

Zusammenfassung

Die Fähigkeit einer biologischen Zelle, selektiv Substanzen aufzunehmen oder abzugeben, ist Grundvoraussetzung für die Aufrechterhaltung eines effizienten Zellstoffwechsels. Polare oder hydrophile Moleküle können nur über spezifische Proteine, die in die Cytoplasmamembran eingelagert sind, in die Zelle transportiert werden.

Eine Gruppe von Proteinen, die sich unter anderem durch die Fähigkeit auszeichnen, basische Aminosäuren in die Zellen zu transportieren, wird unter dem Namen CATs (Cationic Amino acid Transporter) zusammengefasst. Drei Vertreter dieser Proteinfamilie (CAT-1, CAT-2B und CAT-3) weisen Transporteigenschaften des so genannten Systems y^+ auf. Für dieses System wurde in Erythrozyten eine Hemmbarkeit durch eine Kurzzeitbehandlung (10 min) mit 0,2 mM NEM (N-Ethylmaleimid) gezeigt (DEVES et al., 1993). Die Behandlung mit NEM hat in diesen Zellen jedoch keinen inhibitorischen Effekt auf das System y^+ L. Aufgrund dieser Eigenschaft wird NEM, ein Sulfhydryl-Reagenz, das in Proteinen bevorzugt Cysteinreste modifiziert, häufig zur Diskriminierung beider Transportsysteme in Zellen verwendet.

In unserer Arbeitsgruppe wurde erstmals die NEM-Wirkung an isolierten CAT- und y^+ LAT-Isoformen untersucht. Dabei ergaben Vorversuche mit in *Xenopus laevis* -Oozyten exprimierten humanen CAT und y^+ LAT-Isoformen, dass alle CAT-Isoformen (einschließlich hCAT-2A, der kein System y^+ -Verhalten aufweist) durch NEM gehemmt, beide untersuchten y^+ LAT-Isoformen nicht gehemmt werden. Anhand ihrer Empfindlichkeit gegenüber NEM können CAT- und y^+ LAT-Proteine funktionell voneinander unterschieden werden. Die NEM-vermittelte Hemmung resultiert dabei aus einer Modifikation von Cysteinresten.

Um solche Cysteinreste bestimmen zu können, die eine potentielle Zielstruktur für NEM in den CATs darstellen, wurden die Aminosäuresequenzen der hemmbaren CAT-Isoformen untereinander und mit den nicht hemmbaren y^+ LAT-Isoformen verglichen. Dabei konnten sechs, nur in den CAT-Isoformen konservierte, Cysteinreste identifiziert werden. Diese sechs Cysteinreste wurden zunächst einzeln und später in Kombination zu Alanin mutiert.

Transportstudien der in Oozyten von *Xenopus laevis* exprimierten Proteinmutanten ergaben unterschiedliche Transportaktivitäten. Alle erzeugten Mutanten zeigten weiterhin eine Transportaktivität für das Substrat L-Arginin. Für die Transportermutante hCAT-2A/C264A, wurde eine Steigerung der Transportaktivität für das Substrat L-Arginin festgestellt, während die Mutanten hCAT-2A/C33A und hCAT-2A/C427A eine Abnahme der Transporteraktivität zeigten. Mehrfachmutanten, bei denen C33 und C427 substituiert wurde, wiesen eine massiv reduzierte Transportaktivität auf.

Die Untersuchung der erzeugten Proteinmutanten ergab, dass die Transporter weiterhin durch NEM in ihrer Transporteraktivität gehemmt werden, jedoch reagierten die beiden Mutanten hCAT-2A/C33A und hCAT-2A/C273A weniger empfindlich auf den Hemmstoff.