

**Die Transporter SLC22A7 (OAT2) und SLC22A13:
Substratsuche, Lokalisation,
Entdeckung eines Orotsäure-Transporters**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Christian Fork

aus Köln

Köln, 2009

Berichtersteller:
(Gutachter)

Professor Dr. Reinhard Krämer

Professor Dr. Ulf-Ingo Flügge

Professor Dr. Dirk Gründemann

Tag der mündlichen Prüfung: 14.01.10

**The transporters SLC22A7 (OAT2) and SLC22A13:
substrate elucidation, localization,
discovery of an orotic acid transporter**

The solute carriers SLC22A7 (OAT2, organic anion transporter 2) and SLC22A13 are conserved across several mammalian species. Human OAT2 is predominantly expressed in the liver, whereas SLC22A13 is specifically found in the kidney. For both the physiological significances are unknown. Basically transporters are defined through their substrate spectrum. For this reason substrates were elucidated via LC-MS- (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) difference shading. For SLC22A13h (human) guanidiniumsuccinate (GSA) was found and for OAT2h trigonelline (Trig). In addition, other related compounds or substrates from the other organic anion transporters were accepted by SLC22A13: the organic anions α -ketoglutarate, glutarate, glycocholate, guanidiniumglutarate (GGA), nicotinate, para-aminohippurate, pantothenate (PA), orotate, and urate as well as the zwitterions glycylproline (GP), prolylglycine (PG) and creatine. The highest transport efficiency (TE) was measured for nicotinate ($15 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$). Due to the fact that intracellular concentrations of GSA, GGA, GP, PG and PA were decreased in SLC22A13 expressing cells it could be hypothesized, that this transporter acts as an exchanger. This interpretation was confirmed by trans-stimulation experiments. Furthermore, the exact localization of SLC22A13 in the rat kidney was determined by immunohistochemical staining with a self designed antibody. It was indicated for the first time, that the transporter is located in the basolateral membrane of intercalated cells in the collection duct. Based on these results, the hypothesis has been developed that SLC22A13 is involved in the renal excretion and/or reabsorption of organic anions in cooperation with the transporter SLC22A9 (located in the apical membrane of intercalated cells).

As mentioned above, Trig is a specific substrate for OAT2 from human and rat ($\text{TE} = 4 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$, $K_m = 409 \mu\text{M}$). Further experiments have shown that the glutamic acid at position 441 in the human protein is relevant for Trig uptake. Afterwards, several other related compounds were tested and nicotinate riboside was found to be another substrate ($\text{TE} = 7 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$). But the highest TE was measured for the pyrimidine nucleotide precursor orotic acid ($\text{TE} = 74\text{-}99 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$, $K_m = 234 \mu\text{M}$). This uptake is exclusively carried out by the rat transporter. Because of this experimental result, the model is proposed that OAT2 is involved in the development of the fatty liver of rats (hepatic steatosis) derived due to the increased uptake of orotic acid with the nutriment. Thus, for the first time an orotic acid transporter was discovered in eukaryotes.

Die Transporter SLC22A7 (OAT2) und SLC22A13: Substratsuche, Lokalisation, Entdeckung eines Orotsäure-Transporters

Die Solute Carrier SLC22A7 (OAT2, „Organic Anion Transporter 2“) und SLC22A13 liegen in mehreren Mammalia-Spezies konserviert vor. OAT2 wird im Mensch primär in der Leber exprimiert, wohingegen SLC22A13 hauptsächlich in den Nieren vorzufinden ist. Ihre physiologische Bedeutung ist jedoch unklar. Da Transporter im Wesentlichen durch ihre Substrate definiert werden, wurden Substrate für diese beiden verwandten Proteine, mittels LC-MS- (Liquid Chromatography – Mass Spectrometry) Differenz Abtönung, aufgespürt. Über diese Methode konnten Guanidiniumsuccinat (GSA) für SLC22A13h (human) und Trigonellin (Trig) für OAT2h als Substrate identifiziert werden. Darüber hinaus konnten die organischen Anionen α -Ketoglutarat, Glutarat, Glycocholat, Guanidiniumglutarat (GGA), Nikotinat, para-Aminohippurat, Pantothenat (PA), Orotat und Urat sowie die Zwitterionen Glycylprolin (GP), Prolylglycin (PG) und Kreatin als Substrate für SLC22A13h gefunden werden. Die höchste Transporteffizienz (TE) von $15 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$ wurde hierbei mit dem Nikotinat erzielt. Auf Grund eines verminderten intrazellulären Gehalts von GSA, GGA, GP, PG und PA bei Expression von SLC22A13h in HEK293-Zellen sowie trans-Stimulations Experimente, ließ die Schlussfolgerung zu, dass SLC22A13h als Austauschoperiert. Neben dem Aufspüren von Substraten wurde die Lokalisation von SLC22A13 durch eine Antikörperfärbung untersucht. So konnte erstmalig gezeigt werden, dass der Transporter in der basolateralen Membran von Schaltzellen im Sammelrohr der Rattenniere lokalisiert ist. Aufgrund dieser Tatsache, wurde die Hypothese aufgestellt, dass SLC22A13 für die Exkretion und/oder Resorption von organischen Anionen, im Zusammenspiel mit dem in Schaltzellen apikal lokalisierten SLC22A9 eine Rolle spielt.

Für OAT2 konnte festgestellt werden, dass Trig ein spezifisches Substrat für den humanen und den orthologen Rattentransporter (OAT2r) ($TE = 4 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$, $K_m = 409 \mu\text{M}$) ist. Die Glutaminsäure an Position 441 im humanen Protein ist am Trig-Transport involviert. Mit Trig als Leitstruktur wurden strukturähnliche Verbindungen auf einen Transport untersucht. Nikotinat-Ribosid wurde hierbei als ein weiteres Substrat nachgewiesen (TE für OAT2r $7 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$). Des Weiteren wurde erstmalig aufgedeckt, dass OAT2r das Pyrimidin-Derivat Orotsäure bzw. das Salz Orotat effizient transportiert ($TE = 74-99 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$, $K_m = 234 \mu\text{M}$), wohingegen OAT2h Orotat nicht als Substrat akzeptierte. Aufgrund der hier gewonnenen Erkenntnisse, kann die anatomische und physiologische Veränderung der Rattenleber (Steatosis hepatis (Fettleber)) durch vermehrte Orotsäure-Aufnahme mit der Nahrung auf OAT2r zurückgeführt werden. Mit OAT2r wurde zum ersten mal ein Orotsäure-Transporter in Eukaryonten identifiziert.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Major Facilitator Superfamilie (MFS)	1
1.2	Transportproteine bei der Exkretion und Resorption von nicht biomembrangängigen Substanzen in Niere und Leber	2
1.2.1	Die Leber.....	2
1.2.2	Die Niere.....	4
1.3	Die SLC22-Transporterfamilie.....	7
1.3.1	Der Transporter OAT2	12
1.3.2	Der Transporter SLC22A13	15
1.4	Bedeutung der LC-MS-Technik für die Substratforschung.....	15
1.5	Ziel der Arbeit	17
2	Material und Methoden.....	18
2.1	Klonierung von OAT1h, OAT2h, OAT2r URAT1h, und SLC22A13h	18
2.2	Genbankeinträge von OAT1h, OAT2h, OAT2r, URAT1h und SLC22A13h.....	19
2.3	Konstruktion der SLC22A13h-, OAT2h- und OATE441Q-GFP-Konstrukte.....	19
2.4	Material	19
2.4.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	19
2.4.2	Lösungen und Puffer	19
2.4.3	Enzyme und Kits	20
2.4.4	Bakterienstamm und Zelllinie.....	21
2.4.5	Plasmide	21
2.4.6	Expressionssystem pEBTetD.....	21
2.4.7	Oligonukleotide	23
2.5	Methoden.....	24
2.5.1	Mikrobiologische Methoden	24
2.5.1.1	Nährmedien.....	24
2.5.1.2	Kultur und Lagerung von <i>E. coli</i>	25
2.5.1.3	Herstellung elektrokompenter Bakterien und Elektroporation.....	25
2.5.2	Molekularbiologische Methoden	27
2.5.2.1	In vitro Mutagenese von Plasmid-DNA	27
2.5.2.2	Phenol-Chloroform-Extraktion	28
2.5.2.3	Alkohol-Fällung.....	28
2.5.2.4	Gelelektrophorese und Gelextraktion.....	29

2.5.2.5 Restriktion von DNA	30
2.5.2.6 Ligation	30
2.5.2.7 Dephosphorylierung von DNA-Enden	31
2.5.2.8 Phosphorylierung von DNA und DNA-Enden glätten	31
2.5.2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	32
2.5.2.10 Real-time PCR	32
2.5.2.11 Sequenzierung.....	33
2.5.2.12 Plasmid-Präparation aus <i>E. coli</i>	33
2.5.2.13 Konzentrationsbestimmungen von DNA.....	34
2.5.2.14 Präparation von Gesamt-RNA aus Gewebe	34
2.5.2.15 Konzentrationsbestimmung von RNA	35
2.5.2.16 Gelelektrophorese von RNA.....	35
2.5.2.17 reverse Transkription (cDNA-Synthese)	36
2.5.3 Histochemische-Methoden	36
2.5.3.1 Paraffin-Schnitte.....	36
2.5.3.2 Hämatoxylin- und Eosin-Färbung	37
2.5.3.3 Immunhistochemie	37
2.5.3.4. Western-Blot	38
2.5.4 Biochemische Methoden.....	39
2.5.4.1 Synthese von Nikotin-D-Ribosid aus Nikotin-D-Ribonukleotid	39
2.5.4.2 Zellkultur.....	40
2.5.4.3 Transfektion von HEK-293-Zellen	40
2.5.4.4 Aufnahmeversuch	41
2.5.4.5 Proteinbestimmung.....	43
2.5.4.6 LC-MS (Liquid Chromatography- Mass Spectrometry).....	43
2.5.4.7 LC-MS-Differenz-Abtönung (engl.: difference shading)	46
2.5.4.8 GFP-Analyse der HEK293-Zellen.....	48
2.5.4.9 Durchfluss-Zytometrie.....	48
3 Ergebnisse	50
3.1 Kontrollversuche	50
3.1.1 Steuerbarkeit der Zelllinien	50
3.1.2 Zelluläre Lokalisation von OAT2h und SLC22A13h.....	51
3.2 OAT2	53
3.2.1 Substratsuche für OAT2h mittels LC-MS Difference Shading.....	53
3.2.2 Identifizierung der Signale bei m/z 138, 255 und 286	55

3.2.3 Trig Transportmessung mit OAT2h, SLC22A13h und OAT1h	58
3.2.4 Vergleich der Trig-Aufnahme zwischen dem humanen OAT2 und dem orthologen Transporter der Ratte.....	60
3.2.5 Affinität von OAT2r zu Trig	61
3.2.6 OAT2 Transportmessungen mit strukturähnlichen Verbindungen zu Trig	62
3.2.7 Vergleich der NR Aufnahme zwischen dem humanen und dem OAT2 der Ratte.....	64
3.2.8 Orotsäure bzw. Orotat Transportmessungen mit OAT2r, OAT2h, OAT1h und SLC22A13h.	65
3.2.9 Zeitverlauf des Orotat-Transports von OAT2r.....	66
3.2.10 Affinität von OAT2r zu Orotat	67
3.2.11 Triebkraft von OAT2r zu Orotat.....	68
3.2.11.1 pH-Abhängigkeit.....	69
3.2.11.2 Einfluss der Transporterinduktion in Puffer und Zellkulturmedium auf den Orotat- Transport.....	70
3.2.12 Die Mutante OAT2hE441Q.....	71
3.2.12.1 Nachweis der Mutante auf Proteinebene.....	72
3.2.12.2 Trig Transportmessung mit der Mutante OAT2hE441Q	73
3.2.13 relative Expression von OAT2 in Leber und Niere von weiblichen und männlichen Ratten	74
3.3 SLC22A13	75
3.3.1 Substratsuche für SLC22A13h mittels LC-MS Difference Shading	75
3.3.2. Identifizierung des Signals bei m/z 176.....	76
3.3.3 SLC22A13h Transportmessung mit GSA.....	78
3.3.4 SLC22A13h Transportmessung mit Substanzen des Harnstoffzyklus.....	79
3.3.5 SLC22A13h Transportmessung mit höheren GSA Konzentrationen und längeren Inkubationszeiten	80
3.3.6 Trans-Stimulation von SLC22A13 mit GSA und PAH.....	82
3.3.7 Cis-Inhibition der durch SLC22A13 vermittelte PAH-Aufnahme	83
3.3.8 SLC22A13h Transportmessungen von Guanidinverbindungen mit Strukturähnlichkeit zu GSA	84
3.3.9 Vergleich des GSA- und GGA-Transports zwischen SLC22A13h, URAT1h und OAT1h.....	86
3.3.10 SLC22A13h Transportmessungen mit Substraten der Organischen Anionen Transporter der SLC22-Familie	87
3.3.11 Vergleich von PAH, Urat und Glutarat: Transportmessungen zwischen SLC22A13h, URAT1h und OAT1h.....	88
3.3.12 SLC22A13 Transportmessungen mit Glycinverbindungen	90
3.3.13 SLC22A13h, OAT1h und OAT2h Transportmessungen mit cGMP und 2-Deoxyguanosin..	92

3.3.14 SLC22A13hTransportmessung mit Nikotinat	94
3.3.15 Lokalisation von SLC22A13 in der Rattenniere	95
3.3.15.1 Spezifität des Antikörpers	96
3.3.15.2 Immunlokalisierung von SLC22A13 in der Rattenniere.....	97
4 Diskussion.....	103
4.1 OAT2	103
4.1.1 OAT2: ein spezifischer Transporter für Trigonellin	103
4.1.2 OAT2: ein Transporter für Nikotinat-Ribosid	105
4.1.3 OAT2 der Ratte ein sehr effizienter Transporter für Orotat	107
4.1.4 OAT2 ist involviert bei der Steatosis hepatis (Fettleber) der Ratte	108
4.1.5 Substratspektrum von OAT2 für die hier untersuchten Substanzen	111
4.2 SLC22A13.....	114
4.2.1 SLC22A13 akzeptiert Guanidiniumsuccinat, Guanidiniumglutarat und Kreatin als Substrat	114
4.2.2 SLC22A13h akzeptiert <i>para</i> -Aminohippurat, α -Ketoglutarat und Urat als Substrat.....	115
4.2.3 SLC22A13h akzeptiert Glycocholat, Glycylprolin, Prolylglycin und Pantothenat als Substrat	116
4.2.4 Substratspektrum von SLC22A13	116
4.2.5 Lokalisation von SLC22A13r	118
4.3 Ausblick	122
5 Zusammenfassung	123
6 Abkürzungen	125
7 Literaturverzeichnis	128
8 Anhang.....	145

1 Einleitung

Die vielfältigen Stoffwechselfunktionen lebender Zellen erfordern die permanente Aufnahme von Nährstoffen zur Energieversorgung und zum Aufbau der Zellsubstanz. Darüber hinaus müssen sowohl Stoffwechselendprodukte, darunter toxische Substanzen und Signalmoleküle für die Zell-Zell-Kommunikation, ausgeschieden werden. Zu diesem Zweck befinden sich spezielle Proteine, Transporter, in der Zellmembran, welche die Aufnahme oder den Efflux von nicht-biomembrangängigen Substanzen katalysieren.

Die Sequenzierung des menschlichen Genoms erbrachte die Existenz von etwa 2000 Transporter verwandten Genen (5-10% des Genoms) [Landowski et al., 2007; Ballatori 2005]. Die hohe Anzahl von Transportergenen ist hinsichtlich der enormen Anzahl von unterschiedlichen endogenen und exogenen Substanzen nicht überraschend. Es unterstreicht die biologische Signifikanz der Transporter. Zumal mehrere ererbte und erlangte Krankheiten auf defekte Transporter oder fehlerhafte Regulation in ihrer Expression zurückzuführen sind. Erst in den letzten Jahrzehnten, mit Aufkommen der funktionellen Expression in Zellsystemen sowie Rekonstitution dieser Proteine in künstliche Membranen, ist es gelungen die physiologische Funktionen vieler dieser Proteine aufzuklären. Jedoch ist bis heute die Bedeutung mehrerer Transporter immer noch ungeklärt. Denn um diese zu definieren muss vor allem das Substratspektrum und die Lokalisation bekannt sein.

1.1 Major Facilitator Superfamilie (MFS)

Allgemein werden zwei Klassen von Transportproteinen unterschieden. Die Adenosin-Triphosphat (ATP)-Binding Cassette Transporter (ABC-Transporter) gehören zu den so genannten primären Transportsystemen. Sie nutzen die Energie aus der Hydrolyse von ATP um Moleküle zu transportieren. Die zweite Gruppe bilden die Major Facilitator Superfamilie (MFS-) Transporter, deren Mitglieder als sekundäre Transporter bzw. Carrier bezeichnet werden [Pao et al., 1998]. Hierbei ist die treibende Kraft für den Transportvorgang die Energie, die in Form eines Konzentrationsgradienten entlang der Plasmamembran gespeichert ist. Der sekundäre Transport kann als Uniport, Symport oder Antiport erfolgen. Bei einem Uniport wird der Transport durch die Konzentrationsdifferenz der zu transportierenden Substanz in eine Richtung getrieben. Beim Symport erfolgt der Transport gemeinsam mit der Verbindung, deren Gradient über die Membran die Energie liefert, während beim Antiport zwei Substrate gegeneinander bewegt werden. Die MF-Superfamilie besteht aus 58 verschiedenen Familien mit bisher etwa 5000 sequenzierten Mitgliedern [Law et al., 2008]. Die MFS-Transporter sind in allen Organismen und allen Zellen anzufinden. Im

Gegensatz zu den ABC-Transportern, die aus mehreren Proteinkomponenten aufgebaut sind, setzen sich die MFS-Transporter fast ausschließlich nur aus einer Polypeptidkette zusammen, die im Durchschnitt aus 400-600 Aminosäuren bestehen. Strukturell besitzen die meisten Mitglieder 12 Transmembran- α -helicale-Segmente [Lemieux et al., 2007]. Von Membrankanälen unterscheiden sie sich dadurch, dass sie keine durchgehende Öffnung zwischen beiden Seiten der Membran herstellen können.

1.2 Transportproteine bei der Exkretion und Resorption von nicht biomembrangängigen Substanzen in Niere und Leber

Die Leber und die Niere sind essentielle Organe für die Elimination von endogenen Substanzen wie bspw. anfallenden Nebenprodukten des Stoffwechsels sowie exogenen Substanzen. Die Niere spielt außerdem eine entscheidende Rolle bei der Rückgewinnung von wertvollen Verbindungen. Hierbei müssen diese Substanzen von einem Kompartiment (z.B. Blut) in ein anderes gelangen (Galle, Urin). Durch Barrieren zwischen den Kompartimenten, gebildet in der Leber durch Hepatozyten und in der Niere durch Tubuluszellen, bedarf es der Hilfe von Transportern, die Substanzen aus dem Blut in die Zellen fördern und von dort über einen Efflux in die Galle oder in den Harn sekretiert werden. Solch ein vektorieller Transport ist unerlässlich für die Entgiftung, Ausscheidung und Rückgewinnung von nicht-biomembrangängigen Substanzen [Ito et al., 2005]. So nehmen besonders Transporter in diesen beiden Organen einen starken Einfluss auf die Pharmakokinetik sowie Pharmakodynamik von Wirkstoffen und können damit potentielle Angriffspunkte für neue Wirkstoffe sein.

1.2.1 Die Leber

Die Zellen der Leber, die Hepatozyten, sind ausgestattet mit Enzymen, die es ermöglichen Substanzen chemisch zu modifizieren, so dass sie wasserlöslicher werden und entweder über die Nieren oder über die Galle ausgeschieden werden können. Für die Aufnahme von nicht-biomembrangängigen Substanzen in die Hepatozyten sind vorwiegend Solute Carrier (SLC), die ein Bestandteil der MFS sind, verantwortlich [Ballatori, 2005]. So sind Transporter aus der Gruppe der SLC10, SLC21/SLCO und SLC22 auf der Blut zugewandten Seite (sinusoidale Membran) lokalisiert. Die Ausscheidung unterschiedlichster Verbindungen aus den Hepatozyten erfolgt durch die ABC-Transporter. So sind die MRP-Transporter (multidrug resistance-associated proteins) für die Sekretion von Substanzen aus den Hepatozyten in das sinusoidale Blut der Leber verantwortlich und fügen diese somit dem Blutkreislauf wieder zu. Für die Exkretion von Xenobiotika und Metaboliten in die Galle sind zusätzlich zu den MRP-Transportern die MDR-(multidrug resistance proteins) Transporter, auch als P-

Glycoproteine bezeichnet, sowie das BCRP- (breast cancer resistance protein) und BSEP- (bile salt export pump) Protein von Bedeutung (Abb. 1.1) [Takikawa, 2002; Chandra and Brouwer, 2004; Ballatori, 2005].

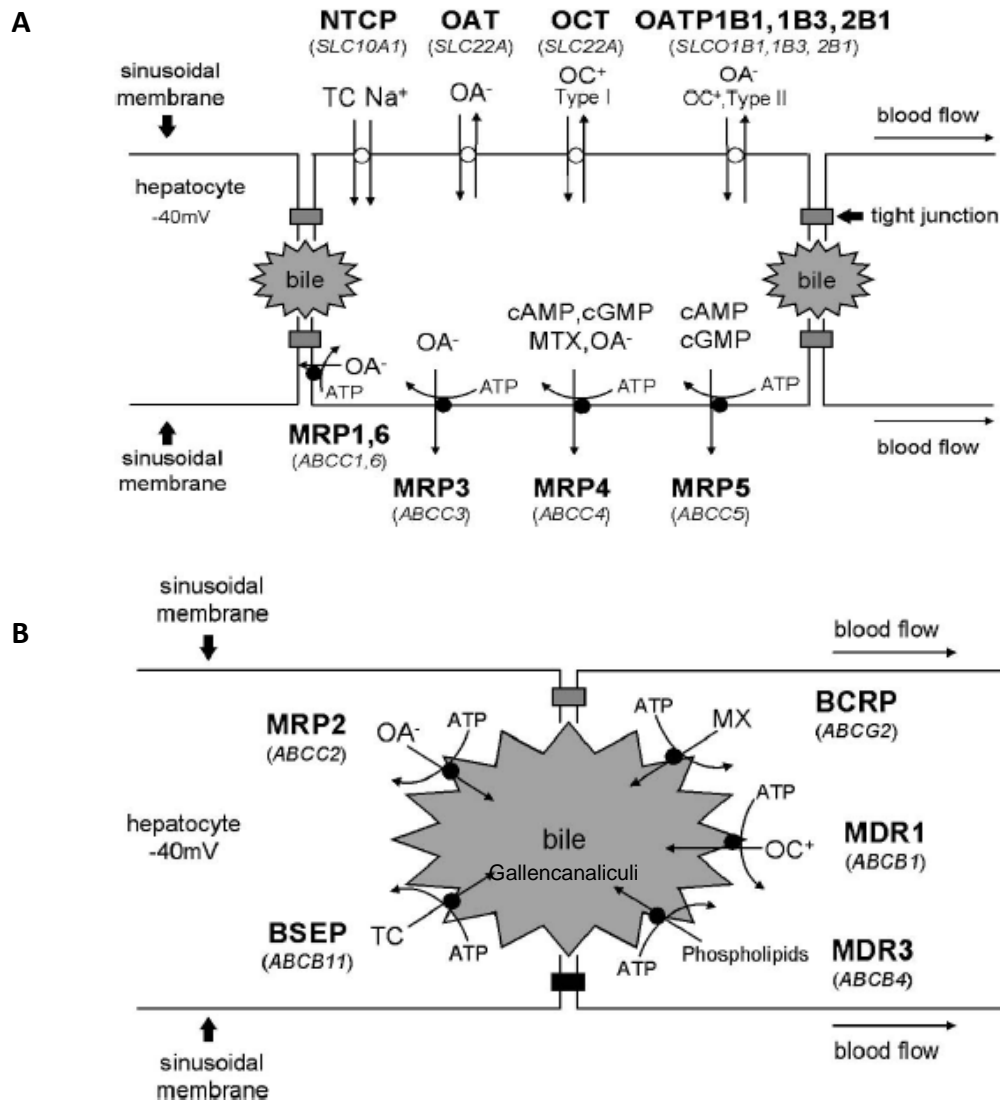


Abb. 1.1: Transporter der humanen Leber. (A) Schematische Darstellung von drei Hepatozyten. Auf der Blut zugewandten Seite der Hepatozyten befinden sich in der sinusoidalen (basolateralen) Membran Transportproteine, die für die Aufnahme (Solute Carrier) und Abgabe (ABC-Transporter) diverser Substanzen zuständig sind. (B) Schematische Darstellung von zwei Hepatozyten, die mit ihrer apikalen Membran die Gallenkanaliculi bilden. ABC-Transporter in der canaliculären Membran befördern Substanzen in die Galle. BCRP = Breast Cancer Resistance Protein, BSEP = Bile Salt Export Pump, MDR = Multidrug Resistance Protein, MRP = Multidrug Resistance Associated Protein, NTCP = Na⁺-Taurocholate Cotransporting Polypeptide, OAT = Organic Anion Transporter, OATP = Organic Anion Transporting Polypeptide, OCT = Organic Cation Transporter, cAMP = Cyclisches Adenosinmonophosphat, cGMP = Cyclisches Guanosinmonophosphat, MTX = Methotrexat, MX = Mitoxantron, OA⁻ = organische Anionen, OC⁺ = organische Kationen, TC = Taurocholat. Abbildung von Chandra and Brouwer, 2004.

1.2.2 Die Niere

Wie später dargestellt, mündet ein Teil der Untersuchungen dieser Arbeit in der exakten Lokalisation eines Transporters in der Niere. Daher sollen bereits an dieser Stelle einige anatomische und physiologische Grundlagen der Niere beschrieben werden.

Im Längsschnitt der humanen Niere ist bereits makroskopisch die Nierenrinde (Cortex) und das Nierenmark (Medulla) zu erkennen (Abb. 1.2). Das Mark wird auf Grund der Verteilung der Tubuli in eine äußere und einer innere Zone aufgeteilt, wobei sich die äußere Zone weiter in einen äußeren und einen inneren Streifen unterteilen lässt (Abb. 1.2, Abb. 1.3). Im Gegensatz zur Rattenniere ist in der humanen Niere das Mark durch die Rindensubstanz in 8-17 Pyramiden unterteilt, deren Spitzen zum Zentrum hin konvergieren. Diese Spitzen, die als Nierenpapillen bezeichnet werden, sind von dem schlauchförmigen Nierenkelch (Calyces) überzogen. Sie fangen den Endharn auf und leiten ihn in den Sammelraum des Nierenbeckens. Von hier tritt der Harn in den Harnleiter (Ureter) ein, der über die Nierenpforte (Hilus), die Niere verlässt und in die Harnblase mündet.

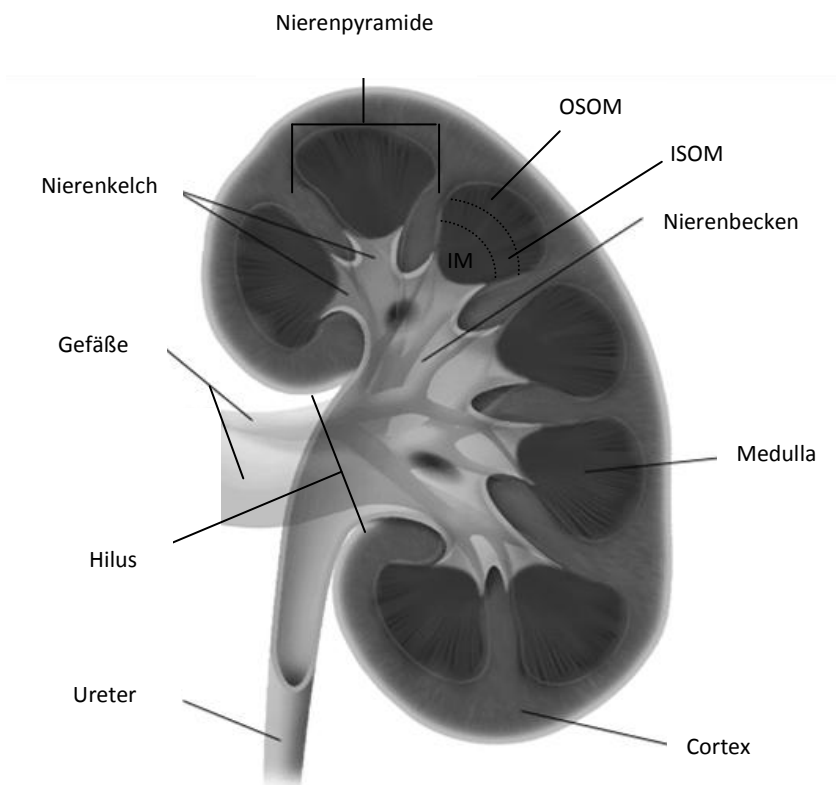


Abb. 1.2: Längsschnitt durch die humane Nieren (abgeändert aus childrenshospital.org). OSOM = Äußerer Streifen der äußeren Medulla, ISOM = Innerer Streifen der inneren Medulla, IM = Innere Medulla.

Das einzelne Bauelement der Niere ist das Nephron von der jede humane Niere um die 1 Millionen besitzt [Hughson et al., 2003]. Jedes Nephron besteht aus einem Nierenkörperchen und einem Tubulussystem. Das Nierenkörperchen (Abb. 1.3 (1)) setzt sich aus einem Kapillarknäuel, dem Glomerulus, und der diesen umgebenden Bowman-Kapsel zusammen. Während das innere Epithel der Bowman-Kapsel die Glomeruluskapillaren bedeckt, begrenzt das äußere Epithel den Kapselraum nach außen und geht in das Tubulussystem über. Aus dem durchfließenden Blutplasma wird im Glomerulus ein nahezu eiweißfreies Ultrafiltrat, der Primärharn, in den Kapselraum abgepresst (glomeruläre Filtration) und gelangt so in das Tubulussystem, mit proximalen Tubulus (Abb. 1.3 (2,3,4)), Henle-Schleife (Abb. 1.3 (4,5,6)) und distaler Tubulus (Abb. 1.3 (6,8)), der schließlich in das Sammelrohrsystem mündet (Abb. 1.3 (9,10,11,12)). Während der Passage durch die verschiedenen Tubulusabschnitte verändert sich die Zusammensetzung des Primärharns, aufgrund von Resorption und Sekretion, grundlegend. Die resorbierenden und sekretorischen Mechanismen bestehen aus mindestens zwei Stufen: Für die Resorption: (i) Aufnahme über die apikale Membran vom Tubuluslumen in die Tubuluszelle und (ii) Abgabe von der Zelle über die basolaterale Membran ins Blut bzw. ins Interstitium. Für die Sekretion: (i) Aufnahme vom Interstitium über die basolaterale Membran und (ii) Abgabe über die apikale Membran ins Tubuluslumen. Durch die glomeruläre Filtration und die tubuläre Sekretion werden Substanzen über die Niere exkretiert, wobei letztere die Filtration übertrifft [Burckhardt et al., 2001].

Im proximalen Tubulus werden die meisten filtrierte organischen Anionen und Kationen aus dem Primärharn resorbiert und/oder vom Blut ins Tubuluslumen sekretiert. Hierbei sind Solute Carrier aus der Gruppe der SLC5, SLC13, SLC17, SLC22, SLC21/SLC0 und SLC26 beteiligt (Abb. 1.4). Besonders Transporter aus der SLC22-Familie, worauf in den nächsten Abschnitten gesondert eingegangen wird, spielen hierbei eine dominierende Rolle. Die wichtigste Aufgabe der Henle-Schleife ist die Harnkonzentrierung. Durch ihr können 70-80 % des Wassers aus dem Primärharn rückresorbiert werden. Einer der Hauptfunktionen des distalen Tubulus ist die Na^+ und Cl^- Resorption durch den Na^+/Cl^- -Symporter (NCC/TSC) in der apikalen Membran. Des Weiteren ist dieser Tubulusabschnitt involviert in der Resorption von Calcium und Magnesium mittels einer Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase in der basolateralen Membran von distalen Tubuluszellen [Madsen et al., 2008]. Das System der Sammelrohre beginnt mit dem Verbindungstubulus (Abb. 1.3 (9)), die in die kortikalen Sammelrohre einmünden (Abb. 1.3 (10)). Der Verbindungstubulus ist ein kurzes Verbindungsstück zwischen distalem Tubulus und Sammelrohr und befindet sich im Nierencortex. Die Sammelrohre verlaufen gestreckt in Richtung Mark (Abb. 1.3 (11)) wo sie untereinander zusammen fließen (Abb. 1.3 (12)) und schließlich in die Nierenpapille münden und der Endharn so in den Nierenkelch gelangt.

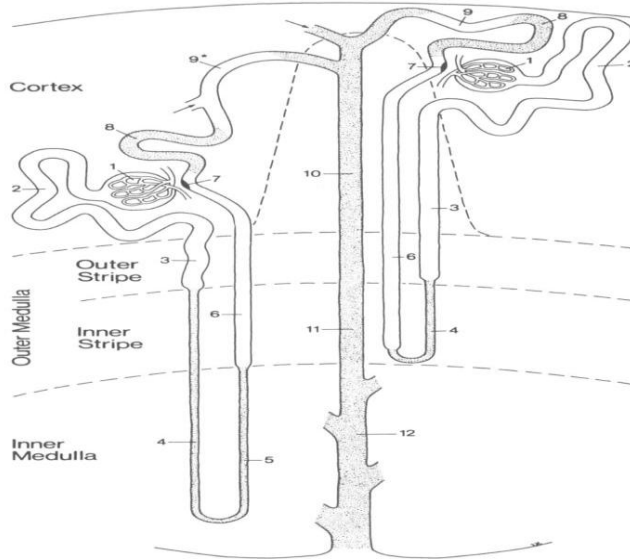


Abb. 1.3: Schematische Darstellung zweier Nephronen die gemeinsam in ein Sammelrohr münden. Linke Seite = Lang-Loop-Nephron mit langer Henle-Schleife, rechte Seite Kurz-Loop-Nephron mit kurzer Henle-Schleife. 1 = Nierenkörperchen, 2 = proximales Konvolut, 3 = Pars recta des proximalen Tubulus, 4 = absteigender dünner Schleifenschenkel der Henle-Schleife, 5 = aufsteigender dicker Schleifenschenkel der Henle-Schleife, 6 = Pars recta des distalen Tubulus, 7 = Macula densa, 8 = distales Konvolut, 9 = Verbindungstubulus, 10 = Kortikales Sammelrohr, 11 = äußeres medulläre Sammelrohr, 12 = inneres medulläre Sammelrohr. Abbildung von Kriz und Bankir 1988.

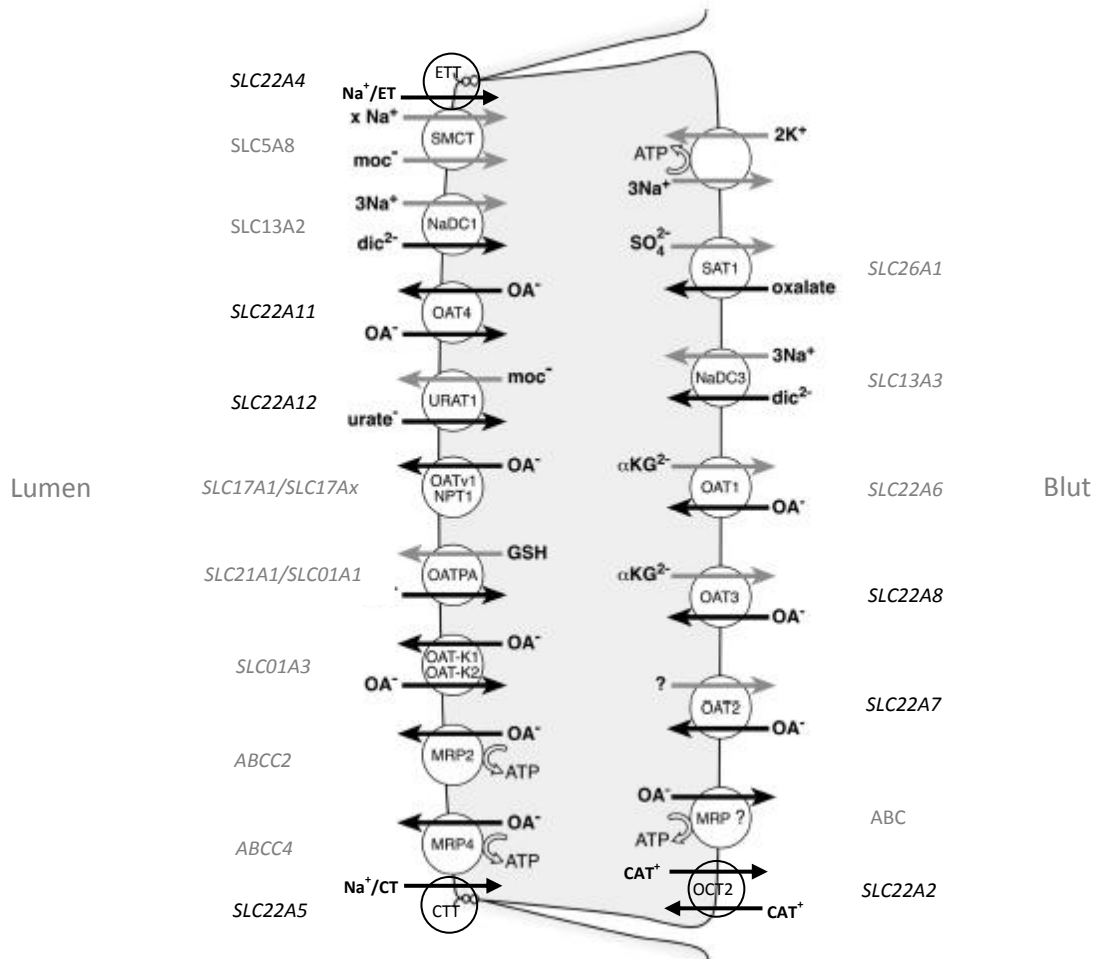


Abb. 1.4: Organische Anionen und Kationen Transporter in proximalen Tubuluszellen. Linke Seite = Tubuluslumen (Primärharn), rechte Seite = Interstitium (Blut). Die Gensymbole der Transporter aus der SLC22-Familie sind fettgedruckt. CTT = Carnitin Transporter, ETT = Ergothionein-Transporter, MRP = Multidrug Resistance-Associated Protein, NaDC = Natrium-Dicarboxylate Cotransporter, NPT1 = Natrium-Dependent Phosphate Transporter 1, OAT = Organic Anion Transporter, OATv1 = Voltage-Sensitive Organic Anion Transporter 1, OCT = Organic Cation Transporter, SAT1 = Sulfate/Anion Exchanger, SMCT = Natrium-Monocarboxylate Cotransporter, URAT1 = Urate Anionen Transporter 1. αKG^{2-} = α -Ketoglutarat, dic^{2-} = Dicarboxylate, moc^- = Monocarboxylate, CAT^+ = Organische Kationen, OA^- = Organische Anionen. Abbildung modifiziert aus Seldin and Giebisch's The Kidney 2007; Burckhardt und Koepsell.

1.3 Die SLC22-Transporterfamilie

Ein wichtiger Bestandteil der MFS ist die Familie der Solute Carrier. Sie ist aufgeteilt in 47 Unterfamilien mit mehr als 300 Proteinen [Hediger et al. 2004]. Eine der Unterfamilien ist die Organische Kation/Anion/Zwitterion Transporter Familie SLC22 [Koepsell et al., 2007]. Die Namensgebung orientiert sich hierbei anhand der Gensymbole dieser Transporter. Eine andere Bezeichnung, die auf die Natur der Substrate zurückgeht, ist Amphiphilic Solute Facilitator (ASF) [Schömig et al. 1998]. Transporter der SLC22-Familie werden, Spezies übergreifend, vorwiegend in der Niere und Leber exprimiert. Ihre Aufgabe in diesen Organen wird zur Zeit dahingehend interpretiert, dass sie bei der hepatobiliären sowie renalen Ausscheidung und Rückgewinnung von endogenen und xenobiotischen Substanzen involviert sind [Rizwan and Burckhardt, 2007; Koepsell et al., 2007; Macias et al., 2009]. Der phylogenetische Stammbaum dieser Familie (Abb. 1.5) lässt sich in mehrere Untergruppen einteilen [Koepsell und Endou, 2004]. Zu diesen zählen die Zwitterionen-Transporter (ETT, CTT, (früher OCTN)), die organischen Kationen-Transporter (OCT, organic cation transporter) und die organischen Anionen-Transporter (OAT, organic anion transporter).

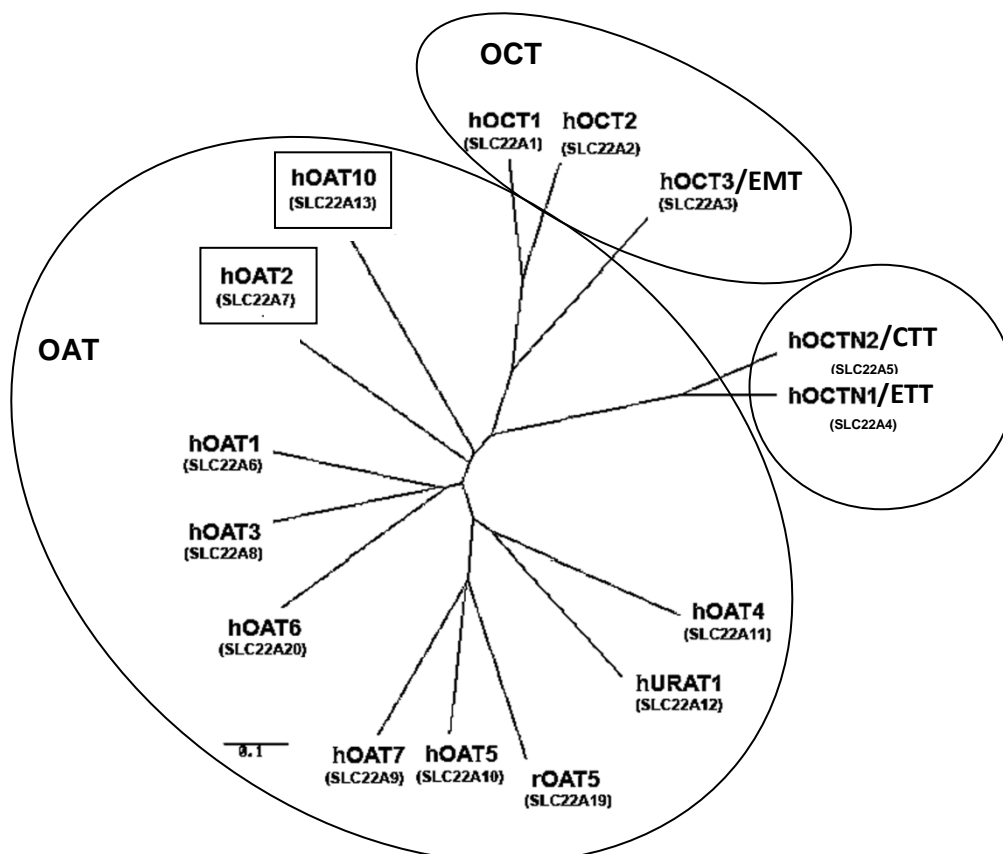


Abb. 1.5: Evolutionsstammbaum der humanen SLC22-Familie. Je kürzer der Abstand zwischen zwei Transportern, desto höher ist der Verwandtschaftsgrad zwischen den Proteinen. Basieren nach Homologie ihrer Aminosäuresequenz. OAT = organic anion transporter, OCT = organic cation transporter. Abbildung modifiziert nach Bahn et al., 2008.

Der Ergothionein- und Carnitin-Transporter

Die Gruppe der Zwitterionentransporter beinhaltet den Ergothionein-Transporter (ETT) [Gründemann et al., 2005] und den Carnitin-Transporter (CTT) [Grigat et al., 2009]. Beide Transporter werden in der Literatur auch als Novel Organic Cation Transporter zusammengefasst, da ihre Aminosäuresequenz eine deutlich höhere Verwandtschaft zueinander aufweisen (77 % Identität) als zu den OCTs (34-37 % Identität). ETT und CTT weisen derzeit als einzige Transporter der SLC22 Familie ein spezifisches Substrat auf, wodurch ihre physiologische Funktion beschrieben werden konnte.

Das beste bekannte physiologische Substrat für ETT ist Ergothionein (ET), welches von Gründemann und Mitarbeitern entdeckt wurde. Wobei der Transporter den nach intrazellulär gerichteten Natriumgradienten als Triebkraft nutzt. Darüber hinaus werden Stachydrin, Glycinbetain und Betonicin mit deutlich geringerer Effizienz als Substrate akzeptiert [Gründemann et al., 2005]. ET stellt als Betain des 2-Thiolhistidins ein Derivat der Aminosäure Histidin dar. Es wird lediglich von Pilzen (Aspergillus- und Alternaria-Arten, sowie Penicillium- und Neurospora-Arten) und wenigen Mykobakterien synthetisiert. Die Aufnahme in Pflanzen erfolgt über die Wurzeln. ET kann von höheren Organismen nicht selber synthetisiert werden, aber dafür effizient aus der Nahrung aufgenommen werden. [Melville, 1958; Mayumi et al., 1978]. Nach der Aufnahme wird es ohne vorherige Metabolisierung im Organismus gespeichert. Über die physiologische Bedeutung von ET in Pflanzen, Tieren oder beim Menschen ist bisher noch nichts genaues bekannt. Es wurde jedoch festgestellt, dass in Geweben (z.B. Samenbläschendrüse, Auge [unveröffentlichte Daten der AG Gründemann, Diplomarbeit D. Nikodemus, 2008] sowie in Monozyten und den Erythrozyten-Vorläuferzellen (CD71+)), in denen ETT exprimiert wird, hohe Konzentrationen an ET vorliegen [Gründemann et al., 2005]. Es wird daher eine antioxidative Wirkung vermutet. Polymorphismen im Gen des ET-Transporters wurden mit den entzündlichen Krankheiten wie Rheumatoider Arthritis [Tokuhira et al., 2003] und Morbus Crohn [Peltekova et al., 2004] in Verbindung gebracht.

Das physiologische Substrat für den Carnitin-Transporter CTT ist Carnitin, welches im Symport mit Natrium transportiert wird. Daneben werden unter anderem Acetylcarnitin und das nicht-physiologische Mildronat als Substrate akzeptiert [Tamai et al., 1998; Grigat et al., 2009]. Der CTT wird stark in Herz, Plazenta, Skelettmuskel, Niere und Pankreas exprimiert. [Wu et al., 1998a; Koepsell et al., 1999; Schömig et al., 1998]. Seine physiologische Aufgabe besteht darin, Muskelzellen mit Carnitin zu versorgen. In der Niere ist CTT in der apikalen Membran der proximalen Tubuluszellen lokalisiert und ist hier für die Rückresorption von Carnitin aus dem Primärharn verantwortlich [Tamai et al., 2001]. Mutationen im Gen die zu einer verringerten Expression oder einer gestörten Funktion des CT-Transporters

hervorrufen, führen zur Systemischen Carnitin-Defizienz mit einer gestörten mitochondrialen Fettsäureoxidation [Koepsell and Endou, 2004].

Die organischen Kationen-Transporter

Die OCTs (OCT1, OCT2 und EMT (Extraneuronalen Monoamin-Transporter) sind elektrogene Transporter, deren treibende Kraft das Membranpotential ist. Sie transportieren einfach positiv geladene Substrate pH-abhängig, jedoch unabhängig von Natrium und sind fähig das Substrat abhängig vom elektrochemischen Gradienten in beide Richtungen zu transportieren (Aufnahme und Efflux) [Koepsell et al., 2007]. Da die OCTs die physiologischen Monoamine Dopamin, Noradrenalin, Adrenalin und Serotonin als Substrate akzeptieren, können sie auch als nicht-neuronale Monoamintransporter bezeichnet werden. [Braidert et al. 1998; Gründemann et al. 1999].

OCT1 ist im Menschen vor allem in der Leber in der sinusoidalen Membran der Hepatozyten lokalisiert [Gründemann et al., 1999]. In Nagetieren wird OCT1 zudem in der Niere exprimiert und ist dort in der basolateralen Membran der proximalen Tubuluszellen lokalisiert [Koepsell et al., 2007]. OCT1 scheint insbesondere für die systemische Ausscheidung von Stoffwechselprodukten und Xenobiotika verantwortlich zu sein [Schömig et al., 2006], was durch Experimente mit OCT1^{-/-} Mäusen bestätigt werden konnte [Jonker et al., 2001]. OCT2 ist bei Mensch und Nagetier hauptsächlich in der basolateralen Membran der proximalen Tubuluszellen lokalisiert. Seine Aufgabe wird dahingehend interpretiert, dass es bei der renalen Elimination von diversen Substanzen eine Rolle spielt [Koepsell et al., 2007]. Neben Monoaminen und Xenobiotika werden Creatinin und Tetraethylammonium (TEA) von OCT1 und OCT2 transportiert. OCT1 transportiert in hohem Maße Cholin aber nahezu kein Histamin und kein Agmatin (Braidert et al., 1998; Gründemann et al., 1999). OCT2 transportiert neben den Katecholaminen auch Histamin, Agmatin und Guanidin [Schömig et al., 2006]. Die Verbindung, die von allen organischen Kationen-Transportern am effizientesten transportiert wird, ist das nicht-physiologische Neurotoxin 1-Methyl-4-Phenylpyridinium (MPP⁺) [Russ et al., 1992].

Bei EMT handelt es sich um einen Transporter der bei der extraneuronalen Inaktivierung - auch als „Uptake 2“ bezeichnet - von freien Monoamin-Transmittern beteiligt ist [Gründemann et al., 1998]. Die Expression von EMT ist nicht, wie bei OCT1 und OCT2 vorwiegend auf die Leber und Niere beschränkt. Vielmehr wird dieser Transporter in verschiedenen Organen exprimiert. Ein starkes Expressionsniveau wurde in der Plazenta [Kekuda et al., 1998], der Leber und dem Herzen gefunden [Gründemann et al., 1998]. Die Expression von EMT in Gliazellen ist ebenfalls gut dokumentiert [Inazu et al., 2003; Russ et al., 1996]. Darüber hinaus konnte der Transporter im Gehirn der Ratte [Haag et al., 2004; Wu et al., 1998b] und in Neuronen der Maus [Vialou et al., 2004] nachgewiesen werden. Mittels

Real-Time-PCR wurde zudem in der Speicheldrüse und in der Prostata ein starkes Signal gefunden (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe Gründemann, Diplomarbeit A. Noetel). Im Vergleich zu OCT1 und OCT2 transportiert EMT kein TEA [Gründemann et al., 1998]. Die Substrate, die von EMT am effizientesten transportiert werden sind Histamin, Tyramin, Adrenalin, Agmatin und Noradrenalin [Schömig et al., 2006].

Die organischen Anionen-Transporter

Ein physiologisches und vor allem ein spezifisches Substrat, welches nur von einem Transporter akzeptiert wird, wurde für die Transporter aus der Gruppe der OATs, aber auch OCTs noch nicht gefunden. Sie zeichnen sich vielmehr durch ein breites Substratspektrum aus. Die OATs (OAT1, OAT2, OAT3, OAT4, OAT5, OAT6, OAT7 und URAT1) operieren als Antiporter, indem sie die Aufnahme von organischen Anionen in die Zelle durch die Abgabe eines anderen organischen Anions aus der Zelle katalysieren. Die treibende Kraft für die Aufnahme von organischen Anionen ist der von intrazellulär nach extrazellulär gerichtete Gradient von Anionen wie z.B. α -Ketoglutarat, Laktat und Nikotinat [Rizwan und Burckhardt, 2007].

Immunhistochemische Analysen von Mensch, Ratte und Maus ergaben, dass OAT1 in der basolateralen Membran von proximalen Tubuluszellen lokalisiert ist. Seine Aufgabe wird hierbei gesehen, dass dieses Protein für die erste Stufe der renalen Sekretion verantwortlich ist, indem es organische Anionen vom Blut bzw. Interstitium in die proximale Tubuluszelle transportiert. Ein direkter Transport für OAT1 wurde unter anderem nachgewiesen für α -Ketoglutarat, cAMP, cGMP, Folat, Urat, Prostaglandin E_2 $F_{2\alpha}$ und das Modells substrat para-Aminohippurat (PAH) [Anzai et al., 2006; Rizwan und Burckhardt, 2007]

OAT3 ist auf RNA-Ebene der dominanteste organische-Anionen-Transporter in der menschlichen Niere. In der Ratte wird er, neben der Niere zusätzlich noch in der Leber exprimiert. Bei Mensch und Ratte ist er in der basolateralen Membran der proximalen Tubuluszellen lokalisiert und ist, wie OAT1, in der renalen Sekretion von organischen Anionen aus dem Blut involviert. Immunhistochemische Analysen in der Ratte zeigten zusätzlich eine Lokalisation im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife sowie im distalen Tubulus und in den Hauptzellen des Sammelrohrs [Motohashi et al. 2002; Kojima et al., 2002; Ljubojevic et al., 2004]. Die Bedeutung von OAT3 in diesen Tubulusabschnitten ist zurzeit völlig offen. Das Substratspektrum von OAT3 überschneidet sich mit dem von OAT1. Die Fähigkeit von OAT3 Corticosteron, Esteronsulfat, Estradiol-17 β -Glucuronid und Taurocholat zu transportieren unterscheidet ihn von OAT1 [Rizwan and Burckhardt, 2007].

OAT4 ist ein organischer Anionentransporter der nur in höheren Primaten vorhanden ist. Exprimiert wird er in der Placenta und in der Niere. In der Placenta wird OAT4 in

Synzytiotrophoblastenzellen auf der Fötalseite exprimiert [Anzai et al., 2006]. Spekuliert wird hier die Beseitigung von toxischen Verbindungen vom Fetus zur Mutter sowie die Versorgung der Placenta mit Steroidsulfaten zur Estrogen Synthese. In der Niere wurde er in der apikalen Membran der proximalen Tubuluszellen identifiziert [Hagos et al., 2007, Rizwan und Burckhardt, 2007]. OAT4 soll an der Sekretion von Glutaratmetaboliten (2-Hydroxyglutarat, 3-Hydroxyglutarat, Glutaconat) involviert sein [Hagos et al., 2008]. Ferner ist er am Transport von Prostaglandinen beteiligt und akzeptiert PAH als Substrat [Rizwan und Burckhardt, 2007].

OAT5 wurde erst kürzlich in Maus und Ratte entdeckt [Youngblood and Sweet, 2004; Anzai et al., 2006] und ist in der apikalen Membran von proximalen Tubuluszellen lokalisiert. Es wird diskutiert, dass das gefundene inaktive humane OAT5-Protein nicht mit dem OAT5 der Maus und Ratte verwandt ist [Rizwan and Burckhardt, 2007]. Substrate die für OAT5 der Nagetiere gefunden wurden sind die Steroidsulfate, die vom Primärharn im Antiport mit Succinat oder α -Ketoglutarat in die Tubuluszelle resorbiert werden. Die Fähigkeit Succinat, ein C4-Körper, als Substrat zu akzeptieren unterscheidet OAT5 von OAT1 und OAT3 [Anzai et al., 2006].

OAT6 und OAT7 wurden kürzlich kloniert und experimentell untersucht [Monte et al., 2004; Shin et al., 2007]. Eine Expression von OAT6 konnte im Riechkolben der Maus nachgewiesen, außer Esteronsulfat sind keine Substrate für dieses Protein bekannt [Kaler et al., 2006]. OAT7 konnte im Menschen in der sinusoidalen Membran von Hepatozyten nachgewiesen werden. In der Ratte wurde dieses Protein in den Sammelrohrepithelzellen der Niere detektiert. Substrate die für OAT7 ermittelt wurde, sind Steroidsulfate im Antiport mit Butyrat sowie das Mykotoxin Ochratoxin A. Desweiteren konnte eine Interaktion mit Salicylat, Furosemid, Taurocholat und Methotrexat beobachtet werden [Yokoyama et al., 2008].

URAT1, ist in der apikalen Membran von proximalen Tubuluszellen lokalisiert. Er ist für die Resorption von Urat aus dem Primärharn in die Tubuluszelle zuständig. Die Aufnahme von Urat erfolgt als Antiport mit bspw. Nikotinat und Laktat, jedoch nicht mit α -Ketoglutarat. Mutationen im URAT1-Gen sind mit der idiopathischen renalen Hypourikämie assoziiert. Betroffene Personen zeigen einen niedrigen Urat-Gehalt im Plasma und vermehrte renale Urat Ausscheidung [Enomoto et al., 2002].

1.3.1 Der Transporter OAT2

Der Transporter OAT2 (SLC22A7) ist ein weiteres Mitglied der SLC22-Familie. Im Jahr 1994 wurde das Protein von Gregg und Mitarbeitern in der Leber entdeckt und als NLT für „Novel Liver-Specific Transporter“ bezeichnet. Aufgrund der Tatsache, dass dieses Protein organische Anionen als Substrate akzeptiert und eine 42 %ige Identität zu OAT1 aufweist wurde es in OAT2 umbenannt [Sekine et al., 1998]. Das humane Gen für OAT2 liegt auf dem 6. Chromosom des Menschen (6q26). Das Protein für Mensch, Maus und Ratte besteht aus 535-548 Aminosäuren und weist, anhand von Sekundärstrukturvorhersagen, die charakteristischen 12 Transmembransegmente der MFS-Transporter auf.

Die Expression der humanen OAT2-mRNA ist in der Leber am stärksten und weniger intensiv in der Niere [Sun et al., 2001; S. Golz Kooperationspartner, Bayer Healthcare, Wuppertal, Daten nicht gezeigt]. In Nagetieren scheint die Expression von OAT2 Spezies- und Geschlechtsabhängung zu sein. Männliche Ratten zeigen eine hohe Expression in der Leber, wohingegen weibliche Ratten etwas mehr OAT2 in der Niere aufweisen [Buist et al., 2002; 2003 Kobayashi et al., 2002a;]. Bei der Maus konnte in Weibchen OAT2-mRNA in der Niere und schwächer in der Leber detektiert werden. In der männlichen Maus hingegen, wurde in Niere, jedoch nicht in der Leber, OAT2-mRNA detektiert [Kobayashi et al., 2002b]. Immunhistochemische Analysen ergaben das OAT2 in der sinusoidalen Membran von Hepatozyten der Rattenleber lokalisiert ist. In der humanen Niere konnte eine basolaterale Lokalisation in proximalen Tubuluszellen festgestellt werden [Enomoto et al., 2002b]. Im Gegensatz dazu, wurde OAT2 in Ratte und Maus auf der apikalen Seite von proximalen Tubuluszellen detektiert [Kobayashi et al., 2005a; Ljubojevic et al., 2007]. Kojima und Mitarbeiter wiederum beschreiben, dass OAT2 der Ratte nicht im proximalen Tubulus sondern apikal in den Epithelzellen des Sammelohrs und der Henle-Schleife lokalisiert ist.

Substratspektrum von OAT2

Die Qualität eines Substrats bzw. wie effizient es transportiert wird, kann durch die Transporteffizienz (TE) bestimmt werden. Diese ist definiert, analog zur katalytischen Effizienz von Enzymen, aus dem Quotienten aus der Wechselzahl (k_{cat}) und der Affinität (K_m) des Transporters ($TE = k_{cat}/K_m$). Die Wechselzahl selbst wird durch den Quotienten aus maximaler Aufnahmegeschwindigkeit (V_{max}) und der Gesamtzahl der aktiven Transporterproteine in der Membran (T_{aktiv}) beschrieben ($k_{cat} = V_{max}/T_{aktiv}$). Wenn die Anzahl aktiver Transporter konstant ist, kann die relative Transporteffizienz durch $TE = V_{max}/K_m$ beschreiben werden. Eine weitere Möglichkeit die Effizienz des Transports zu bestimmen, ist das Ermitteln der Clearance ($\mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$). Dabei handelt es sich um das Volumen, das pro Minute vom Substrat befreit wird. Zur Berechnung der Clearance wird die Aufnahmegeschwindigkeit (v) durch die Substratkonzentration (S) dividiert. Denn nach der

Michaelis-Menten-Gleichung $v = V_{max} * S / (K_m + S)$ gilt: $v/S = V_{max} / K_m$ wenn S viel kleiner als K_m ist. Somit ist die Clearance v/S proportional zu V_{max}/K_m und entspricht damit der Transporteffizienz [Gründemann et al., 1999; Schömig et al., 2006]. Bei einer regulären Transporterüberexpression, basierend auf starken viralen Promotoren, liegt die TE für ein physiologisch relevantes Substrat in Mammaliazelllinien in der Größenordnung von $50 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$ oder höher. Ist die TE unter $1 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$ ist das Substrat wahrscheinlich physiologisch irrelevant für den Transporter [Schömig et al., 2006].

OAT2 wurde, verglichen mit OAT1 und OAT3, wenig auf Substrate untersucht [Rizwan und Burckhardt, 2007]. Die getesteten Substanzen, für die ein direkter Transport gezeigt werden konnte, sind in Tab. 1.1 aufgelistet. Zu diesen Substanzen wurde die Transporteffizienz mit dargestellt, die lediglich einen Richtwert darstellen soll, da in den Versuchen eine eventuelle ungleiche Anzahl aktiver Transportproteine bestehen könnte. Für die meisten Substrate weist OAT2 eine schlechte Transporteffizienz auf (Tab. 1.1) und das Substratspektrum ist zum Teil umstritten. Es wurde publiziert, dass der Zitratzyklusmetabolit α -Ketoglutarat, das Diuretikum Bumetanid, der Histamin-Rezeptor Antagonist Cimetidin, das Hormon DHEAS, das Zytostatikum Methotrexat und das Analgetikum Salicylat transportiert werden [Sun et al., 2001; Kobayashi et al., 2005b; Tahara et al., 2005; Khamdang et al., 2002]. Wohingegen in anderen Veröffentlichungen [Morita et al., 2001; Hasannejad et al., 2004; Sun et al., 2001, Kobayashi et al., 2002b] kein Transport dieser Substanzen festgestellt wurde. Die Tatsache, dass OAT2 dem Anschein nach, kein α -Ketoglutarat als Substrat akzeptiert unterscheidet ihn von OAT1 und OAT3 die als Triebkraft α -Ketoglutarat bzw. Dicarboxylate durch einen Antiport für die Aufnahme von organische Anionen nutzen. Substrate zu denen der humane OAT2 nach Literaturdaten eine gute Transporteffizienz in Mammaliazellen aufweist sind das Nukleotid 2-Deoxyguanosin ($TE = 38 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$) und der second messenger cGMP ($TE = 26 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$) [Cropp et al., 2008] sowie das nicht-physiologische Analgetikum Indometacin ($TE = 242 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$) [Morita et al., 2001] für den orthologen Rattentransporter (Tab. 1.1). Der humane OAT1 besitzt zu seinem Modellsubstrat PAH in *Xenopus* Oozyten eine TE von $0,02 \mu\text{l min}^{-1} \text{Oocyte}^{-1}$ [ermittelt aus Cihlar et al., 1999]. Eine vergleichbare TE für OAT2_h (human), wie OAT1_h zu PAH in Oozyten, weisen die Zytostatika 5-Fluorouracil ($TE = 0,03 \mu\text{l min}^{-1} \text{Oocyte}^{-1}$) sowie Taxol ($TE = 0,03 \mu\text{l min}^{-1} \text{Oocyte}^{-1}$), Prostaglandin PGE₂ ($TE = 0,03 \mu\text{l min}^{-1} \text{Oocyte}^{-1}$) [Kobayashi et al., 2005b], das Xanthin Theophyllin ($TE = 0,03 \mu\text{l min}^{-1} \text{Oocyte}^{-1}$) [Kobayashi et al., 2005c] sowie Propionat ($TE = 0,5 \mu\text{l min}^{-1} \text{Oocyte}^{-1}$) für den murinen OAT2 [Islam et al., 2008] (Tab. 1.1) auf. Die Verwendung von Oozyten bei Transportmessungen, bei der i.d.R. die cRNA des Transporters injiziert wird, hat jedoch den Nachteil, dass es häufiger zu Artefakten kommen kann, als bei transfizierten Zellsystemen, die das Protein funktionell exprimieren [Schömig et

al., 2006]. Obwohl für OAT2 einige Substrate vorliegen, ist seine genaue Funktion in der Leber noch nicht verstanden.

Tab. 1.1: Substrate von OAT2 die durch einen direkten Transport ermittelt wurden.

Substanz	OAT2 Spezies	Zellen	Transporteffizienz		Literatur
			$\mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$	$\mu\text{l min}^{-1} \text{Oozyte}^{-1}$	
Endogen					
2-Deoxyguanosin	Mensch	HEK293	$V_{\text{max}}/K_m = 38$		(1)
α -Ketoglutarat	Mensch	HEK293	Transport *		(2)
	Maus	<i>Xenopus</i> Oozyte		$v/S = 0,001$	(3)
	Ratte	LLC-PK1	kein Transport		(4)
	*	*	kein Transport		(5)
Ascorbinsäure	Mensch	<i>Xenopus</i> Oozyte		$V_{\text{max}}/K_m = 0,001$	(6)
cAMP	Mensch	HEK293	Transport *		(2)
cGMP	Mensch	HEK293	$V_{\text{max}}/K_m = 26$		(1)
DHEAS	Mensch	HEK293	kein Transport		(2)
	Mensch	<i>Xenopus</i> Oozyte		$v/S = 0,003$	(6)
Esteron-3-Sulfat	Mensch	<i>Xenopus</i> Oozyte		$v/S = 0,007$	(6)
Prostaglandin E ₂	Mensch	prox. Tubulus S2	$v/S = 18$		(16)
	Mensch	<i>Xenopus</i> Oozyte		$v/S = 0,03$	(6)
	Ratte	LLC-PK1	$V_{\text{max}}/K_m = 14$		(4)
	Maus	<i>Xenopus</i> Oozyte		$v/S = 0,001$	(3)
Propionat	Maus	<i>Xenopus</i> Oozyte		$v/S = 0,5$	(8)
Exogen					
2'3'Dideoxycytidin	Ratte	prox. Tubulus S2	$V_{\text{max}}/K_m = 1$		(4)
5-Fluorouracil	Mensch	<i>Xenopus</i> Oozyte		$v/S = 0,03$	(6)
Allopurinol	Maus	<i>Xenopus</i> Oozyte		$v/S = 0,001$	(3)
Bumetanid	Mensch	prox. Tubulus S2	kein Transport		(10)
	Mensch	<i>Xenopus</i> Oozyte		$v/S = 0,00002$	(6)
Cimetidin	Mensch	HEK293	$V_{\text{max}}/K_m = 2$		(11)
	Ratte	LLC-PK1	kein Transport		(4)
Erythromycin	Mensch	<i>Xenopus</i> Oozyte		$v/S = 0,015$	(12)
Glutarat	Maus	<i>Xenopus</i> Oozyte		$v/S = 0,0006$	(3)
Indometacin	Ratte	LLC-PK1	$V_{\text{max}}/K_m = 242$		(4)
Methotrexat	Mensch	HEK293	Transport*		(2)
	Ratte	LLC-PK1	kein Transport		(4)
Ochratoxin A	Maus	<i>Xenopus</i> Oozyte		$v/S = 0,00003$	(3)
Ranidin	Mensch	HEK293	$V_{\text{max}}/K_m = 11$		(11)
	Ratte	LLC-PK1	$V_{\text{max}}/K_m = 17$		(4)
Salicylat	Mensch	prox. Tubulus S2	$v/S = 0,5$		(13)
	Mensch	<i>Xenopus</i> Oozyte		kein Transport	(6)
	Maus	<i>Xenopus</i> Oozyte		kein Transport	(3)
	Mensch	<i>Xenopus</i> Oozyte		$v/S = 0,03$	(6)
Taxol	Mensch	<i>Xenopus</i> Oozyte		$v/S = 0,03$	(6)
Tetracyclin	Mensch	prox. Tubulus S2	$v/S = 1$		(14)
Theophyllin	Mensch	<i>Xenopus</i> Oozyte		$v/S = 0,03$	(12)
Valproat	Maus	<i>Xenopus</i> Oozyte		$v/S = 0,002$	(3)
Zidovudin	Mensch	prox. Tubulus S2	$V_{\text{max}}/K_m = 4$		(15)
	Ratte	LLC-PK1	$V_{\text{max}}/K_m = 3$		(4)

Für die Berechnung der Transporteffizienz über v/S wurde die Aufnahme der Kontrollzellen von der Aufnahme der Transporter exprimierenden Zellen subtrahiert. Zum Teil wurde die TE aus Zeitverläufen ermitteln, hierbei wurden die Werte der 1-minütigen Inkubation verwendet. Die $\text{PGF}_{2\alpha}$ Aufnahme von Enomoto et al., 2002b wurde aufgrund einer unrealistischen TE ($v/s = 16000$) in der Tabelle nicht aufgelistet. DHEAS = Dehydroepiandrosteron Sulfat. (1) Cropp et al., 2008; (2) Sun et al., 2001; (3) Kobayashi et al., 2002b; (4) Morita et al., 2001; (5) Burckhardt and Koepsell, 2007; (6) Kobayashi et al., 2005b; (8) Islam et al., 2008; (10) Hasanejad et al., 2004; (11) Tahara et al., 2005; (12) Kobayashi et al., 2005c; (13) Khamdang et al., 2002; (14) Babu et al., 2002; (15) Takeda et al., 2002. (16) Kimura et al., 2002. * = aus der Literatur konnten keine Angaben gewonnen werden.

1.3.2 Der Transporter SLC22A13

Der Transporter SLC22A13 ist ein weiteres Mitglied der SLC22-Familie und besitzt zu OAT2 den höchsten Verwandtschaftsgrad (Abb. 1.5). Zu Beginn dieser Arbeit waren weder Substrate noch genaue Angaben über die Lokalisation dieses Proteins bekannt. Das Gen *Slc22a13* wurde 1998 durch das Japanese Human Genome Projekt entdeckt und befindet sich auf dem dritten Chromosom des Menschen (3p21.3) [Nishiwaki et al., 1998]. In der Literatur werden die Trivialnamen wie ORCTL3, OCTL3 (Organic Cation Transporter Like 3) und OCTL1 (Organic Cation Transporter Like 1) beschrieben. Die Namensgebung orientiert sich dabei an den Transportern für organische Kationen. Ein entsprechender Transport ist aber unbewiesen. Das Protein besitzt zu den OCTs eine Aminosäureidentität von 31-33 % sowie zu den OATs 31-37 % und liegt in mehreren Mammalia-Spezies gut konserviert vor (z.B. *mus musculus* und *rattus norvegicus* 75 % Aminosäureidentität). Strukturell setzt sich der humane Transporter aus 551 Aminosäuren zusammen und zeigt nach Sekundärstruktur-Vorhersagen die klassische Membrantopologie von 12 Transmembransegmenten.

Laut Northern-Blot Analysen von Nishiwaki und Mitarbeiter sowie nach semi-quantitativen PCR Analysen von Eraly und Mitarbeiter wird SLC22A13 im Menschen ubiquitär exprimiert. Im Gegensatz dazu ist der Transporter nach Real-time PCR Daten von Nishimura und Naito sowie nach PCR-Analysen von Bahn und Mitarbeitern hauptsächlich in der in der Niere lokalisiert. Real-time PCR Daten von S. Golz (Kooperationspartner, Bayer Healthcare, Wuppertal, Daten nicht gezeigt) bestätigen das SLC22A13 vorwiegend in der humanen Niere exprimiert wird. Kürzlich durchgeführte immunhistochemische Analysen von Lee und Mitarbeitern ergaben, dass der Transporter in der Mausniere im Glomerulus, in der apikalen Membran von proximalen sowie distalen Tubuluszellen und im Sammelrohrsystem lokalisiert ist.

Erst 10 Jahre nach der Entdeckung des Gens konnten Bahn und Mitarbeiter erstmals Substrate für SLC22A13_h (human) identifizieren. Dabei konnten sie einen Transport mit radioaktiv markiertem Nikotinat, para-Aminohippurat und Urat in SLC22A13_h-exprimierenden *Xenopus laevis* Oozyten zeigen. Aufgrund dieser drei Substrate für SLC22A13 schlugen sie den Namen OAT10 für dieses Protein vor. Die physiologische Bedeutung von SLC22A13 ist jedoch weiterhin unklar.

1.4 Bedeutung der LC-MS-Technik für die Substratforschung

Der bisherige Wissensstand zu den Mitgliedern der SLC22-Familie macht erkennbar, dass sowohl Substratspezifität als auch Lokalisation der Transporter für ihre physiologische Rolle entscheidend sind. Eine besondere Stellung nimmt dabei das Substratspektrum ein, denn

erst wenn ein physiologisches Substrat für den Transporter bekannt ist, kann eine Aussage über seine Bedeutung im Organismus gemacht sowie pathophysiologische Konsequenzen erforscht werden. Klassischerweise werden Transportaktivitäten mit so genannten Radio Tracer Assays untersucht. Diese etablierte und spezifische Methode hat den Nachteil, dass eine Vorstellung von der Struktur des Substrates bestehen muss, da dieses entsprechend markiert erworben oder synthetisiert wird. Dies schränkt die zur Verfügung stehenden Substanzen ein. Um trotzdem bei einer funktionellen Charakterisierung ein großes Kollektiv an möglichen Substraten zu testen, greift man auf Konkurrenzexperimente zurück. Hierbei wird versucht, den Transport eines bekannten radioaktiv-markierten Substrates, durch die Zugabe anderer Substanzen kompetitiv zu hemmen. Eine solche indirekte Methode macht allerdings lediglich eine Aussage über eine Interaktion beider Substanzen am Transporter, ist aber kein Beweis für einen Transport. Dieser kann nur durch ein direktes Aufnahmeexperiment nachgewiesen werden. Bei Transportern, deren Substratspektren noch unbekannt sind, werden üblicherweise zunächst die Substrate der nächstverwandten bekannten Transporter getestet. So wurden bspw. die OATs alle auf die gleichen Substanzen getestet z.B. PAH, DHEAS, ES, Prostaglandine. Auf diese Weise werden allerdings nicht unbedingt neue Substratspektren aufgedeckt

Daher wurden in dieser Arbeit die analytischen Möglichkeiten, die die Massenspektrometrie bietet, zur Substratforschung eingesetzt. Hierdurch wird eine selektive Detektion unmarkierter Substanzen ermöglicht. Die Strategie der hier verwendeten Substratsuche ist in Abb. 1.6 dargestellt. Hierbei wird der Transporter heterolog in Zellen zur Expression gebracht. Als Kontrolle werden Zellen eingesetzt, die den Transporter nicht exprimieren. Die Zellen können anschließend in einer biologische Matrix inkubiert werden (z.B. Organhomogenate, Plasma). Befindet sich in dem Gemisch eine Substanz, die vom Transporter als Substrat akzeptiert wird, reichert sich diese in den Transporterzellen an, während das in den Kontrollzellen nicht der Fall ist. Nach Waschen und Lyse der Zellen werden die Zelllysate mit der LC-MS analysiert. Die transportierte Substanz ergibt in den resultierenden Massenspektren von Transporterzellen ein Signal, welches in den Spektren der Kontrollzellen nicht vorhanden ist. Durch die neu entwickelte Methode LC-MS (Liquid Chromatography- Mass Spectrometry)-Differenz-Abtönung (LC-MS Difference Shading) [Gründemann et al., 2005] wird eine Überlagerung der Massenspektren von Kontroll- und Transporterzellen sowie eine optische Darstellung des Signals ermöglicht (siehe 2.5.4.7). Ein solches Signal kann über gezielte Fragmentierung seiner Masse sowie durch das Ermitteln der akkuraten Masse strukturell aufgeklärt werden. Nach Identifizierung der entsprechenden Verbindung kann durch die LC-MS/MS Technik der Transport dieser Substanz in einem Aufnahmeversuch quantitativ analysiert werden.

Mit Hilfe der Methode der LC-MS Differenz Abtönung konnte das physiologische Substrat für den Ergothionein-Transporter aufgedeckt werden [Gründemann et al., 2005] sowie die zyklischen Dipeptide Cyclo(Arginin-Prolin), Cyclo(Histidin-Prolin) und Cyclo(Lysin-Prolin) als Substrate für OCT1 und OCT2 und abgesehen von Lysin-Prolin für EMT [unveröffentlichte Daten der AG Gründemann].

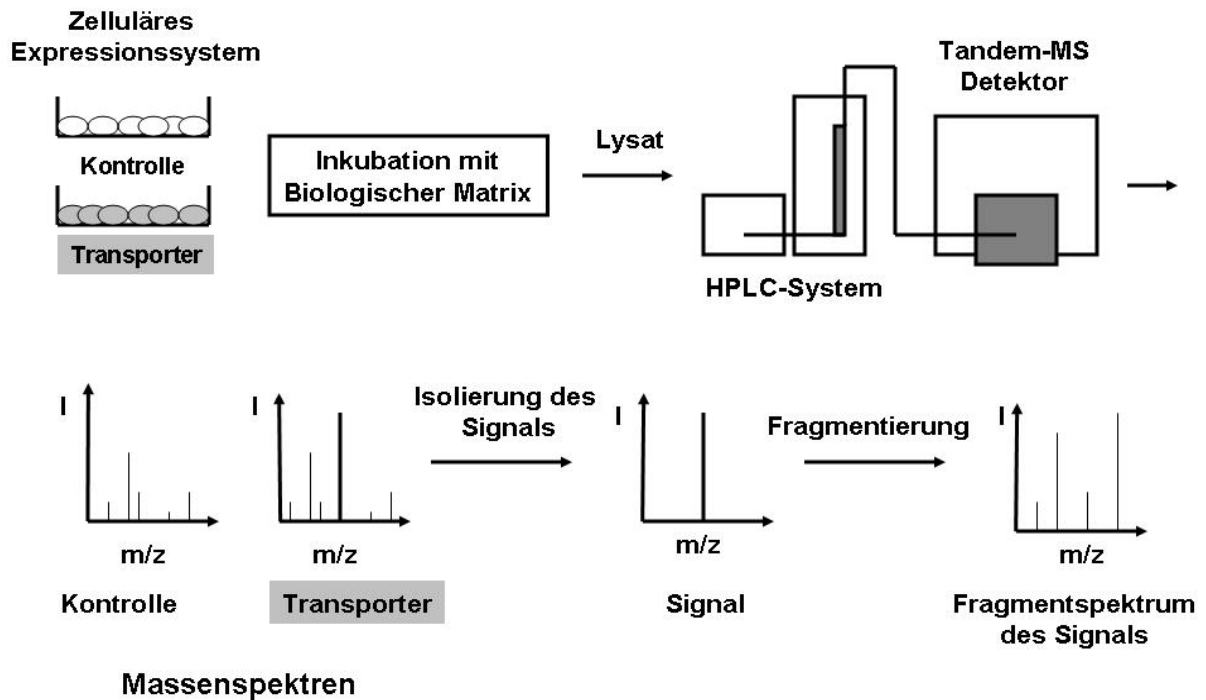


Abb. 1.6: Schematische Darstellung der Substratidentifizierung mittels LC-MS Screening. I = Intensität, m/z = Masse durch Ladung. Dissertation S. Harlfinger, 2005 (AG Gründemann).

1.5 Ziel der Arbeit

Die beiden verwandten Transporter OAT2 und SLC22A13 liegen in mehreren Mammalia-Spezies konserviert vor. Ihre funktionelle Rolle im Organismus ist jedoch unklar. Der physiologische Zweck und der pathophysiologische Hintergrund eines Transporters ist im Wesentlichen von zwei Merkmalen abhängig: Vom Substratspektrum und von der Lokalisation im Organismus. Es war deshalb das Ziel dieser Arbeit, Substrate für OAT2 und SLC22A13h zu finden. Besonders im Vorfeld dieser Arbeit waren keine einzigen Substrate für SLC22A13 bekannt. Für die Substratsuche dieser beiden Transporter wurde erstmals die Methode der LC-MS Differenz Abtönung angewendet. Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit bildete die exakte Lokalisation von SLC22A13 in der Niere. Denn es war lediglich bekannt, dass SLC22A13 hauptsächlich in der Niere exprimiert wird. Aber wo in der Niere, in welchem Tubulusabschnitt und vor allem ob in der apikalen oder basolateralen Membran der Nierentubuluszellen, war völlig offen. Es bestand demnach die Möglichkeit, die physiologische Funktion dieser Proteine zu definieren.

2 Material und Methoden

2.1 Klonierung von OAT1h, OAT2h, OAT2r URAT1h, und SLC22A13h

Für die Klonierung von OAT1h, URAT1h und OAT2h wurden als Ausgangsmaterial Gesamt-RNA aus humaner Nieren bzw. Leber verwendet. Die cDNAs der Transporter wurden durch reverse Transkription (RT)-PCR produziert und mittels PCR (Primer Tab. 2.6, PCR-Programm siehe 2.5.2.9) amplifiziert. Hierbei wurden die Transporter in zwei Konstrukte aufgeteilt (Abb. 2.1). Beide Konstrukte wurden über Blunt-end Ligation in pUC19 kloniert. Durch einen Restriktionsverdau (Enzyme: siehe Tab. 2.1) wurden die jeweiligen Konstrukte nachgewiesen. Anschließend wurden beide Konstrukte sequenziert und der fehlerfreie offene Leserahmen über die Schnittstellen *Hind*III und *Xho*I, welche durch PCR den jeweiligen Konstrukten angefügt wurden, in pEBTetD ligiert. Die Konstrukte selber wurden über die künstlich eingefügte Schnittstelle *Esp*31 ligiert bzw. für OAT2h über die interne *Btg*ZI Erkennungssequenz. Durch eine Spaltung mit entsprechenden Restriktionsenzymen (siehe. Tab. 2.1) konnten die beiden Konstrukte bzw. die Transporter-cDNA in pEBTetD nachgewiesen werden. Vor dem Startcodon wurden den Transportern-cDNAs zusätzlich eine Kozaksequenz (GCCACC), welches eine bessere Ribosomenbindung ermöglicht, eingefügt. Die cDNA von OAT2r und SLC22A13h mit der Kozaksequenz lag bereits vor und wurde über die Schnittstellen *Hind*III und *Xho*I in pEBTetD kloniert.

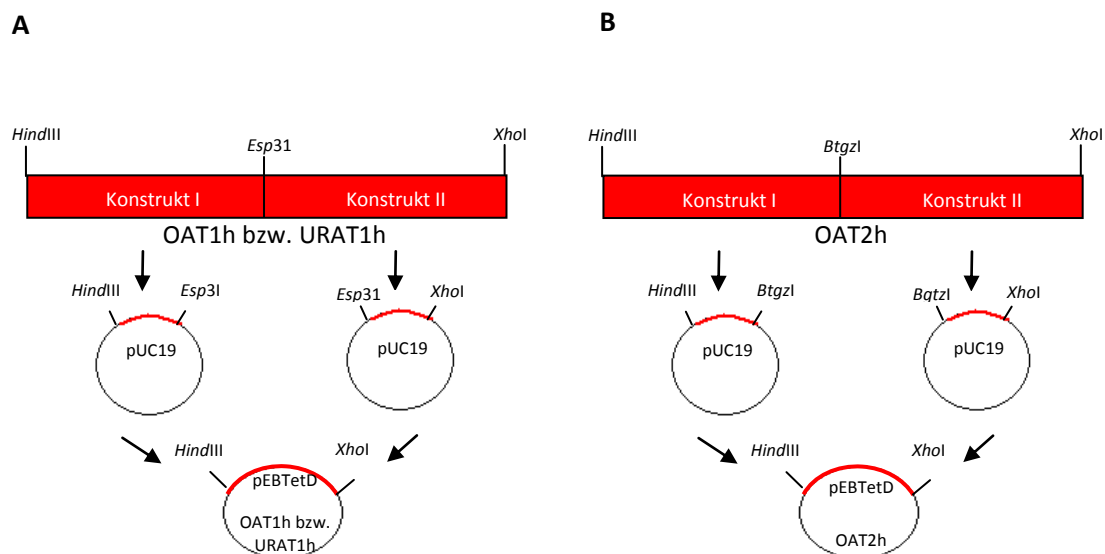


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie von (A) OAT1h, URAT1h und (B) OAT2h

2.2 Genbankeinträge von OAT1h, OAT2h, OAT2r, URAT1h und SLC22A13h

Die Aminosäuresequenzen von OAT1h, OAT2h, OAT2r und URAT1h entsprachen den Genbankeinträgen: NM_153276, NM_006672.3, NM_053537.2 und BC053348.

SLC22A13h entsprach bis auf Glycin¹⁴⁶ dem Genbankeintrag AB010438. Sämtliche sequenzierte Klone wiesen an dieser Position ein Alanin¹⁴⁶ auf.

2.3. Konstruktion der SLC22A13h-, OAT2h- und OATE441Q-GFP-Konstrukte

Für die Generierung der GFP-Konstrukte wurden den cDNA Sequenzen von SLC22A13h, OAT2h und OAT2hE441Q am 3'-Ende über PCR eine *NcoI* Schnittstelle eingefügt und der fehlerfreie offene Leserahmen über die *NcoI* Erkennungssequenz mit der GFP Nukleotidsequenz ligiert. Dadurch befindet sich auf Proteinebene zwischen dem C-Terminus der Transporter und dem N-Terminus von GFP ein zusätzliches Serin.

2.4 Material

2.4.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Fluka (Neu-Ulm, Deutschland), Sigma-Aldrich (München, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Roche (Mannheim, Deutschland) mit dem Reinheitsgrad „p.a.“ oder „reinst“ verwendet.

Radioaktive Chemikalien wurden von den Firmen ARC (St. Louis, MO, USA), Amersham (Freiburg, Deutschland) und NEN (Dreieich, Deutschland) und Hartmann Analytik (Braunschweig, Deutschland) geliefert.

Glas- und Plastikgefäße wurden von den Firmen Falcon (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland), Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) und VWR International (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Alle Materialien wurden vor dem Gebrauch bei 121 °C in Wasserdampf unter 1,2 bar für 20 min im Varioklav autoklaviert (H+P Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland). Alle Glasgefäße wurden 4 h in einem Heißluftsterilisator (Typ T12, Heraeus Instruments, Düsseldorf, Deutschland) bei 200 °C gebacken.

2.4.2 Lösungen und Puffer

Lösungen bzw. deren Stammlösungen und Puffer wurden mit deionisiertem Wasser aus

einer Wasseraufbereitungsanlage (SG Clear, SG Wasseraufarbeitungs- und Regenerationsstation GmbH, Barsbüttel, Deutschland) bei Raumtemperatur angesetzt und anschließend autoklaviert oder steril filtriert (Steril Syringe Filter w/0,2 µm Polyethersulfon Membran, VWR International, Leuven, Niederlande).

2.4.3 Enzyme und Kits

In allen Ansätzen wurden die Enzyme in einer einfachen Pufferkonzentration verwendet.

Tab. 2.1: Restriktionsendonukleasen.

Bezeichnung	Hersteller
<i>BtgZ</i> I	New England Biolabs (Frankfurt, Deutschland)
<i>Esp</i> 31	MBI Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland)
<i>Hind</i> III	MBI Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland)
<i>Hinc</i> II	MBI Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland)
<i>Nco</i> I	MBI Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland)
<i>Pst</i> I	MBI Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland)
<i>Sma</i> I	MBI Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland)
<i>Xho</i> I	MBI Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland)

Tab. 2.2: Enzyme für die Klonierung und Nikotinat-D-Ribosid Synthese.

Bezeichnung	Hersteller
Alkalische Phosphatase (CIAP)	Promega (Madison, WI, USA)
T ₄ -DNA-Ligase	MBI Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland)
T ₄ -DNA-Polymerase	MBI Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland)
T ₄ -Polynukleotidkinase (PNK)	MBI Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland)

Tab. 2.3: Enzyme für RNA-Isolation, cDNA-Synthese und PCR.

Bezeichnung	Hersteller
High Fidelity PCR-Enzym-Mix	MBI Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland)
Proteinase K	MBI Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland)
RNase-A (DNase-frei)	MBI Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland)
RQ1 DNase	Promega (Madison, WI, USA)
Superscript II Reverse Transkriptase	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
High Fidelity PCR-Enzym-Mix	MBI Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland)

Tab. 2.4: Enzyme für die Antikörperfärbung und Westerblot.

Bezeichnung	Hersteller
Anti-SLC22A13r	Eurogentec (Deutschland)
Goat Anti Rabbit IgG Alexa 594	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Stabilized Goat Anit-Rabbit HRP	Pierce (Rockford, USA)

Tab. 2.5: Kit-Systeme.

Kit-System	Hersteller
BCA Protein Assay Kit	Pierce Biotechnology (Rockford, IL, USA)
Plasmid Maxi Purification Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Plasmid Mini Purification Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
QIAquick [®] Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Quik Change II Site –Directed Mutagenesis	Stratagene (Heidelber, Deutschland)
QIAquick [®] Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
TaqManMaster	Roche (Mannheim, Deutschland)
Tfx [™] -50-Transfection Kit	Promega (Madison, WI, USA)
SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate Antibodies	Pierce (Rockford, USA)

2.4.4 Bakterienstamm und Zelllinie

Verwendet wurde der *Escherichia Coli* (*E coli*) Stamm DH10B [Grant et al., 1990; Lorow and Jesse, 1991] mit folgendem Genotyp: F⁻, *mcrA*, Δ (*mrr-hsdRMs-mcrBC*), Φ 80d*lacZ* Δ M15, Δ *lacX74*, *deoR*, *recA1*, *araD139*, Δ (*ara, leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL*, *endA1*, *nupG*, λ

Verwendet wurde die Zelllinie Human Embryonic Kidney (HEK-293) American Tissue Type Culture Collection 1988, ATCC CRL-1573HEK293-Zellen.

2.4.5 Plasmide

pUC19 ist ein Plasmid mit hoher Replikationsrate [Yanisch-Perron et al., 1985; Balbas et al., 1986], ist 2686 bp lang und besitzt ein β -Laktamase-Gen (*amp^r*), das eine Ampizillin-Resistenz ermöglicht.

pEBTetD: siehe 2.4.6

2.4.6 Expressionssystem pEBTetD

Für die Expression von verschiedenen cDNAs (engl. c = complementary) wurde der Expressionsvektor pEBTetD verwendet (Bach et al., 2007). Dieser Vektor basiert auf Elementen des Epstein-Barr-Virus. Als Grundgerüst diente das Plasmid pCEP-Pu [Kohfeldt et al., 1997] und zur Steuerung der Expression wurde das Tetracyclin-Repressor-System verwendet.

Das Epstein-Barr-Virus ist ein humanpathogenes DNA-Virus, das zur Familie der Herpesviren gezählt wird. Es wurden zwei Regionen der Virus-DNA identifiziert, die eine autonome Replikation zirkulärer DNA erlauben: der Replikationsursprung oriP und das DNA-Bindeprotein EBNA-1 (Epstein-Barr nuclear antigen) [Yates et al., 1985]. Da sich alle

notwendigen Bestandteile für die induzierbare Expression, im Gegensatz zu anderen Expressionssystemen (z.B. Flp-In™-T-Rex™-System, FIT-System, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), auf einem einzigen Vektor befinden, ist eine Zelllinie schon nach einer einzigen Transfektion und anschließender Selektionsphase etabliert, was eine Zeitersparnis von ca. 2 - 9 Wochen gegenüber anderen Systemen, wie dem FIT-System, bedeutet.

In Abbildung 2.2 ist der schematische Aufbau des Vorläufer-Vektors pEBTet dargestellt. Zur Vermehrung in Bakterien enthält pEBTet einen pUC-Replikationsursprung (engl., plasmid of the University of California) mit einer Ampicillin-Resistenz-Kassette. Weiterhin enthält dieser Vektor einen SV40 Promotor (Simianes Virus 40), der in humanen Zelllinien nach erfolgreicher Transfektion eine konstante Puromycinresistenz aufrecht erhält. Der Tet-Repressor wird kontinuierlich exprimiert und bildet Homodimere, die an die Tet-Operatoren binden und so die Transkription der stromabwärts liegenden cDNA verhindert. Durch die Bindung von Doxzyklin an den Tet-Repressor ändert sich dessen Konformation, wodurch er nicht mehr an den Operator binden kann und somit die Transkription freigibt.

Da der ursprüngliche pEBTet-Vektor im nicht induzierten Zustand eine gewisse Grundexpression besaß, ergab sich ein Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis auf mRNA-Ebene von 100:1 (Bach et al., 2007). Die mRNAs der exprimierten Transportproteine wiesen jedoch eine hohe Stabilität auf. Aufgrund der hohen Translationseffizienz führte dieser geringe mRNA-Hintergrund im nicht induzierten Zustand bei der funktionellen Charakterisierung der Transporter zu einem starken Hintergrund in der Substrataufnahme. Dieses Problem konnte behoben werden indem die BGH poly-(A)-site (bovine growth hormone) stromabwärts der cDNA aus dem Vektor pEBTet entfernt wurde. Bei dem so entstandenen Vektor pEBTetD (D, Deletion) erfolgt die Termination der Transkription durch den oriP [Yates et al., 2000] was auch durch die Länge der mRNAs bestätigt wurde. Der fehlende poly-(A)-Schwanz führt zu einer instabileren mRNA und die Anzahl translatierter Proteine pro mRNA-Molekül wird verringert [Kahvejian et al., 2005; Kozak, 2004].

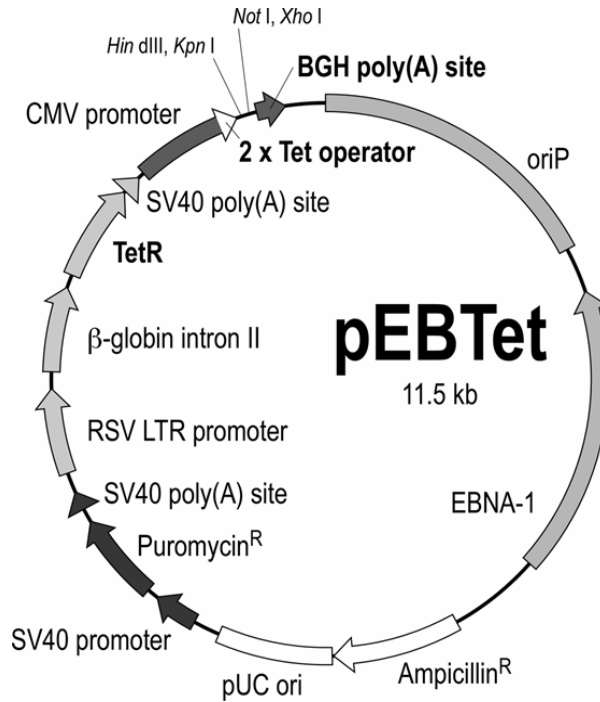


Abb. 2.2: Schematische Darstellung des pEBTet-Expressionsvektors. Funktionellen Elemente und deren Orientierung sind Pfeile dargestellt. Außerhalb des Vektors sind die verwendeten Schnittstellen für die Klonierung (*Not*I, *Xho*I, *Kpn*I und *Hind*III) dargestellt.

2.4.7 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers.net (Ulm, Deutschland) und die TaqMan Sonden von Roche (Mannheim, Deutschland) bezogen.

Tab. 2.6 Primer

Name	Orientierung	Sequenz
FAOAT2h	Sense	AGAAAGCTTGCCACCATGGGCTTTGAGGAGCTGCTGGAGCA
RAOAT2h	Antisense	ACAAGGCAGGGTGACAGCTAGCAGAA
FBOAT2h	Sense	GACTGGCGATGGCTTCTGCTAGCTGTCA
RBOAT2h	Antisense	AGACTCGAGTTAGTTCTGGACCTGCTTCATGGGCAT
FOAT2hE441Q	Sense	GGGAAAGCTTTTTCTCAAGCTGCCTTCACCA
ROAT2hE441Q	Antisense	TGGTGAAGGCAGCTTGAGAAAAAGCTTTCC
FAOAT1h	Sense	AGAAAGCTTGCCACCATGGCCTTTAATGACCTCCTGCAGCAG GTG
RAOAT1h	Antisense	AGACGTCTCCCTTTGCCCATGGTCAGCTCCTTCTGCAG
FBOAT1h	Sense	AGACGTCTCAAAGGCCAGGCATCGGCCATGGAGCTG
RBOAT1h	Antisense	AGACTCGAGTCAGAGTCCATTCTTCTCTTGCTGAG
FAURAT1h	Sense	AGAAAGCTTGCCACCATGGCATTCTGAACTCCTGGACCTC GTG
RAURAT1h	Antisense	CGTCTCTGAGGAGCCATCGTGCCGACTCTGCCAG

FBURAT1h	Sense	AGACGTCTCTCCTCACCACAGGCAGGCTGGATTGGGGCCT
RBURAT1h	Antisense	TCTCTCGAGCTAAAACGTGTGTGGATTTTAGGACAGAGTT
FSLC22A13r#85	Sense	GCCAGACCCTGAAGGACA
RSLC22A13r#85	Antisense	TCTTTGGGGTGCAGTTTTGT
TaqMan Sonde 85		GACCTGGA
FOAT2r#22	Sense	GGAGTACGACCGCTCAGAAT
ROAT2r#22	Antisense	TGACACACAAGATCCCACTCA
TaqMan Sonde 22		CTCCACCA
Fβ-Aktinr#11	Sense	TGTGTGGATTGGTGGCTCTA
Rβ-Aktinr#11	Antisense	TACTCCTGCTTGCTGATCCA
TaqMan Sonde 11		GCTGGAAG
FSLC22A13-GFP	Sense	CTGGACGTCTATCTGACGCAGCTCATC
RSLC22A13-GFP	Antisense	AGACCATGGAGAAGTATGTGCTGCTCACAAAGGCCA
FOAT2h-GFP	Sense	AGACTTCAGAGTTGTACCCTACGGTGCT
ROAT2h-GFP	Antisense	AGACTCGAGCGGCCGCAGACCATGGAGTTCTGGACCTGCTT CATGGGCA

2.5 Methoden

2.5.1 Mikrobiologische Methoden

Die Arbeiten mit *Escherichia coli* (*E. coli*) wurden in einer Reinraumwerkbank (Laminar Flow, Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland) durchgeführt. Alle Gegenstände und Lösungen, die mit *E. coli* in Kontakt kamen, wurden zuvor durch Autoklavieren oder Sterilfiltrieren (0,22 µm Porengröße) sterilisiert bzw. mit 70% Isopropanol desinfiziert.

2.5.1.1 Nährmedien

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in Luria Bertani (LB) -Medium. Nach ihrer Herstellung wurden Nährmedien sofort autoklaviert und bis zum weiteren Gebrauch bei 4 °C gelagert.

Antibiotika: Für die Selektion auf Antibiotikaresistenz wurde das Antibiotikum Ampicillin in Wasser gelöst, steril filtriert und dem jeweiligen Medium in einer Endkonzentration von 10 µg/ml zugesetzt. Ampicillin-Stammlösungen zu 100 mg/ml wurden in Aliquots bei -20 °C gelagert.

Agarplatten: Um Agarplatten herzustellen, wurde LB-Medium mit 15 g/l Agar versetzt, autoklaviert und anschließend bei 4 °C gelagert. Vor dem Gießen der Platten wurde der Agar

aufgekocht, und nach dem Abkühlen auf 50 °C wurde er mit der entsprechenden Menge Antibiotikum versetzt und in sterile Petrischalen (Durchmesser 10 mm) gegossen. Nach dem Aushärten wurden die Platten bei 4 °C gelagert.

LB-Medium:

10	g/l	Casein-Hydrolysat
5	g/l	Hefeextrakt
10	g/l	NaCl

2.5.1.2 Kultur und Lagerung von *E. coli*

Flüssigkultur: Für Flüssigkulturen wurde in einem Reagenzglas mit Kapsenberg-Kappe 2 ml LB-Medium bzw. für größere Mengen 200 ml in einem 500 ml Schüttelkolben mit der entsprechenden Menge Antibiotikum gegeben. Mit einer ausgeglühten Platinöse wurde das Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C, 200 UpM (Umdrehungen pro Minute) inkubiert. (Inkubationsschüttler Minitron HT, Infors Ag, Bottmigne, Deutschland).

Plattenkultur: Für Kulturen auf Agarplatten wurden 100 µl einer Bakteriensuspension auf eine Agarplatte pipettiert und mit einem sterilen Drigalsky-Spatel gleichmäßig verteilt. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit Parafilm abgedichtete Platten wurden bis zu 8 Wochen bei 4 °C aufbewahrt.

Glycerolstocks: Zur langfristigen Aufbewahrung von *E. coli* eignen sich Glycerolstocks. Dabei wurde 1 ml LB-Medium mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und bis zur deutlichen Trübung inkubiert (4-5 h, 37 °C, 200UpM). Die Kultur wurde anschließend mit Glycerol bis zu einer Endkonzentration von 10% versetzt und in Kryoröhrchen bei -80 °C gelagert.

Für die Reaktivierung der Bakterienzellen wurde mit einer ausgeglühten Platinöse vom Inhalt des Kryoröhrchens ein Abstrich genommen, von dem aus durch Ausplattieren Einzelkolonien angelegt wurden.

2.5.1.3 Herstellung elektrokompetenter Bakterien und Elektroporation

Herstellung elektrokompetenter Bakterien: Für die Transformation von Bakterien durch Elektroporation muss die Bakteriensuspension einen niedrigen Salzgehalt haben, um ein zu schnelles Abfallen der angelegten Spannung und damit eine ineffiziente Transformation zu vermeiden.

Eine Einzelkolonie von *E. coli* DH10B wurde über Nacht in 5 ml SOB-Mg bei 37 °C und 200 UpM inkubiert. Am folgenden Tag wurden 4 ml dieser Vorkultur in 200 ml SOB-Mg suspendiert und für 2,5 h inkubiert (37 °C, 200 UpM). Anschließend wurde die Kultur 10 min

auf Eis inkubiert, zentrifugiert (10 min, 4 °C, 3000 x g) und der Überstand vollständig ab dekantiert. Das Bakterienpellet wurde daraufhin in 100 ml eiskalter 10%iger Glycerol-Lösung resuspendiert. Daran schließt sich erneut die beschriebene Zentrifugation an und der Waschschrift wurde wiederholt. Nach erneuter Aufnahme der Pellets in 100 ml 10%iger Glycerol-Lösung erfolgte eine weitere Zentrifugation (10 min, 300 x g). Der Überstand wurde daraufhin verworfen und das Pellet im Restüberstand aufgenommen. Die Zellsuspension wurde zu je 26 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

SOB-Mg:

20	g/l	Casein-Hydrolysat
5	g/l	Hefeextrakt
10	mmol/l	NaCl
2,5	mmol/l	KCl

Elektroporation: Die Zellmembranen von Bakterien sind nicht permeabel für Nukleinsäuren. Um DNA-Moleküle in Bakterien zu replizieren oder zur Expression zu bringen, muss ihrem Eintritt in die Zelle assistiert werden. Bei der Elektroporation werden die Bakterienzellen kurzzeitig einer hohen Spannung ausgesetzt, die temporäre Löcher oder Poren in der Zellmembran verursacht. Diese Poren erlauben einen ungehinderten Stoffaustausch zwischen dem Medium und dem Zytoplasma. Auf diese Weise können Nukleinsäuren in die Zelle gelangen [Neumann et al., 1982; Zimmermann, 1982].

Für die Elektroporation wurden die Aliquots auf Eis aufgetaut. Die DNA-Proben bzw. die Ligationsansätze wurden zunächst durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe 2.5.2.2) aufgereinigt und die DNA mit Ethanol gefällt (siehe 2.5.2.3), sowie zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Die DNA wurde getrocknet und mit 0,5 x TE auf eine Konzentration von 5-10 ng/µl verdünnt. Für die Elektroporation wurde 1 µl DNA-Lösung mit 25 µl Bakteriensuspension gemischt, eine Minute auf Eis inkubiert und luftblasenfrei in eine eisgekühlte Küvette (1 mm Elektrodenabstand, BioRad, München, Deutschland) überführt. Für die Elektroporation selbst wurde ein Gene Pulser und Pulse Controller (BioRad, München, Deutschland) bei 25 µF [Kapazität], 200 [Widerstand], 1.6 kV [Spannung] (Zeitkonstante < 5 ms) eingesetzt. Die eiskalte Elektroporationsküvette wurde außen abgetrocknet und mit dem Spannungsgenerator verbunden. Unmittelbar nach dem Stromstoß wurde 1 ml SOC-Medium in die Küvette gegeben und die Lösung vorsichtig homogenisiert. Die Zellsuspension wurde in ein steriles Reagenzglas überführt und 1 h bei 37 °C, 200 UpM inkubiert. Während dessen wird die auf dem Plasmid kodierte β-Lactamase exprimiert, die eine Ampicillinresistenz vermittelt. Anschließend wurden 100 µl der Kultur, sowie eine 1:100 Verdünnung in LB-Medium auf Agarplatten mit Antibiotikum-Zusatz ausplattiert.

SOC:

10	mmol/l MgCl ₂
10	mmol/l MgSO ₄
20	mmol/l Glucose in SOB-Mg

TE:

10	mmol/l Tris
1	mmol/l EDTA pH 8 mit HCl

2.5.2 Molekularbiologische Methoden

2.5.2.1 In vitro Mutagenese von Plasmid-DNA

Die Mutagenesen erfolgten mit Hilfe des Quik Change II Site –Direkted® Mutagenesis Kit der Firma Stratagene. Die jeweils erwünschten Punktmutationen wurden durch zwei Primer vorgegeben die von 15 bzw. 16 Basen langen komplementären Bereichen flankiert wurden. Für die Mutagenese wurden 20 ng doppelsträngige Plasmid-DNA (pEBTeD/OAT2h) eingesetzt. Durch eine Temperaturschleife analog der PCR wurde eine lineare Amplifikation des gesamten Plasmids erreicht. Im ersten Schritt wurde die DNA 30 sec bei 95°C aufgeschmolzen. Die Anlagerung der Primer erfolgte für 1 min bei 55° C, die während der Synthesephase durch die PfuUltra HF DNA-Polymerase 7.3 min bei 68°C verlängert wurden. Dieser Zyklus wiederholte sich 12-mal. Das entstandene Produkt wurde mit der Endonuklease DpnI (Erkennungssequenz: 5'-Gm⁶ATC-3') behandelt, das nur DNA schneiden kann wenn diese methyliert bzw. hemimethyliert ist. Dadurch wird lediglich die eingesetzte Tamplate-DNA abgebaut, da die neu synthetisierte DNA keine Methylgruppen trägt

Die Transformation, der in dem Kit enthaltenen XL-1 Bakterien, erfolgte mittels Hitzeschock. Hierzu wurden 50 µl der Bakterien mit 1 µl der DpnI behandelten DNA gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock wurde für 45 sec und 42° C durchgeführt. Anschließend wurde die Reaktion für 2 min auf Eis abgekühlt und in 0.5 ml auf 42° C vorgewärmtem NZY⁺-Medium aufgenommen. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37° C im Schüttelinkubator und 200 UpM (Umdrehungen pro Minute) (Inkubationsschüttler: Minitor HAT, Infors AG, Bottmingen, Deutschland) wurden 250 µl des Ansatzes auf einer Agarplatte ausgestrichen (siehe: 2.5.1.1).

NZY⁺

10 g/l	Casein-Hydrolysat
5 g/l	Hefeextrakt
5 g/l	NaCl
12.5 ml	1 M MgCl ₂
12.5 ml	1 M MgSO ₄
20 ml	Glukose 20% (w/v)

2.5.2.2 Phenol-Chloroform-Extraktion

Nukleinsäuren sind häufig verunreinigt, zumeist handelt es sich dabei um Proteine. Eine Methode zur Reinigung von Nukleinsäuren ist die Methode der Phenol-Chloroform-Extraktion. Die organischen Lösungsmittel Phenol und Chloroform denaturieren Proteine, die sich dann in der organischen Phase bzw. an der Grenzschicht zwischen organischer und wässriger Phase ansammeln, während die Nukleinsäuren in der wässrigen Phase gelöst bleiben. Auf dieser Weise können Nukleinsäuren von Proteinen gereinigt werden.

Phenol wurde vor Gebrauch mit Tris/HCl und TE äquilibriert. Dazu wurde Phenol mit einem ½ Volumen 1 M Tris/HCL pH 8 versetzt, gut gemischt und zentrifugiert (5 min, 5000 x g). Der Überstand wurde verworfen und zur Phenolphase wurde ein ½ Volumen 1 x TE gegeben und erneut gemischt und zentrifugiert. Die Phenolphase wurde entnommen und mit 0,1% 8-Hydroxychinolin als Antioxidationsmittel versetzt. Zuletzt wurde zu dem gesättigtem Phenol gleiches Volumen CIA (Chloroform: Isoamylalkohol, 24:1) gegeben und die Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung bei -20 °C gelagert.

Zur Extraktion von Nukleinsäuren, wurde die Nukleinsäurelösung mit einem gleichem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, 10 sec gut gemischt und zentrifugiert (1 min, 16000 x g). Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Die untere organische Phase wurde mit 0,5 x Volumen TE wie beschrieben nachextrahiert. Die wässrigen Phasen wurden vereinigt. Anschließend wurde, um die verbleibenden Phenolreste aus der Lösung zu entfernen, gleiches Volumen CIA Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zur wässrigen Phase gegeben, gut durchmischt und zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde erneut abgenommen und die DNA durch Fällung mit Alkohol (siehe 2.5.2.3) konzentriert.

2.5.2.3 Alkohol-Fällung

Zur Konzentrierung und Reinigung werden Nukleinsäuren mit Alkohol gefällt.

Lösungen von DNA wurden mit 0,1 x Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 2,5 x Volumen 96% Ethanol bzw. 1 x Volumen Isopropanol versetzt, gut gemischt und zentrifugiert (10 min,

16000 x g). Bei Nucleinsäurekonzentrationen $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ wurde vor der Fällung lineares Polyacrylamid als Fällhilfe zugesetzt [Gaillard und Strauss, 1989]. Nach der Zentrifugation wurde das DNA-Pellet mit 150 μl 70% Ethanol gewaschen und zentrifugiert (5min, 1600 x g). Der Überstand wurde daraufhin abgenommen und die DNA bei 60 °C bis zum Verschwinden letzter Flüssigkeitstropfen getrocknet. Das Pellet wurde in TE aufgenommen.

2.5.2.4 Gelelektrophorese und Gelextraktion

Gelelektrophorese: Eine Möglichkeit zur Auftrennung, Identifizierung und Reinigung von DNA-Molekülen, ist die Elektrophorese in Agarosegelen. Sie basiert auf der Tatsache, dass DNA-Moleküle aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatreste in einem elektrischen Feld in Richtung der positiv geladenen Anode wandern. Das Agarosegel fungiert dabei als Sieb, deren Poren kleineren Fragmenten weniger Widerstand bieten. Die elektrophoretische Mobilität eines DNA-Moleküls ist dabei abhängig von der Anzahl der Nucleotide, sowie von der Konformation des DNA-Moleküls. Die Laufstrecke linearer DNA ist umgekehrt proportional zum Logarithmus der Anzahl der Basenpaare. Die Länge einer unbekannt Probe kann daher durch das parallele Auftragen eines DNA-Größenmarker mit Fragmenten bekannter Größe ermittelt werden. Bei anderen DNA-Konformationen wie bei Plasmide ist das Laufverhalten zudem vom Grad der Superspiralisierung abhängig. Durch Zugabe von Ethidiumbromid, das zwischen die Basenpaare der DNA interkaliert, kann die DNA unter UV-Licht durch die Fluoreszenzstrahlung (590 nm) des Ethidiumbromid-DNA-Komplexes identifiziert werden.

In dieser Arbeit wurden Agarosekonzentrationen von 0,8% (w/v) für Fragmente zwischen 0,5-13 kb und 1 kb DNA Leiter (Promega, Mannheim, Deutschland) als Längenstandard eingesetzt. Für Fragmente unter 0,5 kb wurden Agarosekonzentrationen von 1,6% (w/v) und 100 kb Längenmarker eingesetzt. Die Gelelektrophorese selbst wurde mit einer Flachbettapparatur (BioRad, München, Deutschland) und TAE als Elektrophoresepuffer durchgeführt. Die entsprechende Menge Agarose wurde in TAE aufgekocht und nach Abkühlen auf ca. 55 °C in eine mit einem Kamm bestückte Gelform gegossen. Nach dem Erstarren der Agarose wurde das Gel in der Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit einem Gelbeladungspuffer versehen und in die Geltaschen gegeben. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 5 V/cm Elektrodenabstand. Die DNA-Banden wurden mit Ethidiumbromid und UV-Licht detektiert. Dafür wurde das Gel für 10 min bei 60 °C in ein Ethidiumbromidbad (1 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid in TAE) inkubiert.

Gelextraktion: Sollten die DNA-Fragmente weiterverwendet werden, wurde der TAE-Puffer mit 5 M Cytidin versetzt. Cytidin schützt die DNA vor einer Degeneration durch das UV-Licht [Gründemann und Schömig, 1996]. Die gewünschten Banden wurden aus dem Gel unter Verwendung des QIAGEN-Extraction-Kits und nach Angaben des Herstellers extrahiert. Um die DNA zu konzentrieren erfolgte anschließend eine Alkohol-Fällung (siehe 2.5.2.3). Eine Quantifizierung der DNA erfolgte mittels Spot-Test (siehe 2.5.2.13)

TAE:

40 mmol/l Tris
1 mmol/l EDTA
pH 8 mit Essigsäure

Gelbeladungspuffer:

10% Glycerol
0,01% Bromphenolblau
0,05% Orange G
in TAE

2.5.2.5 Restriktion von DNA

Restriktionsenzyme oder Restriktionsendonukleasen sind aus Bakterien isolierte Enzyme, die eine spezifisch Abfolge von 4 bis 8 Basen in einem DNA-Doppelstrang erkennen und diesen spalten. Bei der Spaltung bzw. Restriktion wird in jedem Strang eine Phosphodiesterbindung hydrolysiert, so dass ein 5'-Phosphat freigesetzt wird. Häufig handelt es sich bei der Zielsequenz um Palindrome, d.h. sie sind symmetrisch und somit in beiden Strängen gleich. In dieser Arbeit wurden Restriktionsenzyme vom Typ II verwendet, die innerhalb ihrer Erkennungssequenz schneiden.

Die Restriktion erfolgte nach Angaben des Herstellers. Über die Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.5.2.4) wurden die Restriktionen überprüft. Die Reinigung der Restiktionsansätze erfolgte über die Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe 2.5.2.2) die DNA wurde anschließend mit Alkohol gefällt (siehe 2.5.2.3) und in TE aufgenommen.

2.5.2.6 Ligation

Unter Ligation versteht man die kovalente Verknüpfung von linearen DNA-Molekülen. Diese kann durch die T4 DNA-Ligase katalysiert werden, die unter ATP-Verbrauch das 5'-Phosphat des einen DNA-Strangs mit dem 3'-Hydroxylrest des anderen DNA-Strangs verbindet

Der Ansatz wurde über Nacht bei 25 °C (Blunt-end-Ligation) bzw. 16 °C (Sticky-end-Ligation) inkubiert.

Ansatz: Blunt-end Ligation
150 fmol DNA-Fragment
50 fmol Vektor pUC19 mit *Sma*I oder *Hind*III linearisiert und dephosphoryliert
(siehe Tab. 2.1)
1 x Puffer T4 DNA-Ligase
15 U T4 DNA-Ligase
H₂O ad 10 µl

Ansatz: Sticky-end-Ligation
je 150 fmol DNA-Fragment
50 fmol Vektor pEPTet mit *Hind*III und *Xho*I geschnitten
1 x Puffer für T4 DNA-Ligase
2,5 U T4 DNA-Ligase
H₂O ad 20 µl

2.5.2.7 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Um eine Selbstligation von Plasmiden zu vermeiden müssen diese dephosphoryliert werden. Durch die calf intestine alkaline phosphatase (Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm) werden die Phosphatreste am 5'-Ende eines DNA-Fragments entfernt, so dass es zu keinem Ringschluss der Vektor-DNA kommen kann.

Hierfür wurden pro µg DNA 1 U alkalische Phosphatase mit dem dazu gehörigen Puffer, 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Über die Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe 2.5.2.2) wurde die Phosphatase entfernt.

2.5.2.8 Phosphorylierung von DNA und DNA-Enden glätten

Durch die T4 DNA-Polymerase können DNA-Fragmente mit Überhängen aufgefüllt oder durch die 3'-5'-Exonucleaseaktivität der Polymerase abgebaut und somit glatte Enden präpariert werden. Die Phosphorylierung der DNA-Fragmente kann durch die T4 Polynucleotidkinase erfolgen. Die Kinase überträgt dabei eine Phosphatgruppe von ATP auf das 5'-Ende der DNA.

Der Ansatz wurde für 20 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe 2.5.2.2) und eine Ethanolfällung (siehe 2.5.2.3).

Ansatz: 10 - 40 ng DNA-Fragment
je 100 µM dNTP
25 µM ATP
1 x Puffer für T4 DNA-Polymerase
1 U T4 DNA-Polymerase
5 U T4 Polynucleotidkinase
H₂O ad 25 µl

2.5.2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Amplifizierung von DNA wurde die Polymerase-Kettenreaktion verwendet. Die PCR besteht aus einem Denaturierungsschritt, bei dem sich die beiden Stränge der Template-DNA trennen, aus einem Annealingschritt, bei dem die Temperatur gesenkt wird, so dass die Primer an ihrer komplementären Sequenz der Template-DNA hybridisieren können, sowie aus einem Elongationsschritt, bei dem die Polymerase die Nukleotide an die 3'-OH-Primer-Enden anheftet und so die restliche komplementäre Sequenz synthetisiert, bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt. Daraufhin erfolgt erneut die Denaturierung und der Zyklus beginnt von neuem.

Ansatz: 0,2 µg cDNA
 1 x Puffer für High Fidelity Polymerase
 0,25 U High Fidelity Polymerase
 0,2 µM dNTPs
 0,5 µM Sense Primer
 0,5 µM Antisense Primer
 5 % DMSO
 H₂O ad 50 µl

Amplifikationsprogramm:

94 °C	30 sec	← 33 x
55 °C	60 sec	
72 °C	60 sec	
72 °C	300 sec	

2.5.2.10 Real-time PCR

Die Real-time PCR ermöglicht das Quantifizieren von mRNA. So kann beispielsweise der Expressionsort eines Proteins im Organismus ermittelt werden. Die Amplifikationsprodukte der PCR werden hier über ein Fluorochrom detektiert. Eine Methode, die in dieser Arbeit verwendet wurde, ist das *TaqMan*-Prinzip [Livak et al. 1995]. Hierbei wird der PCR ein weiteres Oligonucleotid (Sonde) zugefügt, welches zwei Fluorochrome (Reporter und Quencher) trägt. Die Sonde wird so gewählt, dass sie zwischen den beiden Primern hybridisieren kann. Das Fluoreszenzsignal des Reporters wird durch die räumliche Anordnung vom Quencher unterdrückt. Durch die Neustrang-Synthese wird die Sonde von der Polymerase abgebaut. Reporter und Quencher werden dabei räumlich voneinander getrennt und das Fluoreszenzsignal des Reporters wird detektiert. Somit steigt die Fluoreszenz proportional zur Anzahl der amplifizierten PCR-Produkte an.

Die Berechnung der relativen Expression erfolgte nach einer Methode, die von D. Gründemann entwickelt wurde. Über diese neue Auswertung war eine Verdünnungsreihe zur Berechnung der Amplifikationseffizienz (AE) nicht erforderlich. Das Ermitteln der AE erfolgt hier über eine simultane Kurvenanpassung [Batsch et al., 2008].

Instrument: Verwendet wurde das LightCycler 2.0 System von Roche

Ansatz: 1 μ M Sense Primer
 1 μ M Antisense Primer
 0,1 μ l TaqMan Sonde(siehe 2.4.7)
 2 μ l 5x TaqManMaster (Roch Diagnostics, Mannheim, Germany)
 1 μ l cDNA (4 ng/ μ l)
 H₂O ad 20 μ l

Amplifikationsprogramm:

95 °C	600 sec		
95 °C	10 sec	←	44x
55 °C	30 sec		
72 °C	1 sec		
40 °C	30 sec		

2.5.2.11 Sequenzierung

Zur Sequenzierung der klonierten Fragmente wurde das BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v1.1 benutzt (T-Mix). Die Analyse erfolgt durch den 16 Kappilar-Sequencer (ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems Hitachi, Foster City, CA, USA). Die Sequenzier-Reaktion erfolgt nach der Didesoxymethode nach Sanger [Sanger et al., 1977]. Jedes der vier ddNTPs ist mit einem Unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff markiert, der während der Elektrophorese mittels Laser angeregt und gemessen wird. Die Zugabe des T-Mix erfolgte nach der ersten Denaturierung.

Ansatz: 200 ng Plasmid
 0,2 μ M Sense- oder Antisense-Primer
 2 μ l T-Mix
 H₂O ad 10 μ l

Amplifikationsprogramm:

94 °C	300 sec		
94 °C	30 sec	←	35 x
50 °C	30 sec		
62 °C	280 sec		
62 °C	600 sec		

2.5.2.12 Plasmid-Präparation aus *E. coli*

Die Plasmid-Präparation aus *E. coli* wurde mit dem Qiagen Plasmid Mini Kit bzw. Qiagen Plasmid Maxi Kit nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

2.5.2.13 Konzentrationsbestimmungen von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte über einen so genannten Spot-Test. Hierzu wurde 1 µl der DNA-Lösung auf eine ethidiumbromidhaltige (5 µg/ml) Agaroseplatte (1% w/v) aufgetragen und diese für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die DNA wird durch das Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar. Durch ein Vergleich von Standards mit unterschiedlichen Konzentrationen (5 - 200 ng/µl λ-DNA) wurde die Konzentration der zu untersuchenden DNA-Probe ermittelt.

2.5.2.14 Präparation von Gesamt-RNA aus Gewebe

Zur Vermeidung von RNase-Kontaminationen wurden alle RNA-Arbeiten unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die verwendeten Geräte und Lösungen wurden, soweit möglich mit 1/1000 Volumen DEPC versetzt und für 20 min bei 120 °C autoklaviert.

Das Prinzip der RNA Isolierung besteht darin das Gewebe in einer Guanidiniumthiocyanatlösung zu lysieren [Chomczynski und Sacchi 1987]. Guanidiniumthiocyanat denaturiert und inaktiviert Proteine, somit auch RNasen. Anschließend werden durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion Proteine und DNA entfernt, so dass in der wässrigen Lösung die RNA zurückbleibt, die daraufhin mit Alkohol gefällt wird

Für die Präparation von Gesamt-RNA aus Gewebe (2 g) wurde dieses in 10 ml DL-Lösung (Denaturierungslösung) aufgenommen und gut geschüttelt. Zu 10 ml Lysat wurden 1 ml 2 M Natriumacetat pH 4 (DEPC behandelt), 10 ml Phenol (Wasser gesättigt) und 10 ml CIA (siehe 2.5.2.2) gegeben. Der Ansatz wurde kräftig geschüttelt und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (30 min, 10000 x g) wurde die wässrige Phase abgenommen, mit 10 ml CIA versetzt, geschüttelt und zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde daraufhin mit gleichem Volumen Isopropanol versetzt und zentrifugiert. Das RNA Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, zentrifugiert (15 min, 10000 x g), bei 60° C getrocknet und in 800 µl DEPC behandeltem Wasser aufgenommen.

DL-Lösung:

400 mmol/l	Guanidiniumthiocyanat
25 mmol/l	Natriumacetat pH 7,0
0,5%	N-Laurylsakosin
100 mmol/l	Mercaptoethanol

2.5.2.15 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde durch eine Absorptionsmessung bei 260 nm ermittelt. Eine Absorptionseinheit bei 260 nm für RNA entspricht ca. 40 µg/ml. Die Konzentration der zu untersuchenden RNA-Lösung ergibt sich durch:

$$c [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times V \times 40$$

c = Konzentration

V = Verdünnungsfaktor

Um die Reinheit der RNA zu ermitteln, wurde der Quotient der Absorption bei 260 nm zu 280 nm (aromatische Gruppen der Proteine) bestimmt. Dieser Wert liegt bei reiner RNA bei 1,8-2.

2.5.2.16 Gelelektrophorese von RNA

Da RNA zur Bildung von Sekundärstrukturen neigt, muss sie vor der Gelelektrophorese denaturiert werden. Eine Methode für die Denaturierung von RNA ist die Verwendung von Glyoxal.

1% Agarose wurde in Laufpuffer 1 X BE aufgekocht. Als Maßnahme gegen RNasen, wurde die Agarose mit 5 mM Natriumjodessigsäure versetzt und in die Elektrophoresekammer gegossen. Das ausgehärtete Gel wurde mit Laufpuffer überschichtet

Die RNA-Proben wurden während der Denaturierung mit Ethidiumbromid gefärbt [Gründemann und Koepsell 1994]. Dafür wurde die Denaturierungslösung (4/3 DLG) mit Ethidiumbromid (2,5 µg/µl) versetzt, die RNA mit drei Probenvolumen 4/3 DLG-Ethidiumbromid-Mix gemischt und 1 h bei 50 °C inkubiert. Nach Zusatz von Orange G auf eine Endkonzentration von 0,5 mg/ml wurden die Proben auf das Gel aufgetragen. Parallel wurde ein RNA-Größen Marker (Life Technologies) wie oben beschrieben behandelt und ebenfalls auf das Gel aufgetragen. Elektrophorese und Auswertung des Gels erfolgten wie unter 2.2.1.3. Da der Puffer nur eine geringe Kapazität hat, wurde er nachdem die Proben 5 min in das Gel eingewandert sind mit einer Pumpe umgewälzt.

BE:

10 mmol/l BES
0,1 mmol/l EDTA
pH 6,7 mit NaOH
mit DEPC behandelt

DLG:

50% DMSO
1 mol/l Glyoxal

2.5.2.17 reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Durch die Reverse Transkriptase wird RNA in cDNA umgeschrieben.

Die Gesamt-RNA von humaner Niere, Dickdarm, Prostata und Lunge stammten jeweils von der Firma Takara Bio Europe/Clontech Europe (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich). Für die cDNA Synthese wurden 5 µl Gesamt-RNA (1 µg/µl) 5 min bei 65 °C inkubiert und folgender Ansatz pipettiert:

Ansatz: 5 µl µg/µl Gesamt-RNA
2 µl 10 x RT-Puffer
2 µl 0,1 M DTT
3 µl dNTPs (je 10 mM)
1,4 µl 0,1 M MgCl₂
1,4 µl 0,1 M MgCl₂
4 µl Primer (Random Hexamer)
DEPC-H₂O ad 19,5 µl

Der Ansatz wurde für 5 min bei RT und für 2 min bei 45 °C inkubiert, mit 0,5 µl Reverse Transkriptase (Superscript II, Invitrogen 200 U/µl) versetzt und für 1h bei 45 °C inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschritt von 10 min bei 95 °C. Um die PCR-Effizienz zu verbessern wurde der Ansatz mit 5 µl 0,5 mg/ml RNase A (DNase-frei, Qiagen) in 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 50% Glycerol versetzt.

2.5.3 Histochemische-Methoden**2.5.3.1 Paraffin-Schnitte**

Für die Paraffin Einbettung der Niere wurden das Organ nach dem entnehmen aus der Ratte (Sprague-Dawley Ratte) in 4 % Paraformaldehyd / PBS für 4 h inkubiert und anschließend über Nacht in PBS bei 4 °C ruhen gelassen. Am nächsten Tag erfolgte die Entwässerung mit einer aufsteigenden Ethanolreihe. Nach drei Inkubationsschritten für eine Stunde mit Xylol erfolgte die erste Inkubation für 3 Stunden bei 63 °C in Paraffin Nr. 3 (Thermo Scientific). Dieser Schritt wurde über Nacht wiederholt. Es folgten zwei Schritte für 3 Stunden mit Paraffin Nr. 6 und eine weitere Inkubation über Nacht bevor die Niere endgültig in Paraffin

Nr. 9 eingebettet wurde. Die Schnitte wurden auf einem Mikrotom HM 355 (Thermo Scientific, MA, USA) mit einer Schnittdicke von 7 µm angefertigt.

2.5.3.2 Hämatoxylin- und Eosin-Färbung

Die Schnitte wurden durch 2 x 5-minütiger Inkubation mit Xylol entparaffiniert und mit einer absteigende Ethanolreihe rehydriert. Die Kernfärbung erfolgte mit Hämatoxylin (Sigma-Aldrich) für 6 min und die Gegenfärbung mit 1 %iger Eosinlösung (Sigma-Aldrich) bei RT. Es folgten eine aufsteigende Ethanolreihe und ein letzter Inkubationsschritt mit Xylol, bevor die Präparate mit DPX (Fluka) eingedeckelt wurden.

2.5.3.3 Immunhistochemie

Die beiden Anti-SLC22A13r-Antikörper wurden von Eurogentec (Deutschland) nach dem „28-Day Polyclonals - New Super Speedy Protocol“ im Kaninchen generiert. Die Peptidsequenzen, gegen die die beiden Antikörper gerichtet wurden, sind unter 3.3.15.1 angegeben.

Die Färbung erfolgte mit Paraffin-fixierten Nierenquerschnitten (7 µm) (siehe 2.5.3.1) (Sprague-Dawley Ratte), die mit Xylol für 2 x 10 min entparaffiniert wurden. Anschließend erfolgte eine 2 x 10-minütige Inkubation mit Isopropanol sowie je 5 min mit 100 %, 96 %, 70 % und 50 % Ethanol sowie nur mit Wasser. Nach 5-minütiger Inkubation mit PBS wurden die Schnitte für 1 h mit 10 % Ziegen Serum in PBS + 0,1 % Triton blockiert. Daraufhin erfolgte über Nacht bei 4 °C die Inkubation mit dem SLC22A13r-Antikörper, welcher 1:500 in 10 % Ziegen Serum / PBS + 0,1 % Triton verdünnt wurde. Am nächsten Tag, nach 3 x 5-minütigen Waschschritten mit PBS + 0,1% Triton (PBST), erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Goat Anti Rabbit IgG Alexa 594, Invitrogen) welcher 1:750 in 10 % Ziegen Serum / PBST verdünnt wurde. Nach 2 x 5-minütigen Waschen in PBST und PBS wurden die Schnitte in Aqua Poly/Mount (Polysciences, Warrington USA) eingedeckelt.

Das Fluorochrom Alexa 594 wurde bei einer Wellenlänge von 590 nm angeregt.

PBS:

8 g/l	NaCl
0,2 g/l	KCl
1,44 g/l	Na ₂ HPO ₄
0,24 g/l	KH ₂ PO ₄
	pH 7,4

2.5.3.4. Western-Blot

Präparation der Nieren- und Leber-sowie HEK293-Zelllysate: Die Organe wurden aus der Ratte entnommen und sofort in eiskaltem Lysepuffer homogenisiert und für 30 min bei 4 °C ruhen gelassen. Anschließend bei 3000 x g bei 4 °C für 10 min zentrifugiert und den Überstand in eine neues Reagiergefaß gegeben.

Für die Gewinnung der HEK293-Zelllysate wurden die Zellen (90 % Konfluent in 175 cm² Kulturflaschen) 2 x mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend in PBS für 5 min bei 700 x g Zentrifugiert und sofort in eiskaltem Lysepuffer aufgenommen sowie homogenisiert.

Lysepuffer:

20-50	mmol/l	Tris-HCL pH 7,4
140	mmol/l	NaCl
1	mmol/l	EDTA
0,25-0,5 %		Na-deoxycholat
1 %		NP40
		Proteaseinhibitor (Konzentration nach Angaben des Herstellers)

Elektrophorese und Blotten: Die Organ- bzw. Zelllysate wurden mit einem gleichen Volumen 2 x SDS Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels eines Polyacrylamidgels (4 % Sammelgel und 10 % Trenngel) bei 100-130 V. Das Gel wurde mit 15 µg Protein (Lysat) beladen. Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid (PVD) –Membran (BIORAD) (aktiviert in Methanol 30 sec, 2 min gewaschen in Wasser) bei 350 mA für 60 min geblottet (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, BIORAD). Nach dem Transfer wurde die Membran für 30 sec in Methanol und für 2 min in Wasser inkubiert. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde mit 3,5 % Milchpulver in TBST geblockt. Daraufhin erfolgte über Nacht bei 4 °C die Inkubation mit dem primären Antikörper der 1:100 in 2 % Milchpulver / TBST verdünnt wurde. Am folgenden Tag nach 3 x 15 min waschen in TBST wurde die Membran für 1 Stunde mit dem sekundären Antikörper (Stabilized Goat Anti-Rabbit, HRP konjugiert, PIERCE), welcher 1:2000 mit 2 % Milchpulver / TBST verdünnt wurde, inkubiert. Nach erneutem 3 x waschen der Membran in TBST für 15 min erfolgte eine Inkubation mit dem ECL-Reagenz (nach Angaben des Herstellers, (SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate Antibodies) für 5 min. Die Entwicklung des Films erfolgte mit den Kokak-Reagenzien nach Angaben des Herstellers.

2x SDS Probenpuffer:

125	mmol/l	Tris-HCL pH 6,8
20	%	Glycerol
4	%	SDS
10	%	β-Mercaptoethanol
0,05	%	Bromophenolblau

4 % Sammelgel:

1,3 ml	30 %	Acrylamid/Bis
2,5 ml	0,5 mol/l	Tris-HCL pH 6,8
0,1 ml	10 % w/v	SDS
50 µl	10 %	APS
10 µl		TEMED
6,1 ml		Wasser

10 % Trenngel:

3,3 ml	30 %	Acrylamid/Bis
2,5 ml	1,5 mol/l	Tris-HCL pH 8,8
0,1 ml	10 % w/v	SDS
50 µl	10 %	APS
5 µl		TEMED
4,1 ml		Wasser

5x Elektrophoresepuffer:

15	g/l	Tris-Base
72	g/l	Glycin
5	g/l	SDS

Transferpuffer:

3	g/l	Tris-Base
14	g/l	Glycin
20	%	MeOH

TBST:

0,2	g/l	KCl
3	g/l	Tris-Base
8	g/l	NaCl
0,1	%	Tween 20
		pH 7,4

2.5.4 Biochemische Methoden**2.5.4.1 Synthese von Nikotin-D-Ribosid aus Nikotin-D-Ribonukleotid**

Für die Synthese des Nikotin-D-Ribosid wurde der Phosphatrest des Nikotin-D-Ribonukleotid mittels Alkalische Phosphatase (CIAP siehe Tab. 2.2) dephosphoryliert. Das so gewonnene Nikotinat-D-Ribosid wurde anschließend über eine Zentrifugationssäule (VWR Zentrifugal-Filter, PES, modifiziert, 3 K, 500 µl) aufgereinigt.

Ansatz:

400 µl	Nikotin-D-Ribonukleotid (5 mg/ml)
40 µl	1 M Tris-HCl pH 8,0
40 µl	5 M NaCl
10 µl	1 M MgCl ₂
625 µl	1 U/µl alkalische Phosphatase (CIAP)
885 µl	Wasser

2.5.4.2 Zellkultur

Die Arbeiten mit HEK-293-Zellen wurden in einer Reinraumwerkbank (Hera Safe, Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland) durchgeführt. Alle Gegenstände und Lösungen die eingesetzt wurden, waren Autoklaviert oder Sterilfiltriert (0,22 µm Porengröße) bzw. mit 70 % Isopropanol desinfiziert.

HEK-293-Zellen (human embryonic kidney, American Tissue Type Culture Collection 1988, ATCC CRL-1573) sind menschliche embryonale Nierenzellen, die mit dem humanen Adenovirus Typ 5 transformiert wurden. Kultiviert wurden die Zellen in Plastikulturflaschen (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland), bei 37° C in einer Wasserdampf gesättigten Atmosphäre (5% CO₂). Als Wachstumsmedium wurde Dulbeco's Modified Eagle Medium (DMEM, Life Technologies, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) eingesetzt, welches mit 10% hitzeinaktiviertem (60 min, 56° C) fötalem Kälberserum (FCS, PAA Laboratories, Pasching, Österreich) supplementiert wurde. Alle zwei bis drei Tage wurde das Medium erneuert. Wöchentlich wurde die Kultur geteilt. Dazu wurden die Zellen durch Klopfen gegen die Gefäßwand abgelöst und nach Resuspendieren in frisches Wachstumsmedium auf neue Kulturflaschen verteilt. Für die Selektion auf Antibiotikaresistenz wurde das Medium ständig mit dem Antibiotikum Puromycin (MP Biomedicals, Ohio, USA) in einer Endkonzentration von 3 µg/µl versetzt.

2.5.4.3 Transfektion von HEK-293-Zellen

Mit Hilfe der Lipofektion ist es möglich HEK-293-Zellen mit fremder DNA zu transfizieren [Sambrook and Russell, 2001]. Dabei wird die zu transfizierende DNA von Lipiden umschlossen so dass es zur Bildung von Liposomen kommt, die entweder direkt mit der Plasmamembran interagieren oder über Endozytose von der Zelle aufgenommen werden.

Als Transfektionsreagenz wurde Tfx-50 eingesetzt (TFxTM50-Reagent, Promega Corporation, Madison, USA). 10 µg Plasmid-DNA wurde mit serumfreiem Medium auf 4 ml aufgefüllt. Tfx-50 Lösung wurde nach Hersteller-Protokoll angesetzt und jeweils 40 µl Tfx-50 mit 3960 µl serumfreiem Medium versetzt. Anschließend wurde die DNA-Verdünnung zu den Liposomen gegeben und 15 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden mit serumfreiem Medium gewaschen, das DNA-Liposomen-Gemisch auf die Zellen gegeben und für 4 h, bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde der Überstand durch serumhaltiges Medium ersetzt. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit dem Antibiotikum Puromycin unter Selektionsdruck gesetzt. Ferner wurde dem Medium 1-2 Wochen Glucose in einer Konzentration von 3 µg/µl zugesetzt.

2.5.4.4 Aufnahmeversuch

Aussaat der Zellen: 48 h vor einem Aufnahmeexperiment wurden die transfizierten HEK-293-Zellen in Polystyrolschälchen (60 mm Durchmesser, Nuclon, Nunc, Wiesbaden, Deutschland) ausgesät. Dabei wurden die Schälchen für 20 min mit 1,5 ml steriler Poly-Ornithin-Lösung beschichtet. Die Lösung wurde entfernt und die Schälchen mit serumfreiem Medium gewaschen. Anschließend wurden 2 Millionen Zellen pro Schälchen in 4 ml Medium mit Antibiotikazusatz ausgesät. Die Zellzahl wurde durch eine Neubauer-Zählkammer bestimmt. Etwa 20 h vor dem Aufnahmeexperiment wurde die Expression des Transportes, durch Zugabe von Doxyzyklin (1 µg/ml), angeschaltet Dazu wurde das Medium der Zellen gewechselt und mit 1 µg/ml Doxyzyklin versetzt. Für die Aufnahmeversuche waren die Zellen 70-90% konfluent.

Poly-Ornithin-Lösung:

0,1 g/l	Poly-L-Ornithin
150 mmol/l	Borsäure
	pH 8,4 mit NaOH

Vorinkubation: Die folgenden Schritte der Aufnahmeversuche wurden nicht mehr unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Vor der Substrataufnahme wurde das Medium der Zellen entfernt und diese sofort mit 4 ml des physiologischen Puffers KRH (Krebs-Ringer-Henseleit) für 24 min bei 37 °C vorinkubiert. Hierbei werden Serum- und Mediumbestandteile entfernt und die Zellen equilibriert. Sollten z. B. die Auswirkungen verschiedener pH-Werte oder Ionenkonzentrationen der Aufnahmelösung auf den Transportvorgang untersucht werden, so schloss sich an die Vorinkubation noch ein Umpuffern oder Waschen der Zellen mit Pufferlösungen (den Aufnahmebedingungen entsprechend) an.

Substrataufnahme: Für die Substrataufnahme wurde die Vorinkubationslösung entfernt und durch 3 ml Aufnahmelösung, die auf 37 °C temperiert wurde, ersetzt. Die Aufnahmelösung besteht aus dem KRH-Puffer, welcher mit dem Substrat versetzt wurde. Wenige Sekunden vor Beendigung der Aufnahmezeit wurde die Aufnahmelösung entfernt, so dass genau zur Beendigung der Aufnahmezeit, die Aufnahme durch Waschen der Zellen mit 4 x 4 ml eiskaltem KRH gestoppt wurde. Durch den Kontakt der Zellen mit eiskaltem KRH, kann davon ausgegangen werden, dass Transporter aus Mammalia keine Aktivität mehr zeigen.

Zellaufschluss: Nachdem die Aufnahme gestoppt wurde, erfolgt die Lyse der Zellen. Je nach Quantifizierungsmethode wurden die Zellen unterschiedlich behandelt, um das Lysat freizusetzen, in dem die Substratkonzentration anschließend bestimmt wurde. Bei Aufnahmeversuchen mit radioaktiv markierten Substraten wurde 1 ml einer

detergenzhaltigen Lyselösung (0.1 % (v/v) Triton X-100 in 5 mmol/l Tris, pH 7.4) auf die Schälchen gegeben und 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, bevor das Zelllysate mit einer Pipette homogenisiert und in Reagiergefäße (1.5 ml) überführt wurde. Für die LC-MS/MS Analytik wurden die Zellen mit Methanol, ebenfalls für 20 min, bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in Reagiergefäße überführt. Wenn die so gewonnenen Lysate nicht sofort analytisch weiterbearbeitet werden konnten, wurden sie bei -20° C gelagert.

KRH:

5,6	mmol/l	(+)-Glucose
125	mmol/l	NaCl
4,8	mmol/l	KCl
1,2	mmol/l	KH ₂ PO ₄
1,2	mmol/l	CaCl
1,2	mmol/l	MgSO ₄
25	mmol/l	HEPES
		pH 7,4 mit NaOH

Bestimmung der Radioaktivität: Zur Quantifizierung der Aufnahmeraten radioaktiv markierter Substrate wurde die Flüssigszintillationszählung eingesetzt, hierbei wird der Beta-Zerfall in den Proben detektiert. Notwendig für die Detektion ist die so genannte Szintillationsflüssigkeit. Sie enthält ein organisches Lösungsmittel und eine leicht zur Fluoreszenz anzuregende Verbindung, den so genannten Szintillator. Das organische Lösungsmittel wird durch die Energie des radioaktiven Zerfalls angeregt, überschüssige Energie wird von den Lösungsmittelmolekülen auf die Szintillatoren transferiert. Diese werden ebenfalls angeregt und gehen unter Emission von Licht schnell wieder in den Grundzustand über. Die Lichtblitze werden von einem Photomultiplier in ein elektrisches Signal umgewandelt und detektiert. Die Lösungsmittelmoleküle emittieren bei ihrem Übergang in den Grundzustand selber kein Licht. Als Szintillationsflüssigkeit wurde Ready Flow III der Fa. Beckman, USA eingesetzt. Der Flüssigszintillationszähler war ein 1214 Rackbeta von LKB Wallac. - 43 - .

Von den Zelllysaten wurden jeweils 700 µl mit 2.1 ml Szintillationsflüssigkeit in einem Szintillationsröhrchen gemischt. Von allen Zählraten wurde die so genannte Nullrate abgezogen. Hierfür wurden 100 µl Vorinkubationslösung (KRH, pH 7.4) und 700 µl Lyselösung (0.1 % (v/v) Triton X-100 in 5 mmol/l Tris, pH 7.4) mit 2.1 ml Szintillationsflüssigkeit gemischt und gemessen. Als Eichpunkt für die Konzentrationsbestimmung wurden von den Aufnahmelösungen jeweils 100 µl mit 700 µl Lyselösung und 2.1 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt, bei einer Substratkonzentration von 0.1 µmol/l entspricht diese Zählrate dann einer Stoffmenge von 0.01 nmol. Da das Detergenz Triton X-100 zu einem so genannten Quenching der erzeugten Lichtemission führt, ist darauf

zu achten, dass in allen Proben jeweils das gleiche Volumen Lyselösung enthalten ist. Quenching kommt im Szintillationsansatz zustande, wenn Substanzen enthalten sind, vor allem aromatische Ringsysteme, die die Beta-Strahlung oder die Energie der Lösungsmittelmoleküle selber absorbieren. Jedes Röhrchen wurde dreimal für 10 min im Flüssigszintillationszähler gezählt. Bei der Auswertung wurde aus den Zählraten der Mittelwert gebildet.

2.5.4.5 Proteinbestimmung

Um den Proteingehalt der Aufnahmeproben zu quantifizieren wurde die sogenannte BCA-Methode angewendet. Die Zellen wurden dafür nach 4 x Waschen mit 4 ml KRH, in Triton X-100 5 mM Tris-HCl pH 7,4 lysiert und der Proteingehalt dieser Proben mit dem BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) nach Angaben des Hersteller bestimmt. Für Zelllysate, die mit MeOH aufgeschlossen wurden, kann dieses Kit nicht verwendet werden. Aufgrund dessen wurde, für die Aufnahmeversuche, die per LC-MS/MS quantifiziert werden sollten, jeweils zusätzlich Zellen ausgesät, die mit dem Detergenz lysiert wurden.

2.5.4.6 LC-MS (Liquid Chromatography- Mass Spectrometry)

Die Kopplung einer HPLC Anlage mit einem Massenspektrometer als Detektor ermöglicht eine hochauflösende Trennung von Substanzen, die nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) detektiert und z.B. durch Fragmentierung weiter analysiert werden können. Die Quantifizierung der nicht radioaktiv markierten Verbindungen in den Aufnahmeversuchen sowie Trigonellin im Kultivierungsmedium der Zellen erfolgte mittels LC-MS/MS.

Instrumente: Für die massenspektrometrische Detektion wurde das Triplequadrupol-Tandem-Massenspektrometer Q Trap 4000 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die chemische Auftrennung der Verbindungen erfolgte mit einer HPLC-Anlage (High Performance Liquid Chromatography) der Firma Shimadzu (SLC-20AD Prominace, Shimadzu, Kyoto, Japan).

Chromatographie: Um den polaren Verbindungen ausreichend Retention an der stationären Phase zu vermitteln, wurde eine HILIC (Hydrophilic Interaction Chromatography) Silika-Säule (Atlantis HILIC Silica 5 μm , 3 x 50 mm, Waters, Milford, USA) bzw. zic-pHILIC (5 μm , 2.1 x 100 mm, SeQunat) und eine Reversephasesäule (Atlantis dC18, 5 μm , 3 x 100 mm bzw. Atlantis XBridge Shield RP18 3,5 μm , 3 x 100 mm, Waters, Milford, USA) mit zugehöriger Vorsäule verwendet. Jeder chromatographischer Lauf betrug 10 min, bei einer Flussrate zwischen 200 und 400 μl . Die Temperatur der Säule im Säulenofen (CTO-20AC

Prominanz) betrug 35 – 40 °C und das Injektionsvolumen des Autosamplers (SIL-20A10 Prominanz) je 10 – 20 µl. Die Proben wurden auf 6 °C gekühlt. In Tab. 2.7 sind die hier verwendeten Gradienten für die Chromatographie angegeben. Einige Analyten wurden isokratisch gemessen, dieses ist in Tab. 2.8 vermerkt. Die verwendeten Laufmittel sind in Tab. 2.8 angegeben.

Tab. 2.7: LC-Gradient

Zeit [min]	HILIC	zic-pHILIC	dC18	XBridge
	organische Phase [%]		organische Phase [%]	
0,25	80-90		10-15	
5	10-15		80-90	
8	80-90		10-15	
10	80-90		10-15	

MRM-Scan (Q1 und Q3 Scan): Die Detektion der Massen erfolgte im MRM-Modus (Multiple Reaction Monitoring). Da nur Verbindungen in der Gasphase gemessen werden können, müssen polare oder geladene Moleküle in positiv oder negativ geladene Gasphasenionen überführt werden. Die Ionisierung erfolgte mittels Elektrospray-Ionisierung (ESI) (Sprayvoltag; positiv 5500 V, negativ -4500 V). Dieser Prozess wurde unterstützt durch zusätzliches Stickstoffgas und zwei beheizbare Turboheater (400 °C). Anschließend konnten die protonierten oder deprotonierten Moleküle im Hochvakuum des Quadrupols analysiert werden. Die geladenen Analyten wurden durch ein elektrisches Potential CE (collision energy) beschleunigt und in der Kollisionzelle Q2 fragmentiert. Vor einer Messung wurden die Verbindungen in einer Konzentration von 100 – 300 ng/ml direkt in das Massenspektrometer infundiert (10 µl/min) und die Fragmente sowie die entsprechende Kollisionsenergien ermittelt.

Full Scan Experimente (Q1-Scan): Mittels Full Scan Experimenten werden Massenspektren generiert, die einen bestimmten Massenbereich (m/z) abdeckten. Innerhalb dieser Arbeit wurden Massenspektren im Bereich von m/z 70-400 aufgezeichnet, da dies den Größenbereich der erwarteten Substrate abdeckt. Die Scanzeit betrug zwei Sekunden.

Die Analyse der Full Scan Massenspektren erfolgte mittels LC-MS Differenz Abtönung (siehe 2.5.4.7)

Tab. 2.8: Detektionsbedingungen der Analyten. 1 = 0,1 % Ameisensäure / Methanol, 2 = 0,1 % Ameisensäure / 0,05 % Ameisensäure Acetonitril, 3 = isokratisch 30 % Ameisensäure (0,1 %) / Methanol, 4 = 10 mM Ammoniumacetat pH 4,3 / 0,1 % Ameisensäure Methanol, 5 = 10 mM Ameisensäure / 0,05 % Ameisensäure Acetonitril, 6 = 0,1 % Ameisensäure / 0,1 % Ameisensäure MeOH, 7 = isokratisch 40 % Ameisensäure (0,1 %) / Methanol, 8 = 0,05 % Ameisensäure / 0,05 % Ameisensäuren Methanol, 9 = 10 mM Ammoniumacetat pH 8,9 / Methanol, 10 = 10 mM Ammoniumacetat pH 8,9 / Acetonitril. (★) = die Ionisierung erfolgte negativ, alle anderen Analyten wurden positiv ionisiert. (CE) = Kollisionsenergie, V = Volt, m/z = Masse durch Ladung.

Analyt	Q1 [m/z]	Q3 [m/z]	CE [V]	Säule	Laufmittel
1-Methylnicotinamid	138	95	29	HILIC	1
2-Aminobenzoat	138	120	10	dC18	2
2-Deoxyguanosin	268	152	15	HILIC	4
3-Aminobenzoat	138	121	30	dC18	2
4-Aminobenzoat	138	94	15	dC18	2
Arginin	175	70	30	HILIC	3
Argininosuccinat	291	70	38	HILIC	3
Aspartat	134	116	10	HILIC	3
Betain	118	58	43	HILIC	4
Carnitin	162	85	27	HILIC	4
cGMP	346	152	29	dC18	5
Citrullin	176	159	9	HILIC	2
Ectoin	143	97	25	HILIC	4
Gabapentin	172	154	15	HILIC	4
Glutarat ★	130	87	-40	XBridge	9
Glycocholat	466	412	25	HILIC	4
Glycylglycin	133	76	39	HILIC	1
Glycylprolin	173	116	19	HILIC	3
Guanidiniumacetat	118	72	21	HILIC	6
Guanidiniumglutarat	190	84	33	HILIC	4
Guanidiniumpropionat	132	72	23	HILIC	4
Guanidiniumsuccinat	176	134	19	HILIC	4
Leucylglycin	189	86	19	HILIC	7
Nicotinamid	123	78	33	dC18	5
Nikotinat-D-Ribonukleotid	336	124	21	HILIC	4
Nikotinat-D-Ribosid	256	124	17	HILIC	4
Nikotinat	124	68	27	dC18	8
Ornithin	133	116	10	HILIC	3
Orotat ★	155	110	-16	XBridge	10
Pantothanat	220	90	21	HILIC	6
para-Aminohippurat	195	120	15	HILIC	4
Prolylglycin	173	70	35	HILIC	3
Stachydrin	144	58	39	HILIC	4

Trigonellin	138	79	41	HILIC	4
Urat ★	167	124	-22	zic-pHILIC	9

Kalibrierung und Vorbereitung der Proben: Bei jeder Messung wurde eine Eichgerade mit sechs Konzentrationen des Analyten erstellt (0 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml und 400 ng/ml). Um die Matrix der Proben möglichst genau abzubilden und um Unterschiede bei der Ionisierung zwischen Eichreihe und Proben zu minimieren, wurden die Eichproben ebenfalls im Zelllysats angesetzt. Dieses Zelllysats wurde erzeugt, indem nicht transfizierte HEK-293-Zellen bis zu einer Konfluenz von 90 % kultiviert (175 cm² Kulturflasche) und anschließend mit Methanol für 20 min bei Raumtemperatur lysiert wurden.

Die Proben aus den Aufnahmeversuchen wurden vor der Messung gemischt und zentrifugiert (1 min, 16000 x g). Anschließend wurden 100 µl des Lysats in die Mikroansätze der Glasvials überführt.

Auswertung: Die Auswertung der LC-MS/MS-Daten erfolgte mit der Analyst 1.4.2-Software. Die Peaks wurden nach der Vorgabe eines Standardpeaks in allen Proben automatisch gesucht und integriert. Anschließend wurde der Quotient aus Analyten-Peak-Fläche und Interner-Standard-Peak-Fläche berechnet (Response Ratio).

Um die spezifische Aufnahme zu berechnen wurde vom gemessenen Gesamtgehalt die unspezifische Aufnahme, die über Endozytose, extrazelluläre Bindung und Diffusion entstand, abgezogen. Auch der endogene Substratgehalt, also die Substanzmenge die vor dem Aufnahmeversuch bereits in den Zellen war, wurde subtrahiert.

Die spezifische Aufnahme hängt proportional von den in der Membran vorhandenen Transportproteinen ab. Da die Anzahl der Transporter nicht oder nur schwer messbar ist, wurde die Zellzahl der einzelnen Schälchen über die Proteinkonzentration korrigiert (siehe 2.5.4.5).

2.5.4.7 LC-MS-Differenz-Abtönung (engl.: difference shading)

Für die Substratsuche mit Hilfe der LC-MS wurden die Massenspektren von induzierten (Transporterzellen) und nicht-induzierten HEK293-Zellen (Kontrollzellen) verglichen. Ein Vergleich der komplexen Massenspektren ist jedoch optisch nicht durchführbar. Hinzu kommt, dass z.B. bei einem chromatographischen Lauf von 10 min mit einer Scanzeit von 2 sec jeweils 300 Massenspektren entstehen, die mit ihren jeweiligen Kontrollzellen verglichen werden müssen. Daher wurde als Hilfsmittel eine Software „MS-FullView“ verwendet (entwickelt von D. Gründemann, Institut für Pharmakologie, Universität zu Köln), die Intensitätsunterschiede in den Massensignalen der Spektren von Transporterzellen und

Kontrollzellen optisch sichtbar macht. Dieser Vorgang wird als Differenz Abtönung bzw. Difference Shading bezeichnet [Gründemann et al., 2005].

Die Software benutzt dabei die Rohdatensätze der Massenspektren eines chromatographischen Laufs, welche die Dimensionen Intensität, m/z (Masse durch Ladung) und die Retentionszeit aufweist. In einem ersten Schritt werden die Daten in eine zweidimensionale Ebene projiziert. Dabei wird die Retentionszeit auf der Y-Achse und m/z auf der X-Achse dargestellt. Die Intensität wird sigmoidal in 256 Graustufen abgebildet, so dass Signale von niedriger Intensität schwarze Banden ergeben und Signale von hoher Intensität weiße Banden generieren (Abb. 2.2 Schritt 1). Im nächsten Schritt werden zwei so konvertierte Datensätze zur Deckung gebracht. Hierbei setzen sich die Signale der Transporterspektren aus einem roten RGB-Farbkanal, die Signalen der Kontrollzellen aus grünen und blauen RGB-Farbkanal zusammen. So dass ein gemeinsames Bild generiert wird, indem Signale mit einer höheren Intensität in den Transporterspektren rote Banden erzeugen. Signale, die in den Kontrollspektren intensiver sind, erzeugen türkise Banden. Sind die Signale auf den Massenspuren in beiden Spektren gleich hoch, so sind sie weiß bzw. haben mit abnehmender Intensität dunklere Graustufungen. Schwarz bedeutet, dass kein Signal zu detektieren war (Abb. 2.2 Schritt 2).

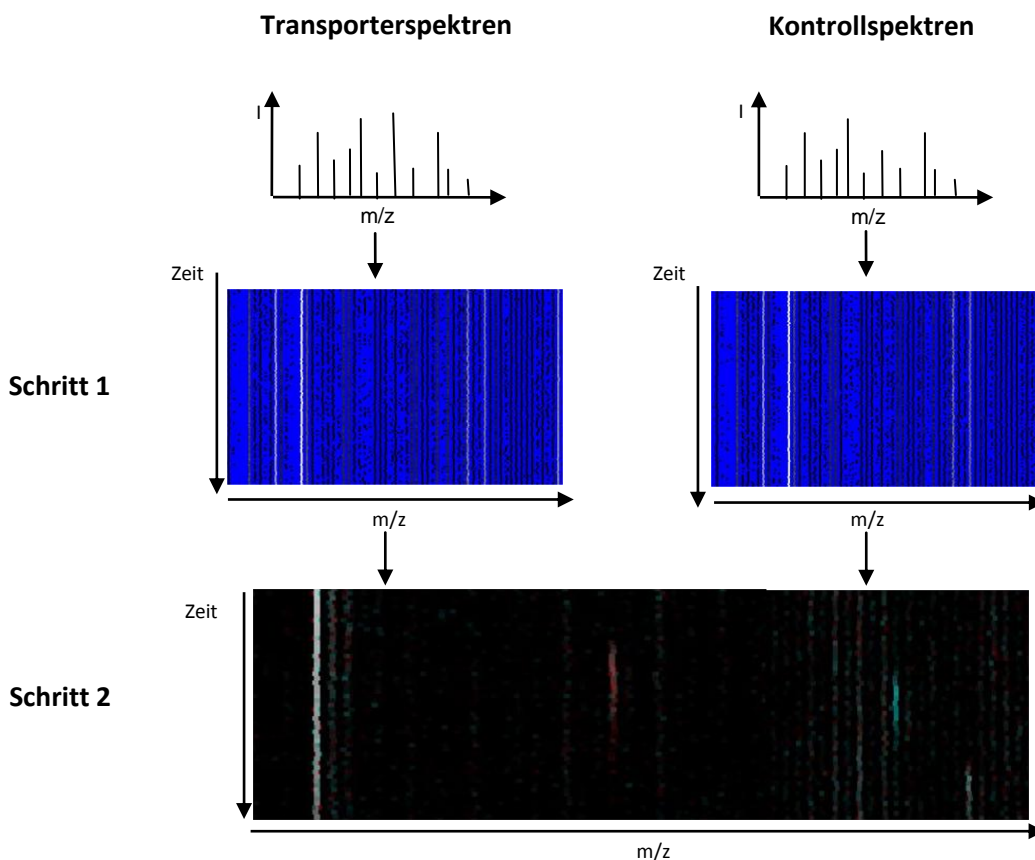


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Differenz Abtönung

2.5.4.8 GFP-Analyse der HEK293-Zellen

Die Bilder der HEK-293-Zellen wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop (Leica DMLB, Wetzlar, Deutschland) und unter Verwendung von Immersionsöl durchgeführt. Dafür wurden 100.000 Zellen ausgesät (siehe 2.5.4.4) und die Expression des Transporters am folgenden Tag angeschaltet, 24 Stunden später wurden die Zellen mit 1 ml KRH gewaschen und für 3 min mit Trypanblau inkubiert. Nach erneutem waschen wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Trypanblau wurde bei einer Wellenlänge von 543 nm angeregt und GFP bei einer Wellenlänge von 475 nm. Die Belichtungszeit der GFP- und Trypanblauaufnahmen betrug eine 1/2 Sekunde. Die Belichtung der Lichtmikroskopischen Aufnahmen betrug 1/125 Sekunden.

2.5.4.9 Durchfluss-Zytometrie

Die FACS-Analysen (Fluorescence activated cell sorting) wurden mit dem Gerät FACSCalibur™ (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der zugehörigen Software CellQuest Pro.

Bei der FACS-Analyse werden simultan verschiedene physikalische Eigenschaften von Zellen gemessen, während diese einzeln einen Laserstrahl passieren. Die Vereinzelung der Zellen erfolgt in einer Vibrationskammer, welche aus einer Zellsuspension feine Tröpfchen generiert, die höchstens eine Zelle enthalten. Sobald die Zellen den Laserstrahl passieren streuen sie einen Teil des Lichts. Diese Streuung wird durch verschiedene Photomultiplier detektiert. Die Menge des vorwärts gestreuten Lichts (forward-scattered light, FSC) hängt vor allem von der Größe der Zelle ab, wohingegen das seitwärts gestreute Licht (side-scattered light, SSC) proportional zur Zellgranularität ist. Um die Streulicht-Messergebnisse anschaulich darzustellen, werden die Zellen in einem so genannten Dot-Plot dargestellt. Dabei wird auf der x-Achse das vorwärts gestreute Licht und auf der y-Achse das seitwärts gestreute Licht aufgetragen. Jeder Punkt in einem Dot-Plot stellt ein erfasstes Ereignis dar (Zellen, Partikel, etc.) In dieser Darstellung lassen sich Gruppen von Zellen, Zelltrümmer, sowie lebende und tote Zellen in einer Zellpopulation unterscheiden. Durch das Einfügen eines so genannten „Gates“ können die gemessenen Parameter für eine bestimmte Gruppe von Zellen betrachtet werden. Parallel mit der Streuung des Lichts wird die Anzahl fluoreszierender Zellen gemessen. Diese können in einem weiteren Dot-Plot oder Histogramm graphisch dargestellt werden.

Für die FACS-Analyse wurden ca. 2 Mio. Zellen in 5 ml Wachstumsmedium in 12,5 cm² Zellkulturflaschen (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) ausgesät und 20

Stunden vor der Messung durch Zugabe von 1 g/ml Doxycyclin eingeschaltet. Für die Analyse wurden die Zellen abgeklopft und in 15 ml Falcons (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) überführt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 700 rpm wurde das Medium abgesaugt und die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen. 10 Minuten vor der Messung wurde der Farbstoff 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD, 1:20, BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) zu den Zellen gegeben. Bei jeder Messung wurden 20000 Ereignisse gezählt.

FACS-Puffer: PBS / 2 mM EDTA / 0,5 % BSA

3 Ergebnisse

3.1 Kontrollversuche

Für Transportanalysen wurden die Transporter SLC22A13 und OAT2 in HEK293-Zellen heterolog zur Expression gebracht. Hierfür wurde das pEBTetD-Expressionssystem verwendet, das eine durch Doxycyclin induzierte Proteinexpression ermöglicht [Bach et al., 2007 (siehe 2.4.6)]. Ein induzierbares Expressionssystem bietet zum einen den Vorteil, dass die Zellen nicht durch die konstitutive Expression des Transporters beeinträchtigt werden und zum anderen, dass die Zellen im induzierten und im nicht-induzierten Zustand genetisch identisch sind. Wenn eine gute Steuerbarkeit für eine Zelllinie gegeben ist, stellen Zellen ohne induzierte Transporterexpression eine optimale Kontrolle für den Substrattransport dar, da der Hintergrund für beide Zustände homogen ist. Ein weiterer Vorteil für Transportmessungen, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurden, ist dass das zu untersuchende Protein nicht oder nur gering endogen in der verwendeten Zelllinie exprimiert werden sollte. Nach vorliegenden real time-PCR-Daten werden SLC22A13 und OAT2 in HEK293-Zellen nicht exprimiert (Daten nicht gezeigt, S. Golz, Bayer Healthcare, Wuppertal).

3.1.1 Steuerbarkeit der Zelllinien

Die Steuerbarkeit der generierten Zelllinien wurde auf Proteinebene überprüft. Hierfür wurden die humanen Transporter SLC22A13 und OAT2 mit eGFP fusioniert (siehe 2.3) und heterolog in HEK293-Zellen zur Expression gebracht. Dafür wurden die Zellen 20 h mit Doxycyclin (1 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurde die eGFP-Fluoreszenz durch eine FACS-Analyse (fluorescence activated cell sorting) gemessen. Parallel wurde die Fluoreszenz von nicht-induzierten Zellen untersucht. Durch den Farbstoff 7-AAD (7-Aminoactinomycin), der tote Zellen anfärbt, wurden nur lebende Zellen in der Analyse berücksichtigt (Abb. 3.1).

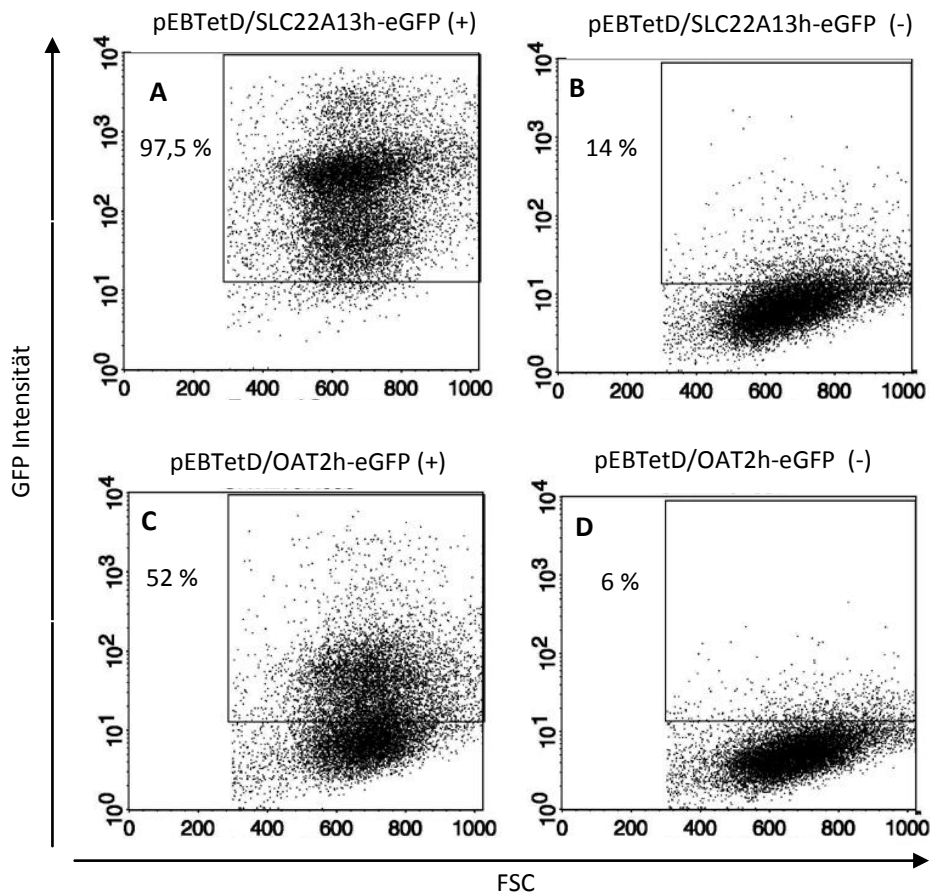


Abb 3.1 FACS-Analyse der SLC22A13h- und OAT2h-Zellen. Aufgetragen ist die eGFP Fluoreszenz der Transporterfusionskonstrukte gegen die Zellgröße (FSC). Tote Zellen wurden mittels 7-AAD aus der Analyse ausgeschlossen. Es wurden 20000 Zellen gemessen (33% dargestellt). Die GFP-Fluoreszenz wurde ab einer Intensität von 10^1 definiert. (A) Induzierte SLC22A13h-eGFP-Zellen. (B) Nicht-induzierte SLC22A13h-eGFP-Zellen. (C) Induzierte OAT2h-eGFP-Zellen. (D) Nicht-induzierte OAT2h-eGFP-Zellen.

Aus den Daten der FACS-Analyse ging hervor, dass 97,5 % der induzierten Zellen und 14 % der nicht-induzierten Zellen mit dem pEBTetD/SLC22A13h-eGFP Konstrukt eine Fluoreszenz im definierten Bereich (einer Intensität von 10^1) aufwiesen (Abb. 3.1 A, B). Bei Zellen mit pEBTetD/OAT2h-eGFP zeigten 52% der induzierten und 6% der nicht-induzierten eine Fluoreszenz (Abb. 3.1 C, D). Das stellt für die SLC22A13h- und OAT2h-Zelllinie eine gute Steuerbarkeit dar. Für die OAT2h-Zelllinie ist das Ausmaß der Expression nicht gut, jedoch ausreichend für die hier durchgeführten Transportanalysen.

3.1.2 Zelluläre Lokalisation von OAT2h und SLC22A13h

Eine weitere Bedingung für die hier angewandten Transportanalysen ist, dass die Transporter OAT2h und SLC22A13h nach Expression in der Zellmembran lokalisiert sind.

Eine intrazelluläre Lokalisation des Transporters würde zu keiner Substrataufnahme in die Zelle führen. Um sicher zu gehen, dass die Zellmembran der Zielort dieser Transporter ist, wurden die eGFP-Fusionsprotein-exprimierenden HEK293-Zellen durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Für einen besseren Vergleich wurde eine Färbung der Zellmembran mit dem Farbstoff Trypanblau vorgenommen. Trypanblau färbt in lebenden Zellen die Zellmembran an. Als Kontrolle wurde nur eGFP über das Konstrukt pEBTetD/eGFP in HEK293-Zellen zur Expression gebracht.

In den Kontrollzellen konnte eine Fluoreszenz im gesamten Cytoplasma beobachtet werden (Abb. 3.2 G). Zellen, die ein Transporter-Fusionskonstrukt exprimierten, zeigten eine eGFP-Fluoreszenz in der Zellmembran, die mit der Trypanblau-Färbung übereinstimmte (Abb 3.2). Demnach erreichen die Transporter OAT2h und SLC22A13h bei Expression in HEK293-Zellen die Zellmembran.

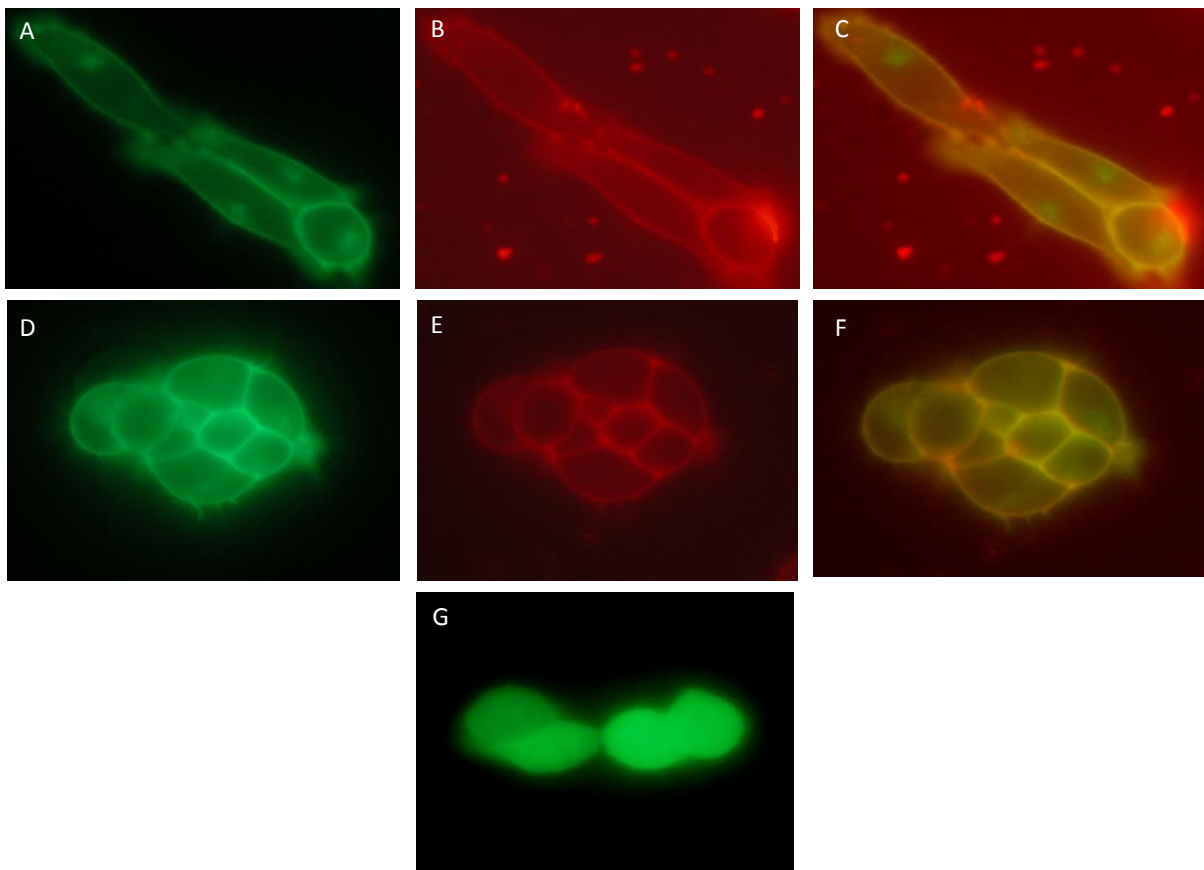


Abb. 3.2: Die Transporterfusionskonstrukte wurden in HEK293-Zellen über Doxycyclin zur Expression gebracht. (A) eGFP-Fluoreszenz des SLC22A13h-eGFP Fusionsproteins. (B) Trypanblau-Färbung der induzierten SLC22A13h-eGFP HEK293-Zellen. (C) Überlagerung (D) eGFP-Fluoreszenz des OAT2h-eGFP Fusionsproteins. (E) Trypanblau-Färbung der induzierten OAT2h-eGFP HEK293-Zellen. (F) Überlagerung. (G) eGFP-Fluoreszenz von HEK293-Zellen die nur GFP exprimieren.

3.2 OAT2

Für OAT2h werden in der Literatur cGMP und 2-Deoxyguanosin als Substrate mit einer guten Transporteffizienz beschrieben [Cropp et al., 2008], was im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte (siehe 3.3.13). Die physiologische Bedeutung von OAT2 ist nach wie vor unklar. Aufgrund dessen wurde für dieses Protein nach Substraten gesucht.

3.2.1 Substratsuche für OAT2h mittels LC-MS Difference Shading

Für das Aufspüren von Substraten wurde in dieser Arbeit die Methode der LC-MS-Differenz-Abtönung verwendet (siehe 2.5.4.7). Hierbei wurde der humane Transporter OAT2h (kloniert von B. Steinrücken) funktionell in HEK293-Zellen zur Expression gebracht. Bei dieser Methode ist es von Bedeutung, dass sowohl die über Doxycyclin induzierten Zellen als auch die nicht-induzierten Kontrollzellen einen identischen genetischen Hintergrund aufweisen. Denn Zellen mit einem anderen Hintergrund könnten einen anderen Stoffwechsel besitzen, was sich auf die jeweiligen Metabolite auswirken könnte und damit zu falsch positiven Signalen bei der Differenz-Abtönungs-Analyse führen würde. Um ein Substrat zu identifizieren, wurden induzierte (Transporter exprimierende Zellen) und nicht-induzierte Kontrollzellen mit Methanol lysiert. Anschließend wurde von den Zelllysaten ein Massenspektrum aufgenommen und über die Differenz-Abtönung ausgewertet.

Die LC-MS Detektion erfolgte mit unterschiedlichen Bedingungen. Die Proben wurden zum einen positiv- sowie zum anderen negativ-ionisiert und entweder über eine HILIC- (Hydrophilic Interaction Chromatography) Säule, die eine Retention für polare und hydrophile Verbindungen aufweist, oder über eine Reversephase-Säule, die für unpolare, hydrophobe Verbindungen Affinität besitzt, gemessen.

Für die positive Ionisierung wurden reproduzierbare Signale über die Reversephasesäule bei m/z 138 mit einer Retentionszeit (RT) von 2,5 min (Abb. 3.3 A), m/z 255 mit einer RT von 2,5 min (Abb. 3.3 B) und m/z 286 mit einer RT von 5,5 min, erhalten (Abb. 3.3 C). Das Signal m/z 286 konnte zusätzlich über eine negative Ionisierung (hier m/z 284) detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Bei der Analyse der jeweiligen Massenspuren bei m/z 138, 255 und 286 von induzierten Transporterzellen konnte ein Peak ermittelt werden der in den Kontrollzellen nicht oder mit einer geringeren Intensität vorhanden war (Abb. 3.3 A, B, C).

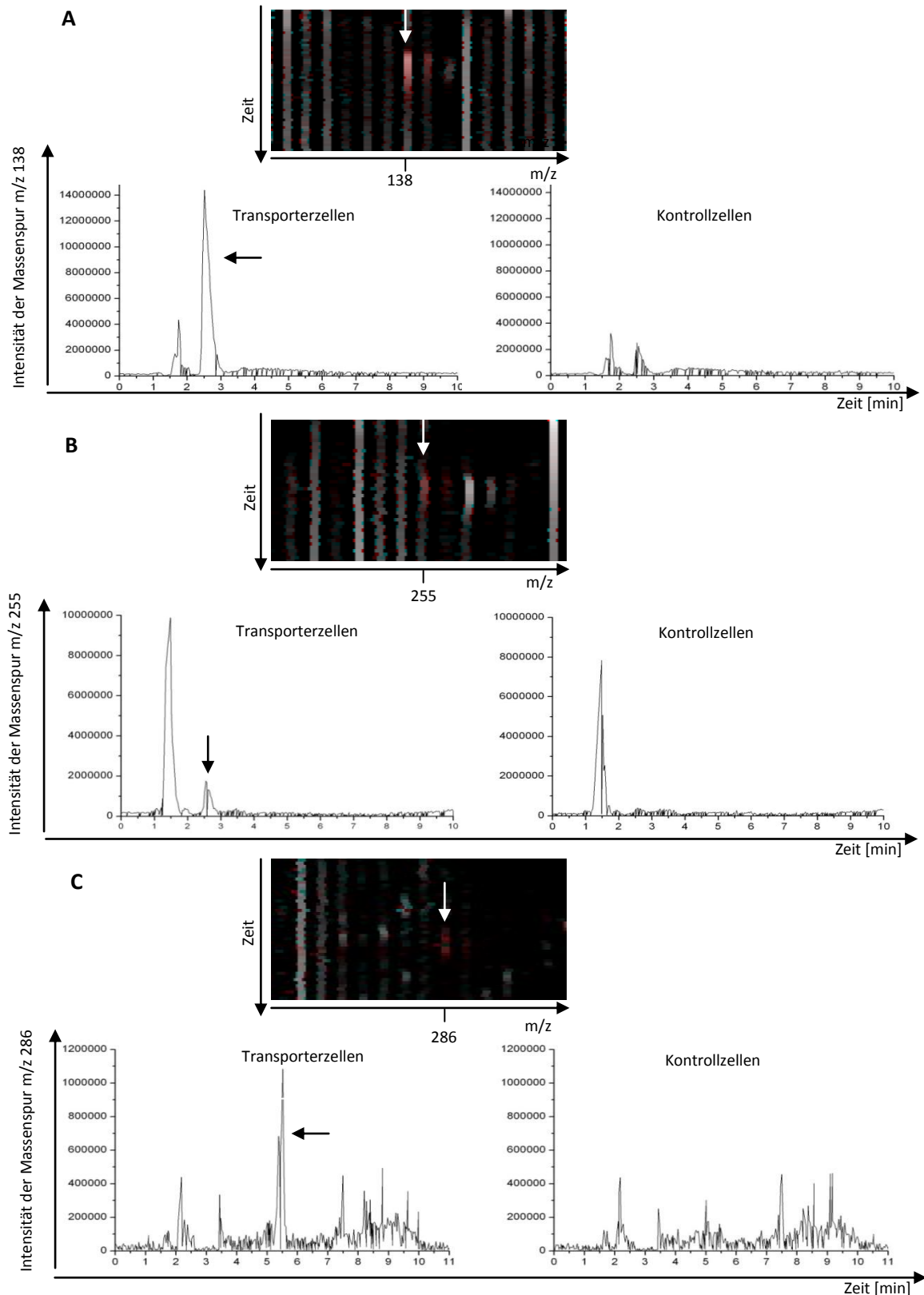


Abb. 3.3: A, B, C oberes Bild: Bildausschnitt der Differenz-Abtönungs Auswertung von OAT2h induzierten (Transporterzellen) und nicht-induzierten HEK293-Zellen (Kontrollzellen). Die weißen Pfeile kennzeichnen die Signale bei m/z 138, 255 und 286. A, B, C linkes unteres Bild: Intensität der Massenspuren m/z 138, 255 und 286 gegen die Retentionszeit der induzierten Transporterzellen. A, B, C rechtes unteres Bild: Intensität der Massenspuren m/z 138, 255 und 286 gegen die Retentionszeit der nicht-induzierten Zellen (Kontrollzellen). Der schwarze Pfeil kennzeichnet den Peak in den Transporterzellen der in den Kontrollzellen nicht vorhanden ist.

3.2.2 Identifizierung der Signale bei m/z 138, 255 und 286

Um die Signale bei m/z 138, 255 und 286 zu identifizieren, wurden mit der LC-MS Produktionspektren von diesen Massen generiert. Beim Produktionspektrum wird die Muttermasse oder das Molekölion $[M-H^+]$ durch den Zusammenstoß mit Argon und das Zuführen von Energie über Spannung fragmentiert. Dabei entstehen für das Molekül zum Beispiel durch Abgehen von funktionellen Gruppen charakteristische Fragmente, durch die eine unbekannte Substanz identifiziert werden kann.

Für m/z 138 konnten Fragmente m/z 120, 110, 94, 92, 78, 67 und 65 bei einer RT von 2,5 min gewonnen werden (Abb. 3.4).

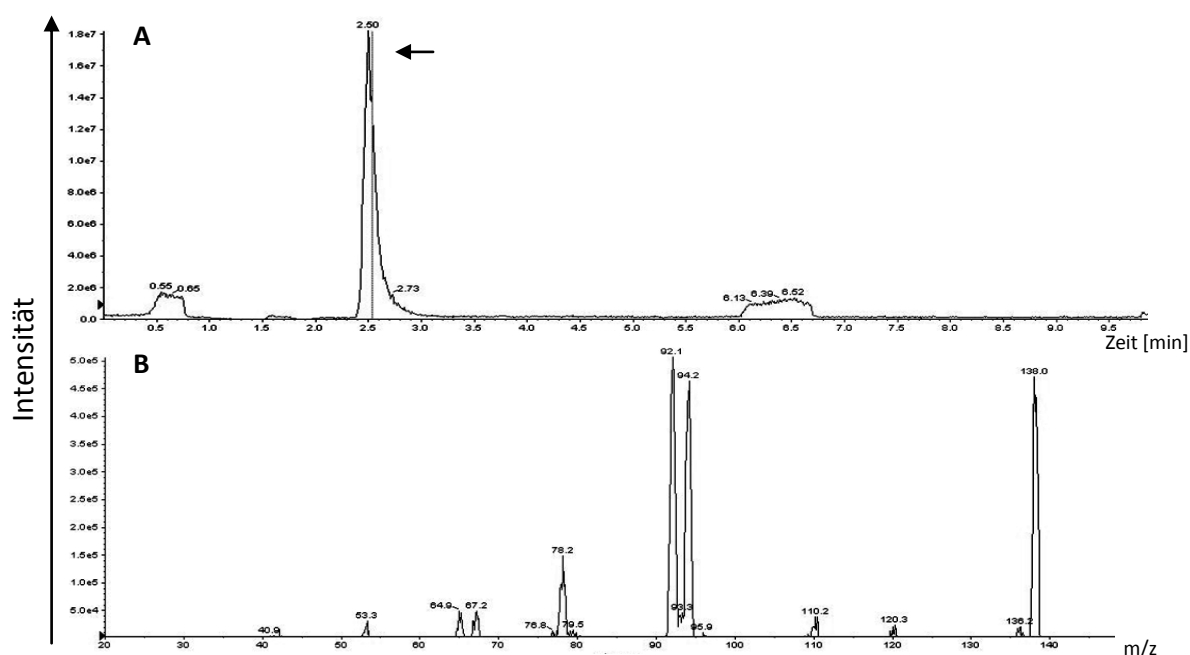


Abb. 3.4: (A) Produktionsstrom von m/z 138 aus den Zelllysaten. Der Pfeil kennzeichnet den Peak bei 2,5 min. (B) Produktionspektrum m/z 138 aus den Zelllysaten zum Zeitpunkt 2,5 min. Kollisionsenergie 15 V.

Die ungeladene Substanz hat demnach ein Molekulargewicht von 137 g/mol. Biomoleküle bestehen im wesentlichen aus den sechs Elementen Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff, Stickstoff, Phosphor und Schwefel. Die positive Ionisierung durch Elektrospray spricht bei den meisten physiologischen Substanzen für eine protonierbare Stickstofffunktion. Diese Informationen wurden zur Strukturaufklärung des Signals herangezogen. So wurden zunächst nur Summenformeln und Strukturen der oben genannten Elemente untersucht, wobei ein Schwefel, aufgrund des Fehlens des charakteristischen Isotopenpeaks, ausgeschlossen wurde. Eine Substanz, die alle Strukturmerkmale erfüllte, war das Trigonellin (Trig) (Abb. 3.5).

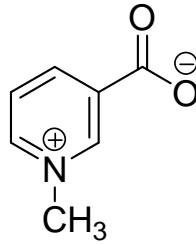


Abb.3.5: Chemische Struktur von Trigonellin (Trig).

Mit einem Trig-Standard wurde ein Produktionenspektrum als Referenz erzeugt (Abb. 3.6). Die entstandenen Fragmente stimmten mit dem Signal m/z 138 aus den Proben in Masse und relativer Intensität überein. Des Weiteren besaß Trig dieselbe Retention von 2,5 min. Demnach handelt es sich bei dem Signal m/z 138, welches in OAT2h exprimierenden HEK293-Zellen vorhanden ist, höchstwahrscheinlich um Trig.

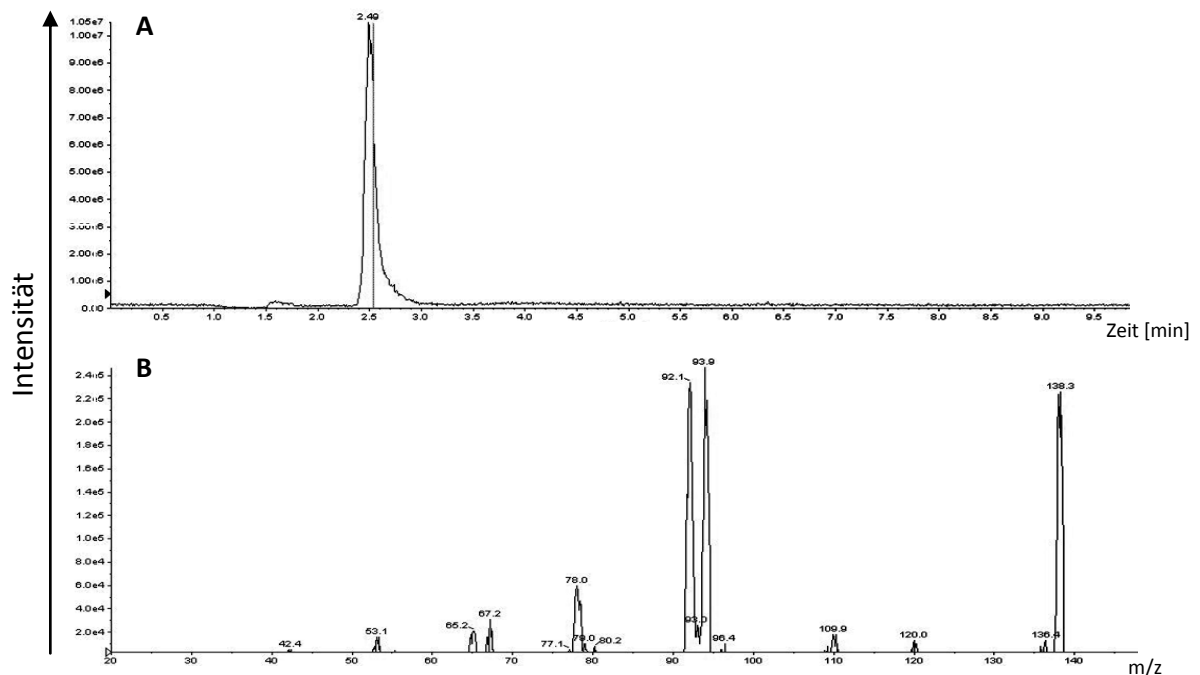


Abb. 3.6: (A) Produktionenstrom von Trig. (B) Produktionenspektrum von Trig zum Zeitpunkt 2,5 min. Kollisionsenergie 15 V.

Für das Signal m/z 255 konnte nur ein Fragment m/z 138 bei einer RT von 2,7 min ermittelt werden (Abb. 3.7). Dieses Signal hat eine ähnliche Retentionszeit wie Trig, zudem kann nur ein Fragment, was der Muttermasse von Trig entspricht, generiert werden. Demnach liegt die Vermutung nahe, dass das Signal m/z 255 Trig enthält. Die Differenz von m/z 255 zu 138 entspricht einer abgegangenen Masse mit einem Molekulargewicht von 117. Eine

Verbindung mit einem Molekulargewicht von 117 ist das Betain, welches in Zelllysaten vorhanden ist. Aufgrund dessen wurde untersucht, ob Trig und Betain zu einer Adduktbildung befähigt sind. Dazu wurden Trig und Betain in einer Probe vereinigt und auf m/z 255 gemessen. Parallel wurden Proben gemessen die nur Trig bzw. Betain enthielten. Nur in den Proben mit Betain und Trig konnte tatsächlich ein Signal bei m/z 255 detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Demnach handelt es sich bei dem Signal m/z 255 um ein Addukt von Trig mit Betain.

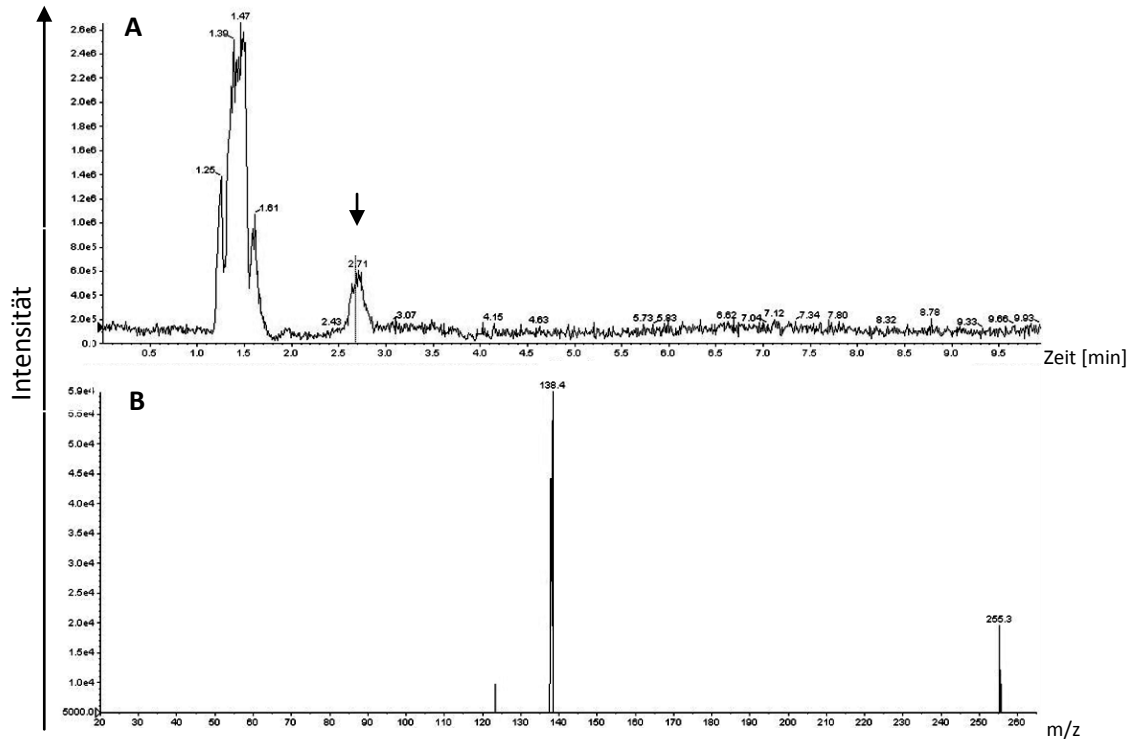


Abb. 3.7: (A) Produktionsstrom von m/z 255 aus den Zelllysaten. Der Pfeil kennzeichnet den Peak bei 2,7 min. (B) Produktionenspektrum m/z 255 aus den Zelllysaten zum Zeitpunkt 2,7 min. Kollisionsenergie 15 V.

Für das Signal m/z 286 konnten nur sehr wenige und schwach intensive Fragmente generiert werden (Abb. 3.8). Mit der Information dieser wenigen Fragmente konnte innerhalb dieser Arbeit die Verbindung, die hinter diesem Signal steckt, nicht aufgeklärt werden.

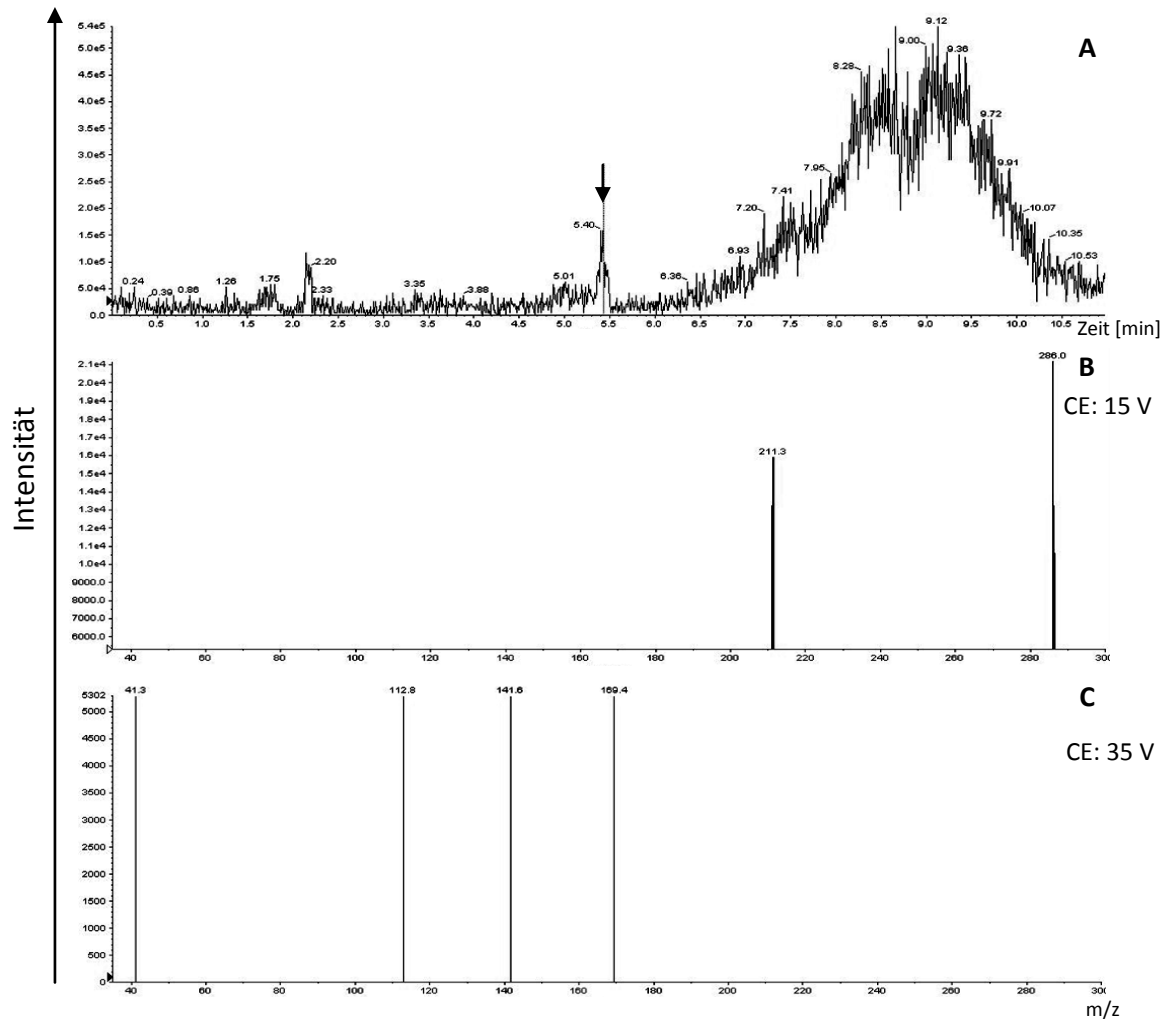


Abb. 3.8: (A) Produktionsstrom von m/z 286 aus den Zelllysaten. Der Pfeil kennzeichnet den Peak bei 5,4 min. (B) und (C) Produktionenspektrum m/z 286 aus den Zelllysaten zum Zeitpunkt 5,4 min. CE = Kollisionsenergie.

3.2.3 Trig Transportmessung mit OAT2h, SLC22A13h und OAT1h

Durch ein Aufnahmeexperiment (siehe 2.5.4.4) mit Trig wurde untersucht, ob der erhöhte Trig-Gehalt über einen direkten Transport durch OAT2h vermittelt wurde. Hierzu wurden OAT2h induzierte und nicht-induzierte HEK293-Zellen für 1 min bei 37 °C in einer Aufnahmelösung inkubiert, welche sich aus einem Puffer mit Trig (10 µM) zusammensetzte. Um den endogenen Trig-Gehalt von induzierten und nicht-induzierten Zellen zu ermitteln, wurden diese mit Puffer ohne Trig Zusatz inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Methanol lysiert und der Trig-Gehalt in den Zelllysaten durch die LC-MS quantifiziert. Um zu überprüfen, ob der potentielle Trig-Transport für OAT2h spezifisch ist, wurden die nächst verwandten Transporter SLC22A13h und OAT1h parallel auf einen Trig-Transport untersucht. Hierfür wurden SLC22A13h und OAT1h aus humaner Niere kloniert und über pEBTetD in HEK293-Zellen zur Expression gebracht.

Induzierte OAT2h Zellen ($1720 \pm 88 \text{ pmol}^{-1} \text{ min mg Protein}^{-1}$), denen Trig als Substrat angeboten wurden, zeigten gegenüber induzierten Zellen ($1064 \pm 87 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$), die nur mit Puffer inkubiert wurden, einen 1,6 x höheren Trig-Gehalt. Verglichen mit nicht-induzierten Zellen ($124 \pm 3 \text{ pmol}^{-1} \text{ min mg Protein}^{-1}$) war der Trig-Gehalt sogar 14 x höher (Abb. 3.9). Daraus folgt, dass Trig durch OAT2h in die Zelle transportiert wurde. Für SLC22A13h und OAT1h wurde keine Trig-Aufnahme beobachtet. Der Trig-Gehalt dieser Zelllinien war im induzierten und im nicht-induzierten Zustand, dem der nicht-induzierten OAT2h Zellen ähnlich (Abb. 3.9).

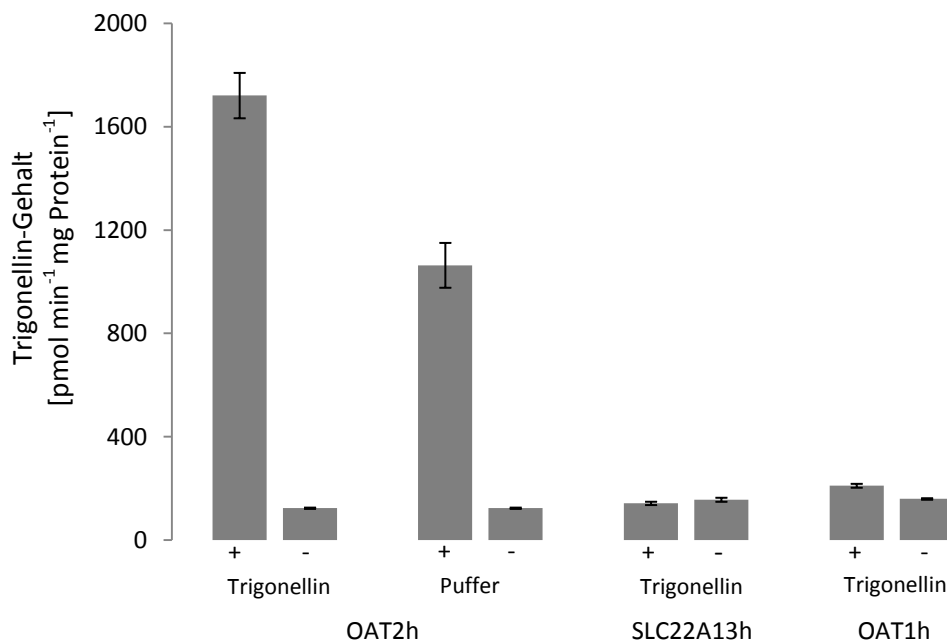


Abb. 3.9: Aufgetragen ist der Trig-Gehalt. Die Induktion der Transporter erfolgte im Zellmedium. OAT2h, SLC22A13h und OAT1h induzierte (+) und nicht-induzierte (-) HEK293-Zellen wurden mit $10 \mu\text{M}$ Trig für 1 min, bei 37°C inkubiert. Die Trig-Quantifizierung erfolgte mittels LC-MS. Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwerts (SEM), $n = 3$. Durchführung des Aufnahmeversuchs B. Steinrücken.

Auf Grund der Tatsache, dass nur mit Puffer inkubierte, induzierte Zellen einen erhöhten Trig-Gehalt aufwiesen, wurde mittels LC-MS untersucht, ob Trig in dem verwendeten Zellkulturmedium (Dulbecco's Modified Eagle Medium + 10 % fetal calf serum) enthalten ist. Hierbei konnte ermittelt werden, dass Trig im Zellkulturmedium mit einer Konzentration von $8 \mu\text{M}$ vorkommt. Daraus erklärt sich der erhöhte Trig-Gehalt in OAT2h induzierten Zellen, die nur mit Puffer inkubiert wurden. Denn schon bei der Induktion des Transporters im Zellkulturmedium kommt dieser mit dem Substrat Trig in Kontakt.

3.2.4 Vergleich der Trig-Aufnahme zwischen dem humanen OAT2 und dem orthologen Transporter der Ratte

Um zu überprüfen, dass der hier gefundene Trig-Transport des humanen OAT2 auch für andere Spezies gilt, wurden Trig-Transportmessungen am orthologen Transporter der Ratten (OAT2r) untersucht. Durch Vorarbeiten der AG Gründemann lag die cDNA von OAT2r bereits vor und wurde über pEBTetD in HEK293-Zellen zur Expression gebracht. Da bekannt war, dass Trig im Zellkulturmedium vorhanden ist, wurde die Expression des Transporters in dem Puffer KRH induziert. Als positiv Kontrolle fungierte der humane OAT2.

Für OAT2r induzierte Zellen ($169 \pm 6 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$) konnte ein 2 x höherer Gehalt von Trig gegenüber nicht-induzierten Zellen ($83 \pm 4 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$) ermittelt werden. Demnach katalysiert der OAT2 der Ratte einen Trig-Transport in HEK293-Zellen. Induzierte OAT2h Zellen ($55 \pm 2 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$) besaßen einen 1,4 x höheren Gehalt an Trig gegenüber nicht-induzierten OAT2h Zellen ($40 \pm 2 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$) (Abb. 3.10). Um die Transporteffizienz (TE) (siehe 1.3.1) zu ermitteln, wurde die spezifische Trig-Aufnahme ermittelt. Hierzu wurde der endogene Trig-Gehalt der Zellen (ermittelt über nur mit Puffer inkubierten Zellen (Daten nicht gezeigt)) von dem Trig-Gehalt der induzierten und nicht-induzierten Zellen subtrahiert. Die Differenz der nicht-induzierten Zellen (unspezifische Aufnahme) wurde anschließend von dem Trig-Gehalt der induzierten Zellen subtrahiert. Für OAT2r wurde so eine TE von $4 \mu\text{l min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$, für OAT2h $1 \mu\text{l min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$, ermittelt. Aus diesen Daten folgt, dass der Ratten OAT2 Trig in HEK293-Zellen besser transportiert als das humane OAT2 Protein.

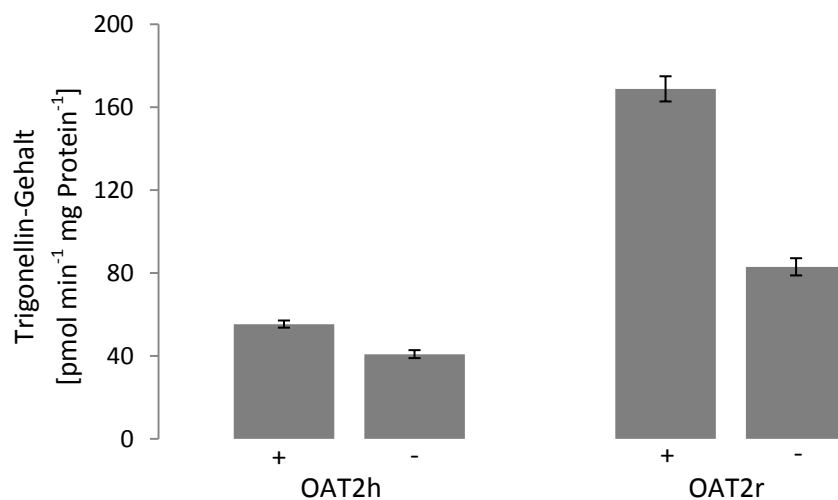


Abb. 3.10: Aufgetragen ist der Trig-Gehalt. Die Induktion der Transporter erfolgte im Puffer. OAT2h und OAT2r induzierte (+) bzw. nicht-induzierte (-) HEK293-Zellen wurden mit $10 \mu\text{M}$ Trig für 1 min, bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Die Trig-Quantifizierung erfolgte mittels LC-MS. Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte und SEM, $n = 3$.

3.2.5 Affinität von OAT2r zu Trig

Als Maß für die Substrataffinität eines Transporters dient, analog zur Enzymkinetik, die Substratkonzentration bei der die halbmaximale Aufnahmegeschwindigkeit erreicht wird (K_m -Wert). Daher wird bei der Bestimmung des K_m -Werts durch steigende Substratkonzentrationen versucht, eine Sättigung der spezifischen Substrataufnahme zu erzielen. Der Kurvenverlauf folgt dabei der Michaelis Menten Funktion. Dabei gilt, dass die Affinität des Transporters zum Substrat bei einem kleineren K_m -Wert höher ist, da weniger Substrat nötig ist, um den Transporter zu sättigen.

Der Transport von Trig vermittelt durch OAT2r wurde genauer charakterisiert, indem die Affinität dieses Proteins zu Trig ermittelt wurde. Dafür wurden Konzentrationen zwischen 10 und 1000 μM verwendet. Die Anpassung der Sättigungskurve erfolgte durch nicht-lineare Regression mit dem Levenberg-Marquardt-Algorithmus und ergab für OAT2r zu Trig einen V_{\max} -Wert von $3686 \pm 117 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$ sowie einen K_m -Wert von $409 \pm 31 \mu\text{M}$ (Abb. 3.11). Aus dem K_m -Wert für OAT2r zu Trig folgt, dass dieses Protein keine allzu hohe Affinität zu Trig besitzt. Wird die Effizienz des Transports über V_{\max}/K_m errechnet, so konnte in diesem Versuch für Trig eine TE von $9 \mu\text{l min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$ ermittelt werden.

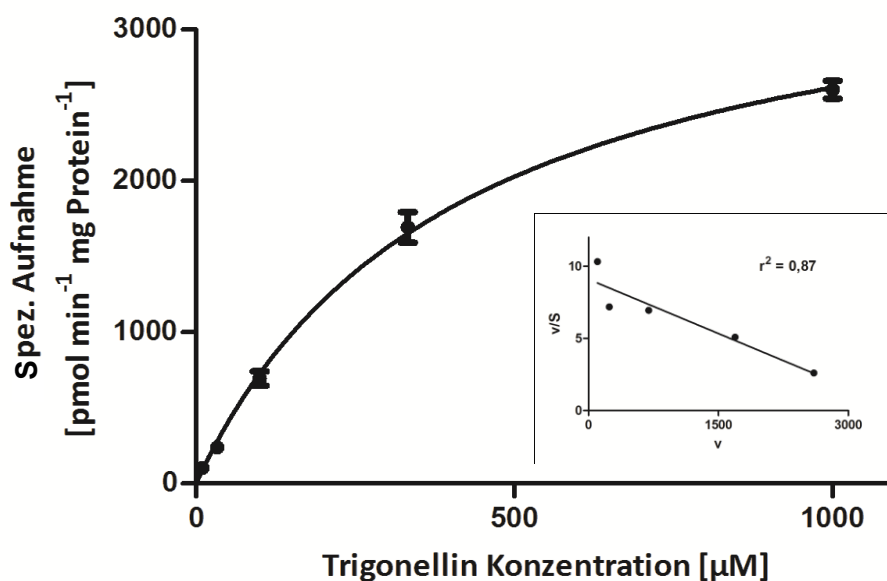


Abb. 3.11: Aufgetragen ist die spezifische Aufnahme gegen die Substratkonzentration. Es wurden Konzentrationen von 10 – 1000 μM Trig eingesetzt. Die unspezifische Aufnahme wurde durch nicht-induzierte Zellen ermittelt und von der Gesamtaufnahme subtrahiert. Die Aufnahmezeit betrug 2 min bei 37 °C. Die Induktion des Transporters erfolgte im Puffer. Die Trig-Quantifizierung erfolgte mittels LC-MS. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, $n = 3$. Eingefügtes Diagramm: Eadie-Hofstee-Linearisierung der Michaelis-Menten-Funktion für die Sättigungskinetik von Trig an OAT2r durch Auftragen von v/s ($s = \text{Substratkonzentration } (\mu\text{M})$) gegen v (Aufnahmegeschwindigkeit ($\text{pmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$)). Dargestellt sind Mittelwerte, $n = 3$.

3.2.6 OAT2 Transportmessungen mit strukturähnlichen Verbindungen zu Trig

Innerhalb dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Trig ein Substrat für OAT2 ist. Aufgrund dessen wurde untersucht, ob Verbindungen, die dem Trig in der Grundstruktur ähnlich sind von OAT2 als Substrat akzeptiert werden.

So wurden 1-Methylnikotinamid, Nikotinamid, Nikotinat, Nikotinat-D-Ribosid (NR), und Nikotinat-D-Ribonukleotid (NRN) (Abb. 3.12) auf einen OAT2h vermittelten Transport untersucht. Da NR nicht kommerziell zu erwerben ist, wurde dieses synthetisiert. Hierzu wurde der Phosphatrest von NRN mittels einer Phosphatase dephosphoryliert und das so gewonnene NR über eine Zentrifugationsäule aufgereinigt (siehe 2.5.4.1). Weiterhin wurden 2-Aminobenzoat (2-ABS), 3-Aminobenzoat (3-ABS) und 4-Aminobenzoat (4-ABS) (Abb. 3.12) auf einen Transport durch OAT2h untersucht. Die Inkubationszeit der Substanzen für beide Versuche betrug 1 min mit jeweils 10 μM . Die Induktion des Transporters erfolgte im oberen Experiment im Zellkulturmedium und im Versuch mit den Aminobenzoensäuren im Puffer.

Da Trig ein Zwitterion ist, wurden andere Substanzen, wie Betain, Carnitin, Ectoin, Gabapentin und Stachydrin (Abb. 3.12), die ebenfalls bei physiologischem pH eine positive und negative Ladung tragen und eine gewisse Ähnlichkeit zum Trig aufweisen, auf einen Transport durch OAT2r untersucht. Die Expression des Rattentransporters erfolgte in KRH. Um überhaupt erstmals einen Effekt zu ermitteln, betrug die Inkubationszeit 20 h mit einer Konzentration von 100 μM der Testsubstanzen.

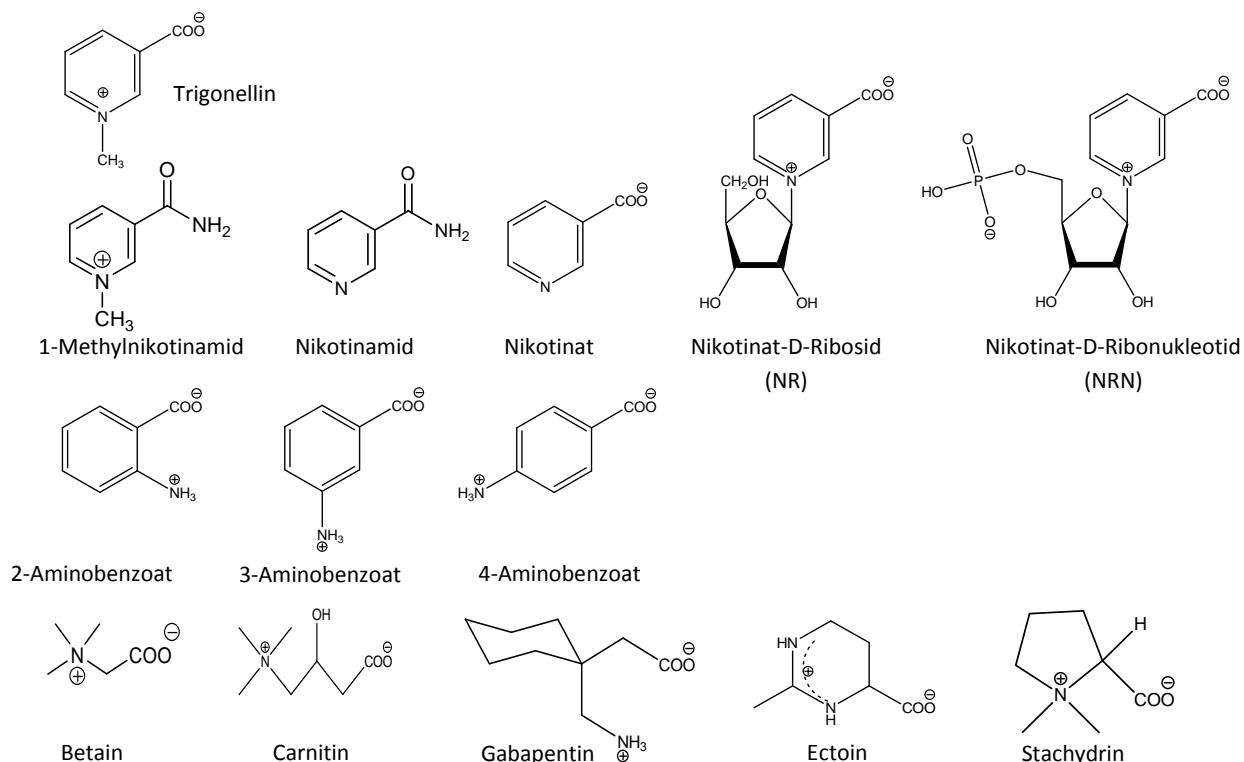
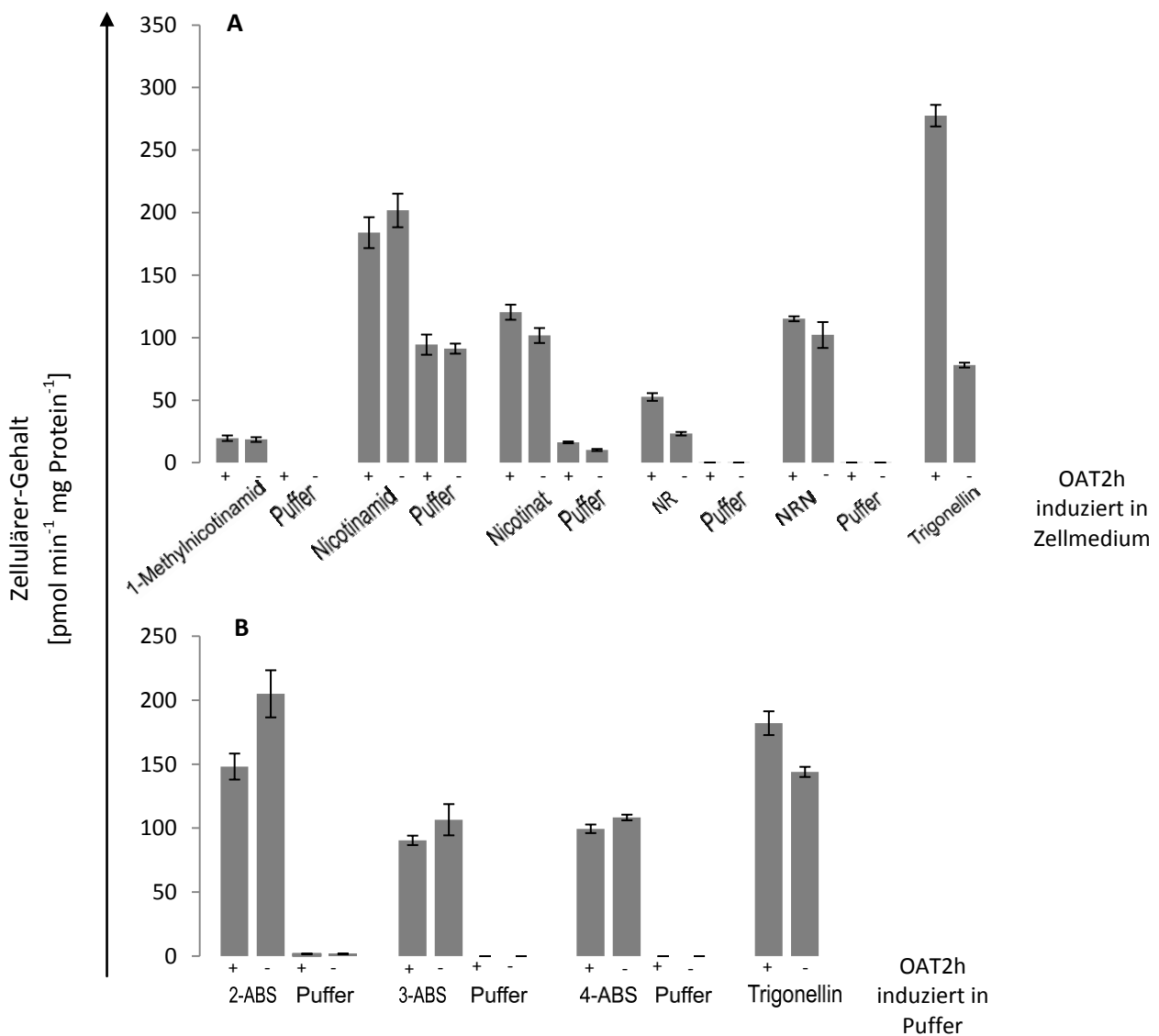


Abb. 3.12: Strukturformeln.

Bis auf NR, zeigten induzierte und nicht-induzierte OAT2h Zellen keinen signifikanten Unterschied durch Inkubation mit 1-Methylnicotinamid, Nicotinamid, Nikotinsäure und NRN. Als Kontrolle fungierten OAT2h induzierte Zellen, die mit Trig inkubiert wurden. In diesen Kontrolle konnte eine Aufnahme beobachtet werden. Da Zellen, die nur mit Puffer anstatt mit NR inkubiert wurden, dieses nicht aufwiesen ist der höherer NR-Gehalt in den induzierten gegenüber den nicht-induzierten Zellen auf einen OAT2h Transport zurückzuführen. (Abb. 3.13 A). Für die drei Aminobenzoesäuren wurde kein Transport durch OAT2h beobachtet Die Kontrolle, Zellen mit Trig Inkubation, verlief positiv (Abb. 3.13 B). Die Inkubation von OAT2r mit Betain, Carnitin, Ectoin, Gabapentin und Stachydrin zeigte keine nennenswerte Aufnahme durch den Transporter. Wohingegen der Transport von Trig in dieser Versuchsreihe bestätigt werden konnte (Abb. 3.13 C).



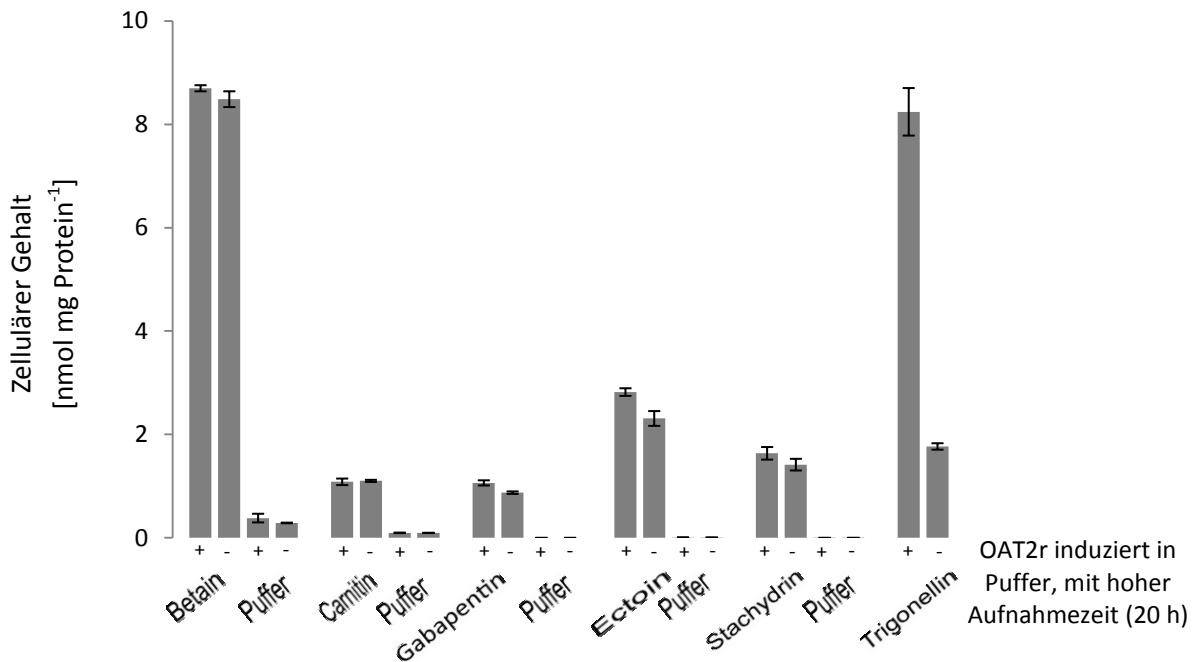


Abb. 3.13: (A) Aufgetragen ist der Gehalt der Substanzen in $\text{pmol min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$ von OAT2h induzierten (+) und nicht-induzierten (-) Zellen. Die Induktion erfolgte in Zellmedium. Die Aufnahmezeit betrug 1 min, $10 \mu\text{M}$, bei 37°C . (B) Aufgetragen ist der Gehalt der Substanzen in $\text{pmol min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$ von OAT2h induzierten (+) und nicht-induzierten Zellen (-). Die Induktion erfolgte im Puffer KRH. Die Aufnahmezeit betrug 1 min, $10 \mu\text{M}$, bei 37°C . (C) Aufgetragen ist der Gehalt der Substanzen in $\text{nmol mg Protein}^{-1}$ von OAT2r induzierten (+) und nicht-induzierten (-) Zellen. Die Induktion des Transporters erfolgte in Puffer. Die Inkubationszeit betrug 24 h, $100 \mu\text{M}$, bei 37°C . Die Quantifizierung erfolgte mit der LC-MS. Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte und SEM, $n = 3$. NR = Nikotinat-D-Ribosid, NRN = Nikotinat-D-Ribonukleotid, ABS = Aminobenzoat. Durchführung des Aufnahmeversuchs mit Unterstützung von B. Steinrücken.

3.2.7 Vergleich der NR Aufnahme zwischen dem humanen und dem OAT2 der Ratte

Aus vorherigem Experiment ging hervor, dass der humane OAT2 einen NR-Transport katalysiert. Daraufhin wurde untersucht, ob der Ratten OAT2 NR ebenfalls als Substrat akzeptiert.

Für induzierte OAT2r Zellen ($83 \pm 3 \text{ pmol min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$) wurde ein 7 x höherer NR-Gehalt gegenüber nicht-induzierten Zellen ($13 \pm 0,1 \text{ pmol min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$) ermittelt. Die induzierten humanen OAT2 Zellen ($53 \pm 3 \text{ pmol min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$) zeigten einen 2 x höheren Gehalt von NR gegenüber den nicht-induzierten Zellen ($23 \pm 1 \text{ pmol min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$) (Abb. 3.14). Für OAT2h wurde eine TE von 3 bzw. für OAT2r eine von $7 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$ ermittelt. Demnach akzeptiert der OAT2 der Ratte, wie der humane OAT2, NR als Substrat, wobei der Rattentransporter dieses effektiver transportiert als das humane Protein.

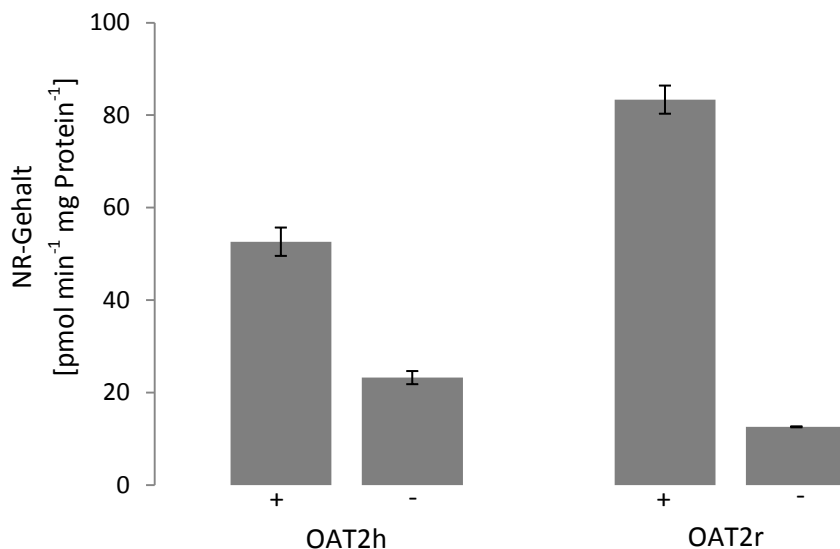


Abb. 3.14: Aufgetragen ist der zelluläre NR-Gehalt. Die Induktion der Transporter erfolgte im Puffer. OAT2h und OAT2r induzierte (+) und nicht-induzierte (-) HEK293-Zellen wurden mit 10 μM NR für 1 min bei 37 °C inkubiert. Die NR-Quantifizierung erfolgte mittels LC-MS. Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte und SEM, $n = 3$.

3.2.8 Orotsäure bzw. Orotat Transportmessungen mit OAT2r, OAT2h, OAT1h und SLC22A13h

Wie später dargestellt wird akzeptiert der Transporter SLC22A13h die Substanz Guanidiniumsuccinat als Substrat. Das Pyrimidin-Derivat Orotsäure bzw. das Salz Orotat ist in seiner Struktur dem Guanidiniumsuccinat ähnlich (Abb. 3.15). Aufgrund dessen wurde untersucht ob Orotat von SLC22A13 als Substrat akzeptiert wird. Dabei wurden die Transporter OAT1 und OAT2 ebenfalls auf Orotat getestet und fungierten so als Vergleich. Die Orotat Messung erfolgte mittels Flüssigszintillationszähler durch radioaktiv markiertes ^3H -Orotat.

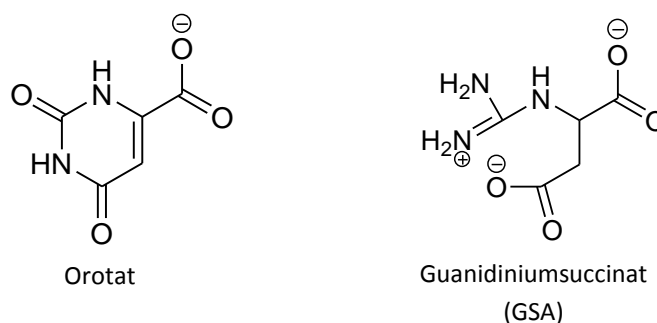


Abb. 3.15: Chemische Strukturen von Orotat und Guanidiniumsuccinat.

Orotat wurde sehr stark von OAT2r transportiert. Induzierte Zellen zeigten eine Aufnahme von 10 $\text{pmol min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$, bei einer extrazellulären Orotat Konzentration von 0,1 μM und einer Inkubation von 1 min. Für nicht-induzierte Zellen lag die Orotat Akkumulation in

den Zellen bei $0,2 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$ und damit 50 x niedriger. Überraschenderweise zeigten induzierte OAT2h Zellen keinen Unterschied zu den jeweiligen nicht-induzierten Zellen und damit keinen Transport von Orotat. Im Gegensatz dazu, wurde in induzierten SLC22A13-Zellen eine leichte Orotat-Aufnahme ($0,54 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$) relativ zu den nicht-induzierten Zellen ($0,16 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$) beobachtet. Für OAT1 konnte ebenfalls eine schwache Aufnahme ($0,27 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$) relativ zu den nicht-induzierten Zellen ($0,1 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$) ermittelt werden (Abb. 3.16). Die TE für OAT2r betrug $99 \text{ } \mu\text{l min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$. Demnach wird Orotat sehr effizient von OAT2r transportiert. Während die beiden anderen Mitglieder der SLC22-Familie, eine TE von $4 \text{ } \mu\text{l min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$ und eine TE von $1,6 \text{ } \mu\text{l min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$ aufweisen und damit Orotat 25-60 x schlechter transportieren als OAT2r.

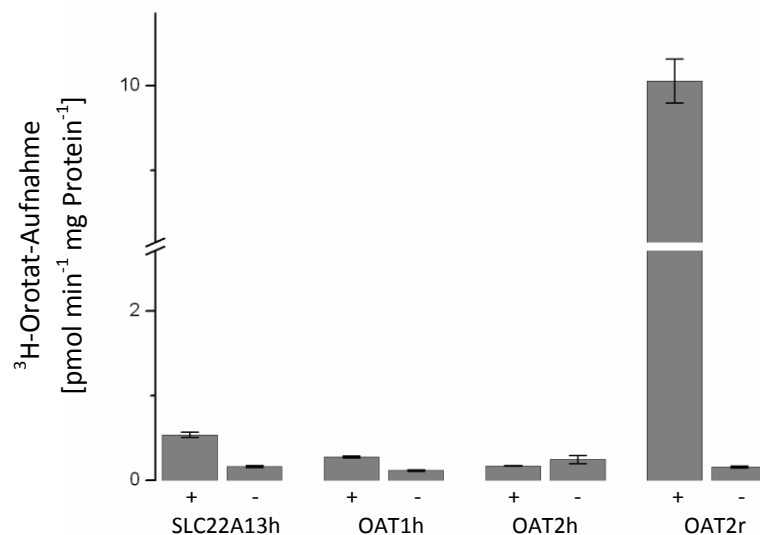


Abb. 3.16: Aufgetragen ist die ^3H -Orotat-Aufnahme. SLC22A13h, OAT1h, OAT2h, und OAT2r induzierte (+) und nicht-induzierte (-) HEK293-Zellen wurden mit $0,1 \text{ } \mu\text{M}$ Orotat für 1 min bei $37 \text{ } ^\circ\text{C}$ inkubiert. Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte und SEM, $n = 3$. In zusammen Arbeit mit B. Steintrücken.

3.2.9 Zeitverlauf des Orotat-Transports von OAT2r

Bei der Betrachtung des Zeitverlaufes der Aufnahme von Orotat über OAT2r induzierten Zellen gegenüber nicht-induzierten Zellen wurde der Unterschied in der Akkumulation dieses Pyrimidin-Derivats weiter verdeutlicht (Abb. 3.17). Mit einer extrazellulären Orotat-Konzentration von $10 \text{ } \mu\text{M}$ wurde nach 60-minütiger Inkubation im Gleichgewicht eine intrazelluläre Konzentration von $860 \text{ } \mu\text{M}$ erreicht (berechnet mit einem intrazellulären Wasservolumen von $6,7 \text{ } \mu\text{l mg Protein}^{-1}$ der HEK293-Zellen [Martel et al., 1996]). Dies entspricht einer Anreicherung in den Zellen um den Faktor 86 gegenüber dem Außenmedium. Zellen, die OAT2r nicht exprimieren, sind praktisch impermeabel für Orotat.

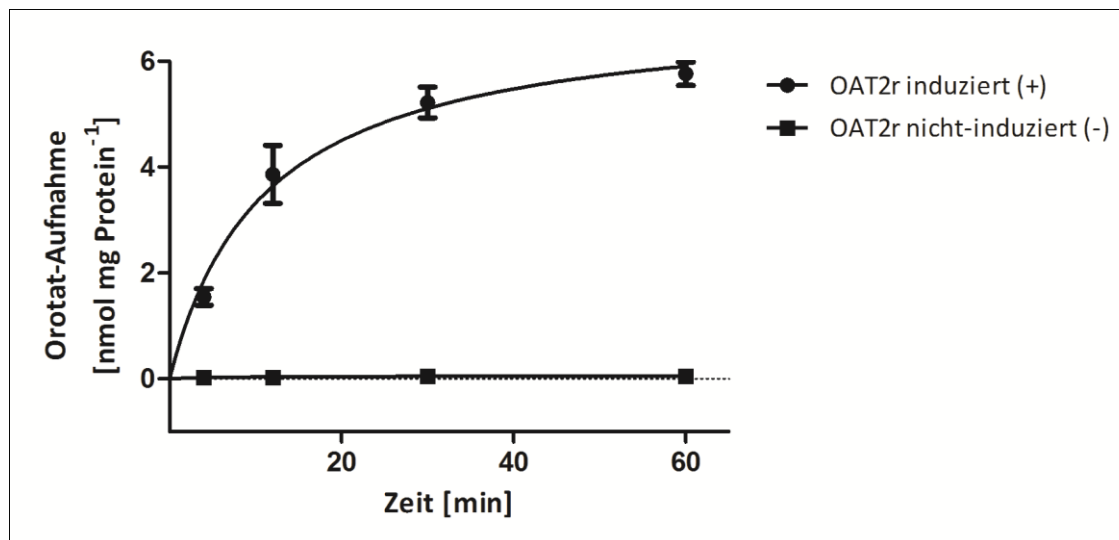


Abb. 3.17: Zeitverlauf der Aufnahme von Orotat über OAT2r. Induzierte und nicht-induzierte HEK293-Zellen wurden mit 10 μM Orotat, bei 37 $^{\circ}\text{C}$, für 4, 12, 30 und 60 min inkubiert. Die Orotat-Quantifizierung erfolgte mittels LC-MS. Der Graph basiert auf einer Exponentialfunktion ($y = a * (1 - e^{-bx})$) basierend auf einem Ein-Kompartiment-Modell. Hierbei entspricht a dem Quotienten der Geschwindigkeitskonstanten k_{in}/K_{out} und b entspricht k_{out} (Russ et al., 1992). Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, $n = 3$. Durchführung des Aufnahmeversuchs B. Steinrücken.

3.2.10 Affinität von OAT2r zu Orotat

Orotat wurde sehr effizient von OAT2r transportiert. Aufgrund dessen wurde die Affinität dieser Substanz zu OAT2r untersucht (Abb. 3.18) und ergab einen K_m -Wert von $234 \pm 13 \mu\text{M}$ sowie einen V_{max} -Wert von $22,6 \pm 0,6 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$. OAT2r besitzt demnach keine besonders hohe Affinität zu Orotat. Die TE in diesem Versuch betrug $V_{max}/K_m = 97 \mu\text{l min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$. Diese hohe Transporteffizienz stimmt gut mit der TE die über v/S ermittelt wurde überein (vgl. 3.2.8).

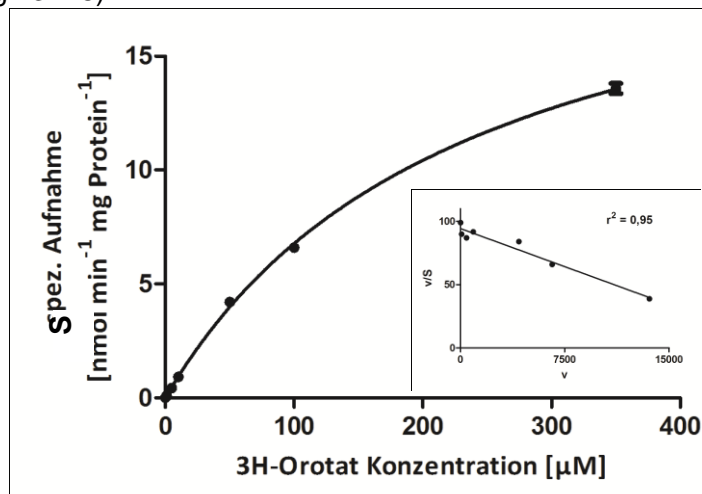


Abb. 3.18: Aufgetragen ist die spezifische Aufnahme gegen die Substratkonzentration. Es wurden Konzentrationen von 0,1 – 350 μM ^3H -Orotat eingesetzt. Die unspezifische Aufnahme wurde durch nicht-induzierte Zellen ermittelt und von der Gesamtaufnahme subtrahiert. Die Aufnahmezeit betrug 1 min bei 37 $^{\circ}\text{C}$. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, $n = 3$. Eingefügtes Diagramm: Eadie-Hofstee-Linearisierung der Michaelis-Menten-Funktion für die Sättigungskinetik von ^3H -Orotat an OAT2r durch Auftragen von v/s (s = Substratkonzentration (μM)) gegen v (Aufnahmegeschwindigkeit ($\text{pmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$)). Dargestellt sind Mittelwerte, $n = 3$.

3.2.11 Triebkraft von OAT2r zu Orotat

Nachdem bekannt war, dass sich das Orotat gegenüber dem extrazellulären Medium innerhalb 60 min um den Faktor 86 in Zellen durch OAT2r anreichert, wurden Versuche zur Triebkraft des Transporters durchgeführt, um die Akkumulation von Orotat durch OAT2r zu erklären.

Die Aufnahmelösung die für die Experimente verwendet wurde war der Krebs Ringer Henseleit Puffer (KRH). Der Puffer setzt sich hierbei aus folgenden Salzen zusammen: 125 mM NaCl, 1,2 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 1,2 mM KH₂PO₄ und 4,8 mM KCl. Desweiteren enthält dieser Puffer 5,6 mM Glucose und 25 mM HEPES. Da die anorganischen Ionen einen Effekt auf den Orotat-Transport haben könnten, wurden diese in der Aufnahmelösung um den Faktor 3 und 10 erniedrigt. Zum Vergleich wurden parallel OAT2r Zellen mit unverdünnten KRH Puffer inkubiert.

Bis auf die 10-fache Erniedrigung von NaCl zeigten induzierte OAT2r Zellen, bei denen die Aufnahmelösung unterschiedliche Salzkonzentrationen enthielt, im Vergleich zur Kontrolle, keinen signifikanten Unterschied in der Orotat-Aufnahme (ca. 3,5 pmol min⁻¹ mg Protein⁻¹) (Abb. 3.19). Eine 10-fache NaCl Erniedrigung in der Aufnahmelösung verminderte den Orotat-Transport um den Faktor 2 (2 pmol min⁻¹ mg Protein⁻¹).

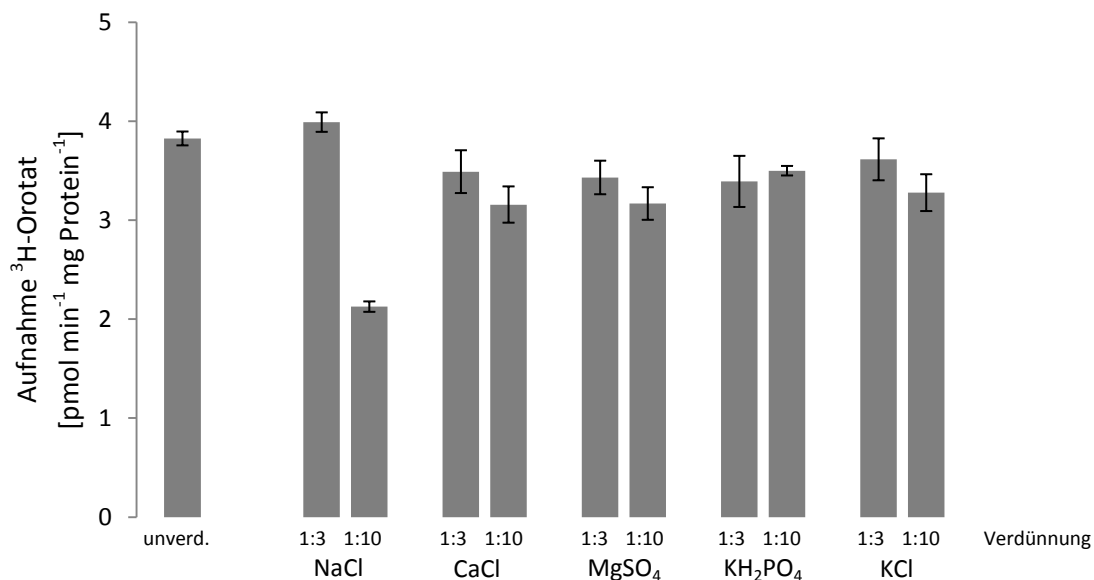


Abb. 3.19: Aufgetragen ist die ³H-Orotat-Aufnahme. OAT2r induzierte HEK-293 Zellen wurden für 1 min, bei 37 °C, mit 0,1 µM Orotat inkubiert. Die Aufnahmelösung enthielt dabei unterschiedliche Salzkonzentration die 1:3 und 1:10 (bezogen auf die Konzentration im KRH-Puffer) erniedrigt wurden. Unverd. = regulärer KRH-Puffer. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n = 3.

Da aus vorherigen Experiment die NaCl Erniedrigung in der Aufnahmelösung einen Effekt zeigte, wurde der Orotat-Transport auf eine Na⁺-Abhängigkeit untersucht. Durch den Ersatz des Natriums mit der Substanz N-Methyl-D-Glucosamin wurde der osmotische Ausgleich sicher gestellt.

Trotz unterschiedlicher Natriumkonzentration in der Aufnahmelösung wurde die Orotat-Aufnahme nicht beeinflusst (Abb. 3.20). Daraus folgt, dass der Orotat-Transport durch OAT2r nicht Natrium getrieben ist.

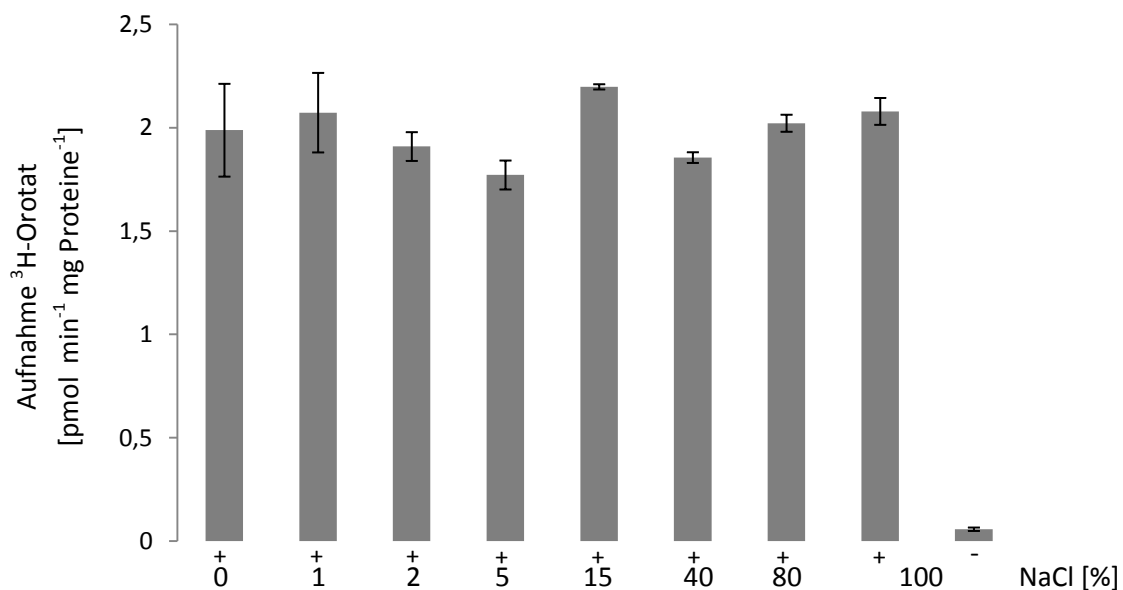


Abb. 3.20: Aufgetragen ist die ³H-Orotat-Aufnahme. OAT2r induzierte (+) und nicht-induzierte (-) HEK-293 Zellen wurden für 1 min, bei 37 °C, mit 0,1 µM Orotat inkubiert. Die Aufnahmelösung enthielt dabei unterschiedliche Natriumkonzentrationen (0-100 %). Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n = 3.

3.2.11.1 pH-Abhängigkeit

Ein weitere Möglichkeit für die Akkumulation von Orotat durch OAT2r in den Zellen ist dass der Transport Protonen getrieben ist. Um dieses zu überprüfen wurden induzierte Zellen mit einer Orotat-Aufnahmelösung inkubiert die aus unterschiedlichen pH-Werten bestand.

Für den Orotat-Transport konnte keine Abhängigkeit bezüglich des pH-Werts der Aufnahmelösung nachgewiesen werden (Abb. 3.21). Die Aufnahme des Orotats erfährt keine signifikante Veränderung wenn die Protonenkonzentration, vom physiologischen Wert aus betrachtet, eine Zehnerpotenz erhöht oder erniedrigt wird. Beim Vorliegen einer Protonenabhängigkeit wäre es zu erwarten, dass die TE mit fallendem pH-Wert ebenfalls abnimmt, die zu beobachtende Entwicklung ist aber eher gegenläufig.

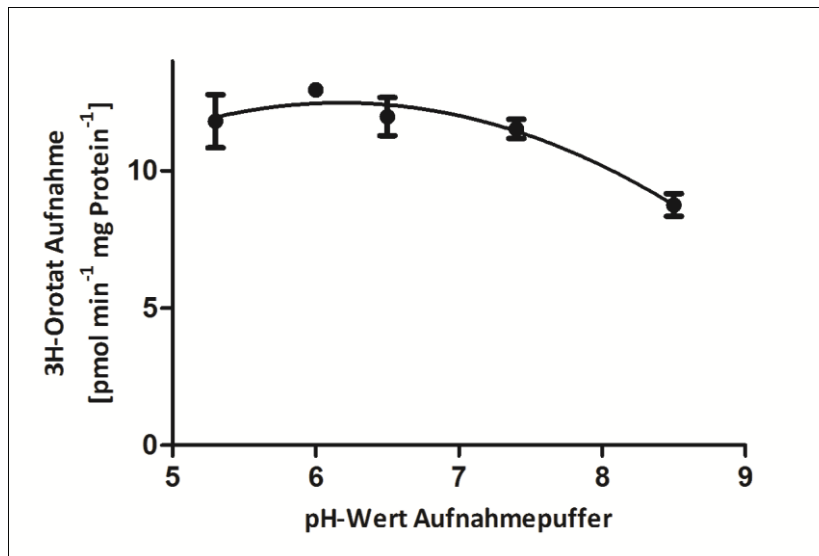


Abb. 3.21: Aufgetragen ist die ^3H -Orotat-Aufnahme gegen den pH-Wert der AufnahmeLösung. OAT2r induzierte (+) HEK-293 Zellen wurden für 1 min, bei 37 °C, mit 0,1 μM Orotat inkubiert. Der pH-Wert der AufnahmeLösungen betrug 5,3, 6,0, 6,5, 7,4 und 8,5. Der Graph beruht auf einer Polynomfunktion 2. Ordnung ($Y = B_0 + B_1 \cdot x + B_2 \cdot x^2$). Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, $n = 3$.

3.2.11.2 Einfluss der Transporterinduktion in Puffer und Zellkulturmedium auf den Orotat-Transport

Da ein Antiportmechanismus von OAT2r als Triebkraft für die Anreicherung von Orotat in den Zellen verantwortlich sein kann, wurden die Zellen in Puffer und zum Vergleich in Zellkulturmedium induziert und 24 h später wurde die Orotat-Aufnahme gemessen. Durch die Puffer Inkubation könnten die Zellen an intrazellulären Substanzen verarmen und der Orotat-Transport bei einem Antiportmechanismus eventuell vermindert sein. Zum Vergleich wurden OAT1h Zellen ebenso behandelt, da bekannt ist, dass dieser für die Aufnahme von organischen Anionen einen von intrazellulär nach extrazellulär gerichteten Gradienten organischer Anionen nutzt. In Abb. 3.22 ist die TE von OAT2 zu Orotat und für OAT1h die TE zu PAH dargestellt. OAT2r-Zellen, die in Puffer induziert wurden, besaßen eine höhere TE ($96 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$) als Zellen die in Vollmedium ($74 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$) induziert wurden. Demnach wurde keine Verminderung des Orotat-Transports durch die 24 h Inkubation der Zellen im Puffer ermittelt. Es trat eher das Gegenteil ein, die Orotat-Aufnahme wurde etwas gesteigert. Für die OAT1h-Zellen konnte kein signifikanter Unterschied in der TE (ca. $50 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$) zu PAH beobachtet werden. Der Vergleich der TE von OAT1h zu seinem Modellsubstrat PAH verdeutlicht nochmals die Transportleistung von OAT2r zu Orotat.

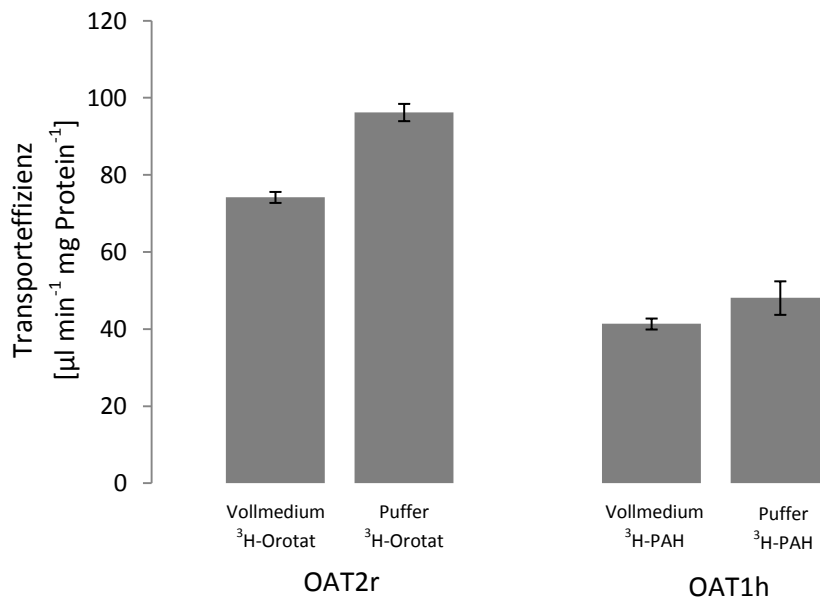


Abb. 3.22 Aufgetragen ist die Transporteffizienz von OAT2r zu Orotat und OAT1h zu PAH. Die Transporterinduktion erfolgte in Vollmedium (Zellkulturmedium) oder Puffer. 24 h später wurden die Zellen gewaschen und für 1 min, bei 37 °C, mit 0,1 μM $^3\text{H-Orotat}$ bzw. $^3\text{H-PAH}$ inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n = 3.

3.2.12 Die Mutante OAT2hE441Q

Die Fähigkeit eines Transporters verschiedene Substrate zu unterscheiden sowie sie mit unterschiedlicher Affinität zu binden und zu transportieren, ist in seiner Aminosäuresequenz festgelegt. OAT2 besitzt, über mehrere Spezies hinweg, in der potentiellen Transmembrandomäne (TMD) 10 nur eine saure Aminosäure, die Glutaminsäure (siehe Anhang). Alle anderen organischen Anionen Transporter innerhalb der SLC22-Familie weisen dort keine negativ geladene Aminosäure auf. Da TMD den Weg bilden, über den Substrate durch die Lipiddoppelschicht bewegt werden, kann diese Glutaminsäure eine potentielle Bindungsstelle für Zwitterionen, wie z. B. das Trig oder NR, darstellen. Um dieses zu überprüfen, wurde die Glutaminsäure an der Position 441 im humanen OAT2 durch das ungeladene Glutamin ersetzt. Der Austausch erfolgte durch eine Punktmutation mittels gerichteter Mutagenese (Ausführung von B. Steinrücken). Ein Auszug aus der Sequenzanalyse von OAT2h ist in Abb. 3.23 dargestellt.

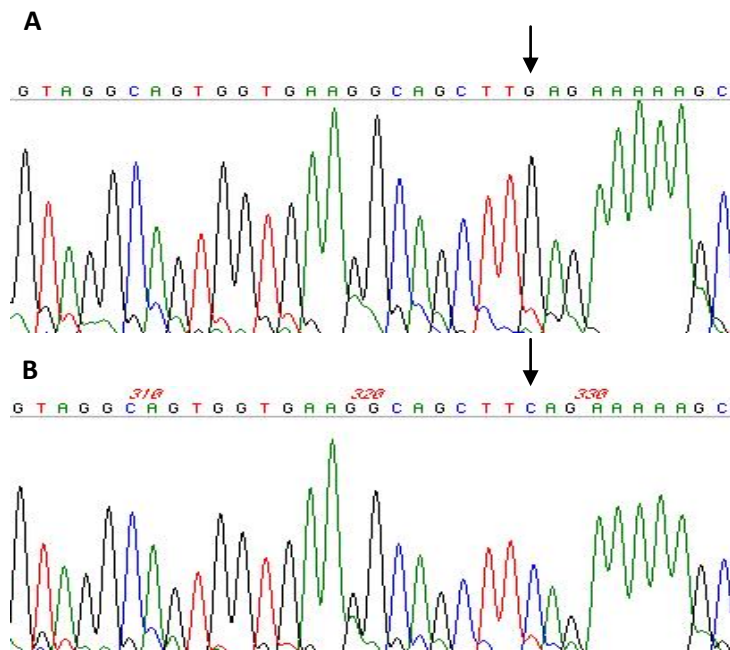


Abb. 3.23: Sequenzierungsprofil Vergleich von Sequenzausschnitten von OAT2h vor der Mutagenese (A) und danach (B). Dargestellt ist ein Ausschnitt der codierenden Region für TMD10, in der das Nukleotid Guanosinmonophosphat an Position 441 durch Cytidinmonophosphat ersetzt wurde. Das ausgetauchte Nukleotid ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

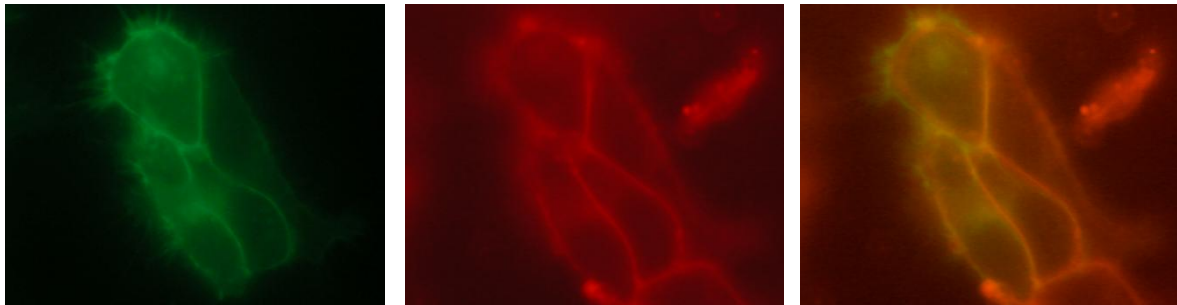
3.2.12.1 Nachweis der Mutante auf Proteinebene

Das Einfügen von Punktmutationen in verschiedene Bereiche eines Transporters kann unterschiedliche Auswirkungen auf seine Aktivität, Faltung oder zelluläre Lokalisation haben. Zum Beispiel kann eine Änderung der Transporteffizienz aus einer veränderten Substrataffinität, Wechselzahl (k_{cat}) oder einer falschen Faltung des Proteins resultieren. Eine fehlerhafte Faltung kann zu einer Degradation des Transporters führen und damit die korrekte Lokalisation in der Zellmembran verhindern. Daher ist es sinnvoll, einen Nachweis der Mutante auf Proteinebene durchzuführen. Um zu überprüfen, ob die eingefügte Mutation zu Unterschieden in der zellulären Lokalisation der Mutante OAT2hE441Q führt, wurde diese mit eGFP fusioniert und die eGFP Fluoreszenz in der Zellmembran durch Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Des Weiteren wurde die Expression mittels FACS-Analyse in induzierten und nicht-induzierten Zellen quantifiziert.

Die eGFP Fluoreszenz konnte bei Zellen, die das Transporterfusionskonstrukt exprimierten, in der Zellmembran beobachtet werden. Die Fluoreszenz stimmte mit der Trypanblau-Färbung überein (Abb 3.24 A). Demnach erreicht die Mutante die Zellmembran.

Aus der FACS-Analyse ging hervor, dass 93 % der induzierten Zellen mit dem pEBTetD/OAT2hE441Q-GFP Konstrukt den mutanten eGFP-Transporter exprimierten. Wohingegen 8 % der nicht-induzierten das Konstrukt exprimierten (Abb. 3.24 B).

A



B

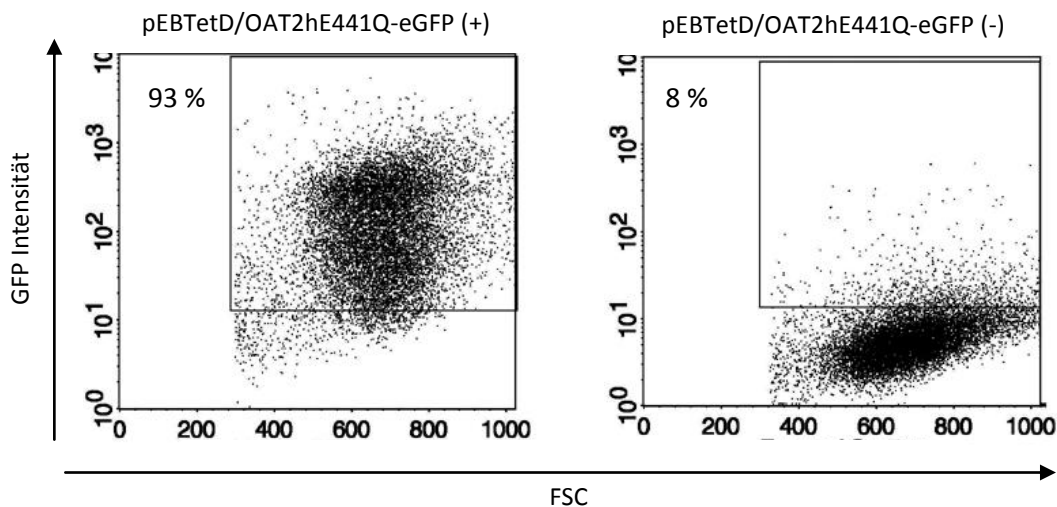


Abb. 3.24: (A) Zelluläre Lokalisation von induzierten OAT2hE441Q-eGFP HEK293-Zellen. Bild links: eGFP-Fluoreszenz vom OAT2hE441Q-eGFP Fusionsprotein. Bild Mitte: Trypanblau-Färbung der induzierten OAT2hE441Q-eGFP Zellen. Bild rechts: Überlagerung. (B) FACS-Analyse der Mutante OAT2hE441Q-eGFP. Aufgetragen ist die eGFP Fluoreszenz gegen die Zellgröße (FSC). Es wurden 20000 Zellen gezählt und tote Zellen über die 7-AAD-Färbung ausgeschlossen. Die GFP Fluoreszenz wurde definiert ab einer Intensität von 10^1 . Linkes Bild: Induzierte OAT2hE441Q-eGFP Zellen. Rechtes Bild: Nicht-induzierte OAT2hE441Q-eGFP Zellen.

3.2.12.2 Trig Transportmessung mit der Mutante OAT2hE441Q

Für die funktionelle Analyse der Mutante wurden induzierte und nicht-induzierte OAT2hE441Q-eGFP HEK293-Zellen zeitgleich mit der Induktion des Transporter-Fusionskonstrukts 20 h mit 100 μ M Trig inkubiert. Parallel wurde die Wildtyp OAT2h-eGFP Zelllinie ebenso behandelt.

Der Trig-Gehalt in Zellen mit exprimierter Mutante (51 ± 4 %) war gegenüber den nicht-induzierten Zellen (35 ± 7 %) leicht erhöht (Faktor 1,5). Wohingegen das Verhältnis des Trig-Gehalts von OAT2h-Wildtyp exprimierenden Zellen (100 ± 4 %) gegenüber den nicht-induzierten Zellen (34 ± 1 %) mit einem von Faktor 3 deutlich größer gewesen ist (Abb. 3.25). Daraus ergibt sich, dass der Trig-Transport durch die Mutante OAT2hE441Q stark erniedrigt ist.

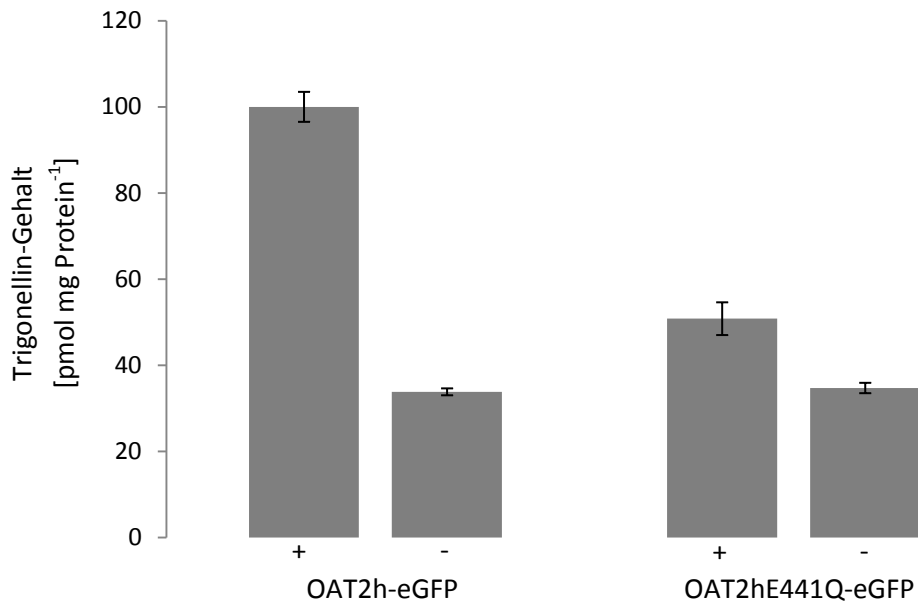


Abb. 3.25: Aufgetragen ist der zelluläre Trig-Gehalt von OAT2h-eGFP und OAT2hE441Q-eGFP induzierten (+) bzw. nicht-induzierten (-) Zellen. Die Induktion der Transporter erfolgte in Puffer zeitgleich mit der Inkubation von 100 μ M Trig bei 37 °C. Die Trig-Quantifizierung in den Zellen erfolgte mittels LC-MS. Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte und SEM, n = 3. Durchführung des Aufnahmeversuchs B. Steinrücken.

3.2.13 relative Expression von OAT2 in Leber und Niere von weiblichen und männlichen Ratten

Da Unterschiede in der Expression von OAT2 in Leber und Niere bei weibl. und männl. Ratten bestehen sollen, wurden Versuche zur Quantifizierung der Expression von OAT2r durchgeführt. Hierbei wurde die relative Expression in Niere und Leber beider Geschlechter mittels real-time PCR ermittelt. Das Herz, indem OAT2r nicht exprimiert wird, fungierte dabei als negativ Kontrolle.

In Böcken und Weibchen konnte jeweils OAT2 mRNA am stärksten in der Leber detektiert werden. Für weibliche Ratten konnte zudem in der Niere eine Expression von ca. 20 % relativ zur weiblichen Leber ermittelt werden. Im Herzen wurde, unabhängig vom Geschlecht, kein Signal detektiert (Abb.3.26). Aus dieser Analyse folgt, dass OAT2 in der Ratte primär in der Leber exprimiert wird.

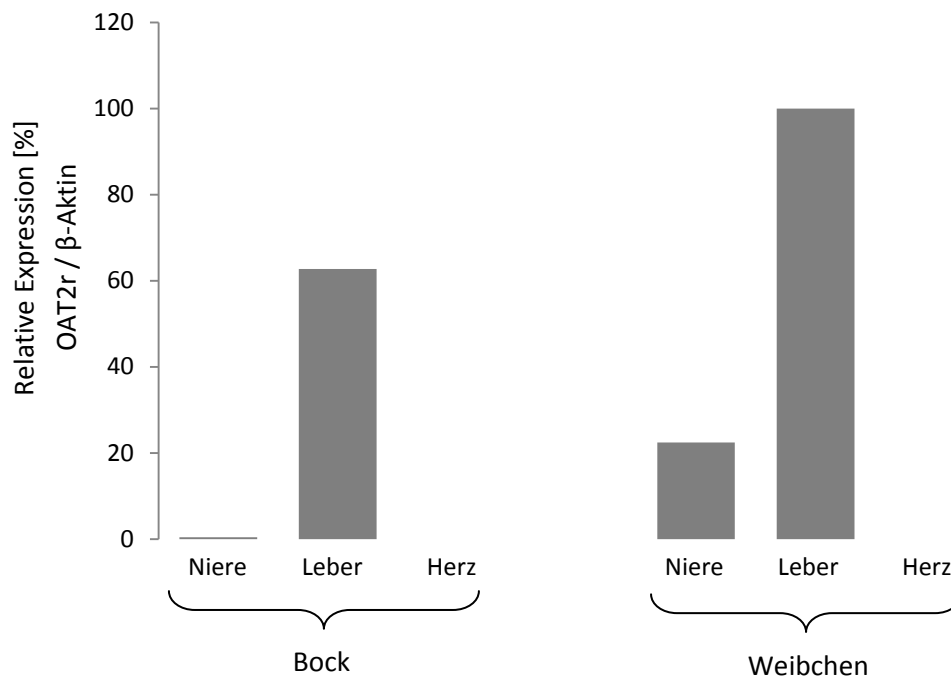


Abb. 3.26: Relative Expression von OAT2 der Ratte in Niere, Leber und Herz.

3.3 SLC22A13

3.3.1 Substratsuche für SLC22A13h mittels LC-MS Difference Shading

Während der Entstehung dieser Arbeit waren keine Substrate für das SLC22A13 Protein bekannt. Aufgrund dessen wurden Substrate mittels LC-MS Difference Shading gesucht. Durch Vorarbeiten von C. Fork (Diplomarbeit) lag die cDNA von SLC22A13h bereits vor und wurde über pEBTetD in HEK293-Zellen zur Expression gebracht.

Die Analyse der Zelllysate bei positiver Ionisierung über die Reversephasesäule ergab in den Kontrollzellen ein Signal auf der Massenspur m/z 176 bei einer Retentionszeit von ca. 2,5 min (Abb. 3.27 A, C). Da Zellen ohne Transporter dieses Signal aufweisen, könnte dieses darauf hindeuten, dass SLC22A13h diese Verbindung aus der Zelle transportiert.

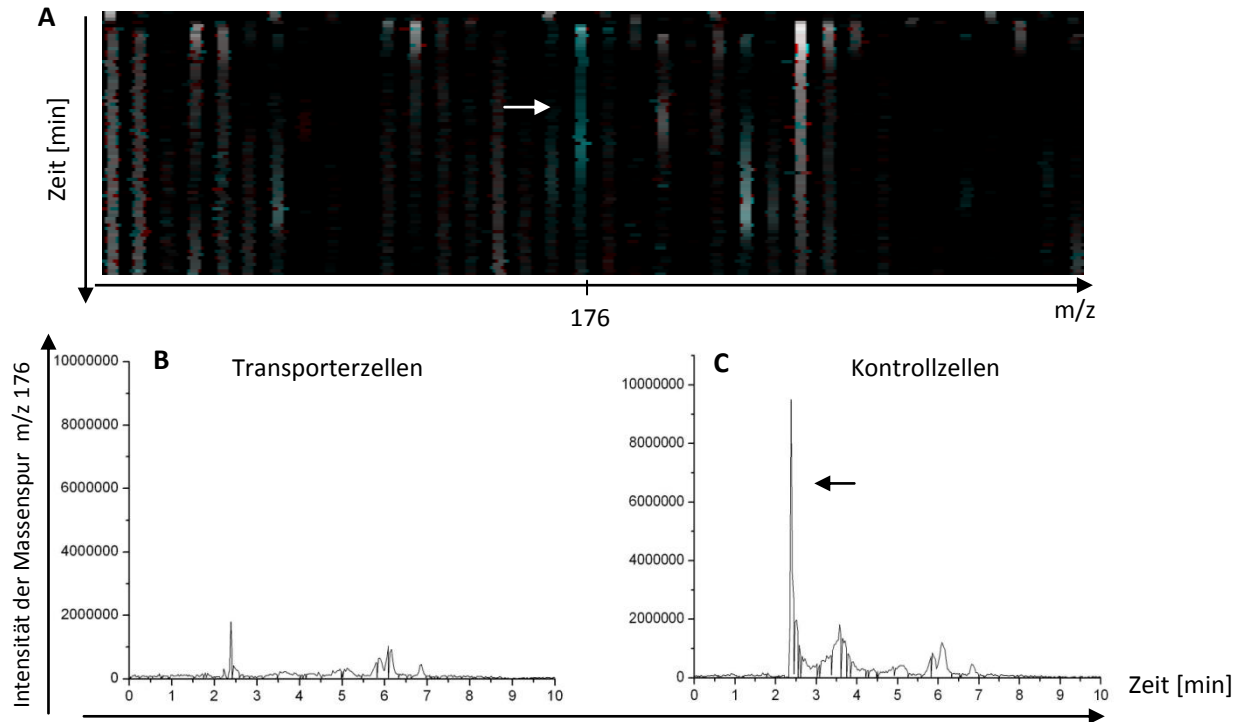


Abb. 3.27: (A) Bildausschnitt der Differenz-Abtönungs Analyse der Zelllysate von SLC22A13h induzierten und nicht-induzierten Zellen. Der Pfeil kennzeichnet das Signal bei m/z 176. (B) Intensität der Massenspur m/z 176 gegen die Retentionszeit der SLC22A13h exprimierenden Zellen (Transporterzellen). (C) Intensität der Massenspur m/z 176 gegen die Retentionszeit der nicht-induzierten Zellen (Kontrollzellen).

3.3.2. Identifizierung des Signals bei m/z 176

Für die Aufklärung des Signals bei m/z 176 wurde, wie schon bei dem Signal für Trig, ein Produktionenspektrum generiert. Im Chromatogramm des Produktionenstroms trat das Signal wieder zur erwarteten Retentionszeit von ca. 2,5 min auf (Abb. 3.28 A). Die Fragmentierung von m/z 176 ergab (Abb. 3.28 B) ein intensives Fragment bei m/z 88 sowie eine Reihe schwächere Signale bei m/z 158, 134, 130, 116, 112, 74, 70 und 50. Weiterhin wurde das Molekülion $[M-H+]$ bei m/z 176 detektiert. Anhand dieser charakteristischen Fragmente konnte dieses Signal als Guanidiniumsuccinat (GSA) identifiziert werden (Abb. 3.15).

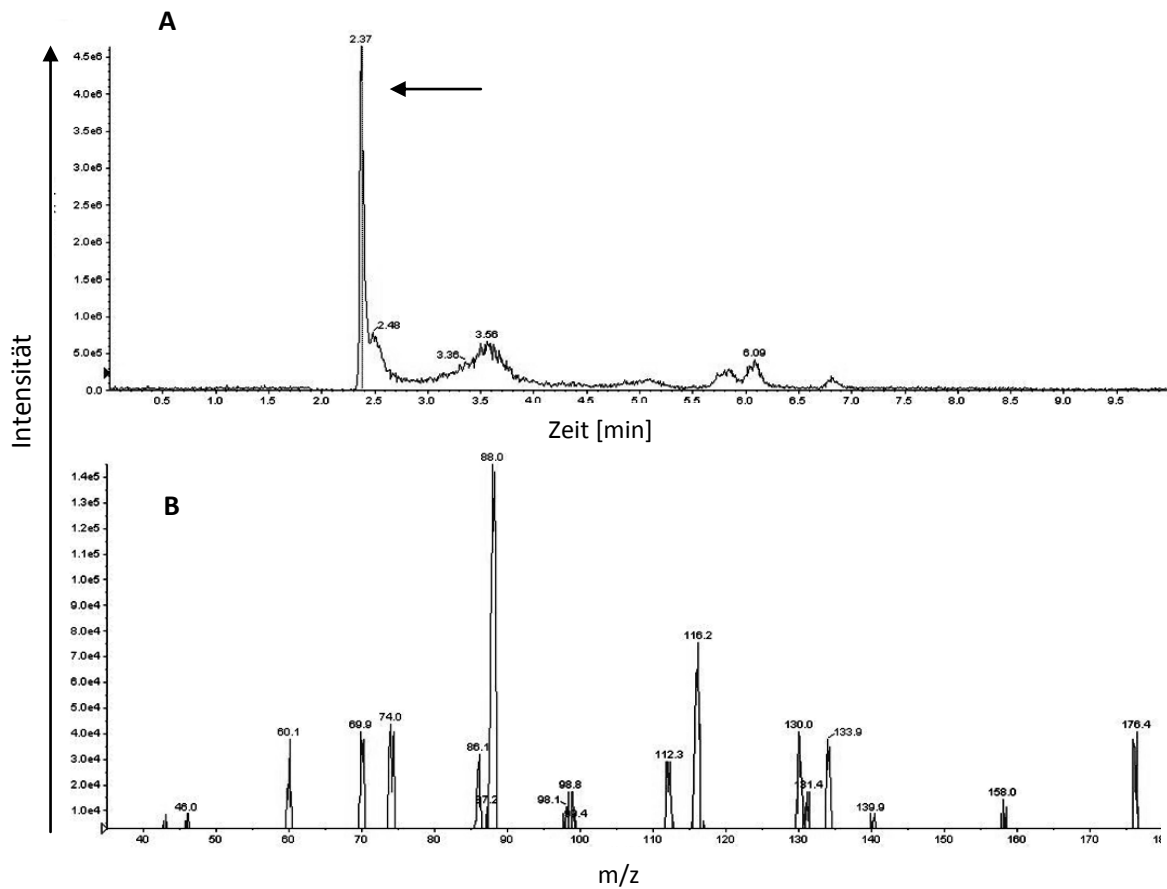


Abb. 3.28: (A) Produktionsstrom von m/z 176 aus den Zelllysaten. Der Pfeil kennzeichnet den Peak bei 2,5 min. (B) Produktionenspektrum m/z 176 zum Zeitpunkt 2,5 min. Kollisionsenergie 20 V.

Durch das Produktionenspektrum von GSA ließen sich die gleichen Fragmente zur selben Retentionszeit, 2,5 min, wie bei dem Signal m/z 176 in den Zelllysaten ermitteln (Abb. 3.29 A, B). Demnach handelt es sich bei dem Signal m/z 176, welches in SLC22A13h exprimierenden HEK293-Zellen erniedrigt ist, um GSA.

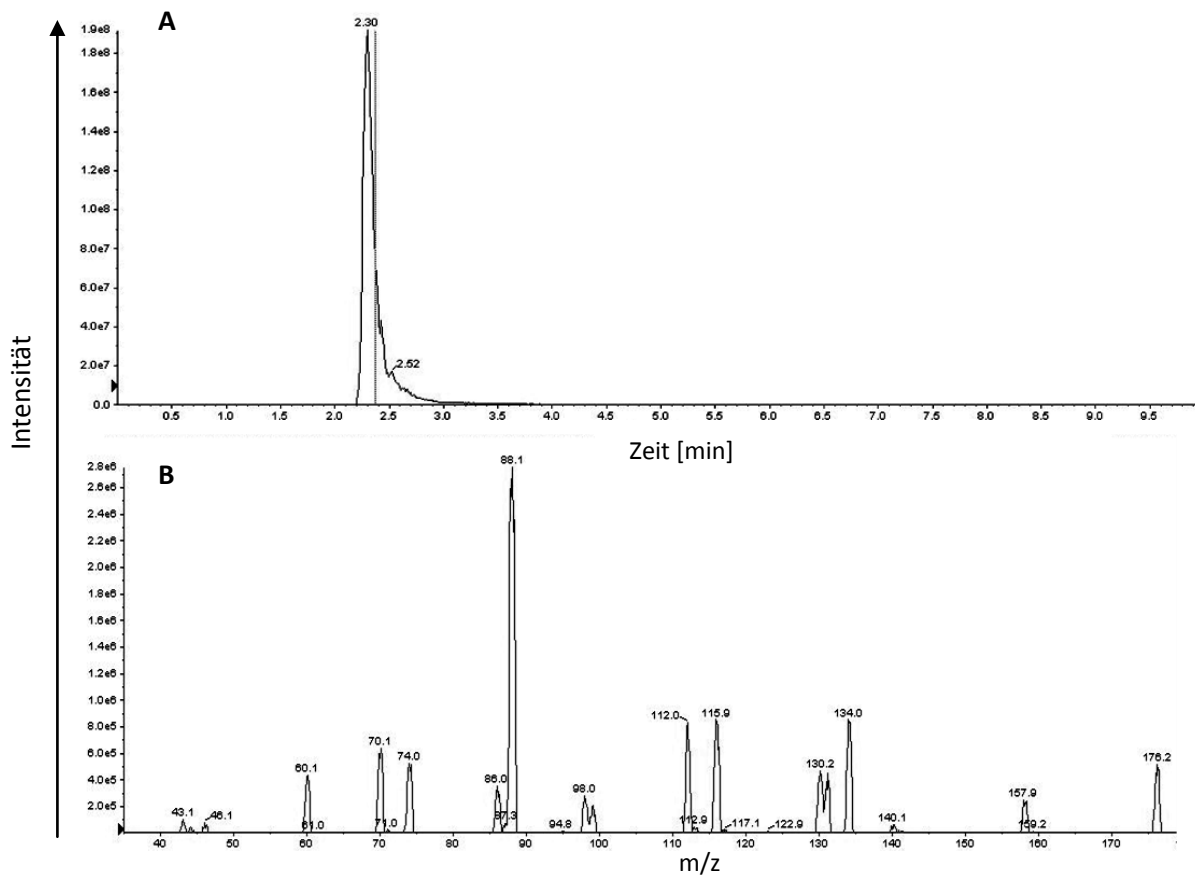


Abb. 3.29: (A) Produktionsstrom von GSA. (B) Produktionenspektrum von GSA zum Zeitpunkt 2,5 min. Kollisionsenergie 20 V.

3.3.3 SLC22A13h Transportmessung mit GSA

Durch ein Aufnahmeexperiment wurde untersucht, ob GSA von SLC22A13h als Substrat akzeptiert wird. Dazu wurden induzierte und nicht-induzierte HEK293-Zellen mit GSA inkubiert. Parallel wurden die Zellen, um den endogenen GSA-Gehalt zu ermitteln, mit Puffer ohne GSA Zusatz inkubiert.

Induzierte Zellen, die mit der Aufnahmelösung bzw. nur mit Puffer inkubiert wurden, zeigten einen GSA-Gehalt von etwa $100 \text{ pmol mg Protein}^{-1}$ (Abb. 3.30). In den nicht-induzierten Zellen wurde ein GSA-Gehalt etwa $650 \text{ pmol mg Protein}^{-1}$ ermittelt. Die SLC22A13h exprimierenden Zellen, denen kein GSA in der Aufnahmelösung angeboten wurde, zeigten den gleichen GSA-Gehalt wie die induzierten Zellen, die mit Substrat inkubiert wurden. Demnach wurde keine akute Aufnahme von GSA über SLC22A13h ermittelt. Gegenüber den nicht-induzierten Zellen besaßen die induzierten Zellen einen 6 x niedrigeren Gehalt an GSA.

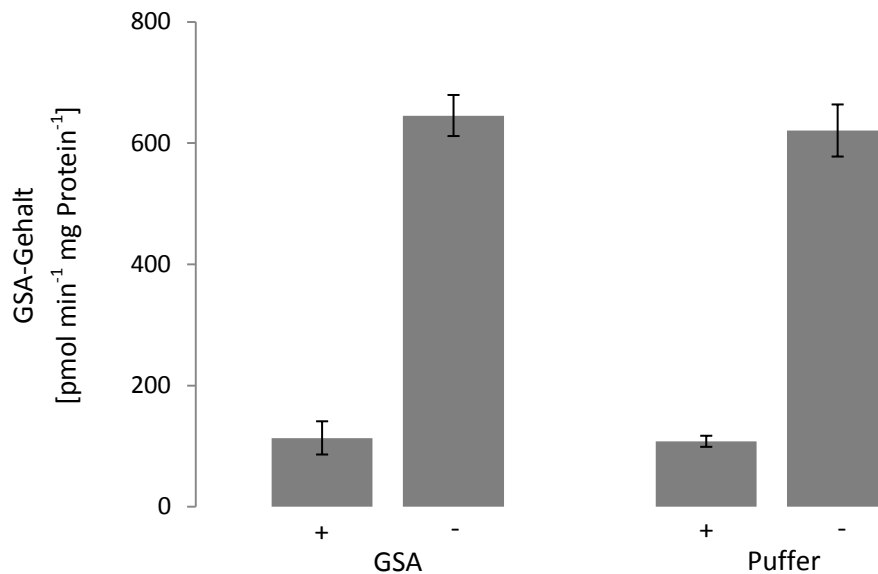


Abb. 3.30: Aufgetragen ist der zelluläre GSA-Gehalt von SLC22A13h induzierten (+) und nicht-induzierten (-) HEK293-Zellen. Die Zellen wurden in Puffer mit 10 μM GSA bzw. ohne für 1 min, bei 37 °C inkubiert. Die GSA-Quantifizierung in den Zellen erfolgte mittels LC-MS. Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwerts (SEM), $n = 3$.

3.3.4 SLC22A13h Transportmessung mit Substanzen des Harnstoffzyklus

GSA entsteht in Anwesenheit von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wie Hydroxylradikalen und Superoxiden, aus Argininosuccinat (ASA) [Aoyagi et al., 1996a,b, 1999, 2001; Cohen, 2003] (Abb. 3.31 A). In ASA ist die Struktur von GSA enthalten. SLC22A13h-exprimierende HEK293-Zellen zeigten einen erniedrigten GSA-Gehalt. Dieser verminderte Gehalt könnte auf einen SLC22A13h vermittelten ASA-Efflux zurückzuführen sein. Denn der daraus resultierende verminderte ASA-Gehalt in der Zelle würde einen verminderten GSA-Gehalt bewirken. ASA ist eine Komponente des Harnstoffzyklus. Somit könnte nicht nur ASA zu einem verminderten GSA-Gehalt in induzierten Zellen führen, sondern auch weitere Substanzen dieses Zyklus, insofern der Transporter diese aus der Zelle transportiert. Daher wurden die Substanzen ASA, Arginin, Ornithin, Citrullin und Aspartat auf einen SLC22A13h vermittelten Transport untersucht. Aufgrund dessen, dass induzierte Zellen schon vor der Inkubation einen erhöhten oder erniedrigten Gehalt dieser Substanzen aufweisen können, wurden diese, parallel mit nicht-induzierten Zellen, zusätzlich nur mit Puffer inkubiert.

Keine der obengenannten Verbindungen zeigte in Transporter exprimierenden und nicht-exprimierenden Zellen einen nennenswert veränderten Gehalt, welcher auf einen Transport von SLC22A13h zurückzuführen wäre (Abb. 3.31 B).

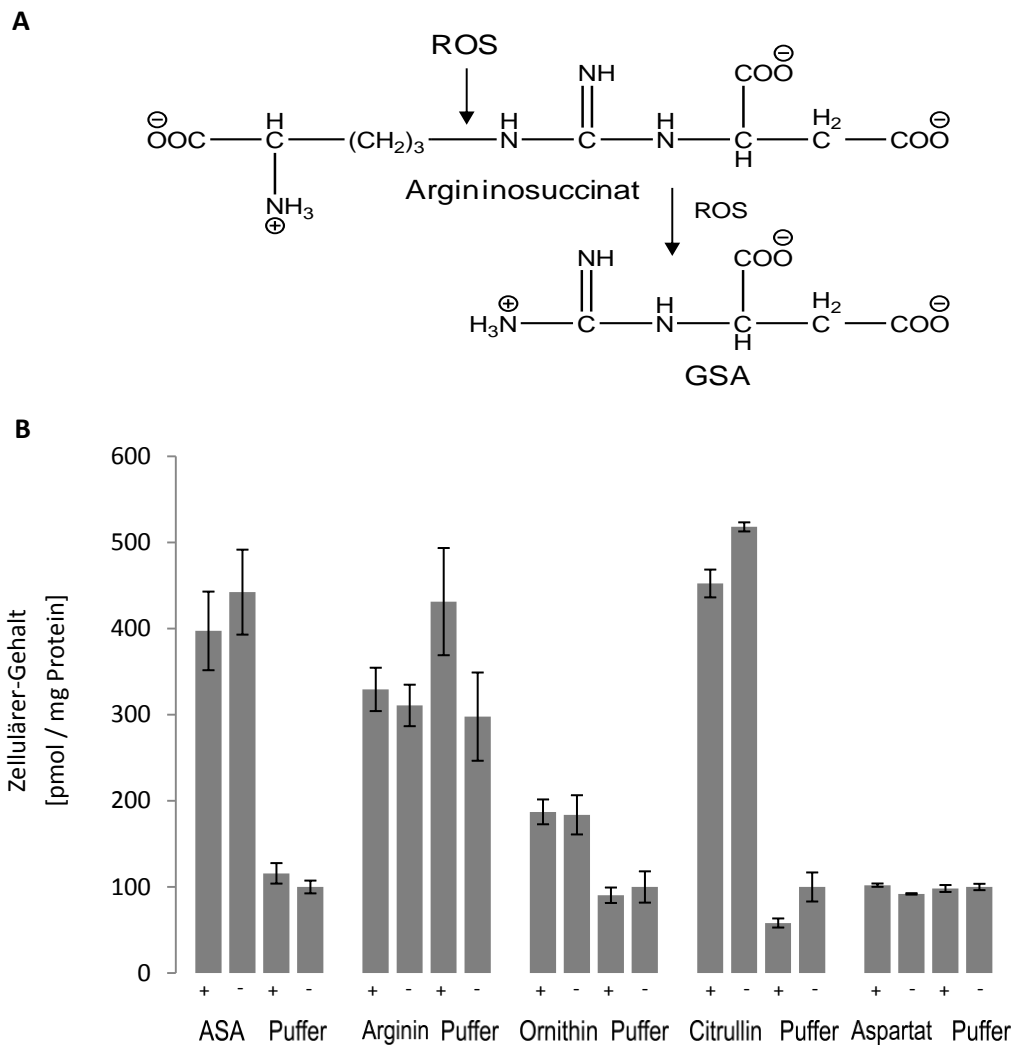


Abb. 3.31: (A) Durch Anwesenheit von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) entsteht aus Argininosuccinat GSA. (B) SLC22A13h induzierte (+) und nicht-induzierte (-) HEK293-Zellen wurden bei 37 °C mit ASA (15 min, 1 mM), Arginin (1 min, 0,01 mM), Ornithin (1 min, 0,01 mM), Citrullin (1 min, 0,1 mM) oder Aspartat (15 min, 1 mM) inkubiert. Die Quantifizierung in den Zellen erfolgte mittels LC-MS. Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwerts (SEM), n = 3.

3.3.5 SLC22A13h Transportmessung mit höheren GSA Konzentrationen und längeren Inkubationszeiten

Die vorherigen Aufnahmeversuche mit GSA wurden mit Konzentrationen von 10 μM und einer Inkubationszeit von 1 min durchgeführt. Da unter diesen Bedingungen kein Transport von GSA beobachtet werden konnte, wurde die Konzentration von GSA auf 100 bzw. 1000 μM erhöht. Zusätzlich wurde die Inkubationszeit bis 24 h gesteigert. (Zusätzlich betrug die Aufnahmezeit 60, 10 sowie 1 min). Zur Kontrolle wurden die Zellen nur mit Puffer inkubiert.

Für induzierte SLC22A13h Zellen, die 24 h ($9,8 \text{ nmol mg Protein}^{-1}$) bzw. 1 h ($1,7 \text{ nmol mg Protein}^{-1}$) mit 1000 μM GSA inkubiert wurden, konnte ein 6 x bzw. 2 x höherer GSA-Gehalt

gegenüber den jeweiligen nicht-induzierten Zellen ($1,7 \text{ nmol mg Protein}^{-1}$ bei 24 h bzw. $0,9 \text{ nmol mg Protein}^{-1}$ bei 1 h GSA Inkubation) ermittelt werden. Die 10-minütige $1000 \mu\text{M}$ GSA Inkubation ergab in induzierten und in nicht-induzierten Zellen einen ca. gleichen hohen zellulären GSA-Gehalt ($1 \text{ nmol mg Protein}^{-1}$). Wohingegen induzierte Zellen bei der 1-minütigen, $1000 \mu\text{M}$ GSA Inkubation ($0,5 \text{ nmol mg Protein}^{-1}$) sowie diejenigen die nur mit Puffer inkubiert wurden ($0,2 \text{ nmol mg Protein}^{-1}$), weniger GSA aufweisen als die jeweiligen nicht-induzierten Zellen ($1 \text{ nmol mg Protein}^{-1}$ bzw. $0,7 \text{ pmol mg Protein}^{-1}$) (Abb. 3.32). Aufgrund der Tatsache, dass der GSA-Gehalt mit zunehmender Inkubationszeit in den induzierten Zellen gegenüber den nicht-induzierten Zellen ansteigt, akzeptiert der Transporter SLC22A13h GSA als Substrat. Die Inkubation der Zellen mit $100 \mu\text{M}$ GSA zeigte in allen induzierten Zellen weniger GSA relativ zu nicht-induzierten Zellen. Beispielhaft ist die 24 h Inkubation in Abb. 3.32 dargestellt.

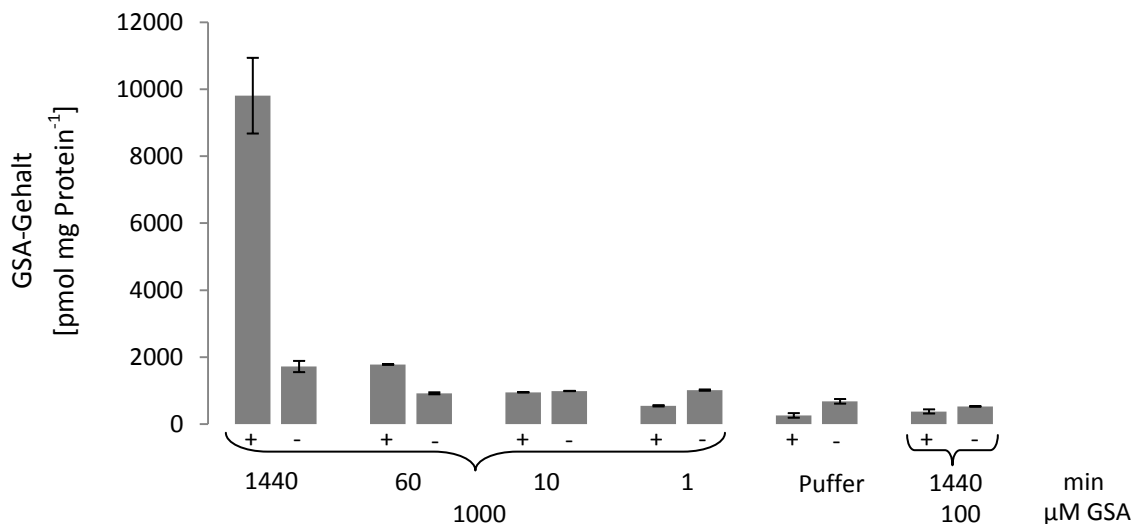


Abb. 3.32: Aufgetragen ist der zelluläre GSA-Gehalt von SLC22A13h induzierten (+) und nicht-induzierten (-) HEK293-Zellen. Die Zellen wurden 1440, 60, 10 sowie 1 min in Puffer mit 1000 oder $100 \mu\text{M}$ GSA bzw. ohne für 10 min, bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Die GSA-Quantifizierung in den Zellen erfolgte mittels LC-MS. Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwerts (SEM), $n = 3$. Durchführung des Aufnahmeversuchs B. Steinrücken.

Selbst bei einer Inkubation von 15 min mit 1 mM GSA konnte in induzierten Zellen ($1,3 \pm 0,1 \text{ nmol mg Protein}^{-1}$) relativ zu den nicht-induzierten Zellen ($0,7 \pm 0,05 \text{ nmol mg Protein}^{-1}$) ein höherer GSA-Gehalt beobachtet werden. Gegenüber induzierten Zellen ($0,1 \pm 0,01 \text{ nmol mg Protein}^{-1}$), die nur mit Puffer inkubiert wurden, besaßen diese sogar einen um den Faktor 11 höheren Gehalt an GSA (Abb. 3.33). Unter Vorbehalt, dass bei solchen hohen Konzentrationen und langen Inkubationszeiten sich die Aufnahme schon in einem gesättigten Bereich befindet und die eingesetzte Substratkonzentration größer als der K_m ist, ergibt sich für SLC22A13h zu GSA eine TE von $0,07 \pm 0,01 \mu\text{l min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$.

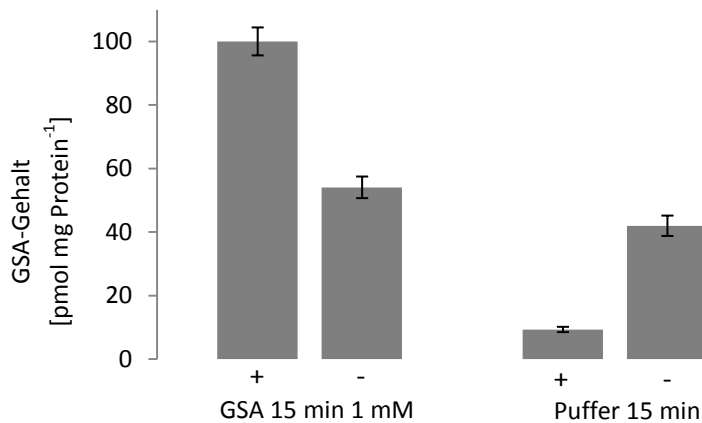


Abb. 3.33: Aufgetragen ist der zelluläre GSA-Gehalt von induzierten (+) und nicht-induzierten (-) SLC22A13h HEK293-Zellen. Die Zellen wurden in Puffer mit 1 mM GSA bzw. ohne für 15 min, bei 37 °C inkubiert. Die GSA-Quantifizierung in den Zellen erfolgte mittels LC-MS. Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwerts (SEM), n = 3.

3.3.6 Trans-Stimulation von SLC22A13 mit GSA und PAH

Ein Transporter mit einer Substratbindungsstelle kann wechselweise immer nur auf einer Membranseite Substrat binden. Eine hohe Substratkonzentration auf der Zielseite (trans) beschleunigt die Rückkehr der Substratbindungsstelle zur Quellenseite (cis) des Transporters, beeinflusst dann aber nicht den Substrattransport von cis nach trans. Dieser Vorgang wird als trans-Stimulation bezeichnet. Theoretisch muss nicht jeder membranständige Transporter trans-Stimulation zeigen [Tanford et al 1986]. Kann der Substrattransport aber trans-stimuliert, also durch einen Überschuss von Substrat auf der Zielseite beschleunigt werden, so ist der Beweis erbracht, dass es sich bei dem Protein nicht um einen Kanal, sondern um einen Transporter handelt [Tanford et al 1986].

SLC22A13h transportiert in exprimierenden HEK293-Zellen, insofern extrazellulär keine hohen Konzentrationen vorliegen, GSA aus der Zelle. Durch Zugabe eines Substrats in das extrazelluläre Medium sollte der Efflux-Transport von GSA beschleunigt bzw. trans-stimuliert werden. Um dieses zu untersuchen wurden SLC22A13h induzierte Zellen 24 h mit 1 mM GSA beladen und nach eiskaltem Waschen für 10 min mit 100 µM para-Aminohippurat (PAH) bei 37 °C inkubiert. (PAH ist ein Substrat für SLC22A13 (siehe 3.3.10)). Zum Vergleich wurden die Zellen parallel nur mit Puffer inkubiert sowie direkt lysiert.

Der GSA-Gehalt von SLC22A13h exprimierenden Zellen, die mit PAH inkubiert wurden, betrug 48 ± 3 %, verglichen mit den direkt lysierten Zellen, die auf 100 % gesetzt wurden. Die nur mit Puffer inkubierten Zellen enthielten einen GSA-Gehalt von 63 ± 7 % (Abb. 3.34). Daraus resultiert, dass der katalysierte Efflux von GSA über SLC22A13h durch PAH im Extrazellulärraum trans-stimulierbar ist.

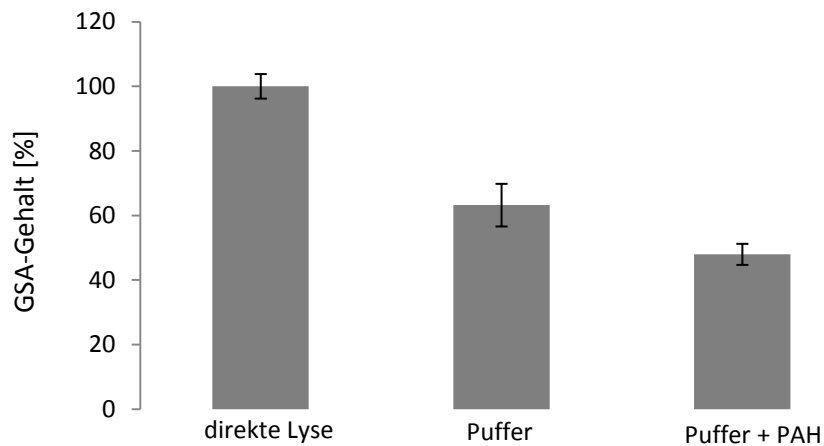


Abb. 3.34: Aufgetragen ist der GSA-Gehalt in % bezogen auf direkt lysierte HEK293-Zellen. SLC22A13h induzierte Zellen wurden 24 h mit 1 mM GSA beladen und nach eiskaltem Waschen entweder 10 min mit 100 μ M PAH inkubiert (Balken rechts) oder nur mit Puffer inkubiert (Balken Mitte) sowie direkt lysiert (Balken links). Die GSA-Quantifizierung in den Zelllysaten erfolgte mittels LC-MS. Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwerts (SEM), $n = 3$.

3.3.7 Cis-Inhibition der durch SLC22A13 vermittelte PAH-Aufnahme

Hohe GSA Konzentrationen in der extrazellulären Flüssigkeit veranlassen den Transporter SLC22A13h in HEK293-Zellen diese Verbindung ins Zytosol zu transportieren. Würde neben GSA das PAH mit in den Aufnahmepuffer gegeben werden, so sollten beide Substanzen um die SLC22A13h Bindungsstelle konkurrieren, das Resultat wäre eine verminderte GSA- oder PAH-Aufnahme. Dieser Vorgang wird als cis-Inhibition bezeichnet. Eine verminderte PAH-Aufnahme in Anwesenheit von GSA wäre ein weiteres Indiz dafür, dass es sich hierbei um Substrate für SLC22A13h handelt. Daher wurden SLC22A13h induzierte Zellen mit PAH, sowie mit PAH und GSA im Aufnahmepuffer inkubiert und der PAH-Gehalt in den Zellen mit der LC-MS quantifiziert.

Der zelluläre PAH-Gehalt ohne GSA in der Aufnahmelösung war in den induzierten Zellen 21 x höher als in nicht-induzierten Zellen. Durch Zugabe von GSA in die PAH-Aufnahmelösung war der PAH-Gehalt in den induzierten Zellen um $64 \pm 2\%$ vermindert (Abb. 3.35). Demnach ist die PAH-Aufnahme über SLC22A13h durch GSA inhibierbar.

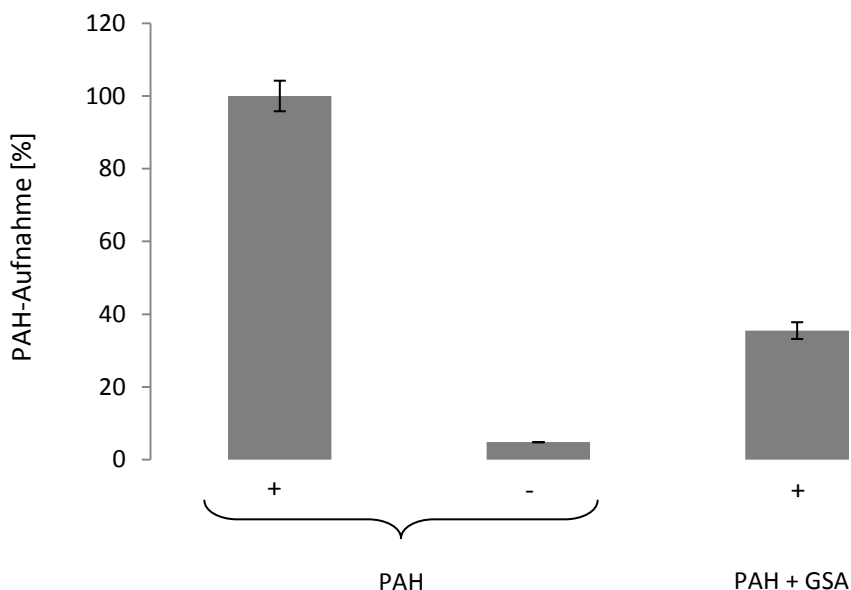


Abb. 3.35: Aufgetragen ist die PAH-Aufnahme. SLC22A13h induzierte (+) und nicht-induzierte (-) HEK293-Zellen wurden mit 1 mM PAH für 15 min, bei 37 °C inkubiert (Balken links und Mitte). Balken rechts: SLC22A13h induzierte Zellen wurden mit 1 mM PAH und 1 mM GSA für 15 min, bei 37 °C inkubiert. Die PAH-Quantifizierung in den Zellen erfolgte mittels LC-MS. Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwerts (SEM), n = 3.

3.3.8 SLC22A13h Transportmessungen von Guanidinoverbindungen mit Strukturähnlichkeit zu GSA

Neben GSA wurden weitere Substanzen, die ebenfalls eine Guanidinogruppe tragen und Strukturähnlichkeit zu GSA aufweisen, auf einen SLC22A13h vermittelten Transport untersucht. Diese Substanzen waren Guanidiniumacetat (GAA), Guanidiniumglutarat (GGA) Guanidiniumpropionat (GPA) sowie Kreatin (Abb. 3.36). Die Quantifizierung von GAA, GGA und GPA erfolgte mit der LC-MS. Die Kreatin Messung erfolgte durch radioaktiv markiertes ^3H -Kreatin.

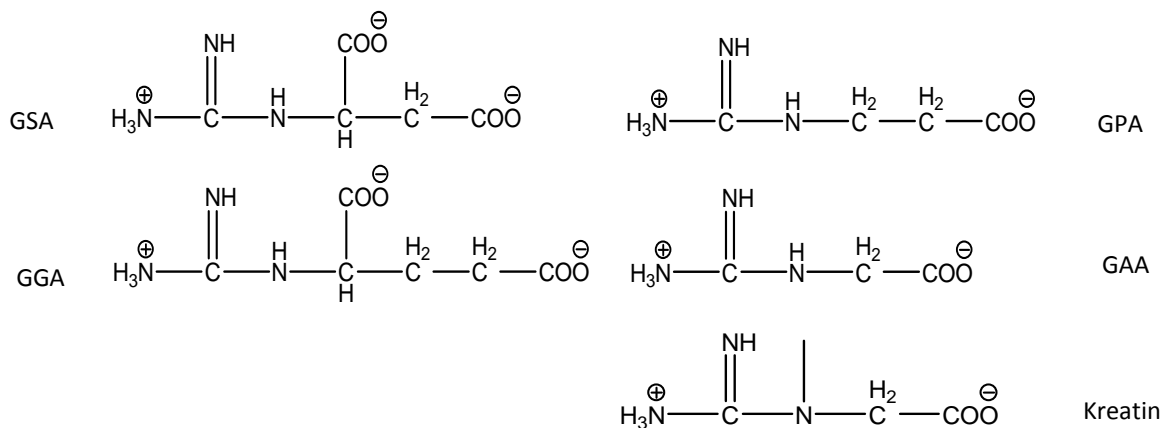


Abb. 3.36: Chemische Strukturen: GSA = Guanidiniumsuccinat, GGA = Guanidiniumglutarat, GPA = Guanidiniumpropionat, GAA = Guanidiniumacetat.

Für GGA konnte in induzierten SLC22A13h Zellen, die sowohl mit GGA als auch nur mit Puffer inkubiert wurden, ein verminderter Gehalt gegenüber nicht-induzierten Zellen ermittelt werden (Abb. 3.37). Das Verhältnis des GGA-Gehalts von Transporterzellen zu Kontrollzellen war, bei den mit GGA inkubierten Zellen kleiner (ca. Faktor 1,2) gegenüber den Zellen, die nur mit Puffer inkubiert wurden (Faktor 1,8). Dieses lässt auf einen Transport von GGA über SLC22A13h schließen. Die TE für SLC22A13h zu GGA betrug $0,02 \pm 0,01 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$. Für GPA und GAA wurden keine nennenswerten Unterschiede in induzierten und nicht-induzierten Zellen beobachtet. Der Vergleich zu den Zellen, die nur mit Puffer inkubiert wurden, zeigte, dass HEK293-Zellen diese Substanzen stark in die Zellen aufnehmen (Abb. 3.37), was auf einen endogenen Transporter hindeuten könnte.

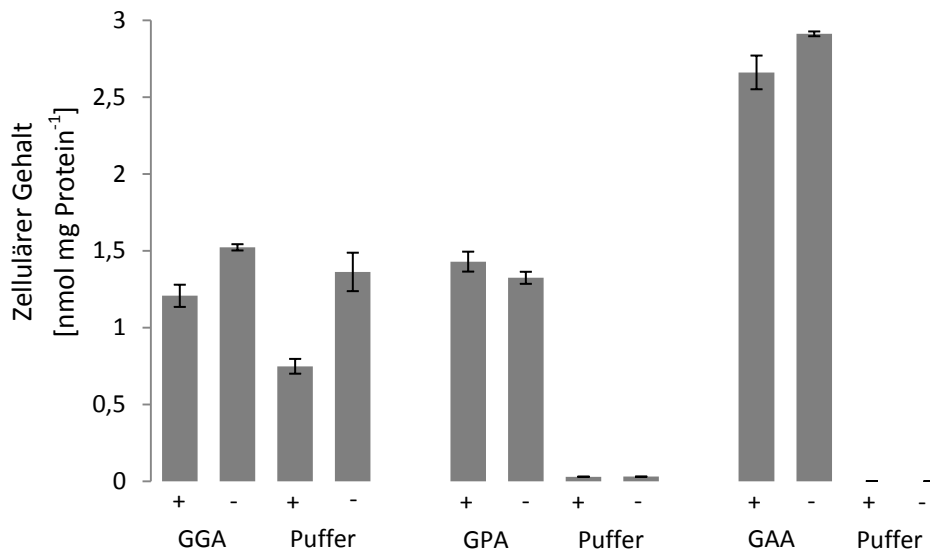


Abb. 3.37: Aufgetragen ist der GGA-, GPA- und GAA-Gehalt von SLC22A13h induzierten (+) und nicht-induzierten (-) HEK293-Zellen, die 15 min mit Puffer oder mit GGA, GPA bzw. GAA jeweils 1 mM, bei 37°C inkubiert wurden. Die Quantifizierung in den Zellen erfolgte mit der LC-MS. Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwerts (SEM), n = 3

Für Kreatin konnte eine schwache Aufnahme in SLC22A13h induzierten ($0,2 \text{ pmol min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$) relativ zu den nicht-induzierten Zellen ($0,17 \text{ pmol min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$) beobachtet werden (Abb. 3.38). Die daraus resultierende TE für Kreatin betrug $0,5 \pm 0,1 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$. Diese niedrige Transporteffizienz zeigt, dass Kreatin kein gutes Substrat für SLC22A13 ist.

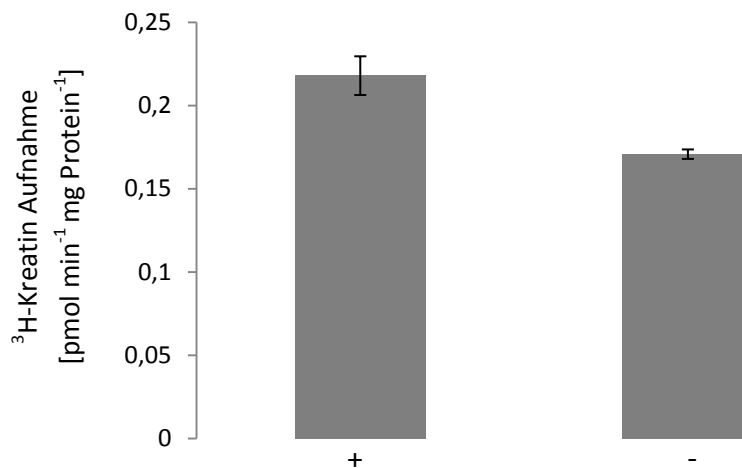


Abb. 3.38: Aufgetragen ist die $^3\text{H-Kreatin}$ Aufnahme von SLC22A13h induzierten (+) und nicht-induzierten (-) HEK293-Zellen, die 1 min mit $0,1 \mu\text{M } ^3\text{H-Kreatin}$, bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$, inkubiert wurden. Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwerts (SEM), $n = 3$. Durchführung des Aufnahmeversuchs B. Steinrücken.

3.3.9 Vergleich des GSA- und GGA-Transports zwischen SLC22A13h, URAT1h und OAT1h

Um den für SLC22A13h vermittelten Transport von GSA und GGA besser einordnen zu können, wurden diese Substrate auf die Anionentransporter OAT1h und URAT1h untersucht. Dazu wurden die beiden Transporter kloniert (siehe 2.1) und anschließend über den Expressionsvektor pEBTetD in HEK293-Zellen zur Expression gebracht. GSA und GGA wurden jeweils in HEK293-Zellen 24 h nach Induktion bzw. in Kontrollzellen ohne Induktion der Transporter, quantifiziert. Parallel wurden ebenfalls SLC22A13h Zellen als Referenz ebenso behandelt. Der zelluläre GSA- und GGA-Gehalt von SLC22A13h exprimierenden Zellen wurde auf 100 % gesetzt.

Der verminderte Gehalt von GSA und GGA in induzierten SLC22A13h-Zellen ($100 \pm 5\%$ bzw. $100 \pm 4,7\%$) gegenüber nicht-induzierten Zellen ($431 \pm 25\%$ bzw. $194 \pm 11\%$) war nicht nur auf diese Zelllinie begrenzt, sondern konnte ebenfalls in OAT1h exprimierenden Zellen nachgewiesen werden ($173 \pm 15\%$ bzw. $4 \pm 0,3\%$) im Vergleich zu nicht-induzierten Zellen ($452 \pm 61\%$ bzw. $144 \pm 22\%$) (Abb. 3.39). Demnach zeigten die OAT1h induzierten Zellen gegenüber nicht-induzierten Zellen einen um den Faktor 2,6 für GSA bzw. Faktor 40 für GGA niedrigeren Gehalt. Für induzierte SLC22A13h Zellen wurde in dieser Versuchsreihe, gegenüber nicht-induzierten SLC22A13h Zellen für GSA ein 4,3 x bzw. für GGA ein 2 x niedrigerer Gehalt ermittelt. Die Expression des URAT1h Transporters führte zu keiner Veränderung im intrazellulären GSA- bzw. GGA-Gehalt. Vielmehr war die Konzentration von GSA und GGA ($378 \pm 29\%$ bzw. $164 \pm 22\%$) in den induzierten URAT1h Zellen, dem der

nicht-induzierten URAT1h ($408 \pm 46\%$ bzw. $180 \pm 29\%$), dem der SLC22A13h und OAT1h Zellen, ähnlich (Abb. 3.29).

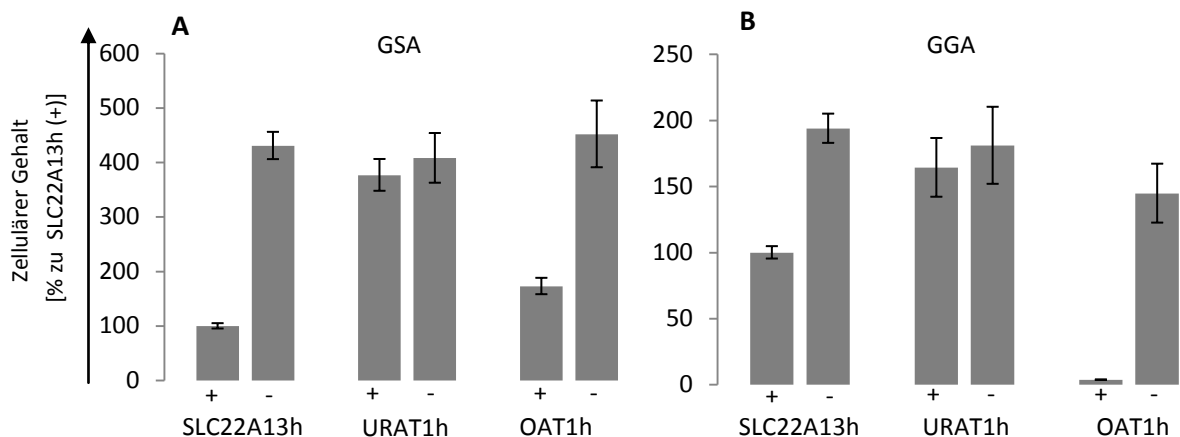


Abb. 3.29: Aufgetragen ist der GSA (A) und GGA (B) Gehalt von SLC22A13h, URAT1h und OAT1h induzierten (+) und nicht-induzierten (-) HEK293-Zellen. Der zelluläre GSA-Gehalt in induzierten SLC22A13h Zellen wurde auf 100 % gesetzt. GSA und GGA wurden jeweils 24 h nach Induktion der Transporter in den Zelllysaten mittels LC-MS quantifiziert. Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwerts (SEM), $n = 3$. Durchführung des Aufnahmeversuchs B. Steintrücken.

3.3.10 SLC22A13h Transportmessungen mit Substraten der Organischen Anionen Transporter der SLC22-Familie

Innerhalb der SLC22 Familie steht der Transporter SLC22A13 den Organischen Anionen Transportern am nächsten. Das Modellsubstrat für OAT1 und OAT3 sind das nicht-physiologische PAH und das physiologische α -Ketoglutarat. Der Harnsäuretransporter URAT1 akzeptiert Urat als Substrat [Rizwan and Burckhardt, 2007; Anzai et al., 2006]. So wurde untersucht ob SLC22A13h PAH, Urat oder α -Ketoglutarat als Substrat akzeptiert. Die Messung erfolgte mit den entsprechenden Tritium markierten Substanzen.

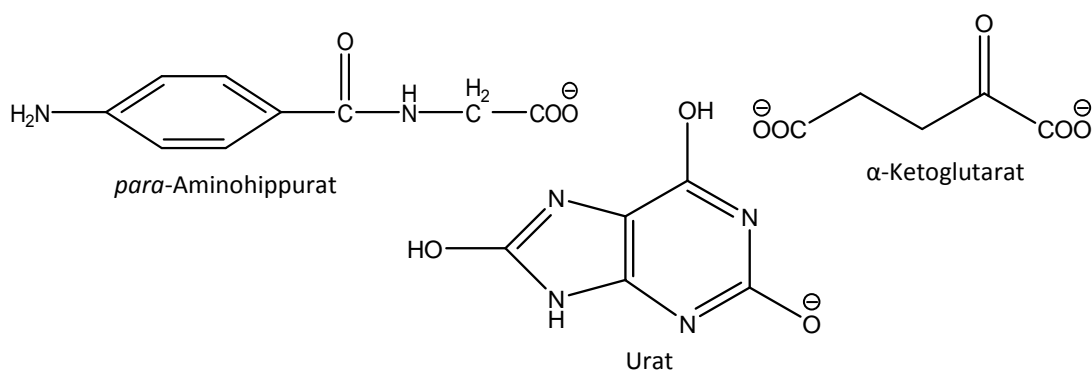


Abb. 3.30: Strukturformeln

In den induzierten Zellen konnte jeweils eine Aufnahme über SLC22A13h für PAH ($1,21 \pm 0,34 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$), Urat ($0,4 \pm 0,1 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$) und α -Ketoglutarat ($0,61 \pm 0,01 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$) ermittelt werden. Zellen ohne induzierten Transporter zeigten für PAH ($0,34 \pm 0,01 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$) einen um den Faktor 1,7, für Urat ($0,23 \pm 0,01 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$) um den Faktor 1,8 und für α -Ketoglutarat ($0,36 \pm 0,01 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$) um den Faktor 3,5 niedrigere Aufnahme gegenüber den jeweiligen Transporterzellen (Abb. 3.31). Die TE für SLC22A13 zu PAH betrug 9, zu Urat 1,7 und zu α -Ketoglutarat $2,5 \mu\text{l min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$.

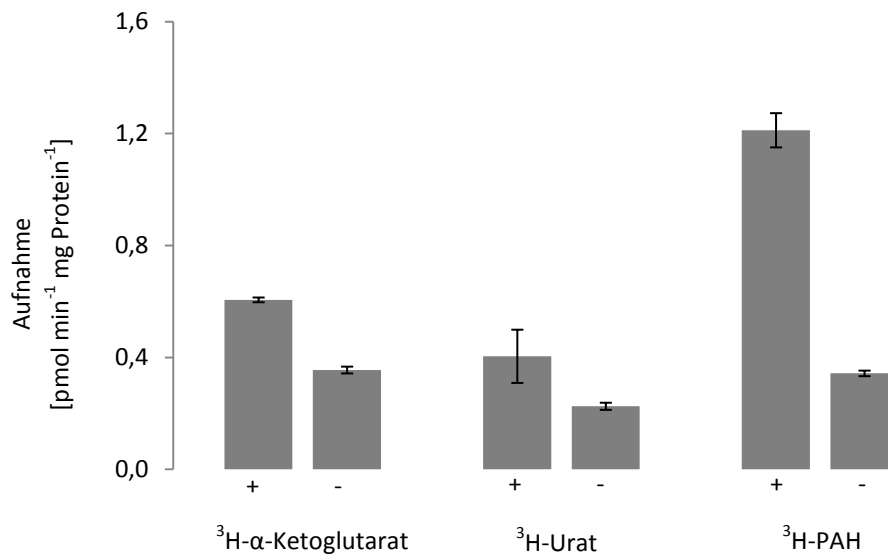


Abb. 3.31: Aufgetragen sind die $^3\text{H-PAH}$ -, $^3\text{H-Urat}$ - und $^3\text{H-}\alpha\text{-Ketoglutarat}$ -Aufnahme von SLC22A13h induzierten (+) und nicht-induzierten (-) HEK293-Zellen, die mit $0,1 \mu\text{M}$ $^3\text{H-PAH}$, $^3\text{H-Urat}$ oder $^3\text{H-}\alpha\text{-Ketoglutarat}$ für 1 min, bei 37°C inkubiert wurden. Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwerts (SEM), $n = 3$.

3.3.11 Vergleich von PAH, Urat und Glutarat: Transportmessungen zwischen SLC22A13h, URAT1h und OAT1h

Um den Transport von PAH, Urat und α -Ketoglutarat durch SLC22A13h, mit dem in dieser Arbeit verwendetem System, besser einordnen zu können, wurden diese Substrate ebenfalls auf die Transporter URAT1h und OAT1h getestet. Die Analyse erfolgte mittels LC-MS. Stellvertretend für α -Ketoglutarat wurde das nicht-physiologische Glutarat verwendet, da dieses nicht endogen in HEK293-Zellen enthalten ist und somit ein besseres Signal-Hintergrundverhältnis bei einer Aufnahme erzielt. Der SLC22A13h vermittelte Transport für PAH, Urat und Glutarat wurde jeweils auf 100 % gesetzt.

Der zelluläre PAH-Gehalt für induzierte OAT1h Zellen ($336 \pm 8 \%$) gegenüber den induzierten SLC22A13h Zellen ($100 \pm 2 \%$) war um den Faktor 3,4 höher. Demnach

transportiert SLC22A13h PAH schlechter als OAT1h. Für URAT1h wurde wie erwartet keine Aufnahme von PAH ermittelt [Enomoto et al., 2002]. Der PAH-Gehalt der nicht-induzierten SLC22A13h, URAT1h und OAT1h Zelllinien betrug ca. 10 % (Abb. 3.32.A).

Der zelluläre Gehalt von Urat über OAT1h (347 ± 7 %) war in induzierten Zellen 3,5 x höher als in induzierten SLC22A13h Zellen (100 ± 11 %) bzw. 9,6 x höher gegenüber induzierten URAT1h Zellen (36 ± 4 %). Für induzierte SLC22A13h Zellen konnte ein 3 x höherer Gehalt gegenüber den induzierten URAT1h Zellen beobachtet werden. Daraus resultiert, dass SLC22A13h, zumindest unter den hier vorliegenden Bedingungen, Urat besser transportiert als URAT1h, jedoch schlechter als OAT1h. Der Urat-Gehalt in den nicht-induzierten SLC22A13h, URAT1h und OAT1h Zelllinien betrug ca. 12 % (Abb. 3.32 B).

Für Glutarat wurde ebenfalls der stärkste Gehalt (285 ± 20 %) in OAT1h exprimierenden HEK293-Zellen beobachtet. Dies entspricht einen um den Faktor 2,9 höheren Glutarat-Gehalt gegenüber den SLC22A13h exprimierenden Zellen (100 ± 1 %). Somit wird der Transport von Glutarat über SLC22A13h, zumindest in dem hier verwendeten System, schlechter katalysiert als über OAT1h. Für URAT1h wurde keine Aufnahme von Glutarat ermittelt. Die nicht-induzierten SLC22A13h, URAT1h und OAT1h Zelllinien zeigten einen Glutarat-Gehalt von ca. 33 % (Abb. 3.32 C).

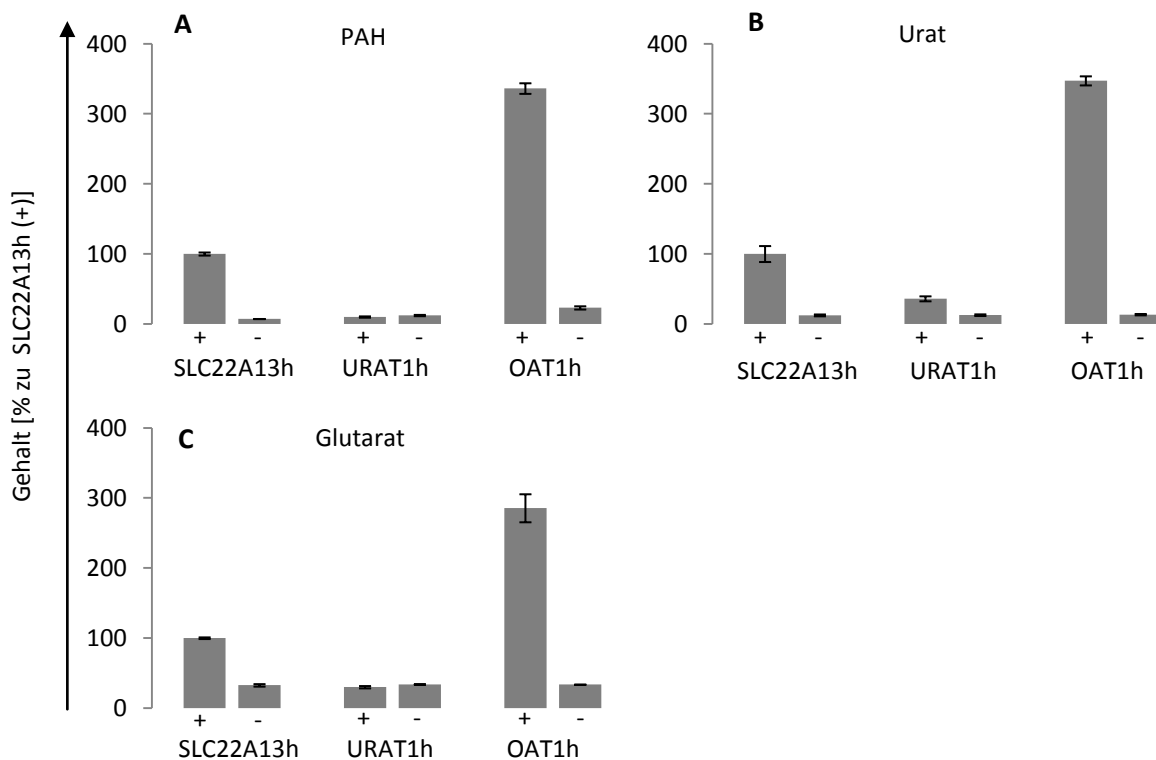


Abb. 3.32: Aufgetragen ist der PAH (A), Urat (B) bzw. Glutarat (C) Gehalt von SLC22A13h, URAT1h und OAT1h induzierten (+) und nicht-induzierten (-) HEK293-Zellen. Der SLC22A13h (+) Gehalt wurde auf 100 % gesetzt. Die Inkubation erfolgte für 15 min bei 37 °C mit 1 mM Substrat. Die Quantifizierung in den Zellen erfolgte mittels LC-MS. Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwerts (SEM), n = 3. Durchführung des Aufnahmeversuchs B. Steinrücken.

3.3.12 SLC22A13 Transportmessungen mit Glycinverbindungen

Das Molekül PAH enthält in seiner Struktur ein Glycin. Da PAH von SLC22A13 als Substrat akzeptiert wird, wurden weitere Verbindungen, die ein Glycin oder eine Glycin-ähnliche Struktur enthalten, auf einen Transport untersucht. Dies waren: Glycocholol, Glycylprolin, Leucylglycin, Prolylglycin und das Pantothenat (Abb. 3.33). Um primär eine Aufnahme beobachten zu können, erfolgte die Inkubation mit den Substanzen in hohen Konzentrationen (1 mM) und einer Inkubationszeit von 15 min. Parallel wurden die Zellen wieder nur mit Puffer inkubiert.

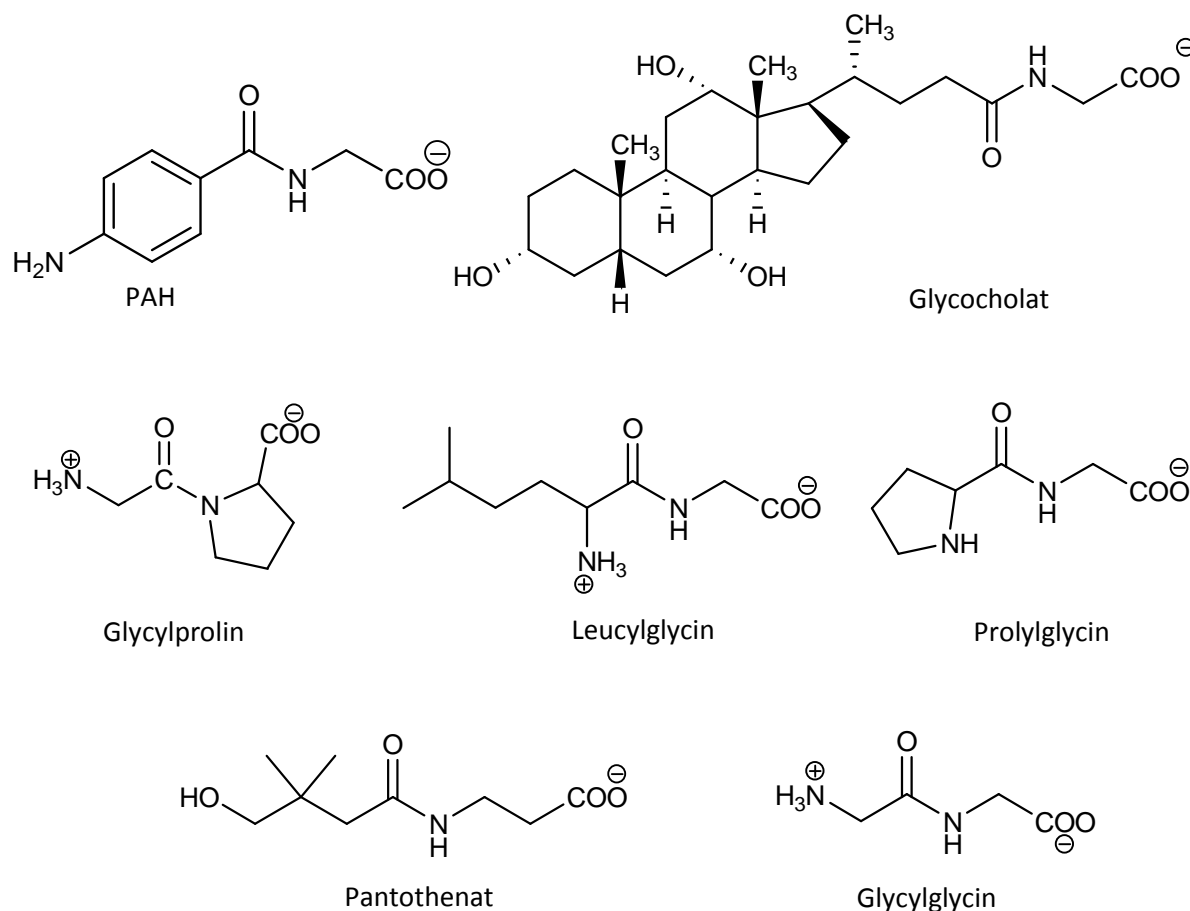


Abb. 3.33: Strukturformeln

Bis auf Leucylglycin konnte für Glycocholol ($1 \text{ nmol mg Protein}^{-1}$), Glycylprolin ($1 \text{ nmol mg Protein}^{-1}$), Prolylglycin ($0,7 \text{ nmol mg Protein}^{-1}$) und das Pantothenat ($24 \pm 3 \text{ nmol mg Protein}^{-1}$) jeweils in induzierten SLC22A13 Zellen ein höherer Gehalt relativ zu den nicht-induzierten Zellen (für Glycocholol $0,6 \pm 0,1$, Glycylprolin $0,1 \pm 0,03$, Prolylglycin $0,2$ und für das Pantothenat $10 \text{ nmol mg Protein}^{-1}$) ermittelt werden (Abb. 3.34). Die Inkubation mit Puffer zeigte, dass nur das Pantothenat in größeren Mengen (nanomolarem Bereich) in den HEK293-Zellen endogen vorhanden ist. Hierbei konnte in induzierten Zellen ($3,9 \pm 0,2 \text{ nmol}$

mg Protein⁻¹) ein etwas verminderter Gehalt gegenüber den nicht-induzierten Zellen beobachtet werden. Aus diesen Daten geht hervor, dass Glycocholat, Glycylprolin, Prolylglycin und das Pantothenat Substrate für SLC22A13h sind.

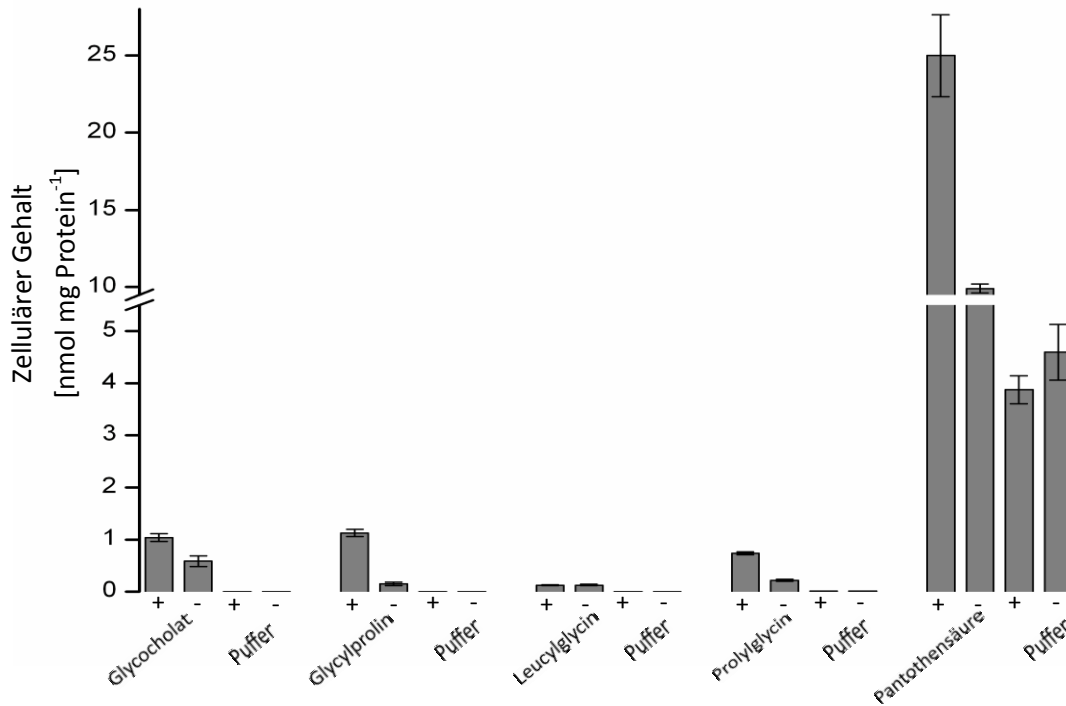


Abb. 3.34: Aufgetragen ist der zelluläre Gehalt von induzierten (+) und nicht-induzierten (-) SLC22A13h-Zellen, die 15 min mit 1 mM Glycocholat, Glycylprolin, Leucylglycin, Prolylglycin und Pantothenat, bei 37 °C inkubiert wurden. Die Quantifizierung in den Zellen erfolgte mittels LC-MS. Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwerts (SEM), n = 3.

Um genauere Aussagen über die Transporteffizienz machen zu können, wurden die auf einen Transport positiv getesteten Substanzen dem Transporter in niedrigeren Konzentrationen (10 µM) und einer Inkubationszeit von 1 min angeboten. Zusätzlich wurde die Substanz Glycylglycin untersucht sowie für einen besseren Vergleich, die Zellen mit PAH inkubiert.

Für Transporterzellen, die mit PAH inkubiert wurden, konnte eine erwartete PAH-Aufnahme ermittelt werden (Abb. 3.35). Für Glycocholat, Glycylglycin und für Pantothenat wurde unter diesen Bedingungen keine Aufnahme durch SLC22A13h beobachtet (Abb. 3.35). Allerdings konnte für das Pantothenat erneut in den induzierten Zellen, die mit Puffer inkubiert wurden, ein leicht verminderter Gehalt, gegenüber den nicht-induzierten Zellen, detektiert werden. Induzierte Zellen, die mit Glycylprolin inkubiert wurden (23 ± 3 pmol min⁻¹ mg Protein⁻¹) zeigten einen höheren Gehalt dieser Substanz gegenüber den jeweiligen nicht-induzierten Zellen (16 ± 1 pmol min⁻¹ mg Protein⁻¹). Zu den induzierten Zellen, die nur mit Puffer inkubiert wurden (9 ± 1 pmol min⁻¹ mg Protein⁻¹), besaßen diese Zellen eine 2,6 x höheren Gehalt

(Abb. 3.35). Bei den Transporterzellen, denen Prolylglycin als Substrat angeboten wurde ($21 \pm 1 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$), konnte ein leicht erhöhter Gehalt relativ zu Kontrollzellen ($19 \pm 1 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$), die ebenfalls mit dieser Substanz inkubiert wurden, beobachtet werden. Durch den Vergleich der jeweiligen induzierten Zellen, die mit Puffer inkubiert ($23 \pm 3 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$) wurden, zeigte sich eine Aufnahme von Prolylglycin durch SLC22A13h (Abb. 3.35.). Für Glycylprolin und Prolylglycin konnte eine TE von 1 bzw. 0,5 $\mu\text{l min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$ ermittelt werden.

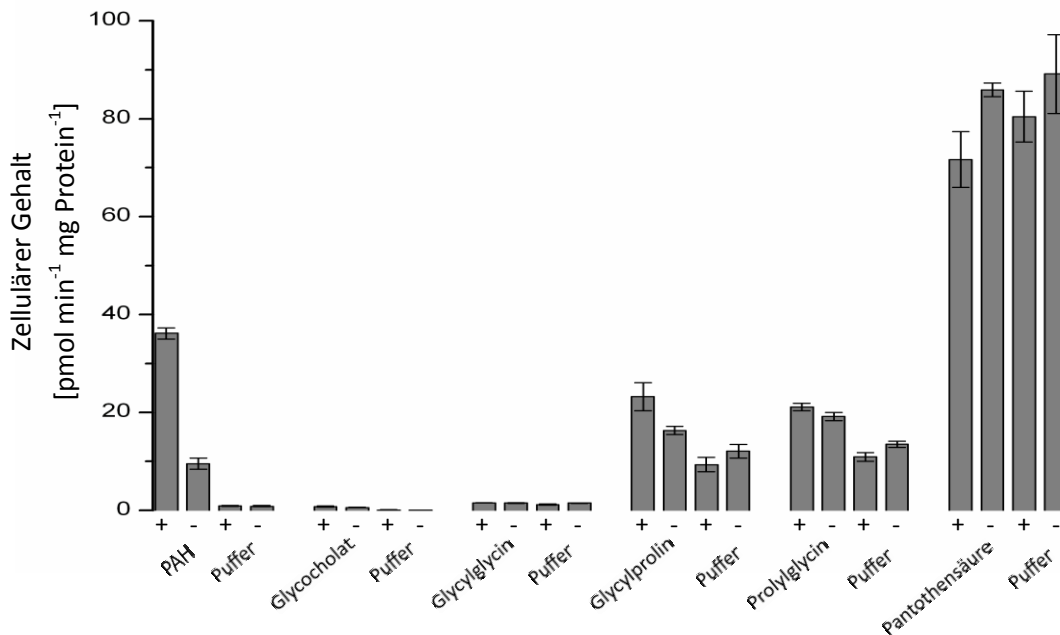


Abb 3.35: Aufgetragen ist der zelluläre Gehalt von induzierten (+) und nicht-induzierten (-) SLC22A13h-Zellen, die 1 min mit 10 μM PAH, Glycocholat, Glycylglycin, Glycylprolin, Prolylglycin und Pantothenat, bei 37 °C inkubiert wurden. Die Quantifizierung in den Zellen erfolgte mittels LC-MS. Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwerts (SEM), $n = 3$.

3.3.13 SLC22A13h, OAT1h und OAT2h Transportmessungen mit cGMP und 2-Deoxyguanosin

Neben den erwähnten Substanzen, ist der second Messenger cGMP ein weiteres Substrat für OAT1 und wird ebenfalls gut von OAT2 transportiert [Cropp et al.,2008]. SLC22A13 steht dem OAT2 innerhalb der SLC22A13-Familie am nächsten. Aufgrund dessen wurde untersucht ob SLC22A13 cGMP als Substrat akzeptiert. Da OAT2 neben cGMP, das 2-Deoxyguanosin (2-DG) transportieren soll [Cropp et al., 2008], wurde dieses ebenfalls als Substrat für SLC22A13h getestet. Für einen besseren Vergleich wurden OAT1h und OAT2h parallel mit cGMP und 2-DG inkubiert.

Für SLC22A13h induzierte Zellen ($5 \pm 0,5 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$), die mit cGMP inkubiert wurden, konnte kein signifikanter Unterschied im zellulären cGMP-Gehalt, im Vergleich zu den nicht-induzierten Zellen ($5 \pm 0,5 \text{ pmol min mg Protein}^{-1}$), beobachtet werden

(Abb. 3.36 A). In Zellen, die nur mit Puffer inkubiert wurden, ließ sich nur sehr wenig cGMP detektieren (aufgrund dessen ist die Puffer Inkubation in Abb. 3.36 A nicht dargestellt). In OAT1h induzierten Zellen ($103 \pm \text{pmol min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$) wurde ein 9 x höher cGMP Gehalt zu den jeweiligen nicht induzierten Zellen ($11 \pm 1 \text{pmol min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$) ermittelt. Die TE betrug hierbei $9 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Proteine}^{-1}$. Für OAT2h zeigten induzierte Zellen ($24 \pm 2 \text{pmol min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$) nur einen 2 x erhöhten cGMP-Gehalt relativ zu den entsprechenden nicht-induzierten Zellen ($11 \pm 0,1 \text{pmol min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$) (Abb. 3.36 A). Hierbei ließ sich eine TE von $1 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$ ermitteln. Aus diesen Daten resultiert, dass cGMP nicht von SLC22A13h transportiert wurde und für OAT2h, zumindest in dem hier verwendeten System, ein schlechtes Substrat ist.

SLC22A13h, OAT1h und OAT2h, die mit 2-DG Inkubiert wurden, zeigten keinen Unterschied zwischen induzierten und nicht-induzierten Zellen. Es scheint, dass 2-DG, unter den gegebenen experimentellen Bedingungen, kein Substrat für diese Transporter darstellt (Abb. 3.36. B).

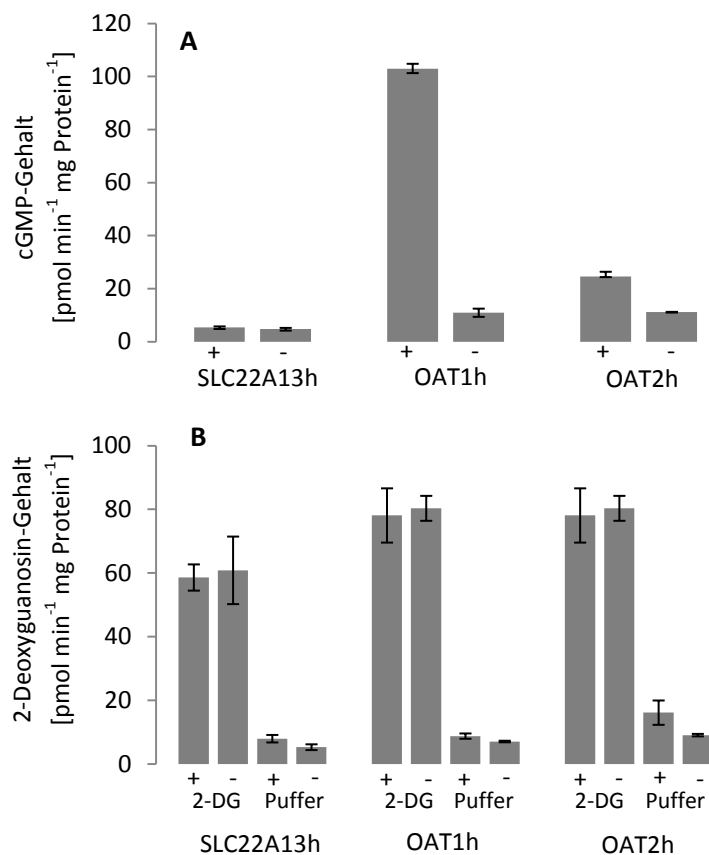


Abb. 3.36: Aufgetragen ist der cGMP- (A) und 2-Deoxyguanosin-Gehalt (B) von induzierten (+) und nicht-induzierten (-) SLC22A13h-, OAT1h-, und OAT2h-Zellen, die 1 min mit $10 \mu\text{M}$ cGMP bzw. 2-Deoxyguanosin (2-DG) oder Puffer, bei 37°C inkubiert wurden. Die Quantifizierung erfolgte mittels LC-MS. Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwerts (SEM), $n = 3$. Durchführung des Aufnahmeversuchs B. Steinrücken.

3.3.14 SLC22A13hTransportmessung mit Nikotin

Bahn und Mitarbeiter konnten kürzlich zeigen, dass SLC22A13h das Vitamin Nikotin transportiert. Um dieses zu prüfen, wurde dem Transporter Nikotin als Substrat angeboten. Induzierte Zellen ($410 \pm 16 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$), die mit Nikotin inkubiert wurden, besaßen einen höheren Nikotin-Gehalt als die nicht-induzierten Zellen ($259 \pm 6 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$). Transporterzellen ($8 \pm 0,4 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$), die nur mit Puffer inkubiert wurden, besaßen etwas mehr Nikotin, relativ zu den jeweiligen nicht-induzierten Zellen ($5 \pm 0,1 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$) (Abb. 3.37). Für SLC22A13h wurde zu Nikotin eine TE von $15 \pm 2 \text{ } \mu\text{l min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$ ermittelt. Demnach wird Nikotin von SLC22A13h als Substrat akzeptiert.

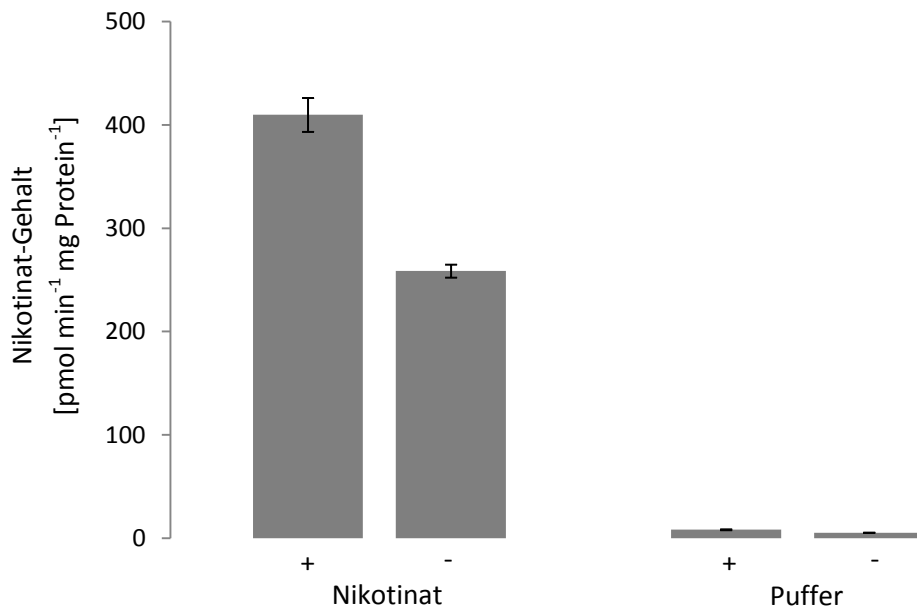


Abb. 3.37: Aufgetragen ist der Nikotin-Gehalt von induzierten (+) und nicht-induzierten (-) SLC22A13h HEK293-Zellen, die 1 min mit $10 \text{ } \mu\text{M}$ Nikotin oder Puffer, bei $37 \text{ } ^\circ\text{C}$ inkubiert wurden. Die Nikotin-Quantifizierung erfolgte mittels LC-MS. Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

3.3.15 Lokalisation von SLC22A13 in der Rattenniere

Um die physiologische Funktion eines Transporters zu definieren müssen primär seine Substrat und die Lokalisation bekannt sein. Somit wurde, neben dem Screening von Substraten für SLC22A13, zusätzlich die Lokalisation dieses Proteins untersucht. Aus den vorliegenden real time-PCR Daten (S. Golz, Bayer Healthcare, Wuppertal) ging hervor, dass das humane Protein hauptsächlich in der Niere exprimiert wird. In Leber und Herz ist der Transporter nicht nachweisbar (S. Golz, Bayer Healthcare, Wuppertal). In dieser Arbeit wurde untersucht, ob diese Befunde auf die Ratte übertragbar sind.

Aus den real time-PCR Daten ging hervor (Abb. 3.38 A) dass SLC22A13 in der Rattenniere exprimiert wird, wohingegen die Organe Leber und Herz keine erkennbare Expression aufwiesen.

Des Weiteren wurde die relative Expression von SLC22A13r in einigen Arealen der Niere, wie Cortex (1), äußeres Mark (2), inneres Mark (3), sowie im Bereich des Pelvis (4), nachgewiesen (Abb. 3.38 B). Hierbei wurde die stärkste Expression im äußeren Mark ermittelt.

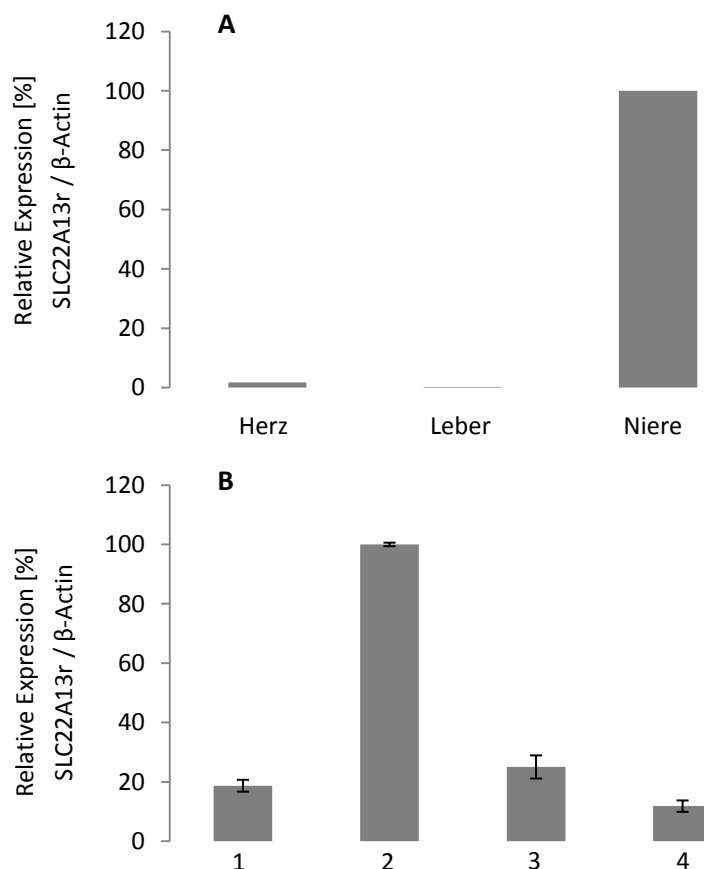
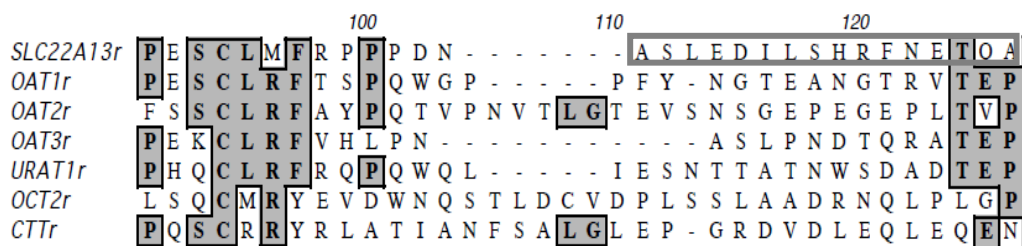


Abb. 3.38: (A) Relative Expression von SLC22A13 der Ratte (SLC22A13r) in Herz, Leber und Niere. (B) Relative Expression von SLC22A13r in verschiedenen Nierenarealen. 1 = Areal aus dem Cortex, 2 = Areal aus dem äußeren Mark, 3 = Areal aus dem inneren Mark, 4 = Areal aus dem Bereich des Pelvis. Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte und SEM, n = 2.

3.3.15.1 Spezifität des Antikörpers

Um die exakte Lokalisation von SLC22A13 in der Niere der Ratte zu ermitteln, wurden zwei polyklonale Antikörper gegen das Ratten SLC22A13-Protein generiert (Eurogentec, Deutschland (siehe 2.5.3.3)). Für den ersten Antikörper (A) wurde (in Zusammenarbeit mit Dr. E. Lain) ein Epitop in der extrazellulären Schleife von SLC22A13r gewählt. Der zweite Antikörper (B) wurde gegen den C-Terminus gerichtet. Bei der Auswahl der Epitope wurde besonders darauf geachtet, dass diese bei den anderen Transportern innerhalb der SLC22-Familie, die ebenfalls in der Niere lokalisiert sind, nicht vorhanden sind (Abb. 3.39).

A



B

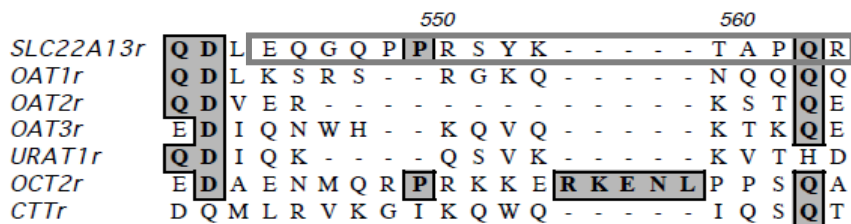


Abb.3.39: Aligment von Transportern der SLC22-Familie die in der Rattenniere lokalisiert sind. (A) Ausschnitt der Proteinsequenz aus der extrazellulären Schleife zwischen Transmembransegment 1 und 2. Die umrandeten Aminosäuren kennzeichnen das Epitop für Antikörper A. (B) Ausschnitt der Proteinsequenz aus dem C-Terminalen Bereich. Die umrandeten Aminosäuren kennzeichnen das Epitop für Antikörper B.

Die Spezifität der beiden Anti-SLC22A13r-Antikörper wurde über einen Westernblot ermittelt. Hierzu wurde untersucht, ob das Protein SLC22A13 der Ratte (SLC22A13r) in Doxycyclin induzierten HEK293-Zellen (+), die mit dem Konstrukt pEBTetD/SLC22A13r transfiziert wurden, zu detektieren ist. Nicht-induzierte HEK293-Zellen (-), die SLC22A13r nicht exprimieren und nicht-transfizierte HEK293-Zellen (NT) fungierten als Kontrollen. Des Weiteren wurde Nierenlysat und als Kontrollen Leber- und Herzlysate auf das Protein untersucht.

Für den Antikörper-A konnte im Westernblot (Abb. 3.40 A) eine Bande bei 55 kD in induzierten SLC22A13r Zellen detektiert werden, die bei nicht-induzierten sowie nicht-transfizierten Zellen nicht vorhanden war. Die Bande bei 55 kD konnte ebenfalls, in der mit

Nierenlysat beladenen Spur detektiert werden, jedoch nicht in den beiden Spuren mit Herz- und Leberlysat. Dieser Bande korreliert mit der errechneten Masse für SLC22A13r von 61 kD. Für den Antikörper-B wurde keine Bande bei 55 kD detektiert (Abb. 3.40 B). Aufgrund dessen wurde der Versuch nicht mit den negativ Kontrollen Herz- und Leberlysaten durchgeführt. Induzierte und nicht-induzierte Zellen zeigten lediglich eine leichte Bande zwischen 36 und 55 kD, die sich ebenfalls mit dem Antikörper A, in den mit Zelllysat beladenen Spuren, jeweils gleich intensiv, detektieren ließ.

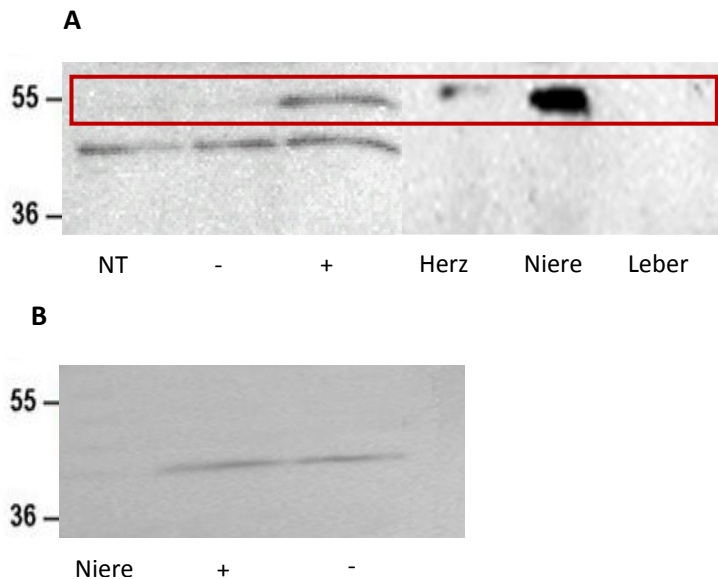


Abb. 3.40: Westernblot-Analyse. Jede Spur wurde mit 15 µg Gesamt-Protein in den Lysaten beladen. (A) Der Anti-SLC22A13r-Antikörper-A detektierte eine Bande in der Niere und in den SLC22A13r induzierten HEK293-Zellen (+) bei 55 kD. (B) Der Anti-SLC22A13r-Antikörper-B detektierte eine gleich intensive Bande in den beiden Zelllysaten von induzierten und nicht-induzierten Zellen (-). (NT) = nicht-transfizierte Zellen. In Zusammenarbeit mit E. Lain und T. Bauer.

3.3.15.2 Immunlokalisierung von SLC22A13 in der Rattenniere

Die exakte Lokalisation von SLC22A13 der Ratte wurde an Paraffinschnitten der Niere untersucht. Der verwendete primäre Antikörpern A binden an das Protein SLC22A13. Mit Hilfe eines sekundären Antikörpers, welcher ein Fluorochrom trägt und an den primären Antikörper bindet, kann das Protein detektiert werden.

Abb. 3.41 A zeigt die Übersicht eines Nierenquerschnitts nach Hämatoxylin- und Eosin-Färbung über eine lichtmikroskopische Aufnahme. Analog dazu ist in Abb. 3.41 B die Lokalisation von SLC22A13r durch eine Immunfluoreszenz-Aufnahme des Anti-SLC22A13r-Antikörper-A dargestellt. Es konnten Signale in einigen Tubulusstrukturen im Cortex, im äußeren Mark und im äußeren Bereich des inneren Marks ermittelt werden. Am intensivsten war die Färbung hierbei im äußeren Mark. Das charakteristische Muster der Intensität der Immunfluoreszenzfärbung des Anti-SLC22A13r-Antikörpers-A im Cortex und im äußeren

sowie inneren Mark bestätigte die auf m-RNA Ebene ermittelte Intensität von SLC22A13r in der Niere.

Als eine weitere Kontrolle für die Spezifität des Antikörpers-A wurde dieser durch das präimmun Serum ersetzt. Hierbei wurde kein Signal beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Für den Anit-SLC22A13r-Antikörper-B konnte, übereinstimmend mit den Ergebnissen der Westernblot-Experimente, trotz unterschiedlich eingesetzter Verdünnungen, kein Signal detektiert werden.

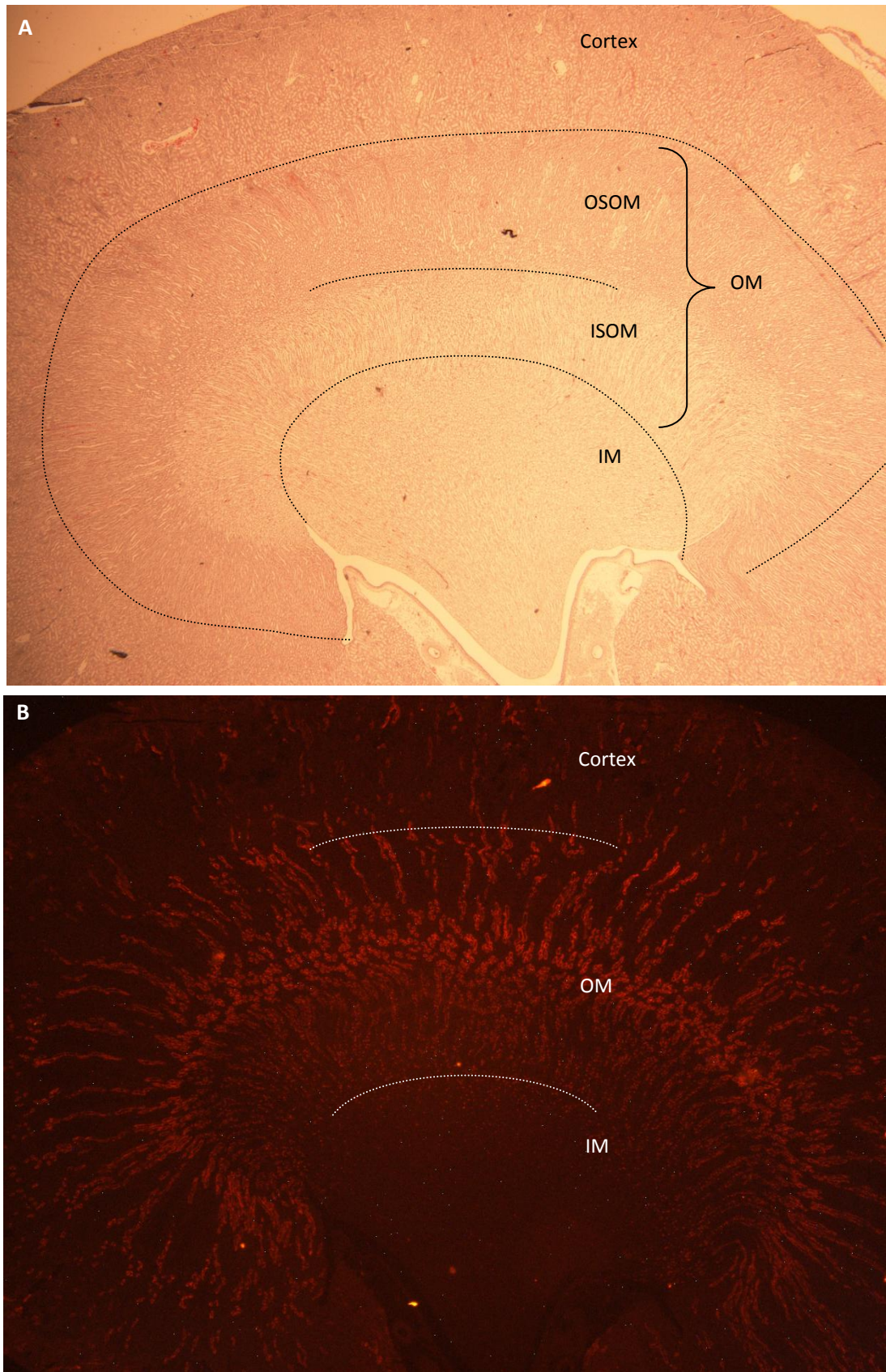


Abb. 3.41. Übersicht der SLC22A13r Antikörperfärbung eines Nierenquerschnitts. Die Färbung erfolgte an 7 µm Paraffin eingebetteten Nierenquerschnitten. (A) Lichtmikroskopische Aufnahme nach Hämatoxylin- & Eosin-Färbung. (B) Immunfluoreszenz Aufnahme des Anti-SLC22A13r-Antikörper-A. (····) kennzeichnet die Grenzen von Cortex, äußerer Streifen des äußeren Marks (OSOM), innerer Streifen des äußeren Marks (ISOM) und das innere Mark (IM). OM = äußeres Mark.

Im gesamten Cortex zeigten die Zellen im kortikalen Sammelrohr (CCD) und im Verbindungstubulus (CNT), zwischen distalem Tubulus und Sammelrohr, eine basolaterale Färbung für SLC22A13r (Abb. 3.42 A, B). Jedoch wurde nicht in allen Zellen des CCD eine Färbung beobachtet (Abb. 3.42 B). Einige Zellen, mit gewölbter apikaler Membran, besaßen oft eine besonders intensive basolaterale Färbung (Abb. 3.42 B). Dies lässt vermuten, dass es sich hierbei um Schaltzellen anstatt um Hauptzellen handelt. Bei einigen Tubuli im Cortex war die Färbung abrupt unterbrochen, was auf die Überganszone vom distalen Konvolut (DCT) zum CNT hindeutet (Abb. 3.42 C). Demnach wurde keine Färbung im DCT ermittelt.

Im äußeren Nierenmark war die Anti-SLC22A13r-Antikörper-A Färbung am intensivsten (Abb. 3.43 A). Hier zeigte nur eine Subpopulation von Zellen des Sammelrohrs innerhalb des basolateralen Pols eine Färbung (Abb. 3.43 B, C, D). Deutlich zu erkennen war, dass die apikale Membran dieser Zellen stark gewölbt in das Lumen hineinreicht (Abb. 3.43 C). Die Anzahl der markierten Zellen im Sammelrohr fiel im inneren Mark kontinuierlich ab (Abb. 3.43 A, E, F). In den tieferen Regionen des inneren Marks konnte kein Signal mehr ermittelt werden. Die Morphologie und die Verteilung der SLC22A13r positiven Zellen im Sammelrohr lässt die Annahme zu, dass SLC22A13r in der basolateralen Membran von Schaltzellen lokalisiert ist. Für die Glomeruli, den proximalen Tubulus und für den dünnen und dicken Bereich der Henle-Schleife konnte keine Fluoreszenzmarkierung nachgewiesen werden.

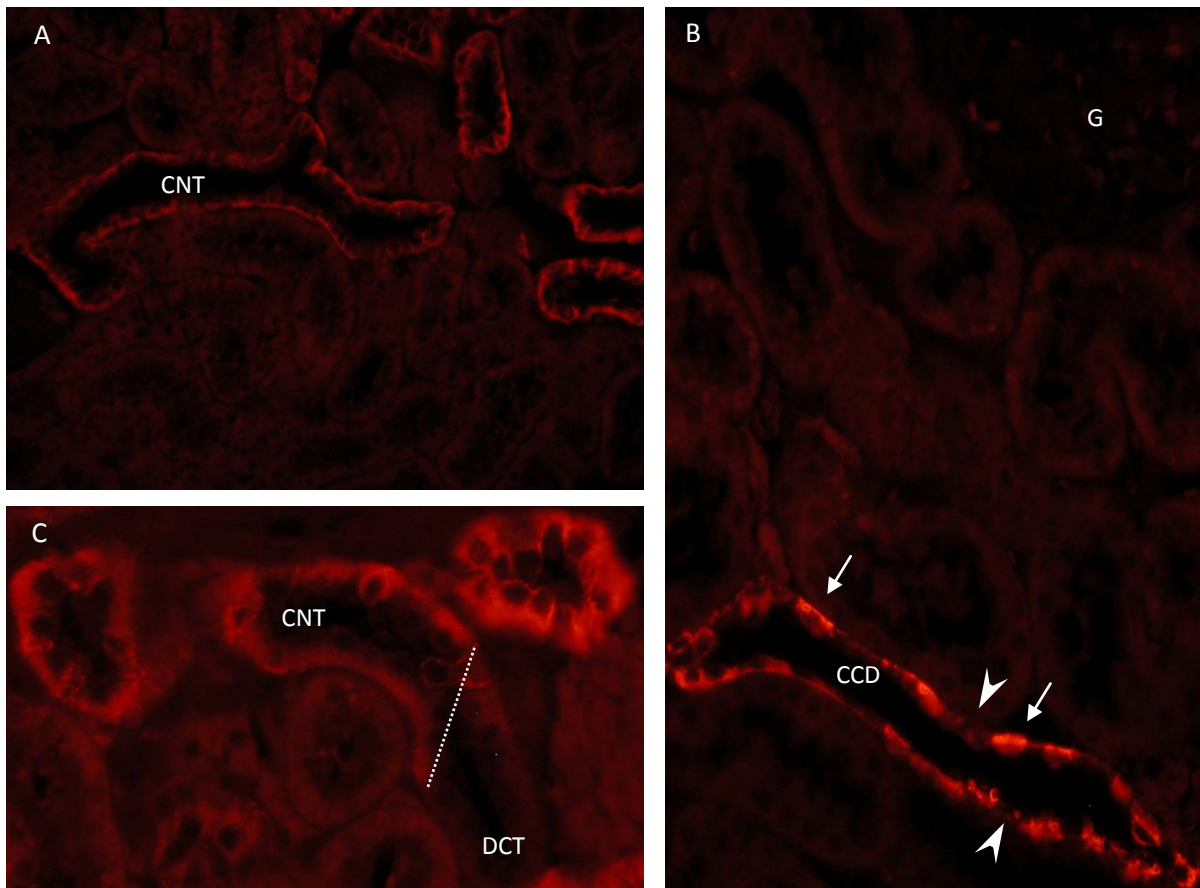


Abb. 3.42: Anti-SLC22A13r Immunfluoreszenz-Aufnahme des Nierencortex (7 μ m Paraffinschnitte) durch Antikörper-A. (A) Im gesamten Cortex zeigte die Mehrzahl der Zellen im kortikalen Sammelrohr und im Verbindungstubulus (CNT) eine basolaterale Färbung für SLC22A13r (rot). (B) Detaillierter Ausschnitt eines kortikalen Sammelrohrs (CCD). Nicht alle Zellen zeigten die Antikörperfärbung (\blacktriangleright). Einige Zellen, deren apikale Membran ins Lumen gewölbt ist, besitzen ein besonders stark basolateral ausgerichtetes Signal (\rightarrow). Zellen des proximalen Tubulus und Glomeruli (G) wiesen keine Färbung auf. (C) Tubulusausschnitt, der die potentielle Übergangszone (.....) vom distalen Tubulus zum Verbindungstubulus enthält.

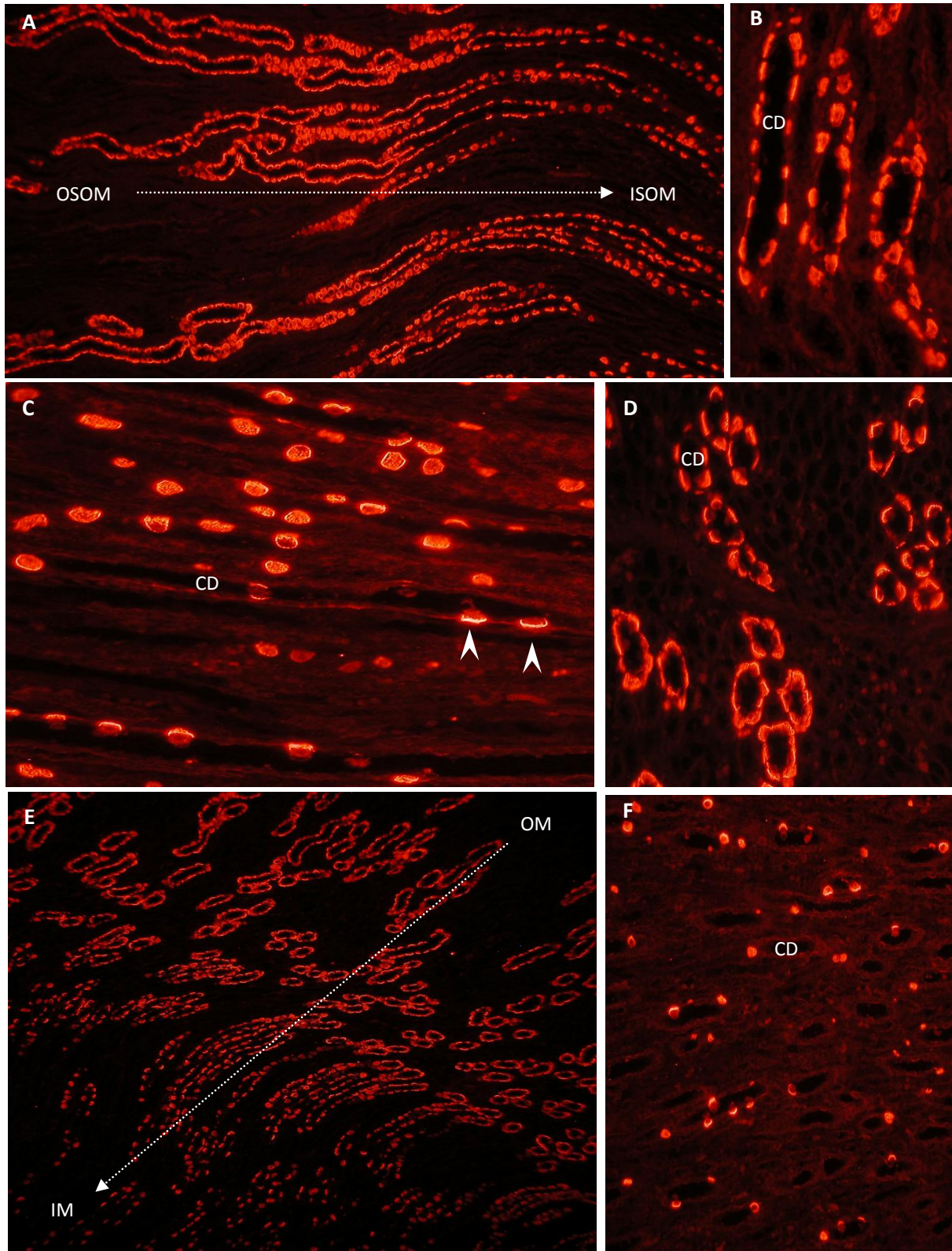


Abb. 3.43: Anti-SLC22A13r- Immunfluoreszenzaufnahme des Nierenmarks (7 μm Paraffinschnitte) durch Antikörper-A. (A) Äußeres Mark: die SLC22A13r Antikörperfärbung (rot) nahm in den Sammelrohren, die zum inneren Mark verlaufen, kontinuierlich ab. (B) (C) (D) nur eine Subpopulation der Zellen der medullären Sammelrohre zeigten die basolaterale Antikörperfärbung. (\blacktriangleright) Zellen deren apikale Membran stark in das Sammelrohlumen hineinreicht. (E) Äußeres und inneres Mark, (F) Inneres Mark: die Färbung in den Zellen der Sammelrohre nahm im inneren Mark ab. CD = Sammelrohr, IM = Inneres Mark, IMOS = Innerer Streifen des äußeren Marks, OSOM = Äußerer Streifen des äußeren Marks, OM = Äußeres Mark.

4 Diskussion

Mitglieder der SLC22-Familie erfüllen physiologische Aufgaben wie die Inaktivierung von freien Monoamin-Transmittern (EMT), die Ausscheidung und Rückgewinnung von Stoffwechselprodukten oder körperfremden Substanzen (OCTs und OATs) sowie die Aufnahme von Carnitin in die Muskelzelle (CTT). Für OAT2 sind deutlich weniger Substrate bekannt, als dies für andere Mitglieder dieser Familie der Fall ist. Weiterhin ist seine physiologische Funktion nicht definiert. Neben OAT2, ist die Bedeutung des Carriers SLC22A13 völlig offen. Weder sein Substratspektrum noch die exakte Lokalisation sind bekannt. So stand im Fokus dieser Arbeit, Substrate für OAT2 und SLC22A13 aufzudecken, welche effizient transportiert werden. Darüber hinaus wurden Versuche durchgeführt, um die exakte Lokalisation von SLC22A13 in der Niere zu untersuchen.

4.1 OAT2

4.1.1 OAT2: ein spezifischer Transporter für Trigonellin

Im Vorfeld dieser Arbeit waren keine endogenen Substrate bekannt die nur von OAT2 und nicht von einem anderen OAT transportiert werden. Daher wurde erstmals die Methode der LC-MS Differenz Abtönung für diesen Transporter angewendet, um Substrate aufzuspüren. Das humane OAT2 Protein wurde in Eukaryontenzellen funktionell zur Expression gebracht und die Zellen lysiert. Für die so gewonnenen Zelllysate wurden mit der LC-MS Massenspektren generiert und über die Differenz Abtönung ausgewertet. Dabei zeigten OAT2h exprimierende Zellen unter anderem ein Signal bei m/z 138. Über eine Fragmentierung konnte dieses Signal als Trigonellin (Trig) identifiziert werden. Ein Aufnahmeversuch mit Trig bewies einen direkten, durch OAT2h vermittelten Transport. Da induzierte Zellen, denen zuvor kein Trig angeboten wurde, bereits höhere Trig-Konzentrationen aufwiesen als nicht-induzierten Zellen, wurde das Kultivierungsmedium auf diese Substanz mittels LC-MS analysiert. Hierbei konnte ein Trig-Gehalt von 8 μM quantifiziert werden, daraus erklärt sich der erhöhte Trig-Gehalt in den nur mit Puffer inkubierten, induzierten Zellen. Denn schon während der Induktion der Transporterexpression im Zellkulturmedium kommt dieser mit dem Substrat Trig in Kontakt, welches daher in den Zellen akkumuliert. Um die Spezifität von Trig als Substrat für OAT2h zu verifizieren wurden die nächst verwandten Transporter SLC22A13h und OAT1h auf die Substanz getestet. Beide Carrier zeigten keine Transportaktivität. Demnach ist die Fähigkeit

Trig über die Zellmembran von Mammaliazellen zu transportieren, zumindest innerhalb der SLC22-Familie, vermutlich auf OAT2 beschränkt. Trig besteht aus einem Pyridinring mit einem methylierten Stickstoff und einer Carboxylgruppe. Die Spezifität von OAT2r zu Trig wurde verdeutlicht, indem die Substanzen wie 1-Methylnikotinamid, welches anstatt der Carboxylgruppe eine Säureamidgruppe aufweist und Nikotinat, bei dem der Stickstoff nicht methyliert ist sowie die Aminobenzoate, die den Stickstoff nicht im Ring aufweisen, nicht transportiert werden. In einem weiterem Aufnahmeexperiment wurde untersucht, ob der Trig-Transport für den humane OAT2 Spezies übergreifend für orthologe OAT2-Transporter gilt. Dieses wurde am OAT2 der Ratte untersucht. Es zeigte sich, dass auch der OAT2 der Ratte mit einer etwas höheren TE ($4 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$) als das humane Protein ($1 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$) Trig transportierte. Aufgrund der höheren Transportleistung des OAT2r wurde dieser für das Ermitteln der Affinität zu Trig herangezogen. Der K_m -Wert von OAT2r zu Trig betrug $409 \mu\text{M}$. Ein Transporter mit einer guten Affinität zu seinem Substrat liegt in der Größenordnung von $1 - 50 \mu\text{M}$. Demnach hat der Rattentransporter keine hohe Affinität zu Trig. Die TE über V_{max}/K_m für OAT2r betrug $9 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$ und liegt in derselben Größenordnung wie die, die über v/S ermittelt wurde.

OAT2 unterscheidet sich Spezies übergreifend von anderen OATs der SLC22-Familie in der potentiellen Transmembrandomäne 10, wo es eine negativ geladene Aminosäure die Glutaminsäure (Glu) aufweist. Der Austausch von Glu durch Glutamin bei OAT2h resultierte in einer deutlich verminderten Trig-Aufnahme. Es hat demnach den Anschein, dass Glu für den Transport oder die Bindung von Trig eine entscheidende Rolle spielt. So könnte Glu entweder direkt mit dem Zwitterion Trig wechselwirken oder andere Aminosäuren im Protein so ausrichten, dass ein effizienterer Trig-Transport erfolgen kann.

Trig kann von einigen Pflanzen wie Hülsenfrüchtler (Leguminosen) und Kaffepflanzen (Rubiaceae) aus Nikotinat durch die Nikotinat-N-Methyltransferase synthetisiert werden [Zheng et al., 2007; Yin et al., 2008]. Mammalia besitzen dieses Enzym nicht und können Trig auf diese Weise nicht synthetisieren. Es wurde jedoch dokumentiert, dass Ratten, denen Nikotinat verabreicht wurde, vermehrt Trig ausscheiden was auf eine N-Methylierung der Nikotinats hindeuten könnte [Mason und Kodicek, 1970; Sandhu und Fraser, 1981; Yuyama und Suzuki, 1985]. Säuger sind in der Lage Trig über die Nahrung aufzunehmen [Yuyama 1999]. Dies würde erklären, warum Trig im Zellkulturmedium enthalten ist. Denn das Medium setzt sich aus Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) und 10 % Fetalem Kälber Serum zusammen. DMEM ist eine definierte Lösung aus Aminosäuren, Vitaminen, Glukose und anorganischen Salzen. Trig jedenfalls, ist nicht im DMEM enthalten. Es muss daher im Fetalem Kälber Serum enthalten sein und wurde wahrscheinlich über die Nahrung der Rinder aufgenommen. Während für Trig in Pflanzen schon frühzeitig mehrere Effekte gezeigt wurden, wie z.B. der Einfluss auf die Nodulation der Wurzeln [Yin et al., 2008; Minorsky,

2002], ging man lange davon aus das Trig in Säugern biologisch inaktiv ist und unverändert mit dem Urin ausgeschieden wird [Sandhu and Fraser 1981]. Mittlerweile konnten jedoch auch einige Auswirkungen von Trig auf Mammaliazellen nachgewiesen werden. So bewirkt Trig in vitro, eine Aktivierung des Estrogen Rezeptors in humanen Brustkrebszellen und fördert die Proliferation dieser Zellen [Allred et al., 2009]. Des Weiteren konnte für Trig ein anti-Diabetischer Effekt mit Typ-2 Diabetes Ratten gezeigt werden, indem es den Blutglucoselevel unter Hyperglykämie verbessert. Es konnte gezeigt werden, dass Trig in der Leber die Aktivität der Fettsäuresynthase vermindert und die der Carnitin-Acetyltransferase sowie die der Glucose-6-Phosphatase steigert. Der Triglycerid-Anteil im Blutplasma und in der Leber war dabei in Tieren, die mit Trig gefüttert wurden gegenüber den Kontrolltieren signifikant erniedrigt [Yoshinari et al., 2009]. Weiterhin wurde berichtet, dass Trig auch einen Speicher für die Nikotinsäure darstellen kann [Sandhu und Fraser, 1981; Yoshinari et al., 2009]. Interessanterweise entdeckten Taguchi und Shimabayashi ein Enzym in der Schweineleber welches Trig zu Nikotinsäure demethyliert. Hierfür muss Trig jedoch ins Zytosol der Hepatozyten gelangen. Trig liegt bei physiologischen pH höchstwahrscheinlich als Zwitterion vor und ist damit nicht membrangängig, es bedarf also der Hilfe eines Transporters, damit Trig in Leberzellen gelangen kann. Das OAT2 diese physiologische Aufgabe erfüllen könnte, dafür würde zumindest sprechen, dass dieser in der Leber exprimiert wird sowie in der sinusoidalen Membran der Hepatozyten lokalisiert ist und vor allem das er spezifisch Trig als Substrat akzeptiert. Allerdings was stark gegen diese Aufgabe von OAT2 spricht, ist seine schlechte Transporteffizienz zum Trig. Es ist demnach wahrscheinlich nicht die Funktion des Carriers Hepatozyten mit Trig zu versorgen.

4.1.2 OAT2: ein Transporter für Nikotinat-Ribosid

Neben Trig konnte das Nikotinat-Ribosid (NR) als Substrat für OAT2 Spezies übergreifend in Mensch und Ratte identifiziert werden. Hierbei wurde NR effektiver von OAT2r (TE $7 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$) als vom humanen OAT2 (TE $3 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$) transportiert. NR unterscheidet sich strukturell von Trig, indem die Methylgruppe am Stickstoff durch den Zucker Ribose ersetzt ist. Befindet sich an der Ribose ein Phosphat, wie beim Nikotinat-Ribonukleotid (NRN), wurde dieses nicht mehr von OAT2 als Substrat akzeptiert. Vermutlich hat die Phosphatgruppe einen störenden Einfluss auf die Bindung oder auf den Transportvorgang. NRN wird in Pro- und Eukaryonten für die Synthese von Nikotinamidadenindinukleotid (NAD^+) verwendet [Sauve 2008; Belenky et al., 2007]. NAD^+ ist ein wichtiger Co-Faktor der an zahlreichen Redoxreaktionen des Stoffwechsels der Zelle beteiligt ist. In Pflanzen konnte ein Enzym mit NR Kinaseaktivität nachgewiesen werden, welches NR phosphoryliert und in NRN überführt [Matsui und Ashihara et al., 2008].

Pflanzliche Zellen wären demnach in der Lage, unter anderem NR für die NAD⁺-Synthese zu verwenden. In tierischen Zellen wurde ein solches Enzym noch nicht gefunden. Zudem ist nicht bekannt ob NR in Säugern vorkommt. Es wurde jedoch berichtet, dass zugefügtes NR zu Mammaliazellen die NAD⁺-Biosynthese stimuliert [Yang et al., 2007]. OAT2 ist in der Lage NR den Zellen zuzuführen. Da dieser aber NR nicht effizient genug transportiert ist es unwahrscheinlich das OAT2 diese physiologische Aufgabe ausführt.

Der humane OAT2 zeigte im Fall der Substrate, Trig und NR, eine geringere TE als OAT2r. Es muss allerdings berücksichtigt werden, das nur jede zweite Zelle den humanen OAT2 Transporter exprimiert. Ein Beleg hierfür lieferte die OAT2h-GFP Chimäre die nur 52 % der HEK293-Zellen exprimieren. Wohingegen andere Transporterfusionskonstrukte, wie SLC22A13-GFP, von 98 % der HEK293-Zellen exprimiert wurde. Da eine gewisse Menge Transporter (ca. 10 %), in dem hier verwendeten Expressionssystem, auch im nicht-induzierten Zustand von den Zellen exprimiert wird, könnte der Transporter eine Substanz, die im Zellkulturmedium enthalten ist, in die Zellen transportieren, die direkt oder indirekt toxisch wirkt. Was dazu führen könnte, dass einige Zellen die Fähigkeit erlangen die Expression dieses heterologen Proteins zu unterbinden. Ein Indiz für diese Hypothese liefert die OAT2h-Mutante, bei der der Austausch einer sauren Aminosäure die Glutaminsäure in der potentiellen Transmembrandomäne 10, gegen das ungeladene Glutamin ersetzt wurde. Die GFP-Chimäre dieser Mutante wurde von 98 % der Zellen exprimiert. Zudem ist die Trig Aufnahme durch den Austausch dieser einen Aminosäure stark reduziert. Es lässt demnach die Vermutung zu, dass diese verminderte Transportleistung der OAT2h-Mutante dazu führen könnte das HEK293-Zellen keine eventuellen toxischen Ereignisse ausgesetzt sind und demnach nicht die Veranlagung erlangen die Expression der Mutante auch bei Induktion zu unterbinden. Die TE für Trig und NR zu OAT2h könnte demnach auf dem Niveau von OAT2r liegen, insofern davon ausgegangen wird dass HEK293-Zellen den orthologen Ratten-Transporter annähernd zu 100 % exprimieren. Wobei sich dann die Frage ergibt, warum OAT2r nicht dieselben Effekte in HEK293-Zellen unterliegt wie die humane Version des Transporters. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung, dass „frisch“ transfizierte OAT2r Zellen sich langsamer teilen als frisch transfizierte OAT2h Zellen. Erst nach etwa zwei bis drei Wochen verhalten sich beide Zelllinien in ihrem Wachstum gleich. Diese Spezies Unterschiede wurde mit anderen heterolog exprimierenden Transportern in HEK293-Zellen noch nicht beobachtet.

4.1.3 OAT2 der Ratte ein sehr effizienter Transporter für Orotat

Der Transporter SLC22A13 wurde auf einen Orotat-Transport untersucht. Denn Orotat weist in seiner Grundstruktur Ähnlichkeiten zum Guanidiniumsuccinat auf, welches von SLC22A13 als Substrat akzeptiert wurde. Der nächst Verwandte Transporter OAT2h und der orthologe OAT2r sowie OAT1h wurden in dieser Versuchsreihe ebenfalls auf Orotat untersucht. Überraschenderweise zeigten nur OAT2r exprimierende Zellen eine sehr starke Orotat-Aufnahme. Die TE hierbei betrug $99 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$ und war damit 25 bzw. 60 x höher als für SLC22A13 ($4 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$) und OAT1h (ca. $2 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$). Besonders der Vergleich der TE von OAT1 zu seinem Modells substrat *para*-Aminohippurat, (ca. $50 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$) verdeutlicht die Transportleistung von OAT2r zu Orotat. Jedoch ist die Affinität des Transporters zu Orotat mit $234 \mu\text{M}$ nicht sehr hoch. Um dennoch solch eine hohe TE zu erzielen, besitzt der Transporter wahrscheinlich eine hohe Wechselzahl (k_{cat}) zu diesem Substrat. Aus dem Zeitverlauf der Aufnahme ging hervor, dass Orotat in den Zellen um den Faktor 86 gegenüber dem Außenmedium angereichert wurde. Aufgrund der Tatsache, dass Zellen innen ein negatives Membranpotential besitzen, würde nach der Nerst-Gleichung für ein einfach negativ geladenes Molekül im elektrochemischen Gleichgewicht, bei der eingesetzten Substratkonzentration von $10 \mu\text{M}$, eine intrazelluläre Konzentration von ca. $1 \mu\text{M}$ erwartet werden. Demnach ist die Anreicherung von Orotat sogar nochmals um den Faktor 10 höher. Die Akkumulation durch OAT2r wurde nicht durch einen Natrium und Protonen getriebenen Transport hervorgerufen. Auch andere anorganische Ionen besaßen bei einer Erniedrigung ihrer Konzentration in der Aufnahmelösung keinen Effekt auf den Orotat Transport. Da ein Antiportmechanismus von OAT2r als Triebkraft für die Anreicherung von Orotat in den Zellen verantwortlich sein kann, wurden die Zellen in Puffer induziert mit der Überlegung das diese an intrazellulären Substanzen verarmen und der eventuelle Orotat-Antiport-Transport vermindert wird. Es wurde hierbei jedoch keine Erniedrigung im Transport festgestellt, im Gegenteil, Zellen die in Puffer, anstatt im Kultivierungsmedium der Zellen, induziert wurden besaßen eine etwas höhere TE zu Orotat. Dies könnte daran liegen, dass durch die Transporterexpression in Puffer die Bindungsstelle von OAT2r zu Orotat nicht durch andere Substanzen, wie sie im Kultivierungsmedium vorhanden sind, behindert wurde. Wegen der starken intrazellulären Anreicherung von Orotat durch OAT2r, muss es aber eine Triebkraft geben, die wie bei anderen organischen Anionentransporter innerhalb der SLC22-Familie, durch einen Antiport mit einem anderen Anion zur Verfügung gestellt werden könnte.

4.1.4 OAT2 ist involviert bei der Steatosis hepatis (Fettleber) der Ratte

Orotat ist reichlich in Kuhmilch (450 μM) und in Rüben wie Karotte vorhanden. Der Mensch besitzt im Blutplasma eine Orotat-Konzentration von 0,5 μM [Salerno und Crifò, 2002]. Eu- und Prokaryonten sind in der Lage Orotat zu synthetisieren. Als Organ mit der stärksten Orotatsynthese wurde in der Ratte die Leber identifiziert [Hassan und Milner, 1981; O'Donovan und Neuhard, 1970]. Orotat ist ein wichtiges Zwischenprodukt der Pyrimidin-Synthese (Abb. 4.1), die mit der Carbamoylphosphatsynthese von Glutamin, durch die Carbamoylphosphat Synthetase II (CPS II), beginnt. Der nächste Schritt ist die Synthese von N-Carbamoyl-Aspartat (CAsp), welches von der Aspartat-Transcarbamoylase katalysiert wird. Anschließend folgt, durch die Dihydroorotase, die intramolekulare Kondensation von CAsp zu Dihydroorotat (DHO). Die ersten drei Enzyme bilden hierbei ein Multienzymkomplex. Das nächste vierte Enzym, die Dihydroorotat-Dehydrogenase, oxidiert DHO zu Orotat. Ein weiterer Multienzymkomplex, die UMP-Synthase, bestehend aus der Orotat-Phosphoribosyltransferase und der Orotidylat-Decarboxylase, katalysiert Orotat zu Uridinmonophosphat (UMP) [Brosnan und Brosnan, 2007]. UMP ist das Ausgangsprodukt aller weiteren Pyrimidin-Nukleotide.

Eine Vielzahl unterschiedlicher Zustände sind bekannt, unter denen Orotat in der Leber akkumuliert und vermehrt mit dem Urin ausgeschieden wird. Vor allem Bedingungen, die einen Anstieg von Carbamoylphosphat begünstigen resultieren in einer vermehrten Synthese von Orotat. Besonders wenn Enzyme des Harnstoffzyklus, wie die Ornithin-Transcarbamylase, die Argininosuccinat-Synthetase oder die Argininosuccinat-Lyase Loss-of-function-Mutationen aufweisen, wird vermehrt Orotat gebildet und über die Niere ausgeschieden. Des Weiteren führen Verlust-Mutationen in den Genen *Slc7a7* und *Slc25a15* zu einem Anstieg von Orotat im Menschen. *Slc7a7* codiert für einen kationischen Aminosäuretransporter, der für die intestinale Absorption und die renale Resorption von unter anderem Arginin und Ornithin zuständig ist. Das Genprodukt von *Slc25a15* ist ein mitochondrialer Ornithin-Citrullin Antiporter der Ornithin in die Mitochondrien transportiert und dieses so in den Harnstoffzyklus einfließen kann [Brosnan und Brosnan, 2007].

Der humane und der Ratten OAT2 besitzen zueinander eine Aminosäureidentität von 78 %. Es ist demnach überraschend, dass OAT2h Orotat nicht als Substrat akzeptiert, wohingegen OAT2r diese Substanz sehr effizient transportiert. Zwar ist bekannt, dass andere Transporter wie ETTh und CTTh, die ebenfalls zu einander eine hohe Aminosäureidentität von 77 % aufweisen und jeweils das Substrat des anderen nicht transportieren [Bacher et al., 2009], jedoch liegen hier zwei unterschiedliche Proteine vor und nicht ein orthologes aus einer anderen Spezies. Es lässt demnach die Hypothese zu, dass OAT2 eine andere oder eine zusätzliche physiologische Funktion in der Ratte haben könnte als im Menschen. Ein Indiz hierfür zeigen Ratten denen Orotat zu 1 % mit der Nahrung, über 7-19 Tage, verabreicht

wurde. Diese Tiere lagern mehr Lipide, insbesondere Triglyceride, in ihrer Leber ein, welche zu einer Fettleber (Steatosis hepatis) mit vermehrter Lebermasse führt [Durschlag und Robinson, 1980a; 1980b; Griffin et al., 2004]. Andere Mammalia wie Primat, Schwein, Hund, Hamster, Meerschwein und sogar die Maus zeigen keinen erhöhten Lipidgehalt in der Leber wenn diese vermehrt Orotat mit der Nahrung aufnehmen [Durschlag und Robinson, 1980b].

Die Pyrimidinsynthese wird durch Orotat gesteigert, wohingegen die Purinsynthese in der Leber vermindert ist. Des Weiteren resultiert ein vermehrter Orotat-Gehalt in der Rattenleber in einem Anstieg von Cholesterol, Phosphocholin und Phosphatidylcholin. Die Methyl-Donatoren Betain und Trimethylaminoxid sind ebenfalls erhöht, wohingegen Cholin und die Expression des Enzyms Stearoyl-CoA-Desaturase 1 (SCD 1) vermindert sind. [Griffin et al., 2004]. SCD 1 synthetisiert einfach ungesättigte Fettsäuren aus gesättigten Fettsäuren. Griffin und Mitarbeiter schlugen vor, dass die Verminderung von SCD 1 aus einer erniedrigten Expression von SREBP-1c (sterol regulatory element-binding protein) resultiert. Beides zusammen soll zu einer vermehrten Zunahme von 16:1 und 18:1 Fettsäuren in der Leber führen. Kurioserweise werden jedoch genau diese einfach ungesättigten Fettsäuren über SCD 1 synthetisiert [Paton und Ntambi, 2009], eine Erniedrigung von SCD 1 sollte zu einer Verminderung von 16:1 und 18:1 Fettsäuren führen. Ratten, denen eine Cholin- und Methionin-freie Diät verabreicht wurde [Rizki et al., 2006], entwickeln ebenfalls eine Fettleber mit verminderter Expression von SCD 1. Rizki und Mitarbeiter argumentieren, dass die Erniedrigung von SCD 1 durch kompensatorische Mechanismen hervorgerufen wird, da die Fettsäuresynthese vermindert und die Lipidoxidation gesteigert ist. Ein Grund dafür ist eine gehemmte Exkretion von Triglyceriden aus der Leber. Auch eine vermehrte Orotat-Aufnahme in der Ratte geht mit einer verminderten Fettsäuresynthese in der Leber einher [Tokmakjian und Haines, 1985]. Es wäre möglich, dass durch vermehrtes Orotat die Triglycerid-Sekretion der Hepatozyten vermindert ist, welches mit einer Akkumulation von Lipiden in den Leberzellen einhergeht. Unterstützt wird dies, durch die Beobachtung, dass ein gesteigerter Orotat-Gehalt die Ausscheidung von Very Low Density Lipoproteinen (VLDL) aus der Rattenleber erniedrigt [Hebbachi et al., 1997].

Orotat wird in der Ratte deutlich stärker in der Leber angereichert als in der Maus. Wohingegen die Maus dieses stärker in der Niere anreichert und schneller über den Urin ausscheidet [Durschlag und Robinson, 1980b]. Diese Daten stimmen mit der Lokalisation von OAT2 in Ratte und Maus überein. Kobayashi und Mitarbeiter zeigten zwar, dass weibliche Ratten mehr OAT2 in den Nieren als in der Leber aufweisen und männliche Ratten OAT2 in der Leber exprimieren. Jedoch konnte dies, für die weibliche Ratte, in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. In beiden Geschlechtern wurde OAT2r-mRNA am stärksten in der Leber detektiert, wobei zusätzlich in der weibliche Ratte, jedoch stark vermindert, OAT2-mRNA in den Nieren detektiert werden konnte. OAT2 wird demnach primär in der

Rattenleber exprimiert. Die stärkere Anreicherung von Orotat in der Leber der Ratte ist damit gut erklärbar, da OAT2r Orotat als Substrat akzeptiert, und dieses den Hepatozyten der Leber zuführt. Wohingegen bei der Maus OAT2 vorwiegend in der Niere exprimiert wird [Kobayashi et al., 2002b] und so Orotat sich stärker, als bei der Ratte, in der Niere anreichert und schneller über den Urin ausgeschieden werden kann. Vorausgesetzt OAT2 der Maus ist in der Lage Orotat zu transportieren. Aufgrund der schnelleren Exkretion des Orotats bei der Maus und die geringere Akkumulation in der Leber wird diskutiert, dass die Maus aus diesem Grund keine Symptome einer Fettleber unterliegt [Durschlag und Robinson, 1980b]. Da Untersuchungen am Affen keinen Effekt von Orotat auf die Leber gezeigt haben, unterstützt dies die Tatsache, dass OAT2h und OAT2r sich, im Bezug auf Orotat als Substrat, unterscheiden.

Aus dem Zeitverlauf mit nicht-induzierten OAT2r Zellen ging hervor, dass Orotat Zellmembranen nicht passieren kann. Es besitzt einen pKa-Wert von 2,4 [Larson und Hegarty, 1979] und trägt damit bei physiologischem pH stets eine Ladung. Damit Orotat, welches über die Nahrung aufgenommen wird, für die Pyrimidinsynthese verwendet werden kann, bedarf es die Hilfe von Transporter. Für Prokaryonten sind bereits Transporter bekannt die Orotat in die Zellen transportieren. So besitzt das Gram-positive Bakterium *Lactococcus lactis*, welches als Starterkultur für die Käsefermentation verwendet wird, das Gen *oroP*, welches für einen Orotat-Transporter codiert. Aber auch Gram-negative Bakterien wie *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* und *Sinorhizobium meliloti* exprimieren einen C₄-Dicarboxylat-Transporter (DctA) welcher eine Orotat-Aufnahme katalysiert [Defoor et al., 2007]. Für Eukaryonten, ist nach dem bisherigen Kenntnisstand kein Transporter bekannt der Orotat transportiert. Selbst über einen Uracil- oder Pyrimidin-Transporter von Mammaliazellen wird Orotat nicht als Substrat akzeptiert [Wohlhueter et al., 1980]. Mit dem OAT2 der Ratte konnte erstmals gezeigt werden, dass Eukaryonten einen Transporter exprimieren der Orotat transportiert. Ob dies die physiologische Aufgabe von OAT2r ist, Hepatozyten mit Orotat zu versorgen kann hier nicht geklärt werden. Leberzellen sind jedenfalls in der Lage Orotat selber zu synthetisieren. Aber, bei der anatomischen und physiologischen Veränderung der Rattenleber durch vermehrte Orotat-Aufnahme mit der Nahrung ist OAT2r mit involviert.

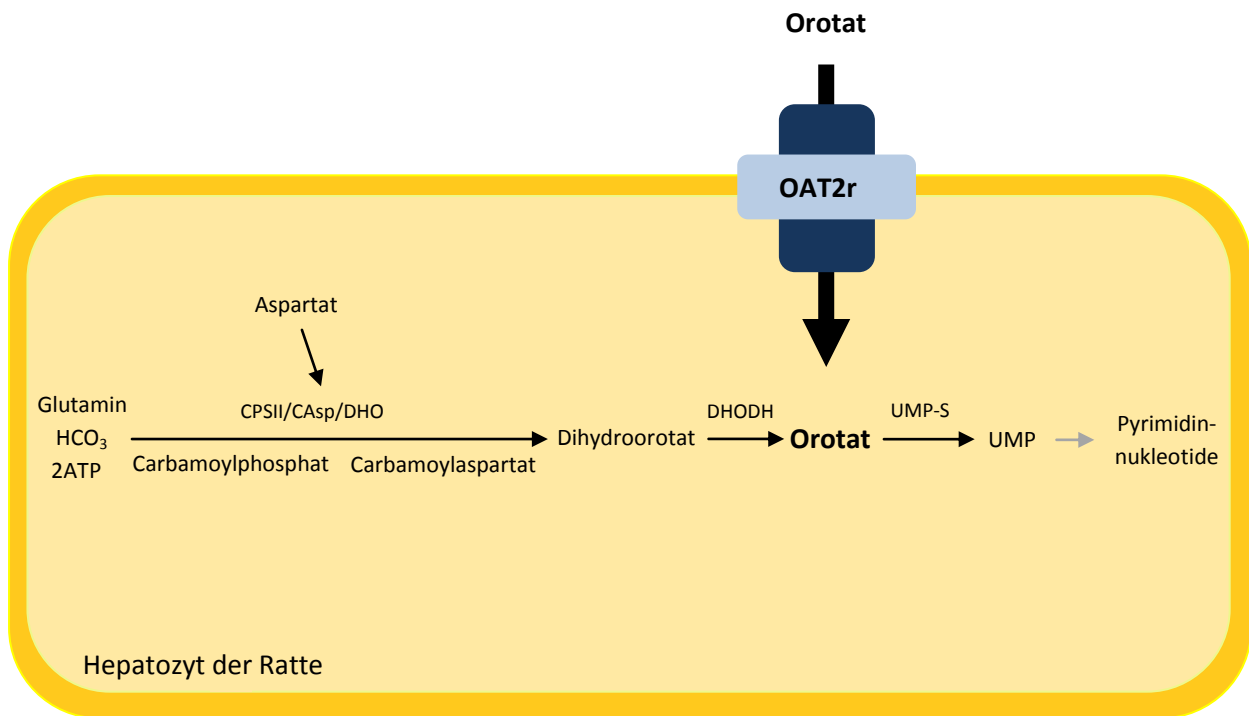


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Orotat-Synthese und -Aufnahme in die Hepatozyten der Ratte durch OAT2r. CPSII = Carbamoylphosphat Synthetase II, CAsp = Aspartat-Transcarbamoylase, DHO = Dihydroorotase, DHODH = Dihydroorotat-Dehydrogenase, UMP-S = UMP-Synthase, ATP = Adenosintriphosphat, UMP = Uridinmonophosphat.

4.1.5 Substratspektrum von OAT2 für die hier untersuchten Substanzen

Zu Beginn dieser Arbeit waren keine guten endogenen Substrate bekannt die OAT2 effizient transportiert. Während dieser Arbeit veröffentlichten Cropp und Mitarbeiter dass OAT2h cGMP und 2-Deoxyguansoin (2-DG) gut transportiert. Dieses konnte jedoch nicht bestätigt werden. cGMP wurde vom humanen OAT2 nur mit einer TE von $1 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$ transportiert, wohingegen 2-DG gar nicht als Substrat akzeptiert wurde. Für OAT1h wurde ein cGMP Transport mit einer TE von $9 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$ ermittelt. 2-DG hingegen wurde von OAT1h nicht transportiert. Kurioserweise sollte nach den Daten von Cropp und Mitarbeitern OAT1h cGMP schlechter transportieren als OAT2h. In den Experimenten von Cropp und Mitarbeitern wurde der Transporter ebenfalls in HEK293-Zellen zur Expression gebracht, allerdings mit dem Unterschied, dass als Expressionsvektor pcDNA5/FRT verwendet wurde. Jedoch steht auch hier das zu untersuchende Protein unter der Kontrolle desselben viralen Promotors (Cytomegalie Virus Promotor (CMV)) wie bei dem hier verwendeten Expressionsvektor pEBTetD. Durch beide Vektoren kommt es zu einer

Überexpression von OAT2h in HEK293-Zellen. Die Diskrepanz zwischen beiden Ergebnissen kann nicht geklärt werden.

In Abbildung 4.2 sind die TEs der in dieser Arbeit getesteten Substanzen auf OAT2 in Mensch und Ratte dargestellt. Das beste Substrat für den humanen OAT2 ist NR mit einer TE von $3 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$. Da Trigonellin nicht von OAT1h und dem nächstverwandten SLC22A13h als Substrat akzeptiert wurde und NR bis auf die Ribose dem Trig ähnelt, wird NR wahrscheinlich auch nicht von diesen beiden Carriern transportiert. Demnach wäre NR das zur Zeit beste spezifische Substrat für den humanen OAT2. Aufgrund der niedrigen TE sind die hier gefundenen Substrate, bis auf Orotat für OAT2r, vermutlich physiologisch irrelevant.

Ein relevantes, physiologisches und spezifisches Substrat für den humanen OAT2 könnte hinter dem Signal m/z 286 stecken, welches über LC-MS Differenz Abtönung ermittelt wurde. Denn anderen Transporter wie SLC22A13, OAT1h, URAT1h, OCT2 und EMT bei denen ebenfalls diese Methode angewandt wurde, weisen dieses Signal bei Expression in HEK293-Zellen nicht auf (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der wenigen generierten Fragmente von m/z 286 konnte dieses Signal nicht identifiziert werden. Eine Möglichkeit die Summenformel und damit wahrscheinlich das Signal zu identifizieren, wäre das Ermitteln der akkuraten Masse mit hochauflösenden Massenspektrometern. Dies wird zur Zeit, in Kooperation mit Herrn Thevis (Deutsche Sporthochschule Köln), durchgeführt. In einem ersten Versuch konnten jedoch keine intensiven Signale und damit keine akkurate Masse gewonnen werden, da die Substanz zu wenig konzentriert in den Zelllysaten vorlag.

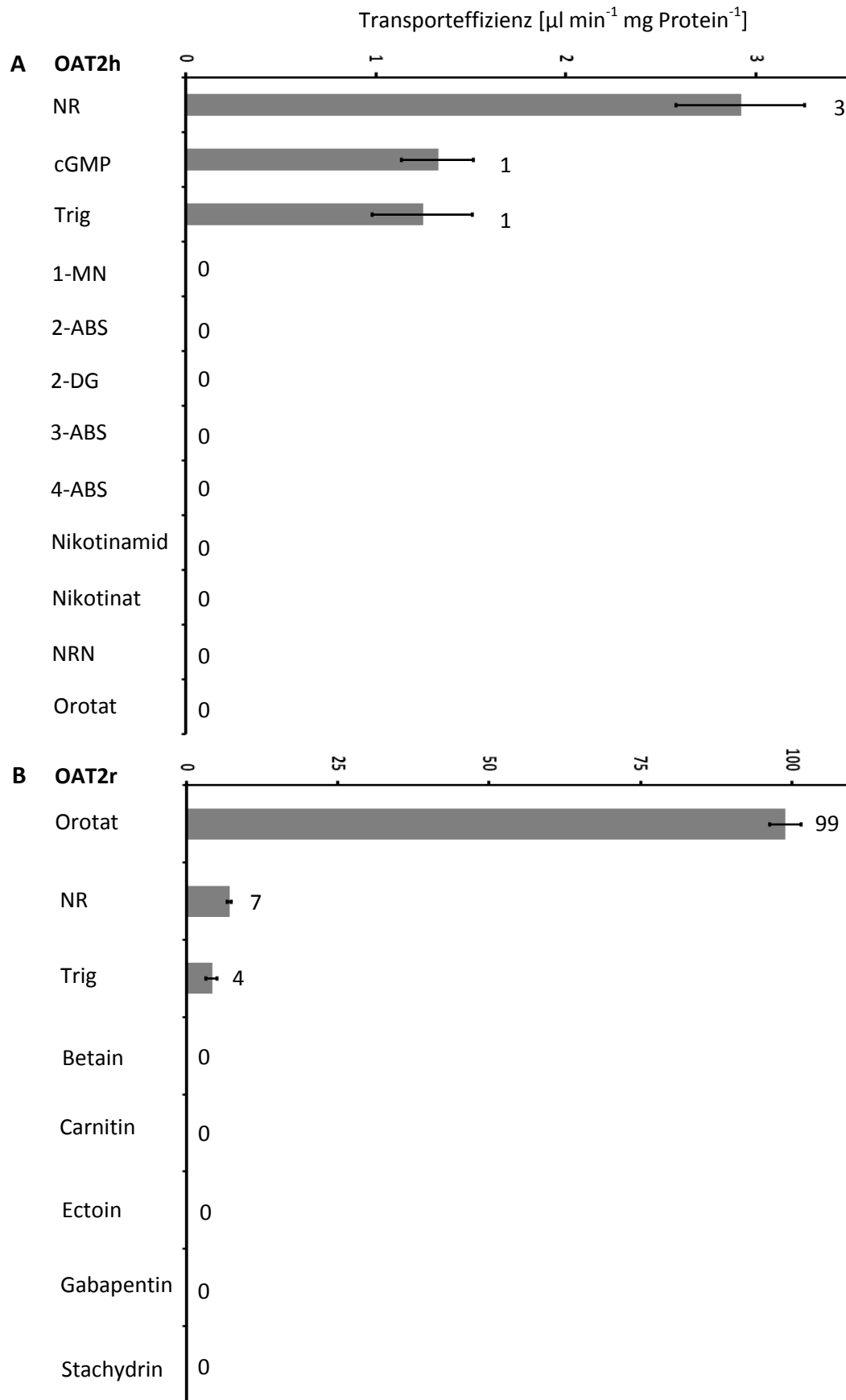


Abb. 4.2: Aufgetragen ist die Transporteffizienz von OAT2h (A) und OAT2r (B) der in dieser Arbeit untersuchten Substanzen. NR = Nikotinat-Ribosid, cGMP = cyclisches Guanosinmonophosphat, Trig = Trigonellin, 1-MN = 1-Methylnikotinamid, ABS = Aminobenzoesäure, NRN = Nikotinat-D-Ribonukleotid.

4.2 SLC22A13

4.2.1 SLC22A13 akzeptiert Guanidiniumsuccinat, Guanidiniumglutarat und Kreatin als Substrat

Die Funktion von SLC22A13 im Säugerorganismus ist unbekannt. Somit wurde, neben OAT2, für dieses Protein nach Substraten über LC-MS Difference Abtönung gesucht. Hierbei wurde in Kontrollzellen, ohne Transporterexpression, ein Signal bei m/z 176 detektiert, welches als Guanidiniumsuccinat (GSA) identifiziert werden konnte. GSA geht durch Radikalspaltung aus Argininosuccinat hervor [Aoyagi et al., 1996a,b, 1999, 2001; Cohen, 2003]. Durch ein erstes Aufnahmeexperiment konnte GSA jedoch nicht als Substrat für SLC22A13 nachgewiesen werden. Transporter exprimierende Zellen besaßen aber eine deutlich verminderte GSA-Konzentration. Erst durch Erhöhung der GSA-Konzentration in der Aufnahmelösung und längeren Inkubationszeiten konnte ein Transport von GSA über SLC22A13 in HEK293-Zellen ermittelt werden. Trans-Stimulations- und Cis-Inhibitions-Experimente bestätigten, dass GSA ein Substrat für SLC22A13h ist. Der Transporter zeigte jedoch keine hohe TE ($0,1 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$) zu GSA.

Neben GSA wurden weitere Substanzen, die ebenfalls eine Guanidinogruppe tragen und Strukturähnlichkeit zu GSA aufweisen, auf einen SLC22A13h vermittelten Transport untersucht. Diese Substanzen waren Kreatin, Guanidiniumacetat (GAA), Guanidiniumglutarat (GGA) und Guanidiniumpropionat (GPA). Kreatin ist unter anderem eine essentielle Substanz für die physiologische Muskelfunktion. GSA, GAA, GGA und GPA sind anfallende Nebenprodukte des Argininmetabolismus [Marescau et al.; Deignan et al., 2008]. Des Weiteren sind sie, wie GSA, bei einer Niereninsuffizienz im Blut erhöht und besitzen störende Einflüsse auf den Organismus [Al Banchaabouchi et al., 2001; Deignan et al., 2008]. GPA und GAA bewirken eine Autohämolyse in Erythrozyten [Giovannetti et al., 1968; Shainkin-Kestenbaum et al. 1982]. GSA selber blockiert die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation [Horowitz et al., 1967; Noris and Remuzzi, 1999]. Ferner wirkt es hinderlich auf das Zentralnervensystem [D'Hoogg et al., 1996; De Deyn et al., 2001] und schwächt mit GAA die Neutrophilenfunktion [Glorieux et al., 2004]. Für GGA wird diskutiert, dass es einen toxischen Effekt auf Neurone haben könnte [Hiramatsu, 2003]. In Anbetracht dieser toxischen Eigenschaften von GSA, GAA, GGA und GPA könnte der Transporter SLC22A13 für das Ausscheiden dieser Verbindungen über die Niere zuständig sein. Es konnte aber nur für GGA und Kreatin ein Transport nachgewiesen werden mit einer TE von 0,02 bzw. für Kreatin $0,5 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$. GGA und Kreatin sind demnach schlechte Substrate für SLC22A13. Wie im Fall von GSA, wiesen induzierte Zellen intrazellulär auch weniger GGA auf. Vermutlich nutzt SLC22A13h für die Aufnahme von Substraten in die

Zelle, den gleichen Mechanismus wie OAT1h, einen von intrazellulär nach extrazellulär gerichteter Gradient von organischen Verbindungen. Zumal für OAT1 ebenfalls eine Erniedrigung von GSA und GGA in induzierten Zellen ermittelt werden konnte und der Efflux von GSA durch die trans-Stimulation mit extrazellulärem PAH gesteigert werden konnte. Im humanen Blutplasma liegen GSA-Konzentrationen von 0,7 μM vor [Lazdins und Dawborn, 1997]. Vermutlich besitzen die Schaltzellen der Niere, in den SLC22A13r exprimiert wird, keine höheren Konzentrationen dieser Guanidinverbindung, so dass zumindest GSA nicht als Triebkraft von SLC22A13h verwendet wird. Da GSA und GGA von OAT1h als Substrat akzeptiert werden, ist die Fähigkeit diese Guanidiniumverbindungen zu transportieren nicht auf SLC22A13 beschränkt. Jedoch sind nicht alle OATs in der Lage diese Verbindungen zu akzeptieren. Denn URAT1h zeigte bei Expression in HEK293-Zellen keine Veränderung im intrazellulären Gehalt dieser Substanzen. Was nicht überrascht, da URAT1 kein α -Ketoglutarat transportiert [Hagos et al., 2007] und vermutlich nicht mit Dicarboxylate wie GSA und GGA interagieren kann.

4.2.2 SLC22A13h akzeptiert *para*-Aminohippurat, α -Ketoglutarat und Urat als Substrat

Die nicht-physiologische Substanz *para*-Aminohippurat, die zur Nierenfunktionsprüfung beim Menschen eingesetzt wird und der Zitratzyklusmetabolit α -Ketoglutarat sowie das Abbauprodukt der Purinbasen Urat, sind Substrate der OATs. Es konnte ermittelt werden, dass SLC22A13h diese ebenfalls transportiert. Die TE war hierbei für PAH mit $9 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$ gegenüber α -Ketoglutarat $2,5 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$ und Urat $1,7 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$ am höchsten. Um den hier gefundenen Transport dieser Substrate für SLC22A13 besser einordnen zu können, wurden diese mit OAT1h und URAT1h verglichen. OAT1h war hierbei der Transporter mit der stärksten Transportaktivität bezogen auf PAH, Urat und Glutarat welches stellvertretend für α -Ketoglutarat verwendet wurde. Überraschenderweise war die Urat-Aufnahme durch URAT1h sehr gering. SLC22A13h transportierte Urat effizienter. Ein Funktionsverlust von URAT1h ist assoziiert mit der Krankheit der idiopathischen renalen Hypourikämie [Enomoto et al., 2002]. Es ist also die oder eine physiologische Aufgabe dieses Transporters Urat zu transportieren. Eine mögliche Ursache für den geringen Urat-Transport könnte sein, dass die Triebkräfte für die Aufnahme von Urat unter den hier verwendeten Versuchsbedingungen nicht ausreichend vorhanden waren. Der nicht nachweisbare Transport von Glutarat durch URAT1 bestätigt, dass dieser Transporter α -Ketoglutarat nicht als Substrat akzeptiert.

Bahn und Mitarbeiter konnten parallel zu dieser Arbeit nachweisen, dass SLC22A13 Nikotinat transportiert. Dies konnte hier ebenfalls bestätigt werden. Der Transporter besaß zu Nikotinat ein TE von $15 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$. Jedoch ist Nikotinat kein spezifisches Substrat

für SLC22A13h denn OAT1h ist ebenfalls in der Lage Nikotinat zu transportieren [Rizwan und Burckhardt, 2007].

Aus obigen Daten geht hervor, dass SLC22A13h überlappende Substratspezifitäten mit den Anionentransportern aus der SLC22-Familie aufweist. Es existieren jedoch auch Unterschiede, so zeigte OAT1h einen cGMP Transport, der für SLC22A13h nicht nachgewiesen werden konnte.

4.2.3 SLC22A13h akzeptiert Glycocholat, Glycylprolin, Prolylglycin und Pantothenat als Substrat

Da PAH, welches von SLC22A13h als Substrat akzeptiert wird, in seiner Struktur ein Glycin aufweist, wurden glycinhaltige Verbindungen auf einen Transport untersucht. Hierbei wurde festgestellt, dass die Dipeptide Glycylprolin und Prolylglycin als Substrate akzeptiert werden, jedoch betrug die TE lediglich 1 bzw. 0,5 $\mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$. Des Weiteren konnte für Glycocholat, eine Komponente der Gallensäure und für das Vitamin Pantothenat bei hohen Aufnahmekonzentrationen ein Transport über SLC22A13h nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass der zelluläre Gehalt von Glycylprolin, Prolylglycin und des Pantothenats bei den nur mit Puffer inkubierten, induzierten Zellen erniedrigt war, lässt sich wahrscheinlich auf einen Efflux dieser Substanzen durch SLC22A13h zurückführen. Dies unterstreicht, die oben aufgestellte Vermutung, dass SLC22A13h als Triebkraft für den Transport von Substraten in die Zelle einen von intrazellulär nach extrazellulär gerichteten Gradienten organischer Verbindungen nutzt. Die Tatsache, dass Glycylprolin, Prolylglycin und Kreatin, die bei physiologischen pH als Zwitterionen vorliegen, transportiert werden können, zeigt dass dieser Transporter nicht nur organische Anionen als Substrat akzeptieren kann.

4.2.4 Substratspektrum von SLC22A13

In Abbildung 4.3 ist das Substratspektrum des humanen SLC22A13 dargestellt. Das zur Zeit beste bekannte Substrat für SLC22A13 ist die Nikotinsäure mit einer TE von 15 $\mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$, das am schwächsten transportierte Substrat ist Guanidiniumglutarat mit einer TE von 0,02 $\mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$. Ein physiologisch relevantes Substrat besitzt nach unseren Erfahrungen eine TE in der Größenordnung von 50 $\mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$ bei Überexpression in Mammaliazelllinien [Schömig et al., 2006]. Der humane Carnitin-Transporter besitzt für sein physiologisches Substrat Carnitin eine TE von ca. 130 $\mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$ bei heterologer Expression in HEK293-Zellen [Grigat et al., 2009]. PAH welches als Modellsubstrat für OAT1 gehandhabt wird [Anzai et al., 2006], weist bei heterologer Expression in HEK293-Zellen eine TE von ca. 50 $\mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$ auf. Es ist möglich,

dass für SLC22A13h, bei den hier durchgeführten Versuchen, eventuelle Faktoren (Membranbeschaffenheit, regulatorische Proteine, bestimmte Metabolite) nicht gegeben waren und somit den Transport abgeschwächt haben könnten wie eventuell bei URAT1. Jedoch scheinen andere Transporter OAT2 und OAT1, der wie SLC22A13, basolateral in Nierenzellen exprimiert wird und vermutlich den gleichen Mechanismus für die Aufnahme von Substraten nutzt, nicht in ihrer Transportleistung beeinträchtigt gewesen zu sein. Die physiologische Relevanz der hier gefundenen Substrate für SLC22A13 ist vermutlich, wegen der niedrigen TE, unbedeutend. Es lässt sich aber aus dem Substratspektrum ableiten, dass der Transporter eine Präferenz zu organische Anionen besitzt.

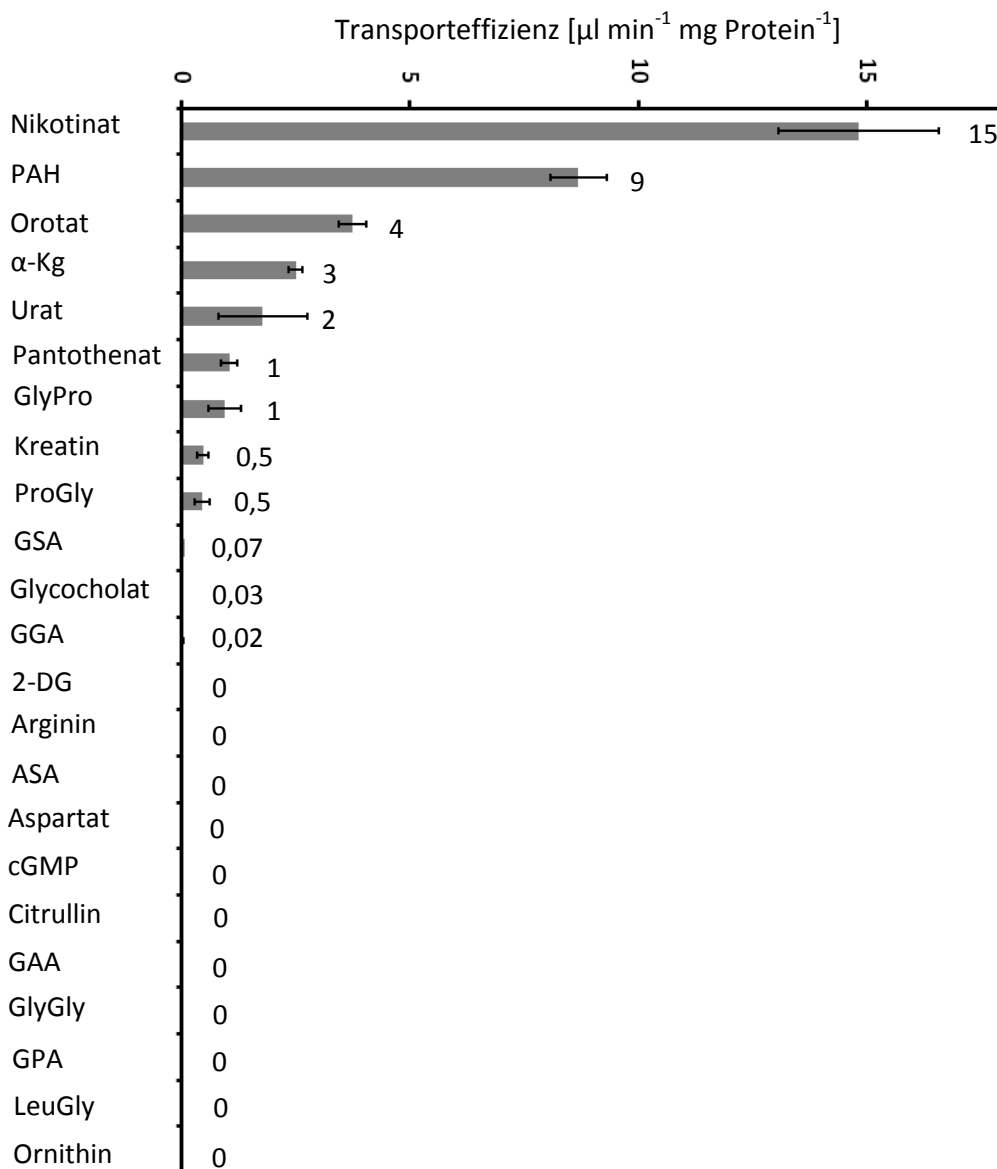


Abb. 4.3: Aufgetragen ist die Transporteffizienz von SLC22A13h der in dieser Arbeit untersuchten Substanzen. PAH = para-Aminohippurat, α -Kg = α -Ketoglutarat, GlyPro = Glycylprolin, ProGly = Prolylglycin, GSA = Guanidinosuccinat, GGA = Gaunidinoglutarat, 2-DG = 2-Deoxyguanosin, ASA = Argininosuccinat, cGMP = cyclisches Guanosinmonophosphat, GAA = Guanidiniumacetat, GlyGly = Glycylglycin, GPA = Guanidiniumpropionat, LeuGly = Leucylglycin.

4.2.5 Lokalisation von SLC22A13r

Es war bekannt, dass SLC22A13 hauptsächlich in der humanen Niere exprimiert wird [S. Golz, Bayer Healthcare, Wuppertal]. Ob dieses analog für die Ratte gilt, wurde zuvor nicht untersucht. Die mRNA des Transporters konnte in der Rattenniere nachgewiesen werden. Für die untersuchten Organe Leber und Herz wurde keine erkennbare Expression ermittelt. Es hat den Anschein, dass SLC22A13 in der Ratte, wie beim Menschen, primär in der Niere exprimiert wird. Die exakte Lokalisation von SLC22A13r wurde mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers ermittelt. Hierbei wurden ausschließlich basolaterale Färbungen der Zellmembranen im Sammelrohrsystem detektiert.

Lee und Mitarbeiter konnten in der Maus SLC22A13 zusätzlich zum Sammelrohrsystem, noch im Glomerulus, proximalen Tubulus und im distalen Tubulus nachweisen. Allerdings ist vermutlich die Spezifität des Antikörpers von Lee und Mitarbeitern gegen SLC22A13m (Maus) gering. Das Epitop, gegen den der Antikörper gerichtet wurde, hat eine hohe Ähnlichkeit zu anderen Mitgliedern der SLC22-Familie, die bekanntlich in der Niere exprimiert werden. So sind z.B. 10 von 16 Aminosäuren identisch mit OAT1m (Abb. 4.4). Es wäre demnach möglich, dass dieser Antikörper nicht nur SLC22A13 im Sammelrohr detektierte sondern zusätzlich noch einige andere Transporter aus der SLC22-Familie.

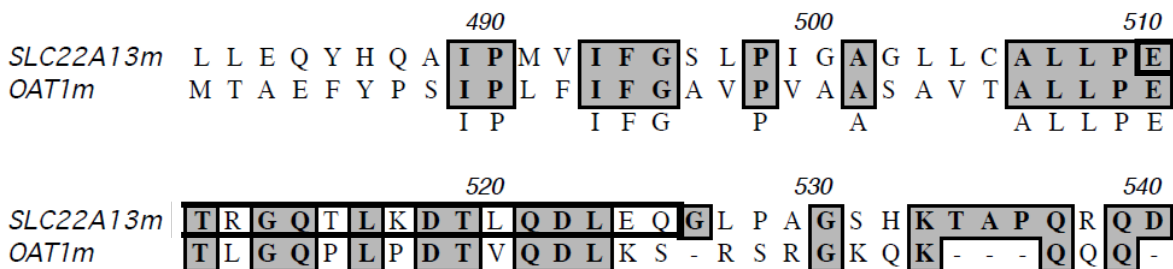
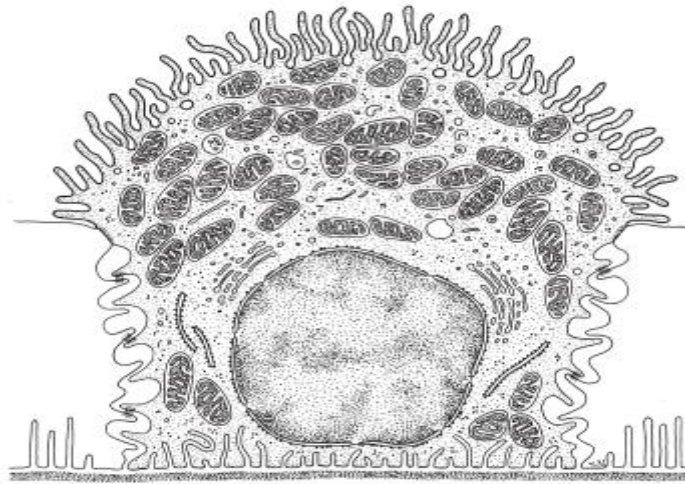


Abb.4.4: Alignment vom C-Terminalen Bereich zwischen SLC22A13 und OAT1 der Maus. Die umrandeten Aminosäuren kennzeichnen das Epitop des Anit-SLC22A13m von Lee und Mitarbeitern.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die intensivste Färbung die Sammelrohre des äußeren Marks aufwies. Auf mRNA-Ebene konnte bestätigt werden, dass in diesem Bereich der Rattenniere der Transporter am stärksten transkribiert wird. Charakteristisch für das Sammelrohrsystem ist das heterogene Epithel. So setzt sich der Verbindungstubulus aus unterschiedlichen Zellen zusammen: den Hauptzellen (Principal cells), den Schaltzellen (Intercalated cells) und den Verbindungstubuluszellen. Die kortikalen Sammelrohre und die des äußeren Marks sowie die Sammelrohre im oberen Abschnitt des inneren Marks bestehen aus den Hauptzellen und den Schaltzellen. Letztere nehmen in den Sammelrohren, die zum inneren Mark verlaufen, kontinuierlich ab [Brown et. al., 1988a, 1988b]. Im tieferen inneren Mark besteht das Sammelrohrepithel, neben den Hautzellen,

überwiegend aus den „inneren Sammelrohrmarkzellen“, die Schaltzellen sind in diesem Abschnitt nicht mehr vertreten [Kriz und Kaissling, 2007]. Die Anzahl der markierten Zellen fiel in den Sammelrohren, die zum inneren Mark verlaufen, kontinuierlich ab. Dieses ist ein starkes Indiz dafür, dass es sich hierbei um die Schaltzellen des Sammelrohrs handelt. Morphologisch und funktionell werden drei Typen von Schaltzellen unterschieden: A-Typ, B-Typ und „non A-non B“-Typ. Der letzte Schaltzelltyp ist in der Ratte kaum vertreten [Kriz und Kaissling, 2007]. A-Typ Schaltzellen zeichnen sich besonders durch eine stark gewölbte apikale Membran, die ins Sammelrohlumen hineinreicht aus (Abb. 4.5).

A-Typ



B-Typ

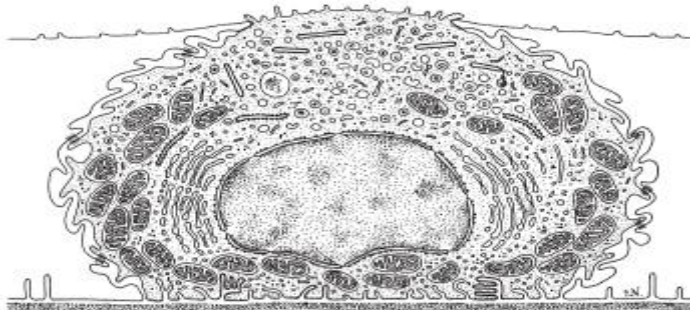


Abb. 4.5: Schematische Darstellung von Schaltzellen A-Typ (oben) und B-Typ (unten) im Sammelrohrsystem. Aus Seldin and Giebisch's The Kidney Vol. 4.

Da vor allem Zellen ein Signal zeigten, deren apikale Membran deutlich ins Sammelrohlumen hineinreichte, handelte es sich hierbei wahrscheinlich um die A-Typ Schaltzellen in denen SLC22A13r in der basolateralen Membran lokalisiert ist. Jedoch wurde SLC22A13r nicht nur in Schaltzellen detektiert, sondern im CNT wurde in allen Epithelzellen eine schwächere Färbung relativ zu den mutmaßlichen A-Typ Schaltzellen beobachtet.

Die physiologische Funktion der Schaltzellen wird darin gesehen, dass sie an der Säure-Base-Homöostase beteiligt sind. A-Typ Zellen scheiden bei einer Azidose Protonen über eine apikale H^+ -ATPase ins Sammelrohlumen und führen Hydrogencarbonat durch den basolateralen Transporter AE1 („Anionen Exchanger 1“, SLC4A1) dem Blut zu. B-Typ-Zellen

sekretieren bei einer Alkalose Hydrogencarbonat mittels des apikalen Pendrinproteins (SLC26A4) in den Endharn und resorbieren Protonen durch die basolaterale H⁺-ATPase [Kriz und Kaissling, 2007; Madsen et al., 2008] (Abb. 4.6). Eine mögliche physiologische Aufgabe von SLC22A13 könnte somit sein, dass organische Anionen über die A-Typ Schaltzellen in den Harn sekretiert werden und somit die Funktion der A-Typ Schaltzellen, bei einer Azidose den Organismus von überschüssiger Säure zu befreien, unterstützen würde. In der apikalen Membran von A-Typ Schaltzellen der Ratte konnte der Transporter SLC22A9 (OAT7/OAT8) nachgewiesen werden welcher organische Anionen transportieren soll [Yokoyama et al., 2008]. Es wäre denkbar, dass SLC22A13 ein Substrat von der Blut zugewandten Seite in die Schaltzellen transportiert, welches durch SLC22A9 über die luminalen Membran in den Harn sekretiert wird. Da beide Transporter die Fähigkeit besitzen als Austausch zu operieren, wäre auch der umgekehrte Weg, die Resorption, möglich. Der proximale Tubulus wird als dominierender Abschnitt des Nephrons in der Sekretion von organischen Anionen angesehen [Burckhardt und Koepsell, 2007]. Ljubojevic und Mitarbeiter konnten zeigen, dass OAT3r (SLC22A8) neben den proximalen Tubulus, zusätzlich in der basolateralen Membran der Hauptzellen im Sammelrohr lokalisiert ist. Die Aufgabe von OAT3 im proximalen Tubulus wird darin gesehen das er für die Ausscheidung von organischen Anionen verantwortlich ist. [Rizwan und Burckhardt]. Seine Funktion im Sammelrohr ist jedoch zur Zeit noch offen. Mit SLC22A13 und SLC22A9 sowie OAT3 könnten auch die Epithelzellen des Sammelrohrs in der Eliminierung von organischen Anionen involviert sein (Abb. 4.6).

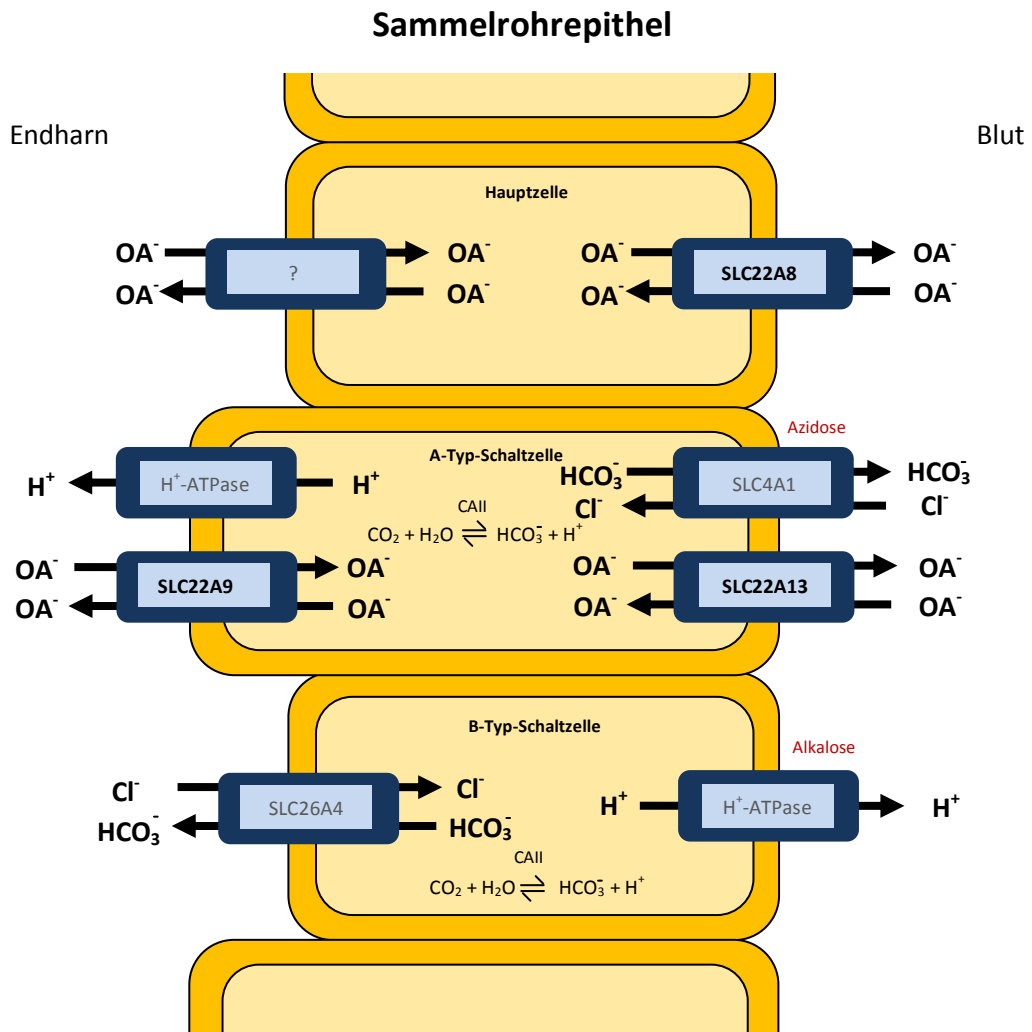


Abb. 4.6: Schematische Darstellung des Ratten Sammelrohrepithels. CAII = Carboanhydrase II, OA^- = organische Anionen.

4.3 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass OAT2r Orotat sehr effizient transportiert. Die starke Anreicherung dieses Pyrimidinderivats gegenüber dem äußeren Milieu ist ein eindeutiger Hinweis auf eine Triebkraft, die den Transport begünstigt. Die Tatsache, dass OAT2 ein Mitglied der Solute Carrier ist, spricht gegen die Hydrolyse von ATP, einem Charakteristikum der ABC-Transporter, als Energiedonor. Wahrscheinlicher ist ein von intrazellulär nach extrazellulär gerichteter Gradient, der durch ein oder mehrere organische Anionen aufgebaut werden könnte. Um diese Frage zu klären, kann die in dieser Arbeit beschriebene Methode der Differenz-Abtönungs-Analyse angewendet werden. Hierzu müsste, anstatt in OAT2r-Zellysaten, in der Orotat-Aufnahmelösung nach Unterschieden in den Massenspektren gesucht werden. Wenn es sich bei OAT2r um einen Austauschere handelt, müssten die Substanzen, deren Gradient die Energie für den Orotat-Transport liefert, extrazellulär akkumulieren und könnten somit mittels LC-MS Differenz Abtönung identifiziert werden.

Da SLC22A13 OAT2 phylogenetisch am nächsten steht, könnten neu gewonnene Erkenntnisse über das Substratspektrum von OAT2 gleichzeitig Hinweise zur Identifizierung von Substanzen dienen, die von SLC22A13 als Substrat akzeptiert werden.

Bezüglich des Orotat-Transports, wurde in dieser Arbeit ein Unterschied zwischen Mensch und Ratte gefunden. Um Speziesunterschiede weiter aufzuklären ist es sinnvoll OAT2 aus weiteren Spezies zu klonieren. Hierfür würde sich der Transporter aus dem Schwein, der eine Aminosäureidentität von 90 % zu der humanen Variante aufweist, und die Maus als naher Verwandter der Ratte anbieten.

Eine Verbindung die dem Orotat sehr ähnlich ist, ist das 5-Fluoroorotat (5-FO), welches anstelle eines Wasserstoffs ein Fluor-Atom aufweist. Zellen die 5-FO aufnehmen synthetisieren das zytotoxische 5-Fluorodeoxyuridin-monophosphat (FdUMP). FdUMP verhindert die Synthese von Thymidinmonophosphat, indem es kovalent an die Thymidylat-Synthase bindet [Defoor et al., 2007]. 5-FO wirkt somit in gleicher Weise wie das Zytostatikum 5-Fluorouracil. In Prokaryonten und in Hefe wird 5-FO bereits als negativer Selektionsmarker verwendet [Solem et al., 2008, Ko et al., 2008]. Sollte OAT2r 5-FO transportieren, so besteht die Möglichkeit, dass mit diesem Transporter ein negativer Selektionsmarker in höheren Eukaryontenzellen gewonnen werden kann. Erste experimentelle Daten der AG-Gründemann bestätigen, dass 5-FO mit gleicher Effizienz wie Orotat, von OAT2r transportiert wird (Daten nicht gezeigt).

5 Zusammenfassung

OAT2 (SLC22A7) und SLC22A13h sind Solute Carrier die in mehreren Organismen konserviert vorliegen. Die physiologische Bedeutung dieser Proteine ist jedoch unklar. Ziel dieser Arbeit war es, diese verwandten Transporter näher zu charakterisieren. Da Transporter im Wesentlichen durch ihre Substrate definiert werden, wurden Versuche durchgeführt, um physiologisch relevante Substrate für OAT2 und SLC22A13 zu finden. Dafür wurden beide Transporter aus Niere bzw. Leber kloniert und eine SLC22A13h (human)- und OAT2h- HEK293-Zelllinie generiert. Um sicherzugehen, dass beide Transporter in HEK293-Zellen bei Induktion exprimiert werden und die Plasmamembran erreichen, wurde eine GFP-Chimäre dieser Proteine generiert. Beide heterolog exprimierten Konstrukte erreichten in HEK293-Zellen die Plasmamembran und wurden bei Induktion von 52-98 % der Zellen exprimiert. Wohingegen im ausgeschalteten Zustand die Transporter nur zu 6-14 % exprimiert wurden. Die beiden Zelllinien eigneten sich daher für die Versuche der Substratsuche nach der LC-MS Differenz Abtönungs Methode. Hierbei konnte in Zellen, die OAT2 exprimierten ein Signal m/z 138 und bei der SLC22A13-Zelllinie im nicht-induzierten Zustand ein Signal bei m/z 176 detektiert werden. Ersteres wurde als Trigonellin und letzteres als Guanidiniumsuccinat identifiziert.

Zellen die SLC22A13 exprimieren enthielten weniger GSA als nicht induzierte Zellen. Durch Aufnahmeexperimente mit hohen extrazellulären Konzentrationen von GSA und trans-Stimulations- sowie cis-Inhibitions- Experimente wurde gezeigt, dass GSA ein Substrat für SLC22A13 ist. Darüber hinaus konnten für die organischen Anionen α -Ketoglutarat, Glutarat, Glycocholat, Guanidiniumglutarat (GGA), Nikotinat, para-Aminohippurat, Pantothenat, Orotat und Urat sowie für die Zwitterionen Glycylprolin, Prolylglycin und Kreatin ein Transport nachgewiesen werden. Die höchste Transporteffizienz (TE) von $15 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$ wurde hierbei mit dem Nikotinat erzielt. Allgemein besitzt SLC22A13 eine Präferenz zu organischen Anionen. Die Tatsache, dass die intrazellulären Gehalte von GSA, GGA, Glycylprolin, Prolylglycin und Pantothenat vermindert waren, wenn der Transporter zur Expression gebracht wurde und diese Substanzen nicht im Inkubationsmedium angeboten wurden sowie das Ergebnis des trans-Stimulationsexperiment, sprechen dafür, dass SLC22A13 als Austauschoperiert und dabei evtl. einen von intra- nach extrazellulär gerichteten Gradienten organischer Verbindungen nutzt.

Neben dem Aufspüren von Substraten wurde die exakte Lokalisation von SLC22A13, der hauptsächlich in der Niere exprimiert wird, durch eine Antikörperfärbung untersucht. So konnte erstmalig gezeigt werden, dass der Transporter in der basolateralen Membran von Schaltzellen im Sammelrohr der Rattenniere lokalisiert ist. Aufgrund dieser Tatsache konnte

eine Hypothese aufgestellt werden, in der SLC22A13 für die Exkretion und/oder Resorption von organischen Anionen, im Zusammenspiel mit dem apikalen SLC22A9, eine Rolle spielt.

Für OAT2 wurde gezeigt, dass Trigonellin ein spezifisches Substrat für den humanen ($TE = 1 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$) und den orthologen Ratten Transporter ($TE = 3 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$, $K_m = 409 \mu\text{M}$) ist. Die verwandten Transporter OAT1h und SLC22A13h akzeptieren Trigonellin nicht als Substrat. OAT2 unterscheidet sich Spezies übergreifend von den anderen OATs innerhalb der SLC22-Familie indem er in der potentiellen Transmembrandomäne 10 eine negativ geladene Aminosäure, die Glutaminsäure, aufweist. Es konnte gezeigt werden, dass der Austausch dieser Aminosäure durch Glutamin an Position 441 bei OAT2h den Transport des Zwitterions Trigonellin stark vermindert. Mit Trigonellin als Leitstruktur wurden strukturähnliche Verbindungen auf einen Transport untersucht. Nikotinat-Ribosid wurde hierbei als ein weiteres Substrat nachgewiesen, welches wie Trigonellin effektiver von dem Ratten OAT2 (OAT2r) transportiert wurde ($TE = 7 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$). Des Weiteren wurde erstmalig aufgedeckt, dass OAT2r die endogene Substanz Orotsäure bzw. das Salz Orotat sehr effizient transportiert ($TE = 74\text{-}99 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$, $K_m = 234 \mu\text{M}$). Andere Mitglieder der organischen Anionentransporter OAT1h und SLC22A13h transportieren Orotat bis zu 60 x schlechter. OAT2r exprimierende HEK293-Zellen reicherten Orotat um den Faktor 86 gegenüber dem äußeren Milieu an. Diese Akkumulation durch OAT2r war Natrium- und pH-unabhängig. Andere anorganische Ionen wie Ca^{2+} , Cl^- , K^+ , Mg^{2+} , PO_4^{3-} und SO_4^{2-} nahmen ebenfalls keinen Einfluss auf den Orotat-Transport.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass bezogen auf den Orotat-Transport Speziesunterschiede zwischen OAT2h und OAT2r existieren. Die in diesem Zusammenhang gezeigten Ergebnisse liefern erstmalig eine Erklärung für die in der Literatur beschriebene Beobachtung, nach denen ausschließlich Ratten eine Fettleber (Steatosis hepatis) nach Orotatgabe entwickeln. Mit OAT2r wurde zum ersten mal ein Orotat-Transporter in Eukaryonten identifiziert

6 Abkürzungen

2-DG	2-Deoxyguanosin
5-FO	5-Fluoroorotat
Abb.	Abbildung
ABC	ATB-Binding-Cassette
ABS	Aminobenzoat
AMP	Adenosinmonophosphat
ampr	β -Lactamase
ASA	Argininosuccinat
ASF	Amphiphilic Solute Facilitator
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumine, Rinderserumalbumin
CCD	cortical collecting duct, kortikales Sammelrohr
CD	collecting duct, Sammelrohr
CE	Collision Energy
CNT	connecting tubule, Verbindungs-Tubulus
CIA	Chloroform-Isoamylalkohol
CMP	Cytomegalievirus
CTT	Carnitin-Transporter
DCT	Distales Convolut
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DL	Denaturierungs-Lösung
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
EBNA	Epstein-Barr nuclear antigen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	enhanced green fluorescent protein
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMT	Extraneuronaler Monoamin-Transporter
ESI	Elektrospray-Ionisierung

ET	Ergothionein
ETT	Ergothionein-Transporter
FdUMP	Fluorodeoxyuridin-monophosphat
g	Erdbeschleunigung, 9,81 m/s
GAA	Guanidiniumacetat
GGA	Guanidiniumglutarat
GPA	Guanidiniumpropionat
GSA	Guanidiniumsuccinat
h	human
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethylen)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
HEK	Human Embryonic Kidney
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IM	inner medulla, inneres Mark
ISOM	inner stripe outer medulla, innerer Streifen äußeres Mark
K_{cat}	Wechselzahl
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
kDa	Kilodalton
KRH	Krebs-Ringer-Henseleit Puffer
LB	Luria Bertani
LC	Liquid Chromatography
M	Mol
m	Maus
MFS	Major Facilitator Superfamilie
MRM	Multiple Reaction Monitoring
m/z	Quotient aus Masse durch Ladung
MS	Mass Spectrometry
NR	Nikotinat-D-Ribosid
NRN	Nikotinat-D-Ribonukleotid
NT	nicht-transfizierte HEK293-Zellen
OAT	Organic Anion-Transporter
OCT	Organic Cation-Transporter
OCTN	Novel Organic Cation-Transporter
OM	outer medulla, äußeres Mark
Ori	Replikationsursprung
OSOM	outer stripe outer medulla, äußerer Streifen des äußeren Marks
PAH	para-Aminohippurat
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion

PBS	Phosphate buffered saline
PEG	Polyethylenglycol
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
PFA	Paraformaldehyd
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
r	Ratte
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Standard Error of Mean, Standardfehler des arithmetischen Mittels
SLC	Solute Carrier
SOB	Super Optimal Broth
SOC	SOB + 20 mM Glucose
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Transporteffizienz
Tet	Tetrazyklin
TetR	Tetracyclin Repressor
T-Mix	Terminator-Mix
Trig	Trigonellin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
U	Unit, Einheit der Enzymaktivität
UpM	Umdrehungen pro Minute
v	Aufnahmegeschwindigkeit
V_{max}	Maximale Aufnahmegeschwindigkeit
V_{max}/K_m	TE
v/S	Clearance (TE)
v/v	volume per Volume, Volumen pro Volumen
w/v	wieght per Volume, Gewicht pro Volumen

7 Literaturverzeichnis

Al Banchaabouchi M, Marescau B, D'Hooge R, Van Marck E, De Deyn PP. **Biochemical, histological and behavioral consequences of nephrectomy in young and aged mice.** *Nephron*. 2001 Sep;89(1):90-100.

Allred KF, Yackley KM, Vanamala J, Allred CD. **Trigonelline is a novel phytoestrogen in coffee beans.**

J Nutr. 2009 Oct;139(10):1833-8. Epub 2009 Aug 26.

Anzai N, Kanai Y, Endou H. **Organic anion transporter family: current knowledge.**

J Pharmacol Sci. 2006;100(5):411-26. Review.

Aoyagi K, Nagase S, Tomida C, Takemura K, Akiyama K, Koyama A. **Synthesis of guanidinosuccinate from argininosuccinate and reactive oxygen in vitro.**

Enzyme Protein. 1996a;49(4):199-204.

Aoyagi K, Nagase S, Gotoh M, Akiyama K, Satoh M, Hirayama A, Koyama A. **Role of reactive oxygen and argininosuccinate in guanidinosuccinate synthesis in isolated rat hepatocytes.**

Enzyme Protein. 1996b;49(4):205-11.

Aoyagi K, Akiyama K, Shahrzad S, Tomida C, Hirayama A, Nagase S, Takemura K, Koyama A, Ohba S, Narita M. **Formation of guanidinosuccinic acid, a stable nitric oxide mimic, from argininosuccinic acid and nitric oxide-derived free radicals.**

Free Radic Res. 1999, Jul;31(1):59-65.

Aoyagi K, Shahrzad S, Iida S, Tomida C, Hirayama A, Nagase S, Takemura K, Koyama A, Ohba S, Narita M, Cohen BD. **Role of nitric oxide in the synthesis of guanidinosuccinic acid, an activator of the N-methyl-D-aspartate receptor.**

Kidney Int Suppl. 2001, Feb;78:S93-6.

Babu E, Takeda M, Narikawa S, Kobayashi Y, Yamamoto T, Cha SH, Sekine T, Sakthisekaran D, Endou H. **Human organic anion transporters mediate the transport of tetracycline.**

Jpn J Pharmacol. 2002 Jan;88(1):69-76.

Bach M, Grigat S, Pawlik B, Fork C, Utermöhlen O, Pal S, Banczyk D, Lazar A, Schömig E, Gründemann D. **Fast set-up of doxycycline-inducible protein expression in human cell lines with a single plasmid based on Epstein-Barr virus replication and the simple tetracycline repressor.**

FEBS J. 2007 Feb;274(3):783-90

Bacher P, Giersiefer S, Bach M, Fork C, Schömig E, Gründemann D. **Substrate discrimination by ergothioneine transporter SLC22A4 and carnitine transporter SLC22A5: gain-of-function by interchange of selected amino acids.**

Biochim Biophys Acta. 2009 Oct 5.

Bahn A, Hagos Y, Reuter S, Balen D, Brzica H, Krick W, Burckhardt BC, Sabolic I, Burckhardt G. **Identification of a new urate and high affinity nicotinate transporter, hOAT10 (SLC22A13).**

J Biol Chem. 2008 Jun 13;283(24):16332-41.

Ballatori N. **Biology of a novel organic solute and steroid transporter, OSTalpha-OSTbeta.**

Exp Biol Med (Maywood). 2005 Nov;230(10):689-98.

Bailey JI, Mitch WE. **Pathophysiology of uremia.**

In: Brenner BM, Rector Fc, eds. The Kidney. New York: W.B. Saunders; 2004:2139-2164

Batsch A, Noetel A, Fork C, Urban A, Lazic D, Lucas T, Pietsch J, Lazar A, Schömig E, Gründemann D. **Simultaneous fitting of real-time PCR data with efficiency of amplification modeled as Gaussian function of target fluorescence.**

BMC Bioinformatics. 2008 Feb 12;9:95.

Belenky P, Racette FG, Bogan KL, McClure JM, Smith JS, Brenner C. **Nicotinamide riboside promotes Sir2 silencing and extends lifespan via Nrk and Urh1/Pnp1/Meu1 pathways to NAD+.**

Cell. 2007 May 4;129(3):453-4.

Breidert T., Spitzenberger F., Grundemann D. and Schomig E. **Catecholamine transport by the organic cation transporter type 1 (OCT1).**

Br J Pharmacol 1998 125, 218-224.

Brosnan ME, Brosnan JT. **Orotic acid excretion and arginine metabolism.**

J Nutr. 2007 Jun;137(6 Suppl 2):1656S-1661S.

Brown D, Hirsch S, Gluck S. **An H-ATPase in opposite plasma membrane domains in kidney epithelial cell subpopulations.**

Nature 1988a;331:622–624.

Brown D, Hirsch S, Gluck S. **Localization of a proton-pumping ATPase in rat kidney.**

J Clin Invest 1988b;82:2114–2126.

Buist SC, Cherrington NJ, Klaassen CD. **Endocrine regulation of rat organic anion transporters.**

Drug Metab Dispos. 2003 May;31(5):559-64.

Buist SC, Cherrington NJ, Choudhuri S, Hartley DP, Klaassen CD. **Gender-specific and developmental influences on the expression of rat organic anion transporters.**

J Pharmacol Exp Ther. 2002 Apr;301(1):145-51.

Burckhardt G, Bahn A, Wolff NA. **Molecular physiology of renal p-aminohippurate secretion.**

News Physiol Sci. 2001 Jun;16:114-8.

Burckhardt G. and Koepsell H. **Organic Anion and Cation Transporters in Renal Elimination of Drugs**

Seldin and Giebisch's The Kidney Vol. 4 2007

Chandra P, Brouwer KL. **The complexities of hepatic drug transport: current knowledge and emerging concepts.**

Pharm Res. 2004 May;21(5):719-35

Cihlar T, Lin DC, Pritchard JB, Fuller MD, Mendel DB, Sweet DH. **The antiviral nucleotide analogs cidofovir and adefovir are novel substrates for human and rat renal organic anion transporter 1.**

Mol Pharmacol. 1999 Sep;56(3):570-80.

Cohen BD. **Methyl group deficiency and guanidino production in uremia.**

Mol Cell Biochem. 2003, Feb;244(1-2):31-6. Review.

Cropp CD, Komori T, Shima JE, Urban TJ, Yee SW, More SS, Giacomini KM. **Organic anion transporter 2 (SLC22A7) is a facilitative transporter of cGMP.**

Mol Pharmacol. 2008 Apr;73(4):1151-8.

Deignan JL, Marescau B, Livesay JC, Iyer RK, De Deyn PP, Cederbaum SD, Grody WW. **Increased plasma and tissue guanidino compounds in a mouse model of hyperargininemia.**

Mol Genet Metab 2008 Feb;93(2):172-8.

De Deyn PP, D'Hooge R, Van Bogaert PP, Marescau B. **Endogenous guanidino compounds as uremic neurotoxins.**

Kidney Int Suppl. 2001 Feb;78:S77-83.

Defoor E, Kryger MB, Martinussen J. **The orotate transporter encoded by oroP from *Lactococcus lactis* is required for orotate utilization and has utility as a food-grade selectable marker.**

Microbiology. 2007 Nov;153(Pt 11):3645-59.

D'Hooge R, Raes A, Lebrun P, Diltoer M, Van Bogaert PP, Manil J, Colin F, De Deyn PP. **N-methyl-D-aspartate receptor activation by guanidinosuccinate but not by methylguanidine: behavioural and electrophysiological evidence.**

Neuropharmacology. 1996 Apr;35(4):433-40.

Deignan JL, Marescau B, Livesay JC, Iyer RK, De Deyn PP, Cederbaum SD, Grody WW. **Increased plasma and tissue guanidino compounds in a mouse model of hyperargininemia.**

Mol Genet Metab. 2008 Feb;93(2):172-8.

Durschlag RP, Robinson JL. **Orotic acid-induced metabolic changes in the rat.**

J Nutr. 1980a Apr;110(4):816-21.

Durschlag RP, Robinson JL. **Species specificity in the metabolic consequences of orotic acid consumption.**

J Nutr. 1980b Apr;110(4):822-8

Enomoto A, Kimura H, Chairoungdua A, Shigeta Y, Jutabha P, Cha SH, Hosoyamada M, Takeda M, Sekine T, Igarashi T, Matsuo H, Kikuchi Y, Oda T, Ichida K, Hosoya T, Shimokata K, Niwa T, Kanai Y, Endou H. **Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels.**

Nature. 2002 May 23;417(6887):393, 395.

Enomoto A, Takeda M, Shimoda M, Narikawa S, Kobayashi Y, Kobayashi Y, Yamamoto T, Sekine T, Cha SH, Niwa T, Endou H. **Interaction of human organic anion transporters 2 and 4 with organic anion transport inhibitors.**

J Pharmacol Exp Ther. 2002 Jun;301(3):797-802.

Eraly SA, Hamilton BA, Nigam SK. **Organic anion and cation transporters occur in pairs of similar and similarly expressed genes.**

Biochem Biophys Res Commun. 2003 Jan 10;300(2):333-42

Giovannetti S, Cioni L, Balestri PL, Biagnini M. **Evidence that guanidines and some related compounds cause haemolysis in chronic uraemia.**

Clin Sci. 1968 Feb;34(1):141-8.

Glorieux GL, Dhondt AW, Jacobs P, Van Langerlaert J, Lameire NH, De Deyn PP, Vanholder RC. **In vitro study of the potential role of guanidines in leukocyte functions related to atherogenesis and infection.**

Kidney Int. 2004 Jun;65(6):2184-92.

Gregg D, Simonson, Alexandra C, Vincent, Kevin J, Roberg, Yue Huang and Victoria Iwanij **Molecular cloning and characterization of a novel liver-specific transport protein**

Journal of Cell Science 1994,107, 1065-1072

Griffin JL, Bonney SA, Mann C, Hebbachi AM, Gibbons GF, Nicholson JK, Shoulders CC, Scott J **An integrated reverse functional genomic and metabolic approach to understanding orotic acid-induced fatty liver.**

Physiol Genomics. 2004 Apr 13;17(2):140-9.

Grigat S, Fork C, Bach M, Golz S, Geerts A, Schömig E, Gründemann D. **The carnitine transporter SLC22A5 is not a general drug transporter, but it efficiently translocates mildronate.**

Drug Metab Dispos. 2009 Feb;37(2):330-7.

Gründemann D., and Koepsell H. **Ethidium bromide staining during denaturation with glyoxal for sensitive detection of RNA in agarose gel electrophoresis.**

Anal. Biochem. 1994, 216:459-461

Gründemann, D., Schechinger, B., Rappold, G. A., und Schömig, E. **Molecular identification of the corticosterone-sensitive extraneuronal catecholamine transporter.**

Nat Neurosci. 1998 Sep;1(5):349-51.

Gründemann D., Liebich G., Kiefer N., Koster S. and Schomig E. **Selective substrates for non-neuronal monoamine transporters.**

Mol Pharmacol. 1999 56, 1-10.

Gründemann D, Harlfinger S, Golz S, Geerts A, Lazar A, Berkels R, Jung N, Rubbert A, Schömig E. **Discovery of the ergothioneine transporter.**

Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Apr 5;102(14):5256-61.

Haag C, Berkels R, Gründemann D, Lazar A, Taubert D, Schömig E. **The localisation of the extraneuronal monoamine transporter (EMT) in rat brain.**

J Neurochem. 2004 Jan;88(2):291-7.

Hagos Y, Krick W, Braulke T, Mühlhausen C, Burckhardt G, Burckhardt BC. **Organic anion transporters OAT1 and OAT4 mediate the high affinity transport of glutarate derivatives accumulating in patients with glutaric acidurias.**

Pflugers Arch. 2008 Oct;457(1):223-31.

Hagos Y, Stein D, Ugele B, Burckhardt G, Bahn A. **Human renal organic anion transporter 4 operates as an asymmetric urate transporter.**

J Am Soc Nephrol. 2007 Feb;18(2):430-9.

Hasannejad H, Takeda M, Taki K, Shin HJ, Babu E, Jutabha P, Khamdang S, Aleboyeh M, Onozato ML, Tojo A, Enomoto A, Anzai N, Narikawa S, Huang XL, Niwa T, Endou H. **Interactions of human organic anion transporters with diuretics.**

J Pharmacol Exp Ther. 2004 Mar;308(3):1021-9.

Hassan AS, Milner JA. **Alterations in liver nucleic acids and nucleotides in arginine deficient rats.**

Metabolism. 1981 Aug;30(8):739-44.

Hebbachi AM, Seelaender MC, Baker BW, Gibbons GF. **Decreased secretion of very-low-density lipoprotein triacylglycerol and apolipoprotein B is associated with decreased intracellular triacylglycerol lipolysis in hepatocytes derived from rats fed orotic acid or n-3 fatty acids.**

Biochem J. 1997 Aug 1;325 (Pt 3):711-9.

Hediger MA, Romero MF, Peng JB, Rolfs A, Takanaga H, Bruford EA. **The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins**

Pflugers Arch - Eur J Physiol (2004) 447:465–468

Hiramatsu M. **A role for guanidino compounds in the brain.**

Mol Cell Biochem. 2003 Feb;244(1-2):57-62.

Horowitz HI, Cohen BD, Martinez P, Papayoanou MF. **Defective ADP-induced platelet factor 3 activation in uremia.**

Blood. 1967 Sep;30(3):331-40.

Hughson M, Farris AB 3rd, Douglas-Denton R, Hoy WE, Bertram JF. **Glomerular number and size in autopsy kidneys: the relationship to birth weight.**

Kidney Int. 2003 Jun;63(6):2113-22.

Inazu, M., Takeda, H., und Matsumiya, T. **Expression and functional characterization of the extraneuronal monoamine transporter in normal human astrocytes.**

J Neurochem 2003 84, 43-52.

Ito K, Suzuki H, Horie T, Sugiyama Y. **Apical/basolateral surface expression of drug transporters and its role in vectorial drug transport.**

Pharm Res. 2005 Oct;22(10):1559-77.

Islam R, Anzai N, Ahmed N, Ellapan B, Jin CJ, Srivastava S, Miura D, Fukutomi T, Kanai Y, Endou H. **Mouse organic anion transporter 2 (mOat2) mediates the transport of short chain fatty acid propionate.**

J Pharmacol Sci. 2008 Mar;106(3):525-8. Epub 2008 Mar 12.

Jonker, J. W., Wagenaar, E., Mol, C. A., Buitelaar, M., Koepsell, H., Smit, J. W., und Schinkel, A. H. **Reduced hepatic uptake and intestinal excretion of organic cations in mice with a targeted disruption of the organic cation transporter 1 (Oct1 [Slc22a1]) gene.**

Mol Cell Biol., 2001, 21, 5471-7.

Kahvejian, A., Svitkin, Y. V., Sukarieh, R., M'Boutchou, M. N., and Sonenberg, N. **Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms.**

Genes Dev. 2005, 19, 104-13.

Kaler G, Truong DM, Sweeney DE, Logan DW, Nagle M, Wu W, Eraly SA, Nigam SK **Olfactory mucosa-expressed organic anion transporter, Oat6, manifests high affinity interactions with odorant organic anions.**

Biochem Biophys Res Commun. 2006 Dec 29;351(4):872-6.

Kekuda, R., Prasad, P. D., Wu, X., Wang, H., Fei, Y. J., Leibach, F. H., and Ganapathy, V. **Cloning and functional characterization of a potential-sensitive, polyspecific organic cation transporter (OCT3) most abundantly expressed in placenta.**

J Biol Chem 1998 273, 15971-9.

Khamdang S, Takeda M, Noshiro R, Narikawa S, Enomoto A, Anzai N, Piyachaturawat P, Endou H. **Interactions of human organic anion transporters and human organic cation transporters with nonsteroidal anti-inflammatory drugs.**

J Pharmacol Exp Ther. 2002 Nov;303(2):534-9

Kim J, Kim YH, Cha JH, Tisher CC, Madsen KM. **Intercalated cell subtypes in connecting tubule and cortical collecting duct of rat and mouse.**

J Am Soc Nephrol. 1999 Jan;10(1):1-12.

Kimura H, Takeda M, Narikawa S, Enomoto A, Ichida K, Endou H. **Human organic anion transporters and human organic cation transporters mediate renal transport of prostaglandins.**

J Pharmacol Exp Ther. 2002 Apr;301(1):293-8.

Ko N, Nishihama R, Pringle JR. **Control of 5-FOA and 5-FU resistance by *Saccharomyces cerevisiae* YJL055W.**

Yeast. 2008 Feb;25(2):155-60.

Kobayashi Y, Hirokawa N, Ohshiro N, Sekine T, Sasaki T, Tokuyama S, Endou H, Yamamoto T. **Differential gene expression of organic anion transporters in male and female rats.**

Biochem Biophys Res Commun. 2002a Jan 11;290(1):482-7.

Kobayashi Y, Ohshiro N, Shibusawa A, Sasaki T, Tokuyama S, Sekine T, Endou H, Yamamoto T. **Isolation, characterization and differential gene expression of multispecific organic anion transporter 2 in mice.**

Mol Pharmacol. 2002b, Jul;62(1):7-14.

Kobayashi Y, Ohbayashi M, Kohyama N, Yamamoto T. **Mouse organic anion transporter 2 and 3 (mOAT2/3[Slc22a7/8]) mediates the renal transport of bumetanide.**

Eur J Pharmacol. 2005a Nov 7;524(1-3):44-8.

Kobayashi Y, Ohshiro N, Sakai R, Ohbayashi M, Kohyama N, Yamamoto T. **Transport mechanism and substrate specificity of human organic anion transporter 2 (hOat2 [SLC22A7]).**

J Pharm Pharmacol. 2005b May;57(5):573-8.

Kobayashi Y, Sakai R, Ohshiro N, Ohbayashi M, Kohyama N, Yamamoto T. **Possible involvement of organic anion transporter 2 on the interaction of theophylline with erythromycin in the human liver.**

Drug Metab Dispos. 2005c May;33(5):619-22.

Koepsell H, Gorboulev V, Arndt P. **Molecular pharmacology of organic cation transporters in kidney.**

J Membr Biol. 1999 Jan 15;167(2):103-17.

Koepsell H, Lips K, Volk C. **Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications.**

Pharm Res. 2007 Jul;24(7):1227-51.

Koepsell H, Endou H. **The SLC22 drug transporter family.**

Pflugers Arch. 2004 Feb;447(5):666-76.

Kohfeldt, E., Maurer, P., Vannahme, C., and Timpl, R. **Properties of the extracellular calcium binding module of the proteoglycan testican.** *FEBS Lett.* 1997, **414**, 557-61.

Kojima R, Sekine T, Kawachi M, Cha SH, Suzuki Y, Endou H. **Immunolocalization of multispecific organic anion transporters, OAT1, OAT2, and OAT3, in rat kidney.**

J Am Soc Nephrol. 2002 Apr;13(4):848-57.

Kozak, M. **How strong is the case for regulation of the initiation step of translation by elements at the 3' end of eukaryotic mRNAs?**

Gene,2004, 343, 41-54.

Kriz W. and Bankir L. **A standard nomenclature for structures of the kidney**

Kidney International, Vol. 33 (1988), pp. 1-7

Kriz W. and Kaissling B. **Structural Organization of the Mammalian Kidney**

Seldin and Giebisch's The Kidney Vol. 4 (2007)

Landowski C.P., Suzuki Y., Hediger M.A. **The Mammalian Transporter Families**
Seldin and Giebisch's The Kidney Vol. 4 2007

Larson B. L. and Hegarty H. M. **Orotic Acid in Milks of Various Species and Commercial Dairy Products**
J Dairy Sci 1979, 62:1641-1644

Law CJ, Maloney PC, Wang DN. **Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters.**
Annu Rev Microbiol. 2008;62:289-305.

Lazdins I, Dawborn JK. **Concentration of guanidines in normal human plasma.**
Clin Exp Pharmacol Physiol. 1978

Lemieux MJ. **Eukaryotic major facilitator superfamily transporter modeling based on the prokaryotic GlpT crystal structure.**
Mol Membr Biol. 2007 Sep-Dec;24(5-6):333-41.

Lee WK, Hwang JS, Yun CH, Cha SH. **Identification of a kidney-specific mouse organic cation transporter like-1 (mOCTL1).**
Exp Mol Med. 2007 Dec 31;39(6):787-95.

LeFurgey A, Tisher CC. **Morphology of rabbit collecting duct.**
Am J Anat. 1979 May;155(1):111-24

Livak KJ, Flood Sja, Marmaro J, Giustu W, Deetz K. **Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization**
PCR Methods and Application 1995, 4:357-362

Ljubojevic M, Herak-Kramberger CM, Hagos Y, Bahn A, Endou H, Burckhardt G, Sabolic I. **Rat renal cortical OAT1 and OAT3 exhibit gender differences determined by both androgen stimulation and estrogen inhibition.**
Am J Physiol Renal Physiol. 2004 Jul;287(1):F124-38.

Ljubojević M, Balen D, Breljak D, Kusan M, Anzai N, Bahn A, Burckhardt G, Sabolić I. **Renal expression of organic anion transporter OAT2 in rats and mice is regulated by sex hormones.**
Am J Physiol Renal Physiol. 2007 Apr;292(4):F1302.

Macias RI, Marin JJ, Serrano MA. **Excretion of biliary compounds during intrauterine life.**

World J Gastroenterol. 2009 Feb 21;15(7):817-28.

Madsen K., Nielsen S., Tisher., **Anatomy of the Kidney**

Barry M. Brenner The Kidney 2008 Vol. 8

Martel F, Vetter T, Russ H, Grundemann D, Azevedo I, Koepsell H and Schomig E. **Transport of small organic cations in the rat liver. The role of the organic cation transporter OCT1.**

Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 1996 354:320-326.

Marescau B, Deshmukh DR, Kockx M, Possemiers I, Qureshi IA, Wiechert P, De Deyn PP. **Guanidino compounds in serum, urine, liver, kidney, and brain of man and some ureotelic animals.**

Metabolism. 1992 May;41(5):526-32.

Mason JB, Kodicek E. **The metabolism of niacytin in the rat. Trigonelline as a major metabolite of niacytin in the urine.**

Biochem J. 1970 Dec;120(3):515-21.

Matsui A, Ashihara H. **Nicotinate riboside salvage in plants: presence of nicotinate riboside kinase in mungbean seedlings.**

Plant Physiol Biochem. 2008 Jan;46(1)

Maunsbach AB. **Observations on the segmentation of the proximal tubule in the rat kidney. Comparison of results from phase contrast, fluorescence and electron microscopy.**

J Ultrastruct Res. 1966 Oct;16(3):239-58.

Mayumi T, Kawano H, Sakamoto Y, Suehisa E, Kawai Y, Hama T (1978). **Studies on ergothioneine V. Determination by high performance liquid chromatography and application to metabolic research.**

Chem Pharm Bull 26:3772-3778

Melville DB. **Ergothioneine.**

Vitamines and Hormones 1958 17:155-204

Minorsky PV. **The hot and the classic.**

Plant Physiol. 2002 May;129(1):5-6.

Monte JC, Nagle MA, Eraly SA, Nigam SK. **Identification of a novel murine organic anion transporter family member, OAT6, expressed in olfactory mucosa.**

Biochem Biophys Res Commun. 2004 Oct 15;323(2):429-36.

Morita N, Kusahara H, Sekine T, Endou H, Sugiyama Y. **Functional characterization of rat organic anion transporter 2 in LLC-PK1 cells.**

J Pharmacol Exp Ther. 2001 Sep;298(3):1179-84.

Motohashi H, Sakurai Y, Saito H, Masuda S, Urakami Y, Goto M, Fukatsu A, Ogawa O, Inui K. **Gene expression levels and immunolocalization of organic ion transporters in the human kidney.**

J Am Soc Nephrol. 2002 Apr;13(4):866-74.

Neumann E, Schaefer-Riddler M, Wang Y and Hofschneider PH. **Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation high electric fields.**

EMBO J. 1982, 1:841-845

Nielsen S, Frøkiaer J, Marples D, Kwon TH, Agre P, Knepper MA. **Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine.**

Physiol Rev. 2002 Jan;82(1):205-44. Review.

Nishimura M and Naito S. **Tissue-specific mRNA expression profiles of human ATP-binding cassette and solute carrier transporter superfamilies.**

Drug Metab Pharmacokinet. 2005 Dec;20(6):452-77.

Nishiwaki T, Daigo Y, Tamari M, Fujii Y, Nakamura Y. **Molecular cloning, mapping, and characterization of two novel human genes, ORCTL3 and ORCTL4, bearing homology to organic-cation transporters.**

Cytogenet Cell Genet. 1998;83(3-4):251-5.

Noris M, Remuzzi G. **Uremic bleeding: closing the circle after 30 years of controversies?**

Blood. 1999 Oct 15;94(8):2569-74.

O'Donovan GA, Neuhard J. **Pyrimidine metabolism in microorganisms.**

Bacteriol Rev. 1970 Sep;34(3):278-343.

Pao SS, Paulsen IT, Saier MH Jr. **Major facilitator superfamily.**

Microbiol Mol Biol Rev. 1998 Mar;62(1):1-34. Review.

Paton CM, Ntambi JM. **Biochemical and physiological function of stearyl-CoA desaturase.**

Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009 Jul;297(1):E28-37.

Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA, Amos CI, Huang Q, Gu X, Newman B, Van Oene M, Cescon D, Greenberg G, Griffiths AM, St George-Hyslop PH, Siminovitch KA. **Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease.**

Nat Genet. 2004 May;36(5):471-5.

Rizki G, Arnaboldi L, Gabrielli B, Yan J, Lee GS, Ng RK, Turner SM, Badger TM, Pitas RE, Maher JJ. **Mice fed a lipogenic methionine-choline-deficient diet develop hypermetabolism coincident with hepatic suppression of SCD-1.**

J Lipid Res. 2006 Oct;47(10):2280-90.

Rizwan AN, Burckhardt G. **Organic anion transporters of the SLC22 family: biopharmaceutical, physiological, and pathological roles.**

Pharm Res. 2007 Mar;24(3):450-70.

Russ, H., Gliese, M., Sonna, J., und Schömig, E. **The extraneuronal transport mechanism for noradrenaline (uptake2) avidly transports 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+).**

Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 1992 346, 158-65.

Russ H, Staust K, Martel F, Gliese M, Schomig E. **The extraneuronal transporter for monoamine transmitters exists in cells derived from human central nervous system glia.**

Eur J Neurosci. 1996 Jun;8(6):1256-64.

Salerno C, Crifò C. **Diagnostic value of urinary orotic acid levels: applicable separation methods.**

J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2002 Dec 5;781(1-2):57-71.

Sandhu JS, Fraser DR. **The metabolic origin of trigonelline in the rat.**

Biochem J. 1981 Dec 15;200(3):495-500.

Sauve AA. **NAD+ and vitamin B3: from metabolism to therapies.**

J Pharmacol Exp Ther. 2008 Mar;324(3):883-93.

Schömig E, Spitzenberger F, Engelhardt M, Martel F, Ording N, Gründemann D. **Molecular cloning and characterization of two novel transport proteins from rat kidney.**

FEBS Lett. 1998 Mar 20;425(1):79-86.

Schömig E., Lazar A. and Grundemann D. **Extraneuronal monoamine transporter and organic cation transporters 1 and 2: a review of transport efficiency.**

Handb Exp Pharmacol. 2006 151-180.

Sekine T, Cha SH, Tsuda M, Apiwattanakul N, Nakajima N, Kanai Y, Endou H.

Identification of multispecific organic anion transporter 2 expressed predominantly in the liver.

FEBS Lett. 1998 Jun 12;429(2):179-82.

Shainkin-Kestenbaum R, Giat Y, Berlyne GM. **The toxicity of guanidino compounds in the red blood cell in uremia and the effects of hemodialysis.**

Nephron. 1982;31(1):20-3.

Shin HJ, Anzai N, Enomoto A, He X, Kim do K, Endou H, Kanai Y. **Novel liver-specific organic anion transporter OAT7 that operates the exchange of sulfate conjugates for short chain fatty acid butyrate.**

Hepatology. 2007 Apr;45(4):1046-55.

Solem C, Defoor E, Jensen PR, Martinussen J. **Plasmid pCS1966, a new selection/counterselection tool for lactic acid bacterium strain construction based on the oroP gene, encoding an orotate transporter from *Lactococcus lactis*.**

Appl Environ Microbiol. 2008 Aug;74(15):4772-5.

Sun W, Wu RR, van Poelje PD, Erion MD. **Isolation of a family of organic anion transporters from human liver and kidney.**

Biochem Biophys Res Commun. 2001 May 4;283(2):417-22.

Tahara H, Kusuhara H, Endou H, Koepsell H, Imaoka T, Fuse E, Sugiyama Y. **A species difference in the transport activities of H2 receptor antagonists by rat and human renal organic anion and cation transporters.**

J Pharmacol Exp Ther. 2005 Oct;315(1):337-45. Epub 2005 Jul 8.

Takeda M, Khamdang S, Narikawa S, Kimura H, Kobayashi Y, Yamamoto T, Cha SH, Sekine T, Endou H. **Human organic anion transporters and human organic cation transporters mediate renal antiviral transport.**

J Pharmacol Exp Ther. 2002 Mar;300(3):918-24.

Taguchi H, Shimabayashi Y. **Findings of trigonelline demethylating enzyme activity in various organisms and some properties of the enzyme from hog liver.**

Biochem Biophys Res Commun. 1983 Jun 15;113(2):569-74.

Takikawa H. **Hepatobiliary transport of bile acids and organic anions.**

J Hepatobiliary Pancreat Surg. 2002;9(4):443-7.

Tamai I, Ohashi R, Nezu J, Yabuuchi H, Oku A, Shimane M, Sai Y, Tsuji A. **Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2.**

J Biol Chem. 1998 Aug 7;273(32):20378-82

Tamai I, China K, Sai Y, Kobayashi D, Nezu J, Kawahara E and Tsuji A **Na(+)-coupled transport of L-carnitine via high-affinity carnitine transporter OCTN2 and its subcellular localization in kidney.**

Biochim Biophys Acta 2001 1512:273-284

Tanford C. Membrane Transport: **Transport and Diffusion across Cell Membranes**

Science. 1986 Aug 22;233(4766):898

Tokmakjian SD, Haines DS. **Early effects of dietary orotic acid upon liver lipid synthesis and bile cholesterol secretion in rats.**

J Lipid Res. 1985 Apr;26(4):478-86.

Tokuhiro S, Yamada R, Chang X, Suzuki A, Kochi Y, Sawada T, Suzuki M, Nagasaki M, Ohtsuki M, Ono M, Furukawa H, Nagashima M, Yoshino S, Mabuchi A, Sekine A, Saito S, Takahashi A, Tsunoda T, Nakamura Y, Yamamoto K. **An intronic SNP in a RUNX1 binding site of SLC22A4, encoding an organic cation transporter, is associated with rheumatoid arthritis.**

Nat Genet. 2003 Dec;35(4):299-300.

Vialou, V., Amphoux, A., Zwart, R., Giros, B., und Gautron, S. **Organic cation transporter 3 (Slc22a3) is implicated in salt-intake regulation.**

J Neurosci 2004. 24, 2846-51.

Wohlhueter RM, McIvor RS, Plagemann PG. **Facilitated transport of uracil and 5-fluorouracil, and permeation of orotic acid into cultured mammalian cells.**

J Cell Physiol. 1980 Sep;104(3):309-19.

Wu X, Prasad PD, Leibach FH, Ganapathy V. **cDNA sequence, transport function, and genomic organization of human OCTN2, a new member of the organic cation transporter family.**

Biochem Biophys Res Commun. 1998a May 29;246(3):589-95.

Wu X, Kekuda R, Huang W, Fei YJ, Leibach FH, Chen J, Conway SJ, Ganapathy V. **Identity of the organic cation transporter OCT3 as the extraneuronal monoamine transporter (uptake2) and evidence for the expression of the transporter in the brain.**

J Biol Chem. 1998b Dec 4;273(49):32776-86.

Yang T, Chan NY, Sauve AA. **Syntheses of nicotinamide riboside and derivatives: effective agents for increasing nicotinamide adenine dinucleotide concentrations in mammalian cells.**

J Med Chem. 2007 Dec 27;50(26):6458-61.

Yates, J. L., Warren, N., and Sugden, B. **Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells.**

Nature 1985, **313**, 812-5.

Yates, J. L., Camiolo, S. M., and Bashaw, J. M. **The minimal replicator of Epstein-Barr virus oriP.**

J Virol. 2000, **74**, 4512-22.

Yin Y, Matsui A, Sakuta M, Ashihara H. **Changes in pyridine metabolism profile during growth of trigonelline-forming *Lotus japonicus* cell cultures.**

Phytochemistry. 2008 Dec;69(17):2891-8.

Yokoyama H, Anzai N, Ljubojevic M, Ohtsu N, Sakata T, Miyazaki H, Nonoguchi H, Islam R, Onozato M, Tojo A, Tomita K, Kanai Y, Igarashi T, Sabolic I, Endou H. **Functional and immunochemical characterization of a novel organic anion transporter Oat8 (Slc22a9) in rat renal collecting duct.**

Cell Physiol Biochem. 2008;21(4):269-78.

Yokoyama H, Anzai N, Ljubojevic M, Ohtsu N, Sakata T, Miyazaki H, Nonoguchi H, Islam R, Onozato M, Tojo A, Tomita K, Kanai Y, Igarashi T, Sabolic I, Endou H. **Functional and immunochemical characterization of a novel organic anion transporter Oat8 (Slc22a9) in rat renal collecting duct.**

Cell Physiol Biochem. 2008;21(4):269-78.

Yoshinari O, Sato H, Igarashi K. **Anti-diabetic effects of pumpkin and its components, trigonelline and nicotinic acid, on Goto-Kakizaki rats.**

Biosci Biotechnol Biochem. 2009 May;73(5):1033-41.

Youngblood GL, Sweet DH. **Identification and functional assessment of the novel murine organic anion transporter Oat5 (Slc22a19) expressed in kidney.**

Am J Physiol Renal Physiol. 2004 Aug;287(2):F236-44.

Yuyama S, Suzuki T. **Isolation and identification of N1-methylnicotinic acid (trigonelline) from rat urine.**

J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 1985 Apr;31(2):157-67.

Yuyama S. **Absorption of trigonelline from the small intestine of the specific pathogen-free (SPF) and germ-free (GF) rats in vivo.**

Adv Exp Med Biol. 1999;467:723-7.

Zhai XY, Thomsen JS, Birn H, Kristoffersen IB, Andreasen A, Christensen EI. **Three-dimensional reconstruction of the mouse nephron.**

J Am Soc Nephrol. 2006 Jan;17(1):77-88.

Zheng XQ, Matsui A, Ashihara H. **Biosynthesis of trigonelline from nicotinate mononucleotide in mungbean seedlings.**

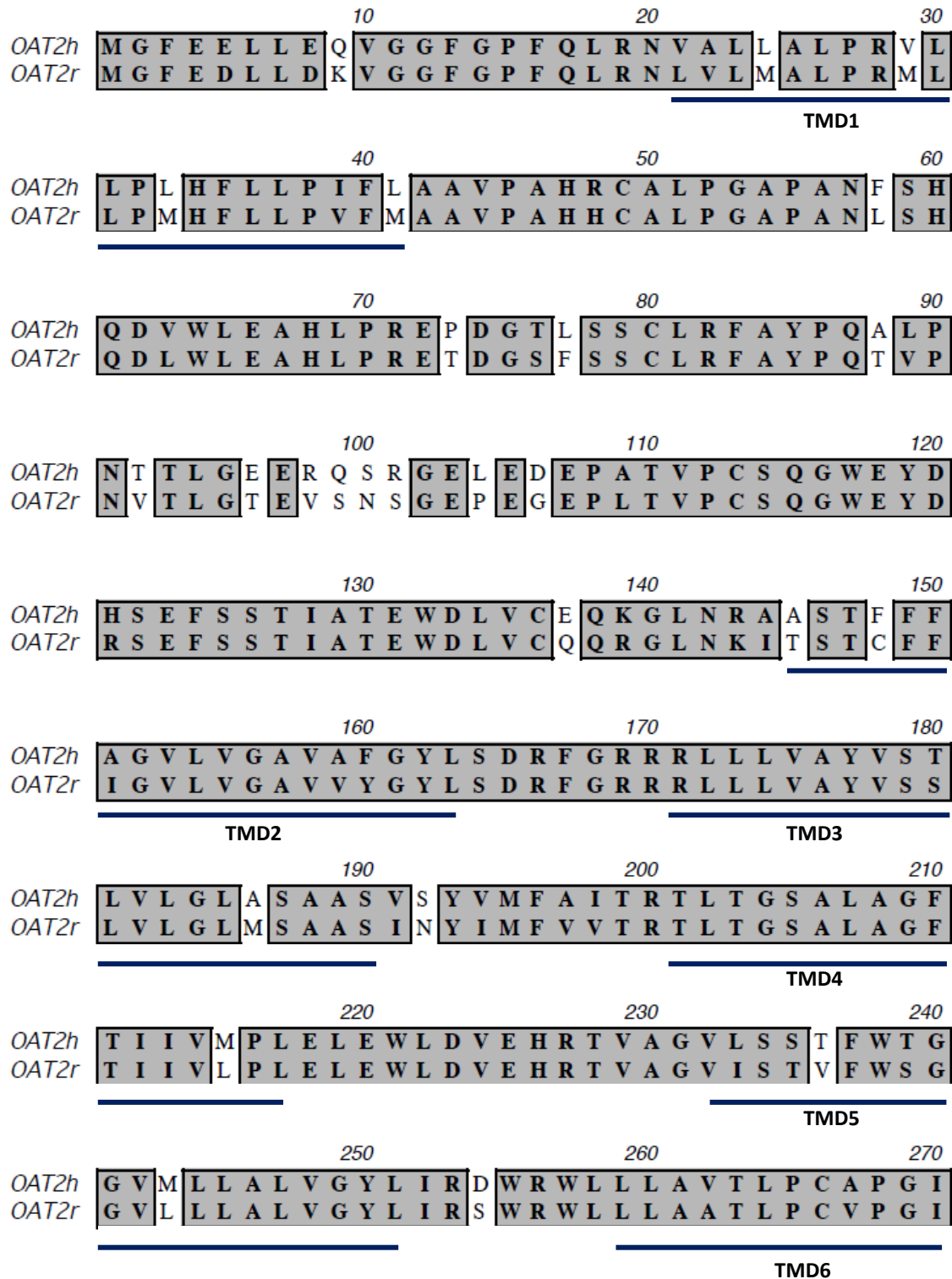
Phytochemistry. 2008 Jan;69(2):390-5.

Zimmermann U. **Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena**

Biochim Biophys Acta. 1982, 694:227-277

8 Anhang

8.1 Aminosäure-Alignment von OAT2h und OAT2r



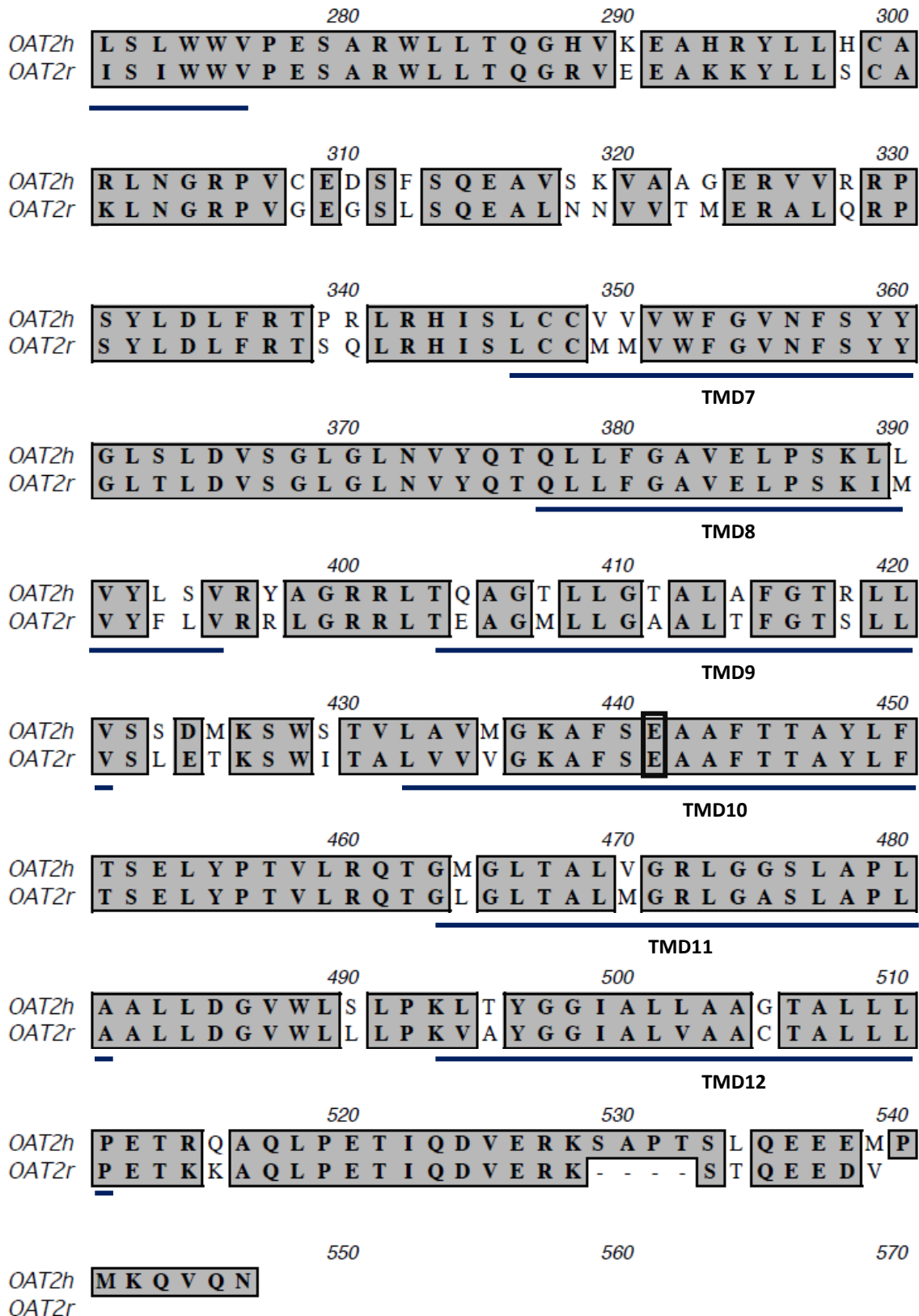


Abb. 8.1: Alignment der Aminosäuresequenzen von OAT2h und OAT2r. Die graue Markierung kennzeichnet Aminosäuren, die in beiden Transportern identisch sind. Die schwarze Markierung kennzeichnet die Glutaminsäure in TMD10. TMD = potentielles Transmembransegment.

Dankeschön!

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dirk Gründemann für die Betreuung, Hilfestellung und Freiräume bedanken und dass ich stets „klopfen“ konnte für meine Belangen.

Herrn Prof. Dr. Reinhard Krämer danke ich, dass er die externe Betreuung meiner Arbeit übernommen hat und sich regelmäßig die Zeit genommen um mit mir die Ergebnisse dieser Arbeit zu diskutieren.

Herrn Prof. Dr. Ulf-Ingo Flügge danke ich für die freundliche Bereitschaft das Zweitgutachten für diese Arbeit zu übernehmen.

Bea, ich danke dir für die Klonierung, den zahlreichen Aufnahmeversuchen und die ganze Arbeit die du im Labor übernommen hast. Simone, Silke und Markus herzlichen Dank für die LC-MS. Regina danke für die Sequenzierung.

Tim du Kompagnon, auf's Freitag After-Work Bierchen. Danke für den Westernblot, die Aufnahmeversuche und den Platz fürs Zusammenschreiben.

Enzo, hättest du nicht auf den zweiten Antikörper bestanden, wir wüssten bis heute nicht wo er lokalisiert ist. Danke für den Westernblot und die Antikörperfärbung.

Denise, Petra, Linda, Susi, Julia C, Julia P, Melanie und David, schade das sich irgendwann die Wege trennen. Aber spätestens zu Karneval, Weihnachtsmarkt etc. sieht man sich. Jedenfalls danke für den schönen Laboralltag.

Die wichtigste Person kommt zuletzt:

Tina, Hallo Schatz, danke für die FACS-Analysen und danke für alles!!!

Auf unseren Urlaub

Dein Schatz

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit einschließlich Tabellen und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. R. Krämer am Institut für Biochemie der Universität zu Köln und unter der Anleitung von Prof. D. Gründemann betreut worden.

Ich versichere, dass ich alle Angaben wahrheitsgemäß nach bestem Wissen und Gewissen gemacht habe, und verpflichte mich, jede, die obigen Angaben betreffende, Veränderung dem Dekanat unverzüglich mitzuteilen.

Keine Teilpublikationen

Köln, Oktober 2009