M. (2007) Functional cell-free synthesis of a seven helix membrane protein: *in situ* insertion of bacteriorhodopsin into liposomes. *J. Mol. Biol.* **371**, 639-648.
- Kamonchanok, S., Balog, C.I., van der Does, A.M., Booth, R., de Grip, W.J., Deelder, A.M., Bakker, R.A., Leurs, R. & Hensbergen, P.J. (2008) GPCR proteomics: mass spectrometric and functional analysis of histamine H<sub>1</sub> receptor after baculovirus-driven and *in vitro* cell free expression. *J. Proteome. Res.* **7**, 621-629.
- Karnik, S.S., Nassal, M., Doi, T., Jay, E., Sgaramella, V. & Khorana, H.G. (1987) Structure-function studies on bacteriorhodopsin. II. Improved expression of the bacterio-opsin gene in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **262**, 9255-9263.
- Karnik, S.S., Sakmar, T.P., Chen, H.B. & Khorana, H.G. (1988) Cysteine residues 110 and 187 are essential for the formation of correct structure in bovine rhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 8459-8463.
- Katzen, F., Fletcher, J.E., Yang, J.P., Kang, D., Peterson, T.C., Cappuccio, J.A., Blanchette, C.D., Sulchek, T., Chromy, B.A., Hoepflich, P.D., Coleman, M.A. & Kudlicki, W. (2008) Insertion of membrane proteins into discoidal membranes using a cell-free protein expression approach. *J. Proteome. Res.* **7**, 3535-3542.
- Keller, T., Elfeber, M., Gorboulev, V., Reilander, H. & Koepsell, H. (2005) Purification and functional reconstitution of the rat organic cation transporter OCT1. *Biochemistry* **44**, 12253-12263.
- Keller, T., Schwarz, D., Bernhard, F., Dötsch, V., Hunte, C., Gorboulev, V. & Koepsell, H. (2008) Cell free expression and functional reconstitution of eukaryotic drug transporters. *Biochemistry* **47**, 4552-4564.
- Kido, M., Yamanaka, K., Mitani, T., Niki, H., Ogura, T. & Hiraga, S. (1996) RNase E polypeptides lacking a carboxyl-terminal half suppress a mukB mutation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**, 3917-3925.
- Kiefer, H. (2003) In vitro folding of alpha-helical membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1610**, 57-62.
- Kiefer, H., Krieger, J., Olszewski, J.D., von Heijne, G., Prestwich, G.D. & Breer, H. (1996) Expression of an olfactory receptor in *Escherichia coli*: purification, reconstitution, and ligand binding. *Biochemistry* **35**, 16077-16084.
- Kigawa, T., Muto, Y. & Yokoyama, S. (1995) Cell-free synthesis and amino acid-selective stable isotope labeling of proteins for NMR analysis. *J. Biomol. NMR* **6**, 129-134.
- Kigawa, T., Yabuki, T., Yoshida, Y., Tsutsui, M., Ito, Y., Shibata, T. & Yokoyama, S. (1999) Cell-free production and stable-isotope labeling of milligram quantities of proteins. *FEBS Lett.* **442**, 15-19.
- Kim, D.M. & Choi, C.Y. (1996) A semicontinuous prokaryotic coupled transcription/translation system using a dialysis membrane. *Biotechnol. Prog.* **12**, 645-649.
- Kim, D.M. & Swartz, J.R. (1999) Prolonging cell-free protein synthesis with a novel ATP regeneration system. *Biotechnol. Bioeng.* **66**, 180-188.
- Kim, D.M. & Swartz, J.R. (2000) Prolonging cell-free protein synthesis by selective reagent additions. *Biotechnol. Prog.* **16**, 385-390.

- Kim, R.G. & Choi, C.Y. (2001) Expression-independent consumption of substrates in cell-free expression system from *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **84**, 27-32.
- Klammt, C., Löhr, F., Schäfer, B., Haase, W., Dötsch, V., Rüterjans, H., Glaubitz, C. & Bernhard, F. (2004) High level cell-free expression and specific labeling of integral membrane proteins. *Eur. J. Biochem.* **271**, 568-580.
- Klammt, C., Schwarz, D., Fendler, K., Haase, W., Dötsch, V. & Bernhard, F. (2005) Evaluation of detergents for the soluble expression of  $\alpha$ -helical and  $\beta$ -barrel-type integral membrane proteins by a preparative scale individual cell-free expression system. *FEBS J.* **272**, 6024-6038.
- Klammt, C., Schwarz, D., Löhr, F., Schneider, B., Dötsch, V. & Bernhard, F. (2006) Cell-free expression as an emerging technique for the large scale production of integral membrane protein. *FEBS J.* **273**, 4141-4153.
- Klammt, C., Srivastava, A., Eifler, N., Junge, F., Beyermann, M., Schwarz, D., Michel, H., Dötsch, V. & Bernhard, F. (2007) Functional analysis of cell-free-produced human endothelin B receptor reveals transmembrane segment 1 as an essential area for ET-1 binding and homodimer formation. *FEBS J.* **274**, 3257-3269.
- Kobilka, B.K., MacGregor, C., Daniel, K., Kobilka, T.S., Caron, M.G. & Lefkowitz, R.J. (1987) Functional activity and regulation of human  $\beta_2$ -adrenergic receptors expressed in *Xenopus oocytes*. *J. Biol. Chem.* **262**, 15796-15802.
- Koepsell, H., Lips, K. & Volk, C. (2007) Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm Res.* **24**, 1227-1251.
- Kornfeld, R. & Kornfeld, S. (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 631-664.
- Krueger-Koplin, R.D., Sørge, P.L., Krueger-Koplin, S.T., Rivera-Torres, I.O., Cahill, S.M., Hicks, D.B., Grinius, L., Krulwich, T.A. & Girvin, M.E. (2004) An evaluation of detergents for NMR structural studies of membrane proteins. *J. Biomol. NMR* **28**, 43-57.
- Kundra, R. & Kornfeld, S. (1999) Asparagine-linked oligosaccharides protect Lamp-1 and Lamp-2 from intracellular proteolysis. *J. Biol. Chem.* **274**, 31039-31046.
- Kyhse-Andersen, J. (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**, 203-209.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lambert, G., Traebert, M., Biber, J. & Murer, H. (2000) Cleavage of disulfide bonds leads to inactivation and degradation of the type IIa, but not type IIb sodium phosphate cotransporter expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Membr. Biol.* **176**, 143-149.
- Larsen, M., Larsen, B.B., Frolund, B. & Nielsen, C.U. (2008) Transport of amino acids and GABA analogues via the human proton-coupled amino acid transporter, hPAT1: characterization of conditions for affinity and transport experiments in Caco-2 cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* **35**, 86-95.

- Lee, T.K., Koh, A.S., Cui, Z., Pierce, R.H. & Ballatori, N. (2003) *N*-glycosylation controls functional activity of Oatp1, an organic anion transporter. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* **285**, G371-G381.
- Li, L.B., Chen, N., Ramamoorthy, S., Chi, L., Cui, X.N., Wang, L.C. & Reith, M.E. (2004) The role of *N*-glycosylation in function and surface trafficking of the human dopamine transporter. *J. Biol. Chem.* **279**, 21012-21020.
- Li, Y., Wang, E. & Wang, Y. (1999) A modified procedure for fast purification of T7 RNA polymerase. *Protein Expr. Purif.* **16**, 355-358.
- Lilie, H., Schwarz, E. & Rudolph, R. (1998) Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**, 497-501.
- Littlefield, J.W., Keller, E.B., Gross, J. & Zamecnik, P.C. (1955) Studies on cytoplasmic ribonucleoprotein particles from the liver of the rat. *J. Biol. Chem.* **217**, 111-123.
- Looman, A.C., Bodlaender, J., de Gruyter, M., Vogelaar, A. & van Knippenberg, P.H. (1986) Secondary structure as primary determinant of the efficiency of ribosomal binding sites in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **14**, 5481-5497.
- Lopez, P.J., Marchand, I., Joyce, S.A. & Dreyfus, M. (1999) The C-terminal half of RNase E, which organizes the *Escherichia coli* degradosome, participates in mRNA degradation but not rRNA processing *in vivo*. *Mol. Microbiol.* **33**, 188-199.
- Luckner, P. & Brandsch, M. (2005) Interaction of 31  $\beta$ -lactam antibiotics with the H<sup>+</sup>/peptide symporter PEPT2: analysis of affinity constants and comparison with PEPT1. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **59**, 17-24.
- Lundstrom, K. (2006) Structural genomics for membrane proteins. *Cell Mol. Life Sci.* **63**, 2597-2607.
- Martemyanov, K.A., Spirin, A.S. & Gudkov, A.T. (1997) Direct expression of PCR products in a cell-free transcription/translation system: synthesis of antibacterial peptide cecropin. *FEBS Lett.* **414**, 268-270.
- Metzner, L. (2007) Der H<sup>+</sup>-Aminosäure-Cotransporter PAT1: Mechanismus, Spezifität und pharmazeutische Relevanz. *Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.*
- Metzner, L., Kalbitz, J. & Brandsch, M. (2004) Transport of pharmacologically active proline derivatives by the human proton-coupled amino acid transporter hPAT1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **309**, 28-35.
- Metzner, L., Kottra, G., Neubert, K., Daniel, H. & Brandsch, M. (2005) Serotonin, L-tryptophan, and tryptamine are effective inhibitors of the amino acid transport system PAT1. *FASEB J.* **19**, 1468-1473.
- Metzner, L., Natho, K., Zebisch, K., Dorn, M., Bosse-Doenecke, E., Ganapathy, V. & Brandsch, M. (2008) Mutational analysis of histidine residues in the human proton-coupled amino acid transporter PAT1. *Biochim. Biophys. Acta* **1778**, 1042-1050.
- Michalke, K., Graviere, M.E., Huyghe, C., Vincentelli, R., Wagner, R., Pattus, F., Schroeder, K., Oschmann, J., Rudolph, R., Cambillau, C. & Desmyter, A. (2009) Mammalian G-protein-coupled receptor expression in *Escherichia coli*: I. High-throughput large-scale production as inclusion bodies. *Anal. Biochem.* **386**, 147-155.

- Miroux, B. & Walker, J.E. (1996) Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol. Biol.* **260**, 289-298.
- Mochizuki, K., Kagawa, T., Numari, A., Harris, M.J., Itoh, J., Watanabe, N., Mine, T. & Arias, I.M. (2007) Two N-linked glycans are required to maintain the transport activity of the bile salt export pump (ABCB11) in MDCK II cells. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* **292**, G818-G828.
- Mullis, K.B. & Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335-350.
- Olivares, L., Aragón, C., Giménez, C. & Zafra, F. (1995) The role of N-glycosylation in the targeting and activity of the GLYT1 glycine transporter. *J. Biol. Chem.* **270**, 9437-9442.
- Oliver, J.D., Roderick, H.L., Llewellyn, D.H. & High, S. (1999) ERp57 functions as a subunit of specific complexes formed with the ER lectins calreticulin and calnexin. *Mol. Biol. Cell* **10**, 2573-2582.
- Oliver, J.D., van der Wal, F.J., Bulleid, N.J. & High, S. (1997) Interaction of the thiol-dependent reductase ERp57 with nascent glycoproteins. *Science* **275**, 86-88.
- Pajor, A.M., Krajewski, S.J., Sun, N. & Gangula, R. (1999) Cysteine residues in the Na<sup>+</sup>/dicarboxylate co-transporter, NaDC-1. *Biochem. J.* **344 Pt 1**, 205-209.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C.A., Motoshima, H., Fox, B.A., Le Trong, I., Teller, D.C., Okada, T., Stenkamp, R.E., Yamamoto, M. & Miyano, M. (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289**, 739-745.
- Panayotova-Heiermann, M., Leung, D.W., Hirayama, B.A. & Wright, E.M. (1999) Purification and functional reconstitution of a truncated human Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter (SGLT1) expressed in *E. coli*. *FEBS Lett.* **459**, 386-390.
- Peti, W. & Page, R. (2007) Strategies to maximize heterologous protein expression in *Escherichia coli* with minimal cost. *Protein Expr. Purif.* **51**, 1-10.
- Plempner, R.K. & Wolf, D.H. (1999) Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 266-270.
- Pompejus, M., Friedrich, K., Teufel, M. & Fritz, H.J. (1993) High-yield production of bacteriorhodopsin via expression of a synthetic gene in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **211**, 27-35.
- Puri, N., Appa Rao, K.B., Menon, S., Panda, A.K., Tiwari, G., Garg, L.C. & Totey, S.M. (1999) Effect of the codon following the ATG start site on the expression of ovine growth hormone in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **17**, 215-223.
- Quick, M. & Wright, E.M. (2002) Employing *Escherichia coli* to functionally express, purify, and characterize a human transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 8597-8601.
- Ranaldi, G., Islam, K. & Sambuy, Y. (1994) D-cycloserine uses an active transport mechanism in the human intestinal cell line Caco 2. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 1239-1245.
- Rasmussen, S.G., Choi, H.J., Rosenbaum, D.M., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Edwards, P.C., Burghammer, M., Ratnala, V.R., Sanishvili, R., Fischetti, R.F., Schertler, G.F., Weis, W.I.



- & Kobilka, B.K. (2007) Crystal structure of the human  $\beta_2$  adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **450**, 383-387.
- Ritter, C. & Helenius, A. (2000) Recognition of local glycoprotein misfolding by the ER folding sensor UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 278-280.
- Rozema, D. & Gellman, S.H. (1996) Artificial chaperone-assisted refolding of denatured-reduced lysozyme: modulation of the competition between renaturation and aggregation. *Biochemistry* **35**, 15760-15771.
- Rudolph, R. & Lilie, H. (1996) In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB J.* **10**, 49-56.
- Rungpragayphan, S., Nakano, H. & Yamane, T. (2003) PCR-linked in vitro expression: a novel system for high-throughput construction and screening of protein libraries. *FEBS Lett.* **540**, 147-150.
- Sagné, C., Agulhon, C., Ravassard, P., Darmon, M., Hamon, M., El Mestikawy, S., Gasnier, B. & Giros, B. (2001) Identification and characterization of a lysosomal transporter for small neutral amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 7206-7211.
- Sawamiphak, S., Sophasan, S., Endou, H. & Boonchird, C. (2005) Functional expression of the rat organic anion transporter 1 (rOAT1) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1720**, 44-51.
- Sawasaki, T., Ogasawara, T., Morishita, R. & Endo, Y. (2002) A cell-free protein synthesis system for high-throughput proteomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 14652-14657.
- Schröder-Tittmann, K. (2009) Rekombinante Herstellung, Renaturierung und biophysikalische Charakterisierung des humanen *Glucagon-like Peptide-1* Rezeptors. *Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.
- Schwarz, D., Dötsch, V. & Bernhard, F. (2008) Production of membrane proteins using cell-free expression systems. *Proteomics*. **8**, 3933-3946.
- Schwarz, D., Junge, F., Durst, F., Frölich, N., Schneider, B., Reckel, S., Sobhanifar, S., Dötsch, V. & Bernhard, F. (2007a) Preparative scale expression of membrane proteins in *Escherichia coli*-based continuous exchange cell-free systems. *Nat. Protoc.* **2**, 2945-2957.
- Schwarz, D., Klammt, C., Koglin, A., Löhr, F., Schneider, B., Dötsch, V. & Bernhard, F. (2007b) Preparative scale cell-free expression systems: new tools for the large scale preparation of integral membrane proteins for functional and structural studies. *Methods* **41**, 355-369.
- Shine, J. & Dalgarno, L. (1974) The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **71**, 1342-1346.
- Sigel, E. (1990) Use of *Xenopus* oocytes for the functional expression of plasma membrane proteins. *J. Membr. Biol.* **117**, 201-221.
- Spirin, A.S. (2004) High-throughput cell-free systems for synthesis of functionally active proteins. *Trends Biotechnol.* **22**, 538-545.

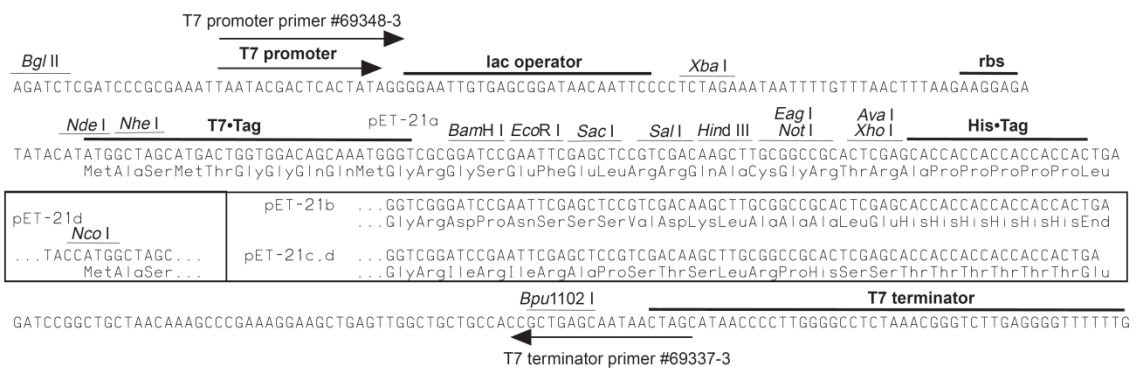
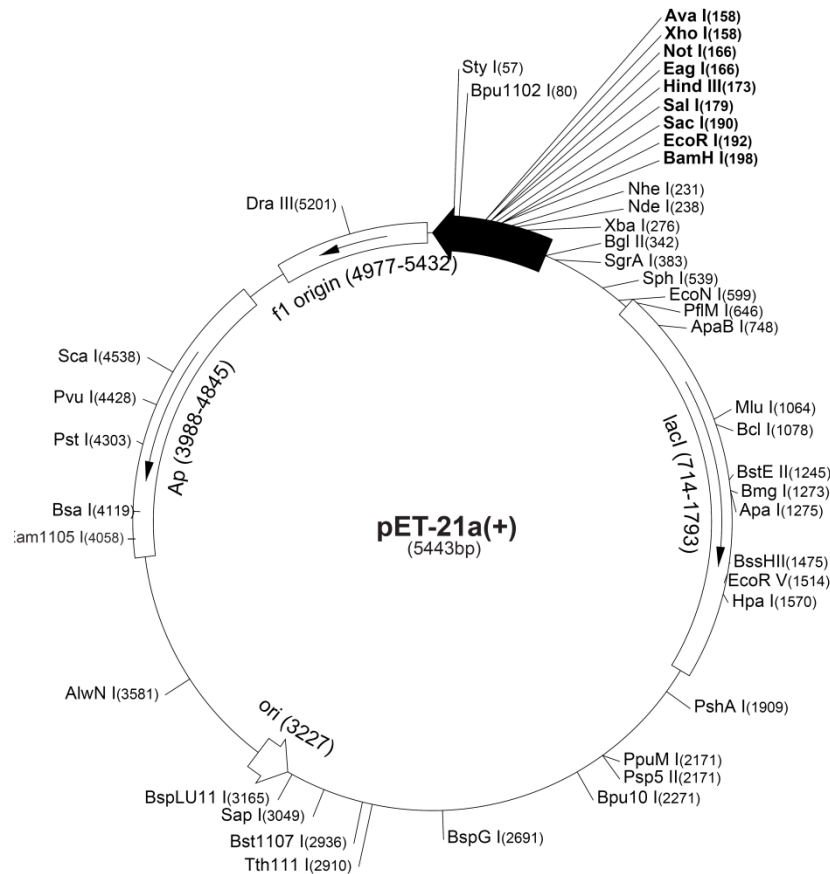
- Spirin, A.S., Baranov, V.I., Ryabova, L.A., Ovodov, S.Y. & Alakhov, Y.B. (1988) A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield. *Science* **242**, 1162-1164.
- Steitz, J.A. (1969) Polypeptide chain initiation: nucleotide sequences of the three ribosomal binding sites in bacteriophage R17 RNA. *Nature* **224**, 957-964.
- Sturm, A., Gorboulev, V., Gorbunov, D., Keller, T., Volk, C., Schmitt, B.M., Schlachtbauer, P., Ciarimboli, G. & Koepsell, H. (2007) Identification of cysteines in rat organic cation transporters rOCT1 (C322, C451) and rOCT2 (C451) critical for transport activity and substrate affinity. *Am. J. Physiol Renal Physiol* **293**, F767-F779.
- Sumikawa, K., Houghton, M., Emtage, J.S., Richards, B.M. & Barnard, E.A. (1981) Active multi-subunit ACh receptor assembled by translation of heterologous mRNA in *Xenopus* oocytes. *Nature* **292**, 862-864.
- Tanaka, K., Xu, W., Zhou, F. & You, G. (2004) Role of glycosylation in the organic anion transporter OAT1. *J. Biol. Chem.* **279**, 14961-14966.
- Tate, C.G. (2001) Overexpression of mammalian integral membrane proteins for structural studies. *FEBS Lett.* **504**, 94-98.
- Tate, C.G. & Blakely, R.D. (1994) The effect of *N*-linked glycosylation on activity of the Na<sup>+</sup>- and Cl<sup>-</sup>-dependent serotonin transporter expressed using recombinant baculovirus in insect cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 26303-26310.
- Tate, C.G., Haase, J., Baker, C., Boorsma, M., Magnani, F., Vallis, Y. & Williams, D.C. (2003) Comparison of seven different heterologous protein expression systems for the production of the serotonin transporter. *Biochim. Biophys. Acta* **1610**, 141-153.
- Thiebe, R. (1975) Aminoacylation of tRNA. Magnesium requirement and spermidine effect. *FEBS Lett.* **51**, 259-261.
- Thwaites, D.T. & Anderson, C.M. (2007) Deciphering the mechanisms of intestinal imino (and amino) acid transport: the redemption of SLC36A1. *Biochim. Biophys. Acta* **1768**, 179-197.
- Thwaites, D.T., Armstrong, G., Hirst, B.H. & Simmons, N.L. (1995a) D-cycloserine transport in human intestinal epithelial (Caco-2) cells: mediation by a H<sup>+</sup>-coupled amino acid transporter. *Br. J. Pharmacol.* **115**, 761-766.
- Thwaites, D.T., McEwan, G.T., Cook, M.J., Hirst, B.H. & Simmons, N.L. (1993) H<sup>+</sup>-coupled (Na<sup>+</sup>-independent) proline transport in human intestinal (Caco-2) epithelial cell monolayers. *FEBS Lett.* **333**, 78-82.
- Thwaites, D.T., McEwan, G.T. & Simmons, N.L. (1995b) The role of the proton electrochemical gradient in the transepithelial absorption of amino acids by human intestinal Caco-2 cell monolayers. *J. Membr. Biol.* **145**, 245-256.
- Turner, R.J. & George, J.N. (1983) Evidence for two disulfide bonds important to the functioning of the renal outer cortical brush-border membrane D-glucose transporter. *J. Biol. Chem.* **258**, 3565-3570.
- Turner, R.J. & George, J.N. (1984) Characterization of an essential disulfide bond associated with the active site of the renal brush-border membrane D-glucose transporter. *Biochim. Biophys. Acta* **769**, 23-32.

- Vinarov, D.A., Lytle, B.L., Peterson, F.C., Tyler, E.M., Volkman, B.F. & Markley, J.L. (2004) Cell-free protein production and labeling protocol for NMR-based structural proteomics. *Nat. Methods* **1**, 149-153.
- Wakabayashi, K., Nakagawa, H., Tamura, A., Koshihara, S., Hoshijima, K., Komada, M. & Ishikawa, T. (2007) Intramolecular disulfide bond is a critical check point determining degradative fates of ATP-binding cassette (ABC) transporter ABCG2 protein. *J. Biol. Chem.* **282**, 27841-27846.
- Wang, D.N., Safferling, M., Lemieux, M.J., Griffith, H., Chen, Y. & Li, X.D. (2003) Practical aspects of overexpressing bacterial secondary membrane transporters for structural studies. *Biochim. Biophys. Acta* **1610**, 23-36.
- Wang, P., Hata, S., Xiao, Y., Murray, J.W. & Wolkoff, A.W. (2008) Topological assessment of oatp1a1: a 12-transmembrane domain integral membrane protein with three N-linked carbohydrate chains. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* **294**, G1052-G1059.
- Warne, T., Serrano-Vega, M.J., Baker, J.G., Moukhametzianov, R., Edwards, P.C., Henderson, R., Leslie, A.G., Tate, C.G. & Schertler, G.F. (2008) Structure of a  $\beta_1$ -adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **454**, 486-491.
- Wedemeyer, W.J., Welker, E., Narayan, M. & Scheraga, H.A. (2000) Disulfide bonds and protein folding. *Biochemistry* **39**, 4207-4216.
- Weickert, M.J., Doherty, D.H., Best, E.A. & Olins, P.O. (1996) Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**, 494-499.
- Wormald, M.R. & Dwek, R.A. (1999) Glycoproteins: glycan presentation and protein-fold stability. *Structure* **7**, R155-R160.
- Wunz, T.M. & Wright, S.H. (1993) Betaine transport in rabbit renal brush-border membrane vesicles. *Am. J. Physiol* **264**, F948-F955.
- Wuu, J.J. & Swartz, J.R. (2008) High yield cell-free production of integral membrane proteins without refolding or detergents. *Biochim. Biophys. Acta* **1778**, 1237-1250.
- Yamane, T., Ikeda, Y., Nagasaka, T. & Nakano, H. (2005) Enhanced cell-free protein synthesis using a S30 extract from *Escherichia coli* grown rapidly at 42 °C in an amino acid enriched medium. *Biotechnol. Prog.* **21**, 608-613.
- Yokoyama, S. (2003) Protein expression systems for structural genomics and proteomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**, 39-43.
- Zuo, X., Li, S., Hall, J., Mattern, M.R., Tran, H., Shoo, J., Tan, R., Weiss, S.R. & Butt, T.R. (2005) Enhanced expression and purification of membrane proteins by SUMO fusion in *Escherichia coli*. *J. Struct. Funct. Genomics* **6**, 103-111.

# 7 ANHANG

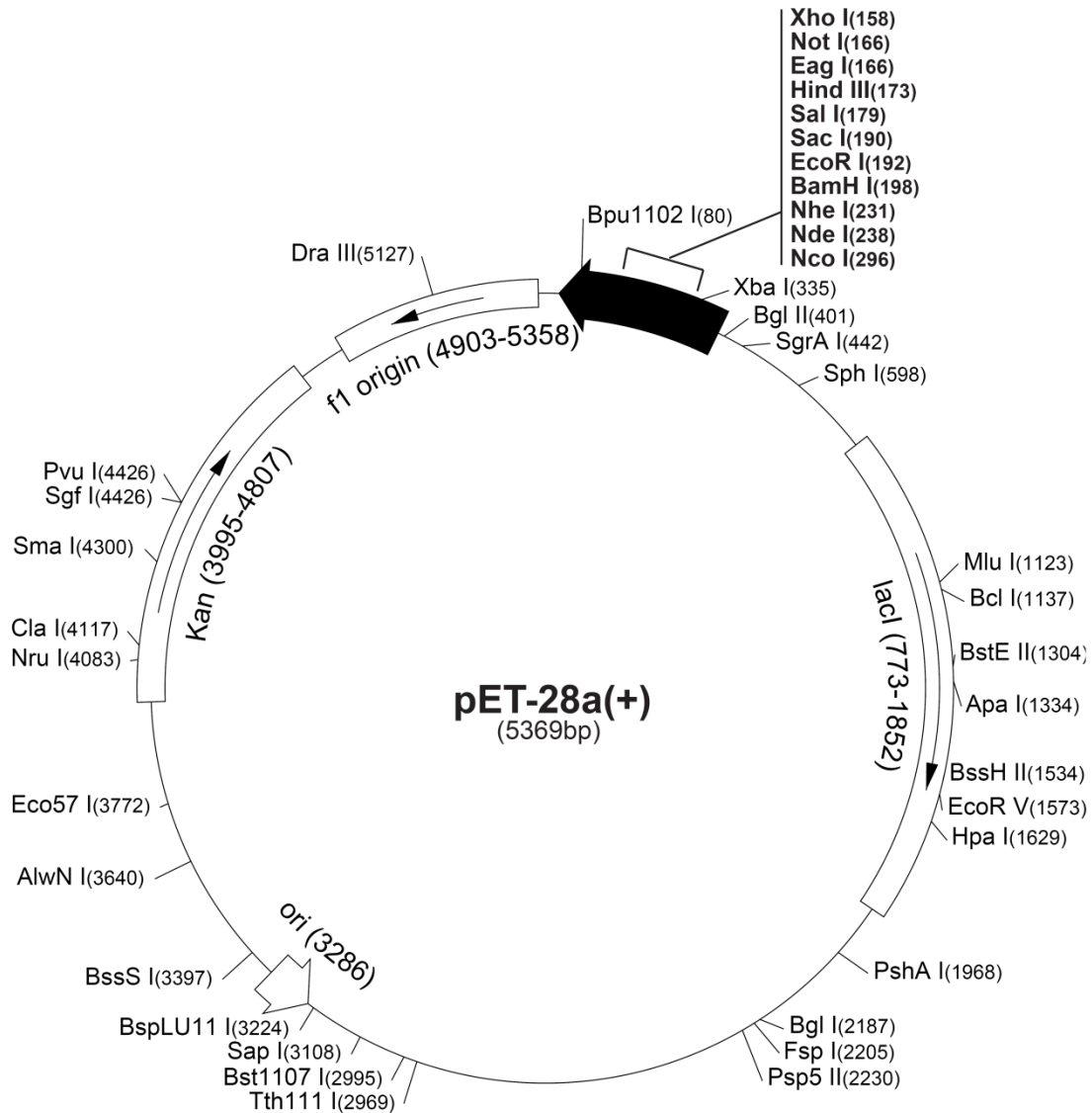
## Vektorkarten bzw. Sequenzen der verwendeten Plasmide

### pET21a



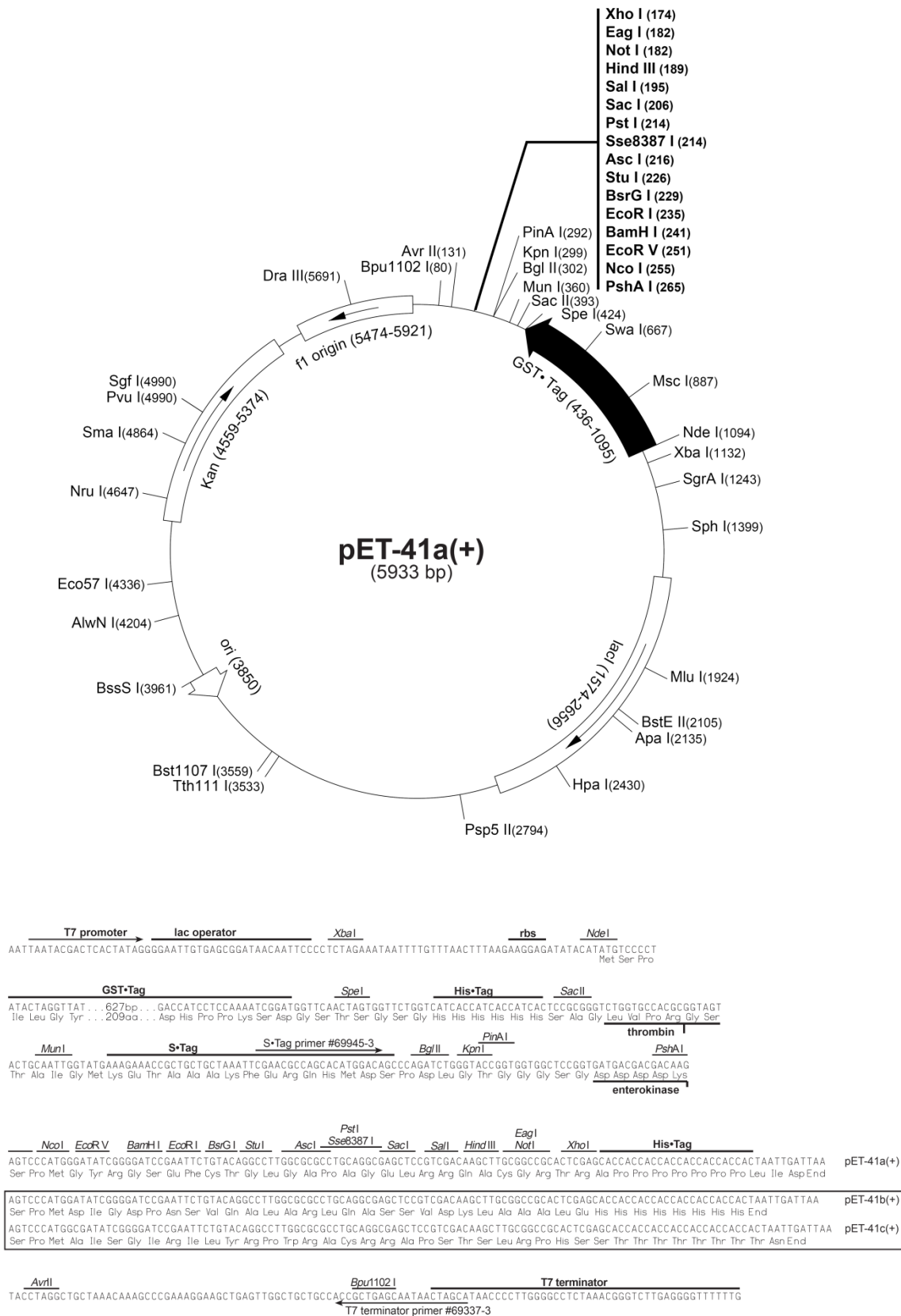
### pET-21a-d(+) cloning/expression region

## pET28a



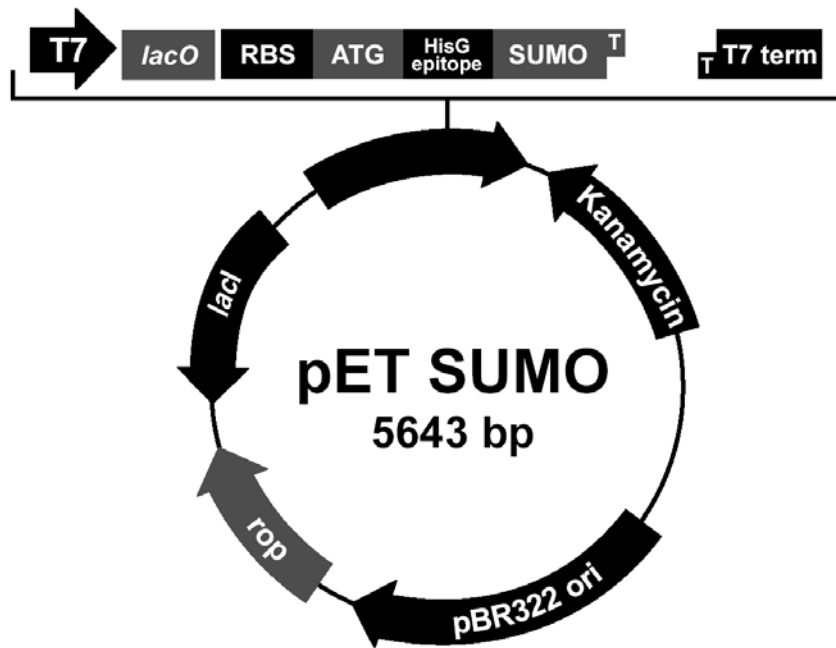
## pET-28a-c(+) cloning/expression region

pET41b



pET-41a(+) cloning/expression regions

## pETSUMO adapt



Oligos for insertion of a MCS into pETSUMO via A/T cloning

NotI  
BamHI HindIII Eag XhoI

Gly Gly  
 GGTGGT **AGAGACCT**CAGGATCCAAGCTTGC GGCCGCTCGAGA GACAAGCTT  
 CCACC **ATCTCTGG**AGTCCTAGGTTCGAACGCCGGGAGCTC TCTGTTCGAA  
BsaI

cut BamHI/BsaI (HindIII, NotI, EagI, XhoI)

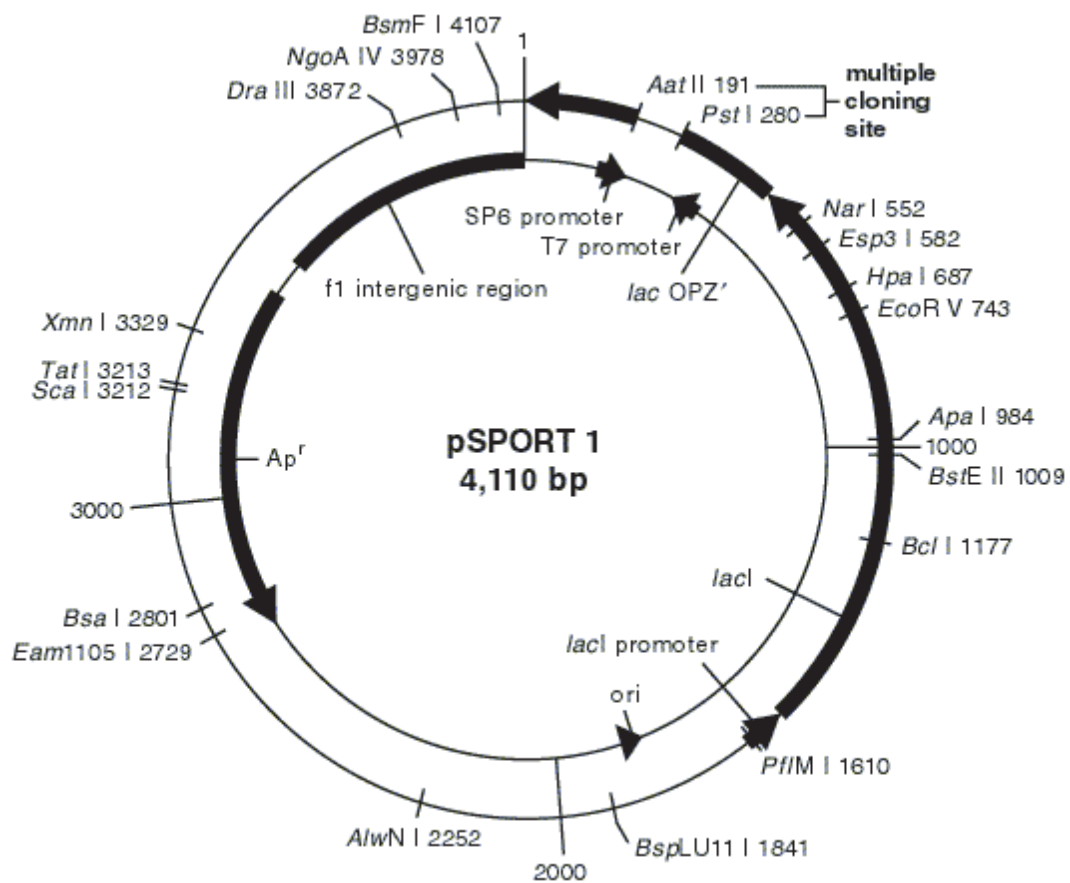
GG GATCCAAGCTT...  
 CCACCA GTTCGAA...

Primer design:

BsaI 1.Codon gene of interest  
 YZGGTCTCATGGTXXX...  
 YZCCAGAGTACCAXXX...

Second primer as usual

## pSPORT1





**pNKS**

Sequenz des pNKS-Leervektors (2858 bp)

**atttagtgacactataga**atacaagctaacaacaagaacaacaacaacaagaatcc**gacgtc**...**ctaga**attcccgggcgccgctc  
 gacgtagctttcatttgttttaattttttaaataagcattacaaaacaattaccacaacaaaaaaaaaaccaaaaaaaaacaataata  
 aagtcccacaaacaaaacggaatfatgcaaacaaagaat  
 tgctcgag**gcggccgc**tcgagcaattccgggtctccctatagtgagtcgtattaggcgtaatagcgaagaggcccgaccgacgacctttt  
 ccaacagttgagcagcctgaatggcgaatgggacgcgacctgtagcgccgcattaagcgcggcgggtggtggttacgcgcagcg  
 tgaccgctacacttgccagcgccttagcgccccgctccttcgctttctcctcctctccttcgccacgttcgcccggctttccccgtaagctc  
 taaatcgggggctcccttttaggttccgatttagtgctttacggcacctcgacccccaaaaacttgattagggtgatggttcacgtgggcc  
 atcgacctgatagacggttttcgcctttgacggttgagtcacgttcttaatagtggactcctgttccaaactggaacaactcaacct  
 tatctcgggtctattctttgattataagggaatfttgccgatttcgacctatttggttaaaaaatgagctgatttaacaaattaacgcaatfta  
 acaaatattaacgtttacaattttaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgttattttctaatacatcacaatatgt  
 atccgctcatgagacaataacacctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacatttccgctgtcccttattc  
 cttttttgcccattttgccttctgttttggctaccagaaacgctggtgaaaagatgctgaagatcagttgggtgacagtg  
 ggttacatgaaactgtagtcaacagcggtaagatccttgagagtttcgccccgaagaacttttccaatgatgagcacttttaagttct  
 gctatgtggcgcggtattatcccgtattgacgccgggcaagagcaactcggctgcccatacactatttctagaatgacttgggtgagta  
 ctaccagtcacagaaaagcatcttaccggatggcatgacagtaagagaatfatgcaagtgtgcccataacctgagtgataacactgcggg  
 ccaacttactctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaacgcctttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgtt  
 gggaaccggagctgaatgaagccataccaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttcgcaacta  
 ttaactgpcgaactactacttagcttcccggcaacaatfatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccattctgcgctc  
 gcccttccggctgggtggtttattgctgataaatctggagccggtagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggt  
 aagccctcccgtatcgtattatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgagataggtgcct  
 cactgattaagcattgtaactgtagaccaatgtaactcatatatacttttagattgatttaaaacttcattttaatttaaaggatctaggtga  
 agatccttttgataatctcatgacaaaatcccttaacgtgagtttctggtccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaagatctt  
 cttgagatcctttttctgcgctaatctgctgcttgcacaaaaaaaaccaccgctaccagcgggtggtttgttggcgatcaagagcta  
 ccaactcttttcgaaggttaactggcttcagcagagccagataaccaataactgtccttctagttagccgtagttagggccaccactca  
 agaactctgtagaccgctacatacctcgtctgtaaatcctgtaccagtggtcgtcggagtgataagtcgtgttaccggggtt  
 ggactcaagacgatagttaccggataaggcgagcgggtcgggctgaacggggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacg  
 acctacaccgaaactgagatactacagcgtgagcattgagaaagcggcggcttcccgaaggagaaaagcggcagggatccggt  
 aagcggcagggcggaacagagagcgcacgagggagcttccaggggaaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggttccgca  
 cctctgacttgcgctgattttgtgatgctcgcagggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttttaggttctc  
 ggctttgtgctggcttctgcacatgttcttctgcgttatccctgattctgtggataaccgtattaccgctttgagtgagctgataccg  
 ctgcgcgagccgaacgaccgagcgcagcgagtcagtgagcgagggaagcggaaagagcgcceaatagcaaacccgcttccccg  
 cggttgccgattcattaatgcagtaatacataaccttatgtatcacacatacg

**act ...****SP6 Promoter****gacgtc**sticky ends der *Aat*II-Schnittstelle**ctaga**sticky ends der *Xba*I-Schnittstelle**gcggccgc***Not*I-Schnittstelle zum Linearisieren

## DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Matthias Brandsch für die Möglichkeit der Durchführung der Promotion, die intensive Betreuung der Arbeit, seine ständige Hilfsbereitschaft, für viele wertvolle Ratschläge und vor allem für die Freiheit bei der Bearbeitung des Themas.

Ebenfalls allerherzlichst möchte ich Frau Dr. Eva Bosse-Doenecke danken. Ihr stetiges Interesse am Fortgang dieser Arbeit, ihre Unterstützung und Diskussionsbereitschaft sowie die vielen aufmunternden Worte haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bei Herrn Prof. Dr. Rainer Rudolph bedanke ich mich für die Möglichkeit die Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen, die hervorragenden Arbeitsbedingungen und die Ideen und Ratschläge während meiner Promotion.

Herrn Prof. Dr. Fritz Markwardt danke ich für die Hilfe bei unzähligen elektrophysiologischen Messungen und anschließenden Auswertungen, die ständige Diskussionsbereitschaft und die kritische Durchsicht der Manuskripte und der Arbeit.

Ein großer Dank gilt Herrn Dr. Matthias Weiwad für die Hilfe bei den Immunfluoreszenzaufnahmen.

Frau Schmidt, Frau Dr. Manuela Klapperstück und Herrn Dr. Wolfgang Boldt danke ich ganz besonders für die Unterstützung und Hilfestellung bei der Oozytenpräparation und cRNA-Injektion.

Herrn Prof. Dr. G. Schmalzing danke ich für die Bereitstellung des Oozytenexpressionsvektors pNKS.

Für die massenspektrometrischen Analysen bedanke ich mich bei Frau Dr. Angelika Schierhorn und Herrn Dr. Christian Ihling.

Der AG Membrantransport danke ich sehr für das herzliche Arbeitsklima, die Einführung in die Zellkulturtechniken und die gemeinsamen, sehr netten Mittagsstunden. Des Weiteren bedanke ich mich bei der AG Membranproteine für die angenehme Arbeitsatmosphäre, insbesondere bei Nils für die vielen fröhlichen Stunden, Yvonne für das Korrekturlesen und die Einführung in die Geheimnisse von Word und Frau Uta Best für die große Hilfe bei den vielen Fermentationen. Meinem ehemaligen Diplomanden Michael Jähme danke ich ebenfalls und wünsche ihm viel Erfolg für seine Promotion.

Dem Land Sachsen-Anhalt danke ich für die Bereitstellung der finanziellen Mittel (Exzellenznetzwerks Biowissenschaften „Strukturen und Mechanismen der biologischen Informationsverarbeitung“).

Meinen Eltern danke ich von ganzem Herzen für ihre immer währende Unterstützung auf meinem Lebensweg. Danke, dass ihr immer für mich da ward.

Meinem Freund Marco danke ich sehr, für sein Verständnis und seine unendliche Geduld und dass er in den zahlreichen Momenten des Frustes immer für mich da war.

**LEBENS LAUF**

Name	Madlen Dorn
Geburtsdatum	07.09.1980
Geburtsort	Lutherstadt Wittenberg
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	Bundesrepublik Deutschland

**Schulbildung**

09/1987–08/1991	Grundschule in Pratau
09/1991–08/1994	Gymnasium in Pratau
09/1994–07/1999	Melanchthon-Gymnasium Lutherstadt Wittenberg
07/1999	Abitur, Melanchthon-Gymnasium, Lutherstadt Wittenberg

**Studium**

10/1999–07/2004	Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
10/2003–07/2004	Diplomarbeit, Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung in Halle (Saale): „Identifizierung der putativen Calmodulin (CaM)-Bindestelle im humanen FKBP38“

**Berufliche Stationen**

10/2004–10/2005	wissenschaftliche Mitarbeiterin, Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung in Halle (Saale)
seit 11/2005	wissenschaftliche Mitarbeiterin, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biochemie/Biotechnologie und Biozentrum der Universität

**Auslandsaufenthalte**

02/2003–04/2003	Praktikum, University of Leeds (UK), <i>School of Biochemistry and Molecular Biology</i>
-----------------	--

Halle (Saale), 25.08.2009

Madlen Dorn

## **EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus fremden Quellen übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Die vorliegende Arbeit wurde noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Halle (Saale), den 25.08.2009

Madlen Dorn