

Transporter-Tandems zur Bestimmung der relativen Transporteffizienz von membranständigen Transportproteinen – Konstruktion und Validierung

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln



vorgelegt von

Julia Tschirka
aus Lwiw (Ukraine)

Köln, 2020

Danksagung

Diese Arbeit beginnt mit der Danksagung, denn es würde sie nicht geben, wenn nicht die Unterstützung von all den Menschen, die mir begegnet sind und mich in meiner Promotionszeit begleitet und unterstützt haben. Die Wissenschaft ist keine Disziplin der Einzelgänger, es ist eine Symbiose aus verschiedenen Ideen und Menschen, die sich gegenseitig ergänzen, inspirieren und sowohl die Welt als auch sich selbst weiterentwickeln.

In erster Linie möchte ich mich bei Prof. Dr. Dirk Gründemann für die Vergabe des Themas, Betreuung und für die Unterstützung („das Leben findet immer einen Weg“) bedanken, sowie bei meinen Kollegen Samira, Simone und Kathi, Chih-Hsuan, Julian, Lea und Mhmd.

Außerdem bedanke ich mich bei meinem Erstbetreuer Prof. Dr. Günter Schwarz und meinem Mentor Prof. Dr. Marcus Krüger sowie bei Prof. Dr. Stefan Herzig für die wissenschaftlichen Diskussionen und fachliche Unterstützung.

Ich bedanke mich bei den Mitarbeitern der Institute für Pharmakologie, Physiologie und Biochemie, sowie CECAD, insbesondere bei Uwe Fuhr, Markus Pietsch, Mechthild Schroeter, Galyna Prymachuk und Stefan Müller.

Ich bedanke mich bei den Koordinatoren der Graduierten Schulen *Graduate School for Biological Sciences* Dr. Isabell Witt und *Pharmacology and Experimental Therapeutics* Dr. Marion Rozowski: für die Weiterbildung, den Ideenaustausch, die Betreuung und Beratung. An dieser Stelle möchte ich auch Anna Köhler, Gladiola Goranci-Buzhala, Dilyana Filipova und Lyn Kailing und Alexander Popoff erwähnen: danke!

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern der *Bayer Pharmaceuticals* DMPK-Abteilung in Wuppertal, besonders bei Julia Lemmen, Uwe Thuß, Bernhard Kluger und Robert Fricke, die mir alle Facetten der Biochemie und Bioanalytik innerhalb der kurzen Zeit vorgeführt haben und den Mut zur Größe gegeben haben.

Ich bedanke mich bei Daniel für die Sonne aus Australien und bei Georgios, der in den schwierigen Zeiten meine Hand gehalten hat und der mir am Ende gezeigt hat, dass ich selbst zwei Hände habe.

Letztendlich bedanke ich mich bei meiner Mutter Olena Tschirka und bei meinem Vater Michael Tschirka, die vor 15 Jahren ein neues Leben in Deutschland mit meiner Schwester Anna Tschirka und meiner Oma angefangen haben, sowie bei meiner Freundin Christina Trück. Sie waren stets an meiner Seite sowohl in schweren, als auch in schönen Zeiten.

Wo ein Ende ist, ist auch ein Beginn

Seien Sie mutig, seien Sie frech, lebendig und neugierig!

Sie werden sehen, dass die Berge sich früher oder später in Bewegung setzen werden.

Seien Sie glücklich! Phoenix.

Im Andenken an meine Großmutter

Olga Brendel

Nach einem halben Jahrhundert hast Du Dein Zuhause gefunden...

Zusammenfassung

Transporter-Tandems zur Bestimmung der relativen Transporteffizienz von membranständigen Transportproteinen – Konstruktion und Validierung.

Die Membrantransporter spielen eine zentrale Rolle in der Zellhomöostase und ihre Charakterisierung repräsentiert einen essentiellen Schritt in der Medikamentenentwicklung.

Die Transporter-Tandems sind die Grundlage für eine neue Methode zur Messung der relativen Transporteffizienz (TE) von membranständigen Transportproteinen *in vitro*. Ein Tandem-Heterodimer besteht aus einem „Ziel“- und einem „Referenz“-Transporter, die mit Hilfe eines Linkers miteinander verknüpft werden. Die Aktivität des Ziel-Transporters wird auf die Aktivität des Referenz-Transporters normiert. Im Gegensatz zu anderen existierenden Methoden für die Normierung der Transportaktivität, die keine Unterscheidung zwischen aktiven und nicht aktiven Transportern gewährleisten, wie z.B. Membranisolierung und die darauffolgende absolute Proteinquantifizierung, erfasst das Tandem-System nur die aktiven Transporter in der Plasmamembran.

Zur Etablierung des Tandem-Systems wurde ein Tandem-Heterodimer aus zwei Transportern der SLC22-Familie, dem Ergothioneintransporter (ETT, *SLC22A4*) und dem organischen Kationen-Transporter 2 (OCT2, *SLC22A5*), generiert. Als Linker wurden vier kurze Peptide (G_{10} , $(GASG)_2$, $(GAAAK)_2$ und $(GP)_5$) verwendet. Die ETT-OCT2-Tandems wurden kinetisch mit den Substraten Ergothionein (ET) bzw. 1-Methyl-4-Phenylpyridinium (MPP^+) untersucht.

Die Tandem-Heterodimere, die keinen Linker oder einen G_{10} -Linker aufwiesen, zeigten keine Aktivität; Tandem-Konstrukte, die die Linker $(GASG)_2$, $(GAAAK)_2$ und $(GP)_5$ enthielten, waren dagegen funktionsfähig. Die Parameter der Transporter-Substrat-Interaktion für ETT und OCT2, i.e. $K_m = 32-50 \mu M$ (ETT) bzw. $K_m = 3-4 \mu M$ (OCT2) und

$V_{max} = 460-800 \text{ pmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ (ETT) bzw. $V_{max} = 390-500 \text{ pmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ (OCT2), waren im Vergleich zu den entsprechenden Parametern der monomeren Transporter leicht verändert. Das Tandem-Heterodimer ETT- $(GASG)_2$ -OCT2 erwies sich als das optimalste Konstrukt der untersuchten Serie und wurde daher in weiterführenden Experimenten verwendet.

Die Verifizierung der Stöchiometrie im ETT- $(GASG)_2$ -OCT2-Konstrukt erfolgte mittels absoluter Proteinquantifizierung (AQUA). Zur Solubilisierung und Aufarbeitung der Membranproteine wurden vier verschiedene Puffer und zwei Extraktionsmethoden eingesetzt. Die optimale Ausbeute von 100 fmol für alle Peptide und ein ETT:OCT2-Verhältnis von 0,9:1 und 0,7:1

wurde unter dem Einsatz von 2 % SDC-Puffer und *Single-Pot Solid-Phase-enhanced Sample Preparation* (SP3)-Extraktion erreicht.

Anschließend wurden die Transporter-Tandems ETT-(GASG)₂-OCT2 und ETT-L503F-(GASG)₂-OCT2 zur Bestimmung der relativen TE der „Ziel“-Transporter ETT *wt* und der Mutante ETT-L503F, die mit chronischen Autoimmunerkrankungen wie Rheumatoide Arthritis assoziiert ist, generiert. Die ETT-L503F-Mutante wies im Vergleich zu ETT *wt* eine 4-fach höhere TE für den Transport des Substrates ET auf.

Die vorliegende Arbeit präsentiert den ersten Schritt in der Entwicklung eines Transporter-Tandem-Systems zur Bestimmung der relativen TE. Die Analyse weiterer Transporter-Heterodimere zur Identifizierung von optimalen „Referenz“-Transportern und Linkern ist jedoch für eine Verifizierung der Methode unerlässlich. Ein optimiertes Transporter-Tandem-System könnte zukünftig zur Bestimmung der relativen TE von Transportern und zu ihrer Klassifizierung ohne Membranisolierung und Proteinquantifizierung *in vitro* verwendet werden, um die Medikamentenentwicklung zu beschleunigen.

Abstract

Transporter-tandems as a tool for determination of the relative transport efficiency of membrane transport proteins – construction and validation.

Membrane transporters play a key role in the cell homeostasis and their characterization is essential for drug development.

Transporter tandems are the basis for a new method to measure the relative transport efficiency (TE) of membrane transport proteins *in vitro*. A heterodimeric tandem consists of a "target" transporter and a "reference" transporters, which are connected by a short peptide linker. The activity of the target transporter is then related to the activity of the reference transporter. In comparison to existing scaling methods for transporter activity, which do not distinguish between active and non-active transporters, such as membrane isolation followed by absolute protein quantification, the tandem system only analyses the active transporters in the membrane.

To establish the tandem system, a tandem heterodimer consisting of two transporters from the SLC22 family i.e. the ergothioneine transporter (ETT, *SLC22A4*) and the organic cation transporter 2 (OCT2, *SLC22A5*), was generated. Four different peptides (G₁₀, (GASG)₂, (GAAAK)₂ und (GP)₅) were used as linkers. The kinetics of ETT-OCT2 tandems was analysed using the substrates ergothioneine (ET) and 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺), respectively.

The tandems without any linker and with a G₁₀ linker were not active. However, the tandems carrying the linkers (GASG)₂, (GAAAK)₂ and (GP)₅ proved to be functional with slightly different kinetic parameters in comparison to monomeric transporters. The values of K_m for ETT and OCT2 were 23-56 and 3-5 μM, respectively, whereas the respective values of V_{max} were 460-800 and 390-500 pmol×mg⁻¹×min⁻¹, respectively. The tandem construct with ETT-(GASG)₂-OCT2 showed the most optimal kinetic results of the investigated series and, thus, was used for further experiments.

The stoichiometry in the ETT-(GASG)₂-OCT2 tandem was verified by absolute protein quantification (AQUA) using four different buffers and two sample preparation protocols were used. The most optimal peptide yield of around 100 fmol for all peptides and ETT:OCT2 stoichiometry of 0,9:1 and 0,7:1 were found for samples solubilized in 2 % SDC buffer and processed according to the *Single-Pot Solid-Phase-enhanced Sample Preparation* (SP3) protocol.

Subsequently, the tandems ETT-(GASG)₂-OCT2 und ETT-L503F-(GASG)₂-OCT2 were generated to determine the relative TE of the "target" transporters ETT *wt* and the mutant ETT-

L503F, that is associated with chronic autoimmune diseases like Rheumatoid arthritis. Compared to ETT *wt*, the ETT-L503F mutant exhibited a 4-fold higher TE for the transport of the substrate ET.

This study represents the first step in the development of a transporter tandem system to determine the relative TE. However, the analysis of further transporter tandems to identify optimal “reference” transporters and linkers is required for verification of the method. An optimized transporter tandem system might be used in the future to determine the relative TE of transporters and to for their classification, thus facilitating the process of drug development, rendering membrane isolation and absolute protein quantification unnecessary.