

Ein neuer Mechanismus des Transporters SLC22A11:  
Membraninsertion von Estronsulfat gegenüber  
Translokation von Harnsäure und Glutamat

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

**Peter Skwara**

aus Hindenburg

Köln, 2017.

Berichterstatter:

Prof. Dr. Ulf-Ingo Flügge

Prof. Dr. Rudolf Wiesner

Tag der mündlichen Prüfung:

01.06.2017

# Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Dirk Gründemann für die Vergabe des Projekts, Betreuung, Unterstützung sowie die interessanten Diskussionen bedanken.

Des Weiteren bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Ulf-Ingo Flügge und Herrn Prof. Dr. Rudolf Wiesner für Ihre Unterstützung.

Ein ganz besonderer Dank gilt Samira Boussettaoui, Simone Kalis und Kathi Krüsemann für deren Support und den Kaffee ☺.

Die Zeit im Zentrum für Pharmakologie empfand ich als sehr angenehm und produktiv. Dafür möchte ich mich bei meinen ehemaligen Kolleginnen und Kollegen Christopher, Johanna, Julia, Michaela, Miriam, Mhmd, Thorsten sowie bei allen anderen Beteiligten bedanke.

So das Beste kommt zum Schluss: Meine bessere Hälfte, Andrea, danke für alles.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Danksagung .....</b>	<b>3</b>
<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>4</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>8</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>12</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>14</b>
<b>Gleichungsverzeichnis .....</b>	<b>15</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>16</b>
<b>1.1 Transporter.....</b>	<b>17</b>
1.1.1 SLC-Transporter .....	18
1.1.2 SLC22-Familie.....	19
1.1.2.1 SLC22A13 .....	20
1.1.2.2 Urate Anion Exchanger Transporter 1 (URAT1).....	21
<b>1.2 Harnsäure .....</b>	<b>22</b>
<b>1.3 SLC22A11 .....</b>	<b>24</b>
1.3.1 Dehydroepiandrosteronsulfat .....	26
1.3.2 Estronsulfat .....	27
<b>1.4 Ziel der Arbeit .....</b>	<b>28</b>
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>31</b>
<b>2.1 Material.....</b>	<b>31</b>
2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	31
2.1.2 Lösungen und Puffer.....	32
2.1.3 Enzyme und Kits.....	32
2.1.4 pUC19.....	33
2.1.5 pEBTetLNC Expressionssystem.....	33
2.1.6 Bakterienstämme und Kulturmedien .....	35
2.1.7 Zelllinie.....	35
2.1.8 HPLC-Säulen .....	35
<b>2.2 Methoden.....</b>	<b>36</b>
2.2.1 Molekularbiologische Methoden .....	36

## Inhaltsverzeichnis

2.2.1.1	SLC22A11-Klonierung .....	36
2.2.1.2	DNA-Konzentrationsbestimmung .....	38
2.2.1.3	Sequenzierung nach Sanger .....	39
2.2.1.4	Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> ohne Säule .....	41
2.2.1.5	Mini-Präparation & Maxi-Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> .....	42
2.2.2	Mikrobiologische Methoden .....	42
2.2.2.1	Nährmedien .....	42
2.2.2.1.1	Antibiotikum .....	43
2.2.2.2	Kultivierung und Lagerung von <i>E.coli</i> .....	43
2.2.2.3	Herstellung elektrokompetenter <i>E.coli</i> .....	44
2.2.2.4	Transformation von <i>E.coli</i> .....	45
2.2.3	Zellbiologische Methoden .....	46
2.2.3.1	Kultivierung von 293-Zellen .....	46
2.2.3.2	Transfektion von 293-Zellen .....	48
2.2.3.3	Aussaat von 293-Zellen .....	48
2.2.3.4	Erstellung von Zelllysaten .....	49
2.2.3.5	Proteinbestimmung mittels BCA Protein Assay Kit .....	49
2.2.4	Transportanalysen .....	50
2.2.4.1	Vorinkubation und Waschung der 293-Zellen (vor Versuchsbeginn) .....	50
2.2.4.2	Substrataufnahme von <sup>3</sup> H-Glutamat und -Aspartat .....	51
2.2.4.3	Glutamat- und Aspartatefflux .....	51
2.2.4.3.1	IC <sub>50</sub> -Bestimmung von E3S und Probenecid auf den Glutamatefflux .....	52
2.2.4.3.2	pH-Abhängigkeit des Glutamateffluxes .....	53
2.2.4.3.3	Chlorid-Abhängigkeit des Glutamateffluxes .....	53
2.2.4.3.4	Transeffekte auf den Glutamatefflux .....	53
2.2.4.4	Substrataufnahme .....	56
2.2.4.4.1	Substrataufnahme im Zeitverlauf .....	56
2.2.4.4.2	Substrataufnahme im Equilibrium .....	56
2.2.4.4.3	Chloridabhängigkeit bei der Substrataufnahme .....	56
2.2.4.5	Transeffekte bei der Harnsäure und E3S-Freisetzung .....	57
<b>2.3</b>	<b>Radioaktivitätsbestimmung .....</b>	<b>58</b>
<b>2.4</b>	<b>Liquid Chromotography-Mass Spectrometry (LC-MS) .....</b>	<b>59</b>
2.4.1	High Performance Liquid Chromatography .....	59
2.4.2	Elektrosprayionisation .....	62
2.4.3	Massenspektrometer .....	63
2.4.4	Fullscan Experimente (Q1-Scan) .....	65
2.4.4.1	Differenzabtönung .....	67
2.4.4.2	Produktionenscan .....	70
2.4.4.3	Tunen von Referenzsubstanzen .....	70

## Inhaltsverzeichnis

2.4.4.4	Multiple Reaction Monitoring (MRM)	71
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>73</b>
<b>3.1</b>	<b>Substratsuche mittels Fullscan und LC-MS-Differenzabtönung</b>	<b>73</b>
3.1.1	Fragmentierung	77
<b>3.2</b>	<b>Guanidiniumsuccinat (GSA)</b>	<b>81</b>
<b>3.3</b>	<b>Akkumulation von <sup>3</sup>H-Glutamat durch SLC22A11</b>	<b>81</b>
<b>3.4</b>	<b>Akkumulation von <sup>3</sup>H-Aspartat durch SLC22A11</b>	<b>82</b>
<b>3.5</b>	<b>Efflux von Glutamat und Aspartat</b>	<b>83</b>
<b>3.6</b>	<b>Zeitliche Substratakkumulation vermittelt durch SLC22A11</b>	<b>86</b>
3.6.1	Zeitverlauf der Akkumulation von Harnsäure durch SLC22A11	86
3.6.2	Zeitverlauf der Akkumulation von E3S	87
3.6.2.1	Bestimmung des $K_m$ -Werts von E3S	88
3.6.2.2	E3S-Akkumulation bei 4 °C	90
3.6.3	Zeitliche Akkumulation von DHEAS	90
3.6.4	Akkumulation von 6-Carboxyfluorescein	91
<b>3.7</b>	<b>Transeffekte</b>	<b>92</b>
3.7.1	Inhibitorisches Potential von E3S und Probenecid auf den Glutamatefflux	96
3.7.1.1	E3S-Einfluss auf die Harnsäureakkumulation	97
<b>3.8</b>	<b>pH-abhängiger Glutamatefflux</b>	<b>98</b>
<b>3.9</b>	<b>Transeffekte auf die E3S und Harnsäurefreisetzung</b>	<b>99</b>
<b>3.10</b>	<b>Chloridabhängigkeit von SLC22A11</b>	<b>102</b>
<b>3.11</b>	<b>SLC22A11 vermittelte Equilibriumakkumulation</b>	<b>105</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>106</b>
<b>4.1</b>	<b>Glutamat- und Aspartatefflux von SLC22A11</b>	<b>106</b>
<b>4.2</b>	<b>Harnsäure vs E3S</b>	<b>107</b>
4.2.1	Akkumulation und Freisetzung	108
4.2.2	Transeffekte auf den Glutamatefflux	108
4.2.3	Transeffekt von DHEAS auf E3S und Harnsäure	110
4.2.4	Auswirkungen einer Chloridsubstitution	110
4.2.5	Zusammenfassung der Unterschiede	111
<b>4.3</b>	<b>Akkumulation im Equilibrium</b>	<b>112</b>
<b>4.4</b>	<b>E3S als Substrat</b>	<b>115</b>
<b>4.5</b>	<b>Fazit</b>	<b>118</b>
<b>4.6</b>	<b>Ausblick</b>	<b>119</b>

## Inhaltsverzeichnis

<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>121</b>
<b>6</b>	<b>Abstract .....</b>	<b>122</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>123</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>138</b>
<b>8.1</b>	<b>Sequenzdaten zum phylogenetischen Stammbaum (Abb. 4) .....</b>	<b>138</b>
<b>8.2</b>	<b>Sequenz des SLC22A11 .....</b>	<b>138</b>

## Abkürzungsverzeichnis

17HSDH	17 $\beta$ -hydroxysteroid-dehydrogenase
3HSDH	3 $\beta$ -hydroxysteroid-dehydrogenase
6CF	6-Carboxyfluorescein
ABC	ATP binding cassette
Amp	Ampicillin
Asp	Aspartat
BCA	bicinchoninic acid
BCRP	breast cancer resistance protein
BOCT	brain-type organic cation transporter
bp	base pair
BSA	bovine serum albumine
BSP	Bromosulphothalein
BWR1A	Beckwith-Wiedemann region 1 A
c	Konzentration
cDNA	complementary DNA
CE	collision energy
CI	Confidenzinterval
CMV	Cytomegalievirus
cps	counts per second
CTT	carnitine transporter
ddNTPs	dideoxynucleotide-tri-phosphate
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEAS	Dehydroepiandrosteronsulfat

## Abkürzungsverzeichnis

DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxynucleotide-tri-phosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E17 $\beta$ G	Estradiol-17 $\beta$ -glucuronid
E3S	Estronsulfat
EAAT1	Excitatory amino acid transporter 1
EBNA	Epstein-Barr nuclear antigen
EMT	Extraneuronal monoamine transporter
ESI	Elektrosprayionisation
ETT	Ergothioneine transporter
FCS	fetal calf serum
FDA	U.S. Food & Drug Administration
FLIP	Fly-like putative transporter
g	Erdbeschleunigung (9,81m/s <sup>2</sup> )
Glu	Glutamat
GSA	Guanidiniumsuccinat
HEK	Human embryonic kidney
HGNC	HUGO Genome Nomenclature Committee
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HS	Harnsäure
HSD-1/2	17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Type 1/2
HUGO	Human Genome Organisation
KRH-Puffer	Krebs-Ringer-Henseleit Puffer
LB-Medium	Luria Bertani-Medium

## Abkürzungsverzeichnis

LC-MS	Liquid Chromotography-Mass Spectrometry
M	Mol
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
MATE1	Multidrug and toxin extrusion protein 1
MATE2K	Multidrug and toxin extrusion protein 2
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MRP1	Multi-drug resistance associated protein 1
MS	Massenspektrometer
NaOH	Natriumhydroxid
NMDG	N-Methyl-D-Glukosamin
NPT1	Sodium-dependent Phosphate Transporter Type 1
NT Zellen	nicht-transfizierten Zellen
NTCP	Na <sup>+</sup> -taurocholate cotransporting polypeptide
OAT	organic anion transporter
OATP	organic anion-transporting polypeptide
OCT	organic cation transporter
OCTL	Organic cation transporter-like
OHCU	2-oxo-4-hydroxy-4-carboxy-5-Ureidoimidazolin
OSTa	Organic solute transporter alpha
OSTb	Organic solute transporter beta
PAH	Paraaminohippursäure
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PFO	Perfluorocatanat
pUC	plasmid of the University of California
RT	Raumtemperatur

## Abkürzungsverzeichnis

SEM	Standard Error of Mean
SGK2	Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 2
SLC	solute carrier
SOAT	Sodium-dependent organic anion transporter
SOB	Super optimal broth
SOC	SOB + 20 mM Glukose
sRGB-Farbraum	Standard Rot Grün Blau-Farbraum
SULT2A1	Sulfotransferase 2A1
TetR	Tetracyclinrepressor
TM	Transmembransegment
UA	uric acid
UpM	Umdrehungen pro Minute
URAT1	Urate anion exchanger 1

# Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Proportion der Transporter- und Kanal-kodierenden Gene des humanen Genoms ....	16
Abb. 2	Transportarten: Uniport, Symport und Antiport .....	18
Abb. 3	Struktur des humanen SLC22A11 Transporters .....	19
Abb. 4	Phylogenetischer Stammbaum der SLC22-Familie .....	20
Abb. 5	SLC22A13h vermittelter Efflux von Aspartat, Taurin und Glutamat .....	21
Abb. 6	Zeitverlauf der Harnsäureakkumulation durch URAT1 .....	22
Abb. 7	Ammoniak, Harnstoff und Harnsäure .....	22
Abb. 8	Stoffwechselweg von Harnsäure zu Allantoin .....	23
Abb. 9	Stoffwechselweg von DHEAS und DHEA .....	27
Abb. 10	Syntheseweg von Estron, Estriol, Estradiol aus Estronsulfat .....	28
Abb. 11	Verschiedene Substrate der SLC22-Familie sowie Estronsulfat .....	29
Abb. 12	Schematische Darstellung des pEBTetLNC-Vektors .....	34
Abb. 13	Klonierung SLC22A11 .....	37
Abb. 14	Mögliche Transeffekte auf den Glutamatefflux .....	55
Abb. 15	Elektrosprayionisation .....	63
Abb. 16	Flugbahn eines Moleküls durch ein Quadrupol .....	64
Abb. 17	Detektion eines spezifischen Moleküls in einem Quadrupol-Massenspektrometer .....	65
Abb. 18	Massenspektrum eines Fullscan-Experiments .....	68
Abb. 19	Berechnung der Intensitäten in der Differenzabtönung .....	69
Abb. 20	Darstellung einer LC-MS Differenzabtönung .....	70
Abb. 21	Differenzabtönungsbild im Intensitätsbereich $10^6$ - $10^7$ (cps) .....	74
Abb. 22	Intensität der Massenspur m/z 132 aus Fullscanmessung .....	75
Abb. 23	Intensität der Massenspur m/z 146 aus Fullscanmessung .....	75
Abb. 24	Intensität der Massenspur m/z 166 aus Fullscanmessung .....	76
Abb. 25	Intensität der Massenspur m/z 174 aus Fullscanmessung .....	76
Abb. 26	Fragmentierung von Aspartat .....	77
Abb. 27	Fragmentierung von 6 Carboxyfluorescein (6CF) .....	78
Abb. 28	Fragmentierung von DHEAS .....	78
Abb. 29	Fragmentierung von E3S .....	79
Abb. 30	Fragmentierung von Glutamat .....	79
Abb. 31	Fragmentierung von GSA .....	80

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 32	Fragmentierung von Harnsäure.....	80
Abb. 33	SLC22A11 reduziert in 293-Zellen die Akkumulation von <sup>3</sup> H-Glutamat.....	82
Abb. 34	Die Akkumulation von <sup>3</sup> H-Aspartat wird durch SLC22A11 reduziert.....	83
Abb. 35	Glutamatefflux vom humanen SLC22A11 gegenüber SLC22A13h.....	85
Abb. 36	Aspartatefflux vom humanen SLC22A11 gegenüber SLC22A13h.....	86
Abb. 37	Zeitverlauf der Akkumulation von Harnsäure durch SLC22A11.....	87
Abb. 38	Zeitverlauf Akkumulation von E3S durch SLC22A11.....	88
Abb. 39	<i>K<sub>m</sub></i> -Wertbestimmung von E3S.....	89
Abb. 40	E3S-Akkumulation bei 4 °C und 37 °C.....	90
Abb. 41	Zeitliche Akkumulation von DHEAS durch SLC22A11.....	91
Abb. 42	Zeitliche Akkumulation von 6CF durch SLC22A11.....	92
Abb. 43	Transeffekte von Harnsäure und E3S auf den Glutamatefflux von SLC22A11.....	93
Abb. 44	DHEAS und E3S inhibieren den transportervermittelten Glutamatefflux.....	95
Abb. 45	Inhibitorische Potenz von E3S auf den transportervermittelten Glutamatefflux.....	96
Abb. 46	Inhibitorische Potenz von Probenecid auf den Glutamaefflux von SLC22A11.....	97
Abb. 47	Harnsäureakkumulation in Anwesenheit von E3S.....	98
Abb. 48	pH-Abhängigkeit der Glutamateffluxgeschwindigkeit.....	99
Abb.49	Transeffekte auf die E3S und Harnsäurefreisetzung.....	100
Abb. 50	DHEAS stimuliert den E3S-Efflux, jedoch nicht den Harnsäureefflux.....	101
Abb. 51	Chlorid-Abhängigkeit der Harnsäure- und E3S-Akkumulation.....	102
Abb. 52	Chlorid-Abhängigkeit des Glutamateffluxes von SLC22A11.....	104
Abb. 53	Equilibriumakkumulation von Harnsäure, E3S und 6CF.....	105
Abb. 54	Perfluorooctanoate.....	107
Abb. 55	Transeffekte auf den Glutamatefflux.....	109
Abb. 56	PAH Akkumulation im Equilibrium durch den humanen OAT1.....	112
Abb. 57	Membranvolumen.....	114
Abb. 58	Dopamintransporter mit Cholesterol.....	115
Abb. 59	E3S- und Digoxinaufnahme bei OATP4C1.....	117
Abb. 60	E3S-, Taurocholol- und E17βG-Akkumulation in ratSER-Vesikel.....	118
Abb. 61	Graphische Zusammenfassung.....	119

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Mögliche Substrate von SLC22A11 laut Publikationen.....	26
Tabelle 2	Mögliche E3S Aufnahmetransporter in der Plasmamembran .....	30
Tabelle 3	Enzyme und Kit-Systeme .....	32
Tabelle 4	HPLC-Säulen .....	36
Tabelle 5	Primer für die Klonierung des SLC22A11 .....	37
Tabelle 6	Primer für die Sequenzierung des SLC22A11 .....	38
Tabelle 7	HPLC-Laufkonditionen für 6CF.....	60
Tabelle 8	HPLC-Laufkonditionen für DHEAS und E3S.....	60
Tabelle 9	HPLC-Laufkonditionen für Harnsäure .....	61
Tabelle 10	HPLC-Laufkonditionen für Glutamat und Aspartat .....	61
Tabelle 11	HPLC-Laufkonditionen für Guanidiniumsuccinat (GSA).....	62
Tabelle 12	HPLC-Konditionen bei Fullscan-Analysen im positiv Modus.....	66
Tabelle 13	HPLC-Konditionen bei Fullscan-Analysen im negativ Modus.....	67
Tabelle 14	Analyse der jeweiligen Substanz im Massenspektrometer mittels MRM .....	71
Tabelle 15	Glutamat- und Aspartatefflux von SLC22A11 und SLC22A13.....	84
Tabelle 16	Transeffekte von Harnsäure und E3S auf den Glutamatefflux von SLC22A11...94	
Tabelle 17	Transeffekte von E3S und DHEAS auf den Glutamatefflux von SLC22A11.....95	
Tabelle 18	Chloridabhängigkeit der Harnsäure- und E3S-Akkumulation beim SLC22A11103	
Tabelle 19	Chloridabhängigkeit des Glutamateffluxes beim SLC22A11 .....	104
Tabelle 20	Zusammenfassung der Unterschiede zwischen E3S und Harnsäure .....	111

## Gleichungsverzeichnis

Gleichung 1	Absorption.....	39
Gleichung 2	Lambert-Beerschen Gesetz .....	39
Gleichung 3	Lambert-Beerschen Gesetz nach c .....	39
Gleichung 4	Funktion zur Bestimmung des $IC_{50}$ .....	52
Gleichung 5	exponentielle Anpassung.....	53
Gleichung 6	Gleichung für einen nicht-linearen Zeitverlauf.....	57
Gleichung 7	Berechnung der Analytkonzentration [ng/mL] .....	72
Gleichung 8	Berechnung der Analytkonzentration [pmol/mL] .....	72
Gleichung 9	Berechnung der Analytkonzentration [pmol/mg Protein].....	72
Gleichung 10	$K_m$ -Wert.....	89
Gleichung 11	Berechnung einer möglichen E3S-Bindung an SLC22A11 .....	113

# 1 Einleitung

Um die physiologische Funktion von Zellen aufrecht zu erhalten, ist ein Austausch von Molekülen über die äußere Zellmembran von Nöten. Zellen tauschen Stoffwechselprodukte, anorganische Ionen, Nährstoffe, Nucleotide und Signalmoleküle mit ihrer Umwelt aus. Dies geschieht per Diffusion ( $H_2O$ ), durch Kanalproteine (z.B.  $Ca^{2+}$ -Kanal) und mittels Transporterproteinen, welche sich in der Zellmembran befinden.

Sowohl geladene als auch größere Moleküle (Anionen, Kationen, Nucleotide und Aminosäuren) können nicht durch die Membran diffundieren und sind auf Kanäle oder Transporter angewiesen. Kanäle und Transporter bestehen aus Polypeptidketten, welche die Lipidmembran einer Zelle permeieren. Kanäle bilden Poren in der Membran, die es z.B. Anionen ermöglichen die Membran zu passieren. Transporter hingegen binden Moleküle. Durch Konformationsänderungen der Transporter erfolgt der Transfer durch die Membran. Dieser Transfer kann unter Energieverbrauch (aktiv) oder ohne (passiv) erfolgen. Des Weiteren können Transporter Substanzen entgegengesetzt dem elektrochemischen Gradienten translokieren.

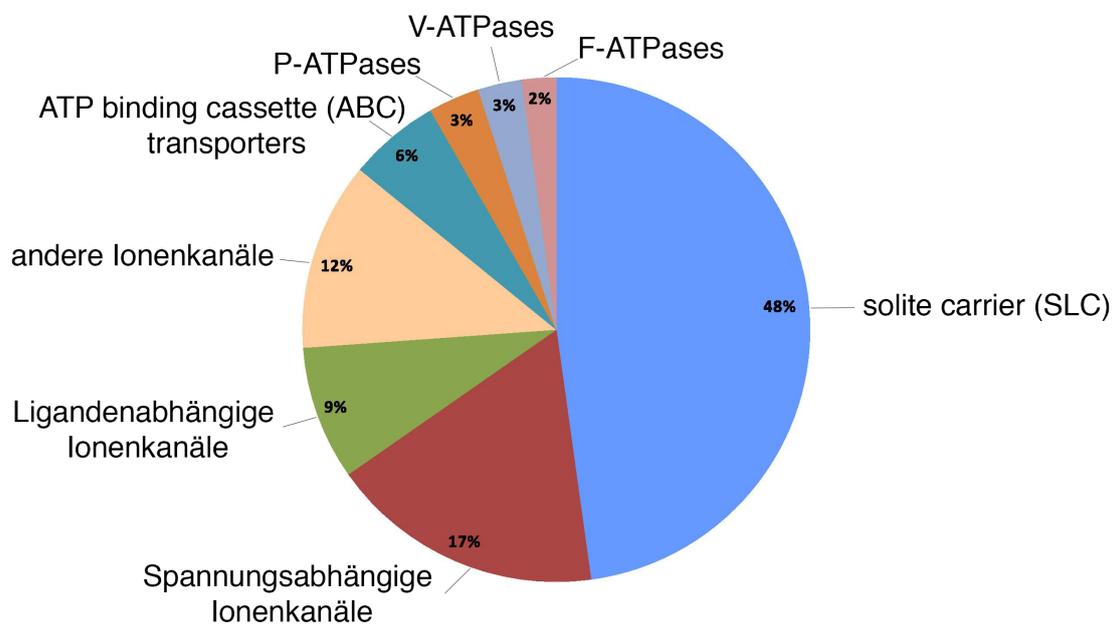


Abb. 1 Proportion der Transporter- und Kanal-kodierenden Gene des humanen Genoms Dargestellt sind die Verhältnisse der Transporter kodierenden Gene nach. (total n= 826, modifiziert nach [1]).

## Einleitung

Im Zuge der Sequenzierung des Humangenoms wurden mehrere hundert Transporter-kodierende Gene entdeckt [2] (Abb. 1). Die Bedeutsamkeit der Transporter für die Aufrechterhaltung der physiologischen Funktionen einer Zelle sowie für den Menschen wurde durch die hohe Transporteranzahl in Bezug auf die Gesamtanzahl der kodierenden Gene bestätigt. Mehrere Krankheiten, wie z.B. okulokutaner Albinismus Typ 2 und epileptische Encephalopathie, sind auf fehlerhafte oder fehlregulierte Transporter zurückzuführen [3, 4]. Dies unterstreicht die Wichtigkeit von Transportern sowie die Aufklärung ihrer Funktionalität.

### 1.1 Transporter

Im Allgemeinen unterscheidet man zwei Transporterklassen: ATP binding cassette - Transporter (ABC-Transporter) und Solute Carrier-Transporter (SLC-Transporter). Bei ABC-Transportern erfolgt ein primärer aktiver Transport unter Energieverbrauch in Form von ATP-Hydrolyse. Beim aktiven Transport werden Ionen, Stoffwechselprodukte und xenobiotische Substanzen durch eine Zellmembran oder durch eine Kompartimentmembran meist entgegengesetzt ihrem Konzentrationsgradienten transportiert. Im Falle von Ionenpumpen z.B. ATPasen, wo Ionen ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$ , etc.) über die Zellmembran transportiert werden, wird ein elektrochemischer Gradient aufgebaut. Dieser Gradient kann durch die zweite Transporterklasse, die SLC-Transporter, als Antriebskraft genutzt werden, da es sich dabei um einen sekundären Transport handelt. Bei diesem Transport wird zwischen Uniport, Symport und Antiport unterschieden. Beim Uniport erfolgt der Transport einer Substanz entlang des elektrochemischen Gradienten (Abb. 2). Beim Symport (Cotransport) wird ein zweites Substrat entlang und beim Antiport entgegengesetzt dem Gradienten transportiert.

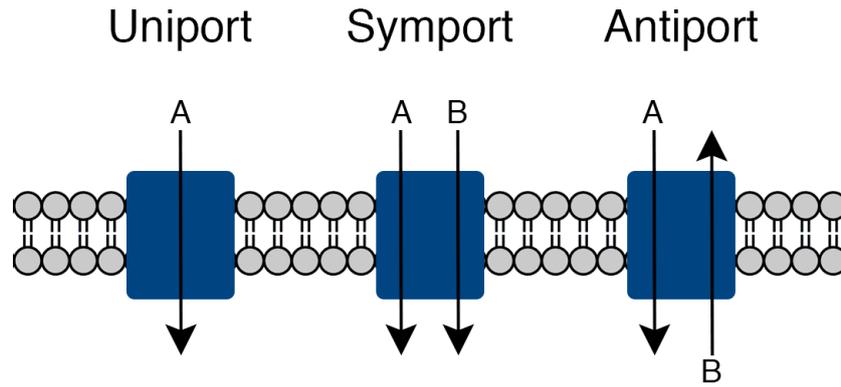


Abb. 2 Transportarten: Uniport, Symport und Antiport

Beim Uniport wird eine Substanz (A) entlang des elektrochemischen Gradienten transportiert. Beim Symport erfolgt ein Cotransporter einer zweiten Substanz (B) entlang und bei Antiport entgegen dem Gradienten.

### 1.1.1 SLC-Transporter

SLC-Transporter werden durch das HUGO Genome Nomenclature Committee (HGNC, HUGO: Human Genome Organisation) aktuell in 395 humane Transporter mit 52 Familien unterteilt [1, 5]. Charakteristisches Strukturelement sind für die meisten SLC-Transporter 12 Transmembransegmente (Abb. 3) und eine Länge von 400 – 600 Aminosäuren.

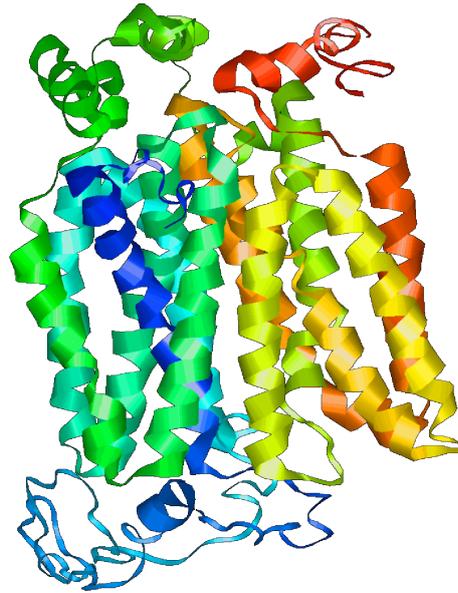


Abb. 3 Struktur des humanen SLC22A11 Transporters

Die Abbildung stellt die Struktur des SLC22A11 Transporters mit dessen 12 Transmembransegmenten im 3D Model dar. Die Erstellung des 3D Models erfolgte mittels I-Tasser (C-Score: -3,71) [6-9].

### 1.1.2 SLC22-Familie

Die SLC22-Familie besteht aus 23 Transportern (Abb. 4). Die meisten Transporter sind in der Leber und Niere exprimiert. Die Hauptfunktionen dieser Transporter sind die renalen und hepatobiliären Ausscheidungen sowie die Resorption von endogenen und xenobiotischen Substanzen [10-12]. In diesem Zusammenhang werden Substanzen durch Barrieren zwischen den Kompartimenten transportiert, beispielsweise in der Niere zwischen Blut und Harn über Tubuluszellen. Ein solches System ist essentiell für die Resorption, Ausscheidung und Entgiftung von nicht-membrangängigen Substanzen [13]. Aufgrund ihrer Lokalisation und Funktion sind Transporter der SLC22-Familie Targets für Wirkstoffe. Sie beeinflussen die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Wirkstoffen. Dieser wichtige Einfluss von Transportern wird besonders hervorgehoben bei Arzneimittelzulassungen. Laut der U.S. Food & Drug Administration (FDA) müssen die Interaktion von Pharmaka bei deren Entwicklung auf Transporter analysiert werden.

## Einleitung

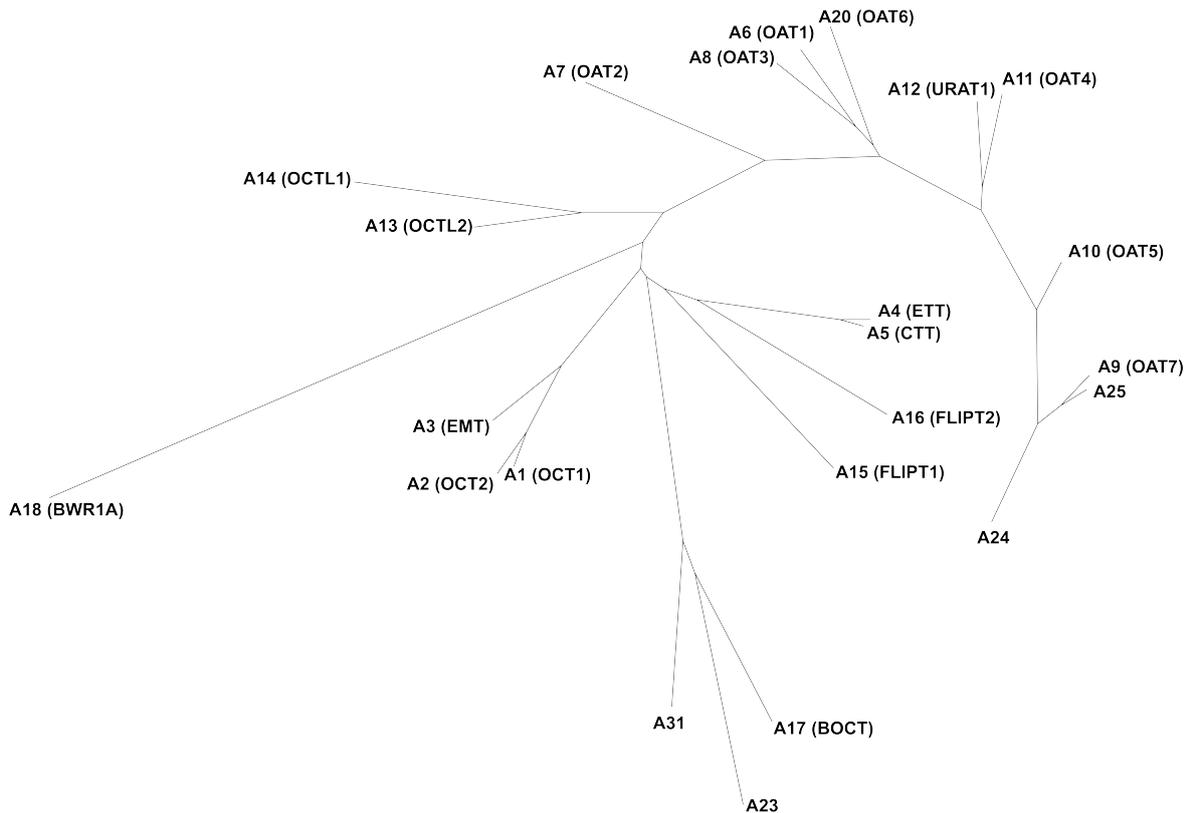


Abb. 4 Phylogenetischer Stammbaum der SLC22-Familie

Dargestellt ist der phylogenetische Stammbaum der SLC22 Familie mit Gen- und Trivialnamen des kodierenden Proteins. Die Astlänge ist proportional zum Verwandtschaftsgrad, je kürzer desto enger verwandter. BOCT = Brain-type organic cation transporter; BWR1A = Beckwith-Wiedemann region 1 A; CTT = carnitine transporter; EMT: extraneuronal monoamine transporter; ETT = Ergothioneine transporter; FLIP = Fly-like putative transporter; OAT = organic anion transporter; OCT = organic cation transporter; OCTL = Organic cation transporter-like; URAT1 = Urate anion exchanger 1. Weitere Details zu Sequenzen im Anhang, (8.1, Seite 138).

### 1.1.2.1 SLC22A13

Der SLC22A13-Transporter ist in mehreren Mammalia-Spezies konserviert. Die Expression findet im Menschen und in der Ratte größtenteils in der Niere statt. Nach immunhistologischer Analyse wird SLC22A13 in der basolateralen Membran von Typ-A-Schaltzellen der Niere exprimiert [14]. Die Schaltzellen sind im distalen Tubulus lokalisiert und essentiell für die Regulation des Säure-Base-Haushaltes[15-18]. Schulz *et al.* demonstrierten einen transportervermittelten Aspartat-, Taurin- und Glutamatefflux beim humanen SLC22A13 (Abb.

5). Die Effluxgeschwindigkeit der Substrate ist in folgender Reihenfolge abnehmend: Aspartat > Glutamat > Taurin [14].

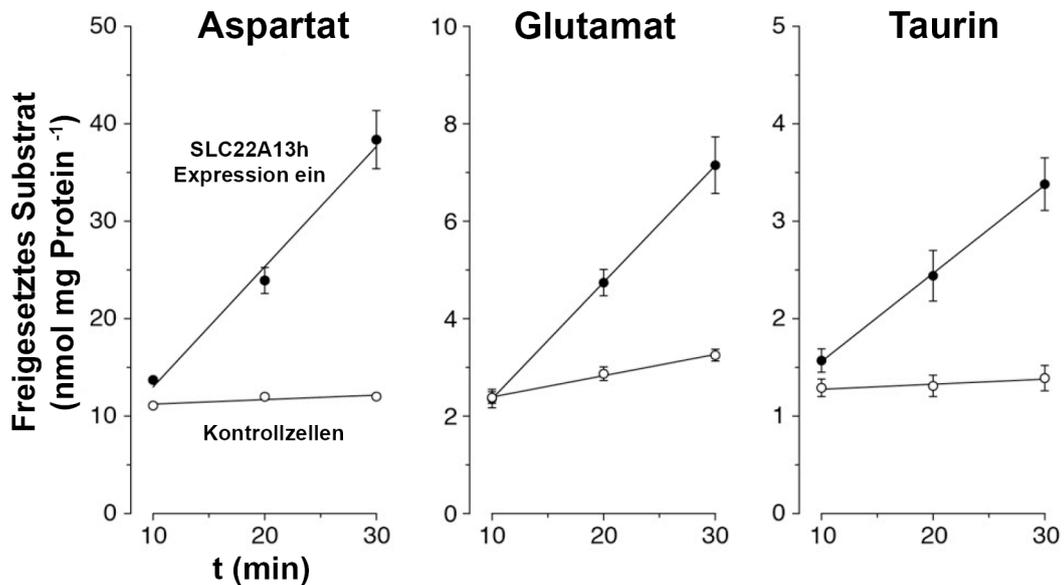


Abb. 5 SLC22A13h vermittelter Efflux von Aspartat, Taurin und Glutamat

SLC22A13h stabil transfizierte 293-Zellen wurden 20 h vor Versuchsbeginn mit (Expression ein) oder ohne (Expression aus, Kontrollzellen) 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Doxycyclin inkubiert. Die Zellen wurden mit natrium- und phosphatfreien KRH-Puffer gewaschen und darin inkubiert. Die Probenentnahme des Überstandes erfolgt zu den jeweiligen Zeitpunkten. Die Substratkonzentration wurde mittels LC-MS/MS bestimmt. Lineare Regression durchgeführt. (Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 5, modifiziert nach [14]).

### 1.1.2.2 Urate Anion Exchanger Transporter 1 (URAT1)

In mehreren Mammalia-Spezies ist URAT1 (SLC22A12) exprimiert. Im Menschen ist URAT1 in der apikalen Membran des proximalen Tubulus der Niere lokalisiert [19, 20]. Die physiologische Funktion ist die Harnsäureaufnahme aus dem renalen Tubulus in die Tubuluszellen [21] (Abb. 6).

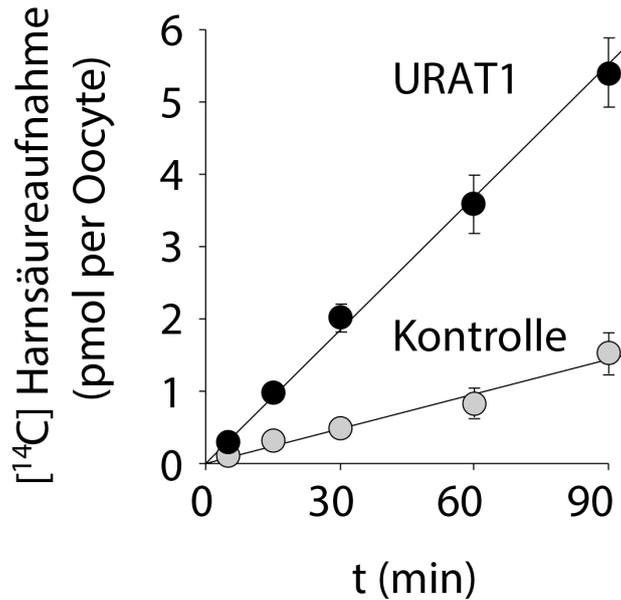


Abb. 6 Zeitverlauf der Harnsäureakkumulation durch URAT1

Die Aufnahme von 50  $\mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ]Harnsäure in wasser-injizierten Oozyten (Kontrolle) und URAT1-exprimierenden Oozyten wurden über die Dauer von 90 min gemessen. (Modifiziert aus [19]).

## 1.2 Harnsäure

Evolutionär betrachtet ist die Bildung von Harn ein Vorteil des Menschen gegenüber anderen Spezies, um an Land leben zu können und Wasser zu sparen. Harn ist die Hauptausscheidungsquelle von Harnsäure. Im Laufe der Evolution gibt es drei Hauptsabstanzen um stickstoffhaltige Abfallprodukte auszuschcheiden: Ammoniak, Harnstoff und Harnsäure (Abb. 7). Um 1 g Stickstoff auszuschcheiden verliert ein Organismus bei Ammoniak 500 mL Wasser, bei Harnstoff 50 mL und bei Harnsäure 1 mL [22].

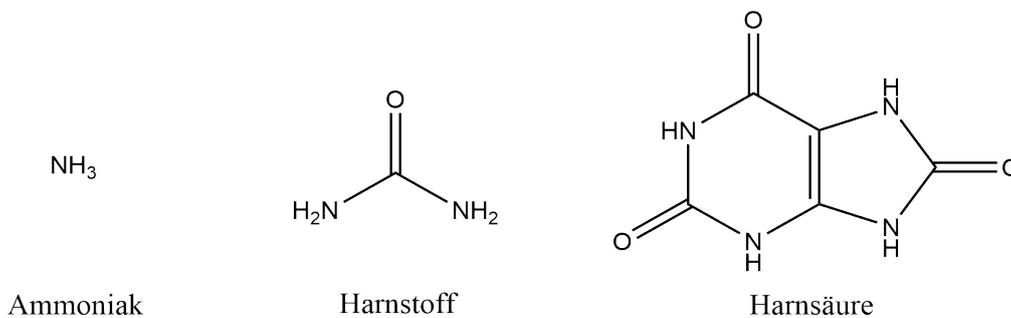


Abb. 7 Ammoniak, Harnstoff und Harnsäure

## Einleitung

Viele Säugetiere und Reptilien oxidieren Harnsäure zu Allantoin (Abb. 8) und weiter zu Harnstoff. Im Laufe der humanen Evolution wurde das Uricase-kodierende Gen mittels Mutation inaktiviert [23-26], wodurch im Menschen und höheren Primaten Harnsäure das Endprodukt des Purinabbaus ist.

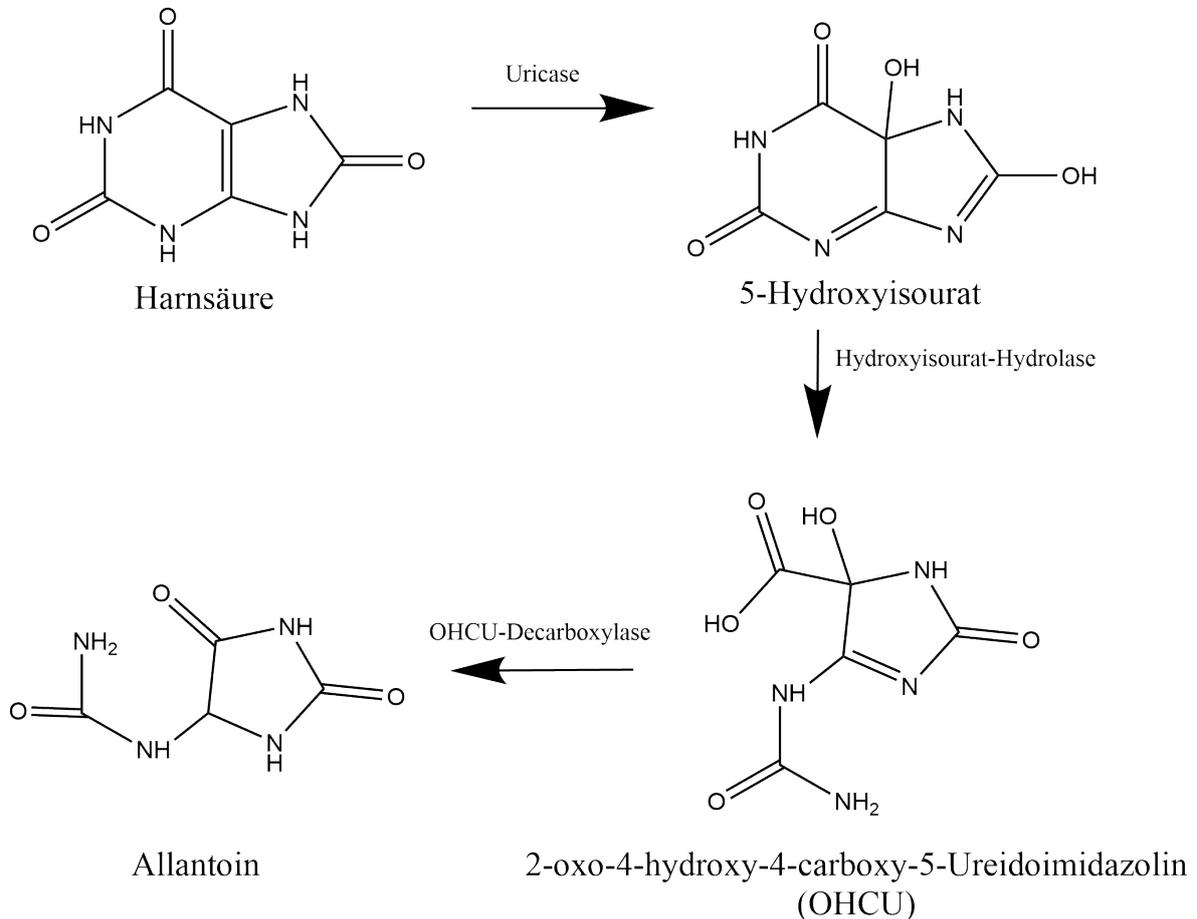


Abb. 8 Stoffwechselweg von Harnsäure zu Allantoin

Enzymatischen Umwandlung von Harnsäure zu Allantoin mit den jeweiligen Enzymen und Zwischenprodukten.

Die normale Konzentration von Harnsäure im menschlichen Blutserum ist viel höher als bei anderen Mammalia wie z.B. der Maus (30-50  $\mu\text{M}$ ) [27]. Der obere Grenzbereich für Frauen beträgt 360  $\mu\text{M}$  und für Männer 400  $\mu\text{M}$ . Hyperurikämie ist das Resultat einer erhöhten Harnsäurekonzentration im Blut. Chronische Hyperurikämie begünstigt die Bildung und Ablagerung von Harnsäurekristallen. Dies kann zu Gicht führen. Ein Serumlevel von  $\geq 535 \mu\text{M}$  Harnsäure führt zur einer gesteigerten Häufigkeit von Gichtarthritis bei Männern (4,9 %) verglichen mit einer Harnsäurekonzentration von  $\leq 415 \mu\text{M}$  (0,1 %) [28]. Gicht ist eine

## Einleitung

fortschreitende entzündliche Arthritis, assoziiert mit einer hohen Morbiditäts- und Mortalitätsrate [29]. In den letzten Dekaden ist die Gichthäufigkeit signifikant gestiegen. In Industrieländern beträgt die Gichtprävalenz ca. 2 % [30]. Im Detail, 2009 war die Gichtprävalenz in Neuseeland 2,9 % (bei Männern 3,6 %) [31] und 3,9 % bei Erwachsenen in den USA in 2007-2008 [32]. Zwischen 2000-2007 in UK (Gichtprävalenz 2,7 %) hatten Patienten mit Gicht Hypertension (51,6 %), ischämische Herzkrankheiten (19,5 %), Diabetes (9,5 %) sowie chronische Nierenschäden (3,7 %) [33]. Außerdem gibt es eine starke Korrelation bei Kindern zwischen Hyperurikämie und primärer Hypertension [34]. Eine verminderte Harnsäureexkretion durch die Niere ist die Hauptursache von Hyperurikämie in über 90 % der Fälle [30].

Harnsäure wird zur mehr als 70 % renal eliminiert [35]. Das glomeruläre System erlaubt Sekretion und Resorption. Nur 7-15 % der filtrierten Harnsäure wird im Urin ausgeschieden [36]. Bei normalen Blut-pH (7,4) liegt Harnsäure als Natrium-Harnsäureanion ( $pK_a = 5,75$ ) vor [27]. Daher findet kein passiver Transport von Harnsäure durch die Zellmembran statt, weshalb Harnsäuretransporter benötigt werden.

Die Funktionalität dieser Transporter kann sowohl durch Mutationen als auch durch Arzneimittelwechselwirkungen beeinträchtigt werden. Genetische Polymorphismen können zu Reduktion der Harnsäureausscheidung und somit zur Hyperurikämie führen [37, 38]. Arzneimittel wie Diuretika, Pyrazinamide, Ethambutol, Levodopa und Aspirin beeinflussen den Harnsäuretransport [28, 30, 39].

Beim Harnsäureaustausch sind einige Transporter an der Sekretion und Resorption involviert [36, 40]. Unter anderem sind folgende Transporter an der Resorption beteiligt; im proximalen Tubulus auf der basolateralen Seite SLC2A9 (URATv1, Glut9) [41], auf der apikalen Seite URAT1 (1.1.2.2, Seite 21) und SLC22A11 (1.3, Seite 24).

### 1.3 SLC22A11

Der SLC22A11 alias Organic Anion Transporter 4 (OAT4) wird nur in Menschen und höheren Primaten exprimiert. Im chromosomalen Abschnitt 11q13.1 liegen SLC22A11 und URAT1 nahe beieinander und deren Aminosäureidentität beträgt 42 % [42, 43]. SLC22A11 besteht aus

## Einleitung

550 Aminosäuren (Uniprot: Q9NSA0, [43]). Genomweite Assoziationsstudien demonstrierten einen Zusammenhang zwischen der Harnsäurekonzentration im Blut und SLC22A11 [44, 45]. Des Weiteren belegten Mutationsanalysen einen Aktivitätsverlust von SLC22A11 [46-48].

mRNA-Analysen zeigten eine SLC22A11-Expression in der Niere und in der Plazenta [43]. Die Lokalisation wurde durch immunohistochemische Analysen belegt. Die SLC22A11-Proteinlokalisierung ist in der apikalen Membran des proximalen Tubulus der Niere, wie URAT1, und in der basolateralen Membran des Syncytiotrophoblast der Plazenta [20, 49, 50].

Eine mögliche SLC22A11-Regulation erfolgt in COS-7 Zellen über Serum- und Glucocorticoid-induzierte Kinase 2 (SGK2), wobei SGK2 den inhibitorischen Effekt der Ubiquitinligase Nedd4-2 auf SLC22A11 reduziert [51].

Erstmalig wurde eine Transportaktivität von SLC22A11 in *Xenopus*-Oozyten nachgewiesen. Cha *et al.* zeigten eine 10-fache Akkumulation mittels Radiotracer von Estronsulfat (E3S) und Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS) in SLC22A11 exprimierenden Oozyten gegenüber der Kontrolle [43]. Die jeweiligen  $K_m$ -Werte waren für E3S 1  $\mu\text{M}$  und für DHEAS 0,6  $\mu\text{M}$ .

Hagos *et al.* demonstrierten eine 5-fache  $^{14}\text{C}$ -Harnsäureaufnahme von SLC22A11 gegenüber der Kontrolle in Oozyten und 1,9 fache in 293-Zellen [52]. Verglichen mit URAT1 in Oozyten betrug die durch SLC22A11-vermittelte Harnsäureaufnahme nur 38 %. SLC22A11 transportiert Harnsäure im Vergleich zu URAT1 schwächer. Des Weiteren ist die Aufnahme Expressionssystem abhängig. Zudem wurde 6-Carboxyfluorescein (6CF) als Aufnahmesubstrat für SLC22A11 demonstriert. In weiteren Publikationen wurden andere Substanzen für SLC22A11 als mögliches Substrat untersucht (Tabelle 1).

Aufgrund der viel höheren Transporteffizienz sowie des besseren Signal-Hintergrundverhältnis werden E3S und das strukturähnliche DHEAS als Modells substrat für den SLC22A11 gegenüber der Harnsäure in der Literatur favorisiert. [47, 51-54].

Tabelle 1 Mögliche Substrate von SLC22A11 laut Publikationen

Potenzielle Substrate des SLC22A11-Transporter sowie Pubchem-ID aus diversen Publikationen.

Substanz	Pubchem-ID	Referenz
p-Aminophippurat	2148	[43]
6-Carboxyfluorescein	76806	[52]
Dehydroepiandrosteronsulfat	12594	[43]
Diclofenac acyl- $\beta$ -D-Glucuronid	57369792	[55]
Estronsulfat	3001028	[43]
Harnsäure	1175	[52]
Ochrotoxin A	33032	[43]
Perfluorooctanoat	2776282	[56]

### 1.3.1 Dehydroepiandrosteronsulfat

DHEAS wird in der Nebenniere in der Zona reticularis gebildet, ist biologisch inaktiv und dient als Langzeitreservoir. Es bindet im Körper an Albumin [57] und ist eine sulfatierte Form von Dehydroepiandrosteron (DHEA). Die Desulfation erfolgt durch die Sulfotransferase 2A1 (SULT2A1) und die Sulfation über Steroid-Sulfotransferase. Im Blut ist die DHEAS-Konzentration 300-fach höher als die DHEA-Konzentration. Des Weiteren ist DHEAS ein Biomarker für das andronerge System [58]. DHEA kann weiter zu Estron, Estradiol über Androstenedion bzw. Testosteron umgewandelt werden [59] (Abb. 9).

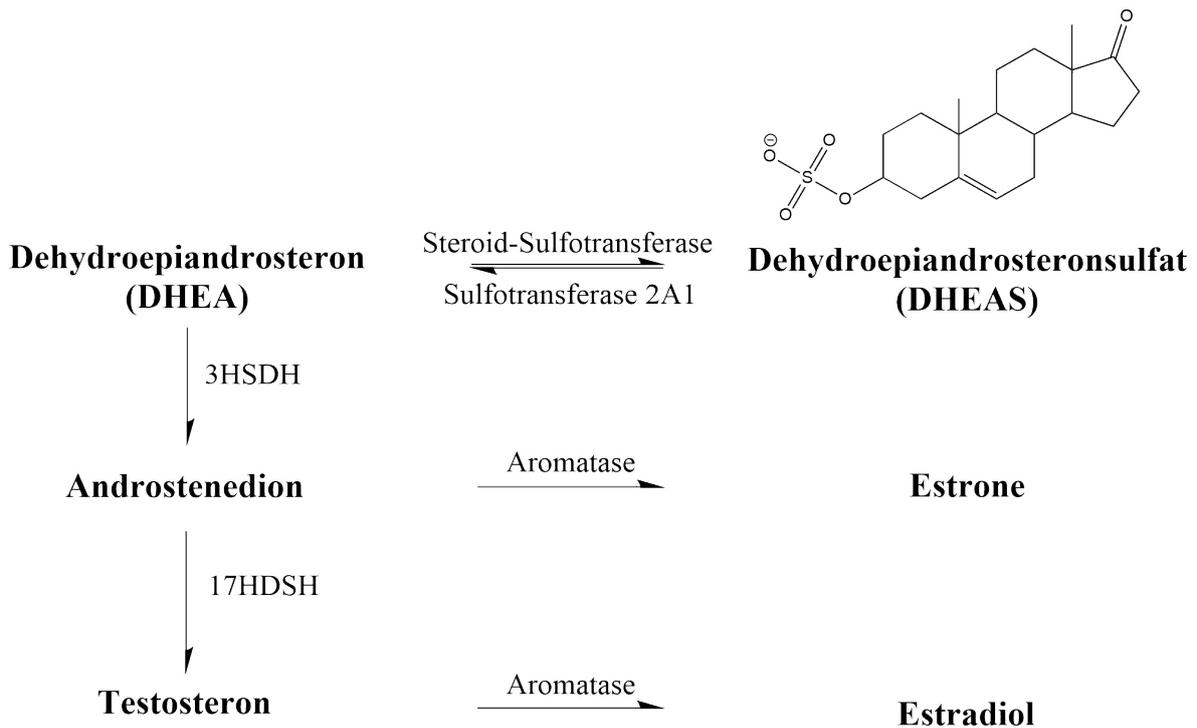


Abb. 9 Stoffwechselweg von DHEAS und DHEA

DHEA kann zu DHEAS und umgekehrt umgewandelt werden. Des Weiteren können daraus u.a. Estron, Estradiol über Androstendion bzw. Testosteron entstehen. 3HSDH: 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, 17HSDH: 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase. Physiologische Struktur bei pH 7,4.

### 1.3.2 Estronsulfat

E3S ist ein Sulfatderivat von Estron. Aufgrund der hydrophoben Struktur (Abb. 10,  $\log P = 3,1$ ) ist Estron schwer wasserlöslich (bis zu 110  $\mu\text{M}$ ). Durch das Sulfation ist E3S 100-fach besser wasserlöslich (bis zu 10 mM) als Estron. E3S hat keine östrogenartige Aktivität [60, 61]. In Männern und Frauen ist E3S das quantitativ häufigste Estrogen [62]. Im Körper ist E3S zu 99 % gebunden, größtenteils an Albumin (85-90 %)[63, 64]. Die Halbwertszeit von E3S beträgt 10-12 h, die Halbwertszeit bei Estron und Estradiol 20-30 min [65]. Bei Bedarf kann E3S in die östrogenaktive Substanz Estradiol über Estron umgewandelt werden (Abb. 10) und dient somit als Langzeitreservoir [66].

Estron, Estradiol und Estriol sind die drei Hauptestrogene im Menschen.

## Einleitung

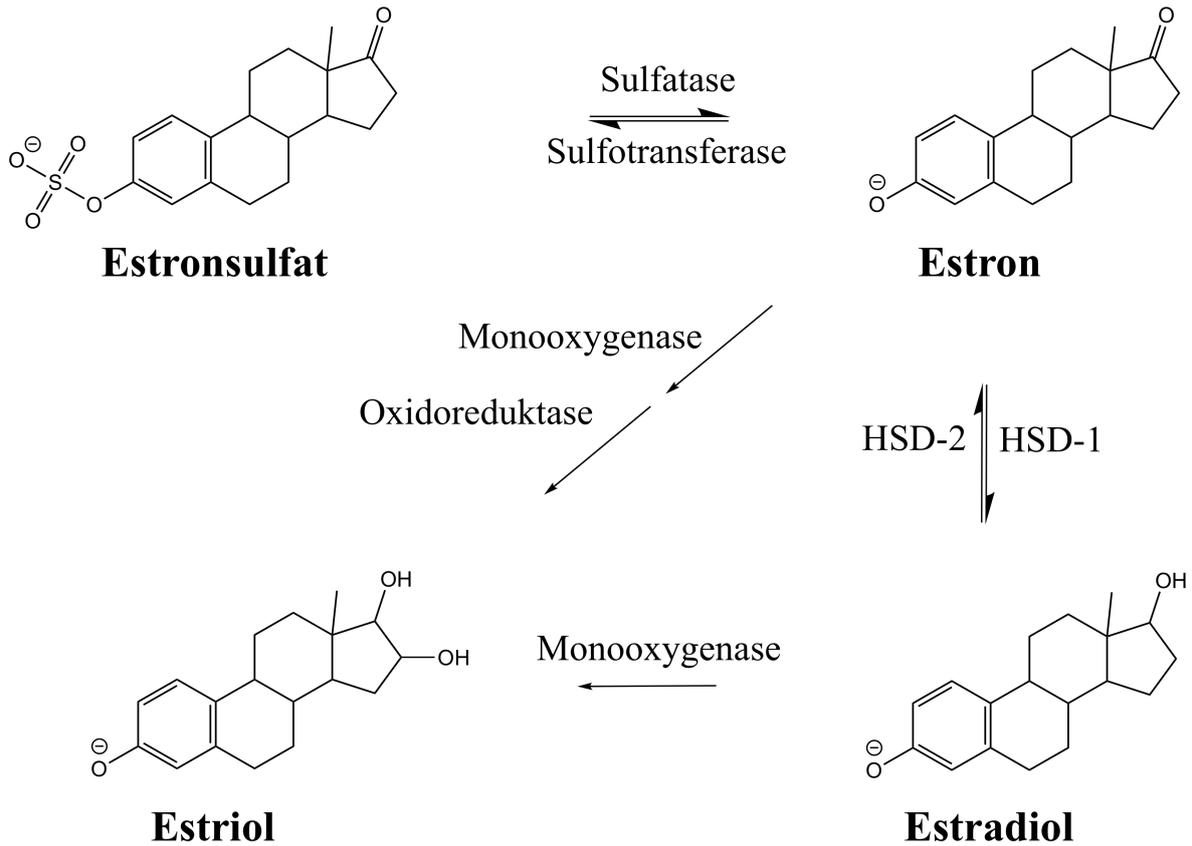


Abb. 10 Syntheseweg von Estron, Estriol, Estradiol aus Estronsulfat

Syntheseweg der drei Hauptestrogene im Menschen aus Estronsulfat. HSD-1/2: 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Type 1/2, Oxidoreduktase: Estrogen 17-Oxidoreduktase, Sulfatase: Estrogensulfatase, Sulfotransferase: Estrogensulfotransferase. Physiologische Struktur bei pH 7,4.

## 1.4 Ziel der Arbeit

Interessanterweise verglichen mit anderen typischen Substraten der SLC22-Familie wie 1-Methyl-4-phenylpyridinium, para-Aminohippursäure, Ergothionein, Carnitin und der Harnsäure ist E3S wesentlich größer und hydrophober, was die Vermutung aufkommen lässt, dass dies kein Substrat des Transporters ist (Abb. 11).

## Einleitung

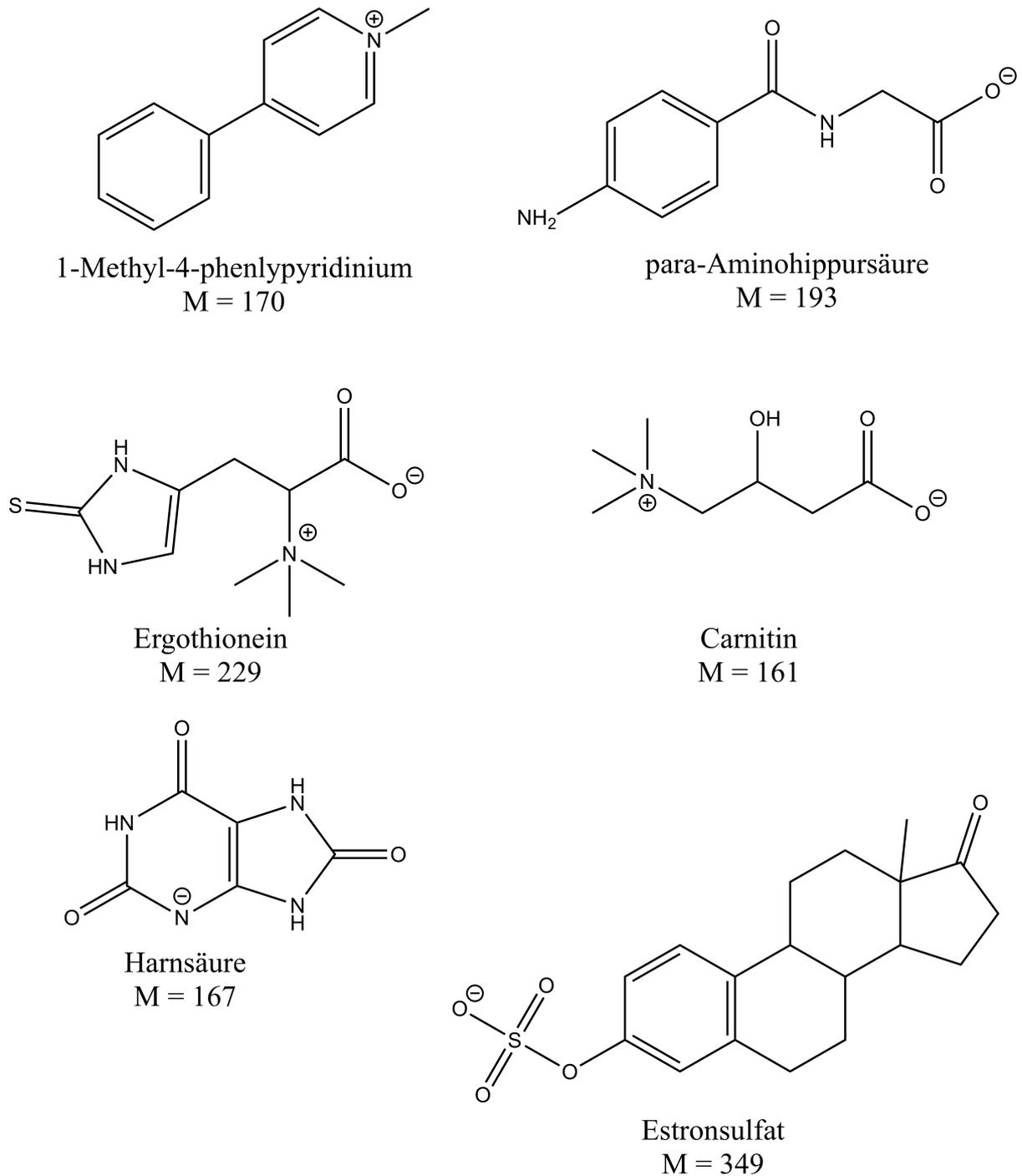


Abb. 11 Verschiedene Substrate der SLC22-Familie sowie Estronsulfat

Substrate der SLC22-Familie als Struktur bei pH 7,4 sowie die korrespondierenden Massen [67].

Außerdem ist es verwunderlich, dass neben dem SLC22A11 über mindestens 18 weitere Transporter aus unterschiedlichen Familien berichtet wurde, welche E3S in Zellen transportieren (Tabelle 2). Aufgrund der Bedeutsamkeit von Harnsäure und E3S ist es das Ziel

## Einleitung

der Arbeit, den Transportmechanismus von E3S durch SLC22A11 im direkten Vergleich zum Harnsäuretransport zu analysieren.

Tabelle 2 Mögliche E3S Aufnahmetransporter in der Plasmamembran

Mindestens 2-fache E3S-Akkumulation gegenüber der Kontrolle im heterologen Transporterexpressionssystem in Vesikeln, Oozyten oder Mammaliazellen.

#	Transporter	Gensymbol	Referenz
1	MRP1	ABCC1	[68]
2	BCRP	ABCG2	[69]
3	NTCP	SLC10A1	[70]
4	SOAT	SLC10A6	[71]
5	NPT1	SLC17A1	[72]
6	OAT2	SLC22A7	[73]
7	OAT3	SLC22A8	[74]
8	OAT7	SLC22A9	[75]
9	OAT6	SLC22A20	[76]
10	MATE1	SLC47A1	[77]
11	MATE2K	SLC47A2	[77]
12	OSTa + OSTb	SLC51A + SLC51B	[78]
13	OATP1A2	SLCO1A2	[79]
14	OATP1B1	SLCO1B1	[80]
15	OATP1B3	SLCO1B3	[81]
16	OATP2B1	SLCO2B1	[80]
17	OATP4A1	SLCO4A1	[82]
18	OATP4C1	SLCO4C1	[83]

## 2 Material und Methoden

Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden hauptsächlich im Zentrum für Pharmakologie des Klinikums der Universität zu Köln in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Dirk Gründemann durchgeführt.

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Sämtliche Chemikalien wurden von folgenden Firmen mit Reinheitsgrad „p.a.“ und „reinst“ verwendet, sofern nicht anders angegeben:

- Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
- Fluka (über Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
- Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Roche (Mannheim, Darmstadt)
- Sigma-Aldrich (München, Deutschland)

Radioaktive Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

- ARC (St. Louis, MO, USA)
- Amersham (Freiburg, Deutschland)
- Hartmann Analytik (Braunschweig, Deutschland)
- NEN (Dreieich, Deutschland)

Alle Plastik- und Glasgefäße wurden von den nachstehenden Firmen bezogen:

- Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
- Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
- Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
- VWR International (Darmstadt, Deutschland)

Die verwendeten Materialien wurden vor Gebrauch für 20 min bei 121 °C und 1,2 bar im Varioklav (H+P Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland) autoklaviert. Alle Glasgefäße

und Metallmaterialien wurden im Heißluftsterilisator T12 (Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland) bei 200 °C für min. 4 h sterilisiert.

### 2.1.2 Lösungen und Puffer

Alle Puffer und Lösungen wurden mit Reinstwasser aus der Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q Advantage A10 (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) bei Raumtemperatur hergestellt. Falls für den Versuch notwendig, wurden diese vor Gebrauch autoklaviert (121 °C, 1,2 bar, 20 min) oder sterilfiltriert (sterile Spritzenfilter w/0,2 µm Celluloseacetatmembran oder Nalgene sterile Flaschenhalsfilter mit w/0,2 µm Polyethersulfon-Membran, beides bezogen bei VWR International, Darmstadt, Deutschland). Der pH-Wert der Lösungen und Puffer wurde mittels pH-Meter (Typ 761 bzw. 766 Calimatic, Knick, Berlin, Deutschland) bestimmt und ggf. justiert. Die genauen Zusammensetzungen der jeweiligen Puffer und Lösungen sind in den entsprechenden Methoden beschrieben.

### 2.1.3 Enzyme und Kits

In allen Reaktionsansätzen wurde die Pufferkonzentration nach Herstellerangaben verwendet.

Tabelle 3 Enzyme und Kit-Systeme

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
BCA Protein Assay Kit	Pierce Biotechnology (Rockford, USA)
BigDye Terminator Mix v1.1	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
GeneJET Gel Extraction Kit	Thermo Fisher Scientific (St. Leon Rot, Deutschland)
NucleoBond Xtra Max	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen (Düsseldorf, Deutschland)
TurboFect	Thermo Fisher Scientific (St. Leon Rot, Deutschland)

### 2.1.4 pUC19

Das Plasmid pUC19 ist 2686 bp lang und hat eine hohe Replikationsrate. Es besitzt sowohl *lacZ* Gen, welche für das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase kodiert, als auch *bla* Gen, welches das Enzym  $\beta$ -Laktamase kodiert, wodurch eine Ampicillin-Resistenz bei erfolgreicher Transformation auftritt [84-86]. pUC19 wurde für die Vervielfältigung von Teilkonstrukten genutzt.

### 2.1.5 pEBTetLNC Expressionssystem

Das Expressionssystem pEBTetLNC wurde verwendet, um die cDNA zu exprimieren. Bei diesem handelt es sich um eine weiterentwickelte Version der pEBTetD- bzw. pEBTet-Vektoren durch ein Chromatin-öffnendes Element (UCOE 0.7). Außerdem enthalten alle Vektoren Elemente des Epstein-Barr-Virus. Als Grundgerüst des pEBTet-Vektor dient das Plasmid pCEP-Pu [87].

Im Gegensatz zu pEBTetD und pEBTet hat der pEBTetLNC-Vektor ein Chromatin-öffnendes Element. Weiterhin wurden die BGH poly(A)site bei den pEBTetLNC und pEBTetD-Vektoren entfernt, um die Grundexpression im nicht eingeschalteten Zustand zu mindern. Dies ist nicht der Fall für den pEBTet-Vektor [88]. Die Steuerbarkeit der Vektoren erfolgt über ein Tetracyclin-Repressor-System.

Der pEBTetLNC-Vektor enthält den Replikationsursprung oriP und das EBNA-1, das DNA-Bindeprotein aus dem Epstein-Barr-Virus. Beide Komponenten ermöglichen eine autonome Replikation zirkulärer DNA [89]. Eine positive Selektion transfizierter humaner Zellen kann aufgrund der konstanten Puromycinresistenz, welche durch SV40 Promotor aufrechterhalten wird, erfolgen. Der Tetracyclin-Repressor (TetR) und der CMV-Promotor, welchem zwei Tetracyclin-Operatoren nachgeschaltet sind, werden ebenfalls kontinuierlich exprimiert. Der Tetracyclin-Repressor inhibiert als Homodimer durch die Bindung an den Tetracyclin-Operator (TetO) die Transkription der nachgeschalteten cDNA. Da es sich dabei nicht um eine irreversible Inhibition handelt, gibt es ein Basallevel der Transkription bei aktiver Inhibition aufgrund der Dissoziation des TetR vom TetO. Die Genexpression wird durch Zugabe von Doxycyclin, einem Derivat des Tetracyclin, induziert (Tet-on System). Doxycyclin bindet an den TetR, wodurch eine Konformationsänderung erfolgt. Aufgrund dieser

Konformationsänderung kann der Repressor nicht an den TetO binden und die nachgeschaltete cDNA wird transkribiert.

Der pEBTetLNC-Vektor enthält einen pUC-Replikationsursprung mit einer Ampicillin-Resistenz-Kassette zur selektiven Vermehrung in *E. coli*.

Die Etablierung einer Zelllinie nach einer Transfektion und anschließender Selektion ist mit dem pEBTetLNC-Vektor in kürzester Zeit möglich, da sich alle notwendigen Bestandteile auf dem Vektor befinden.

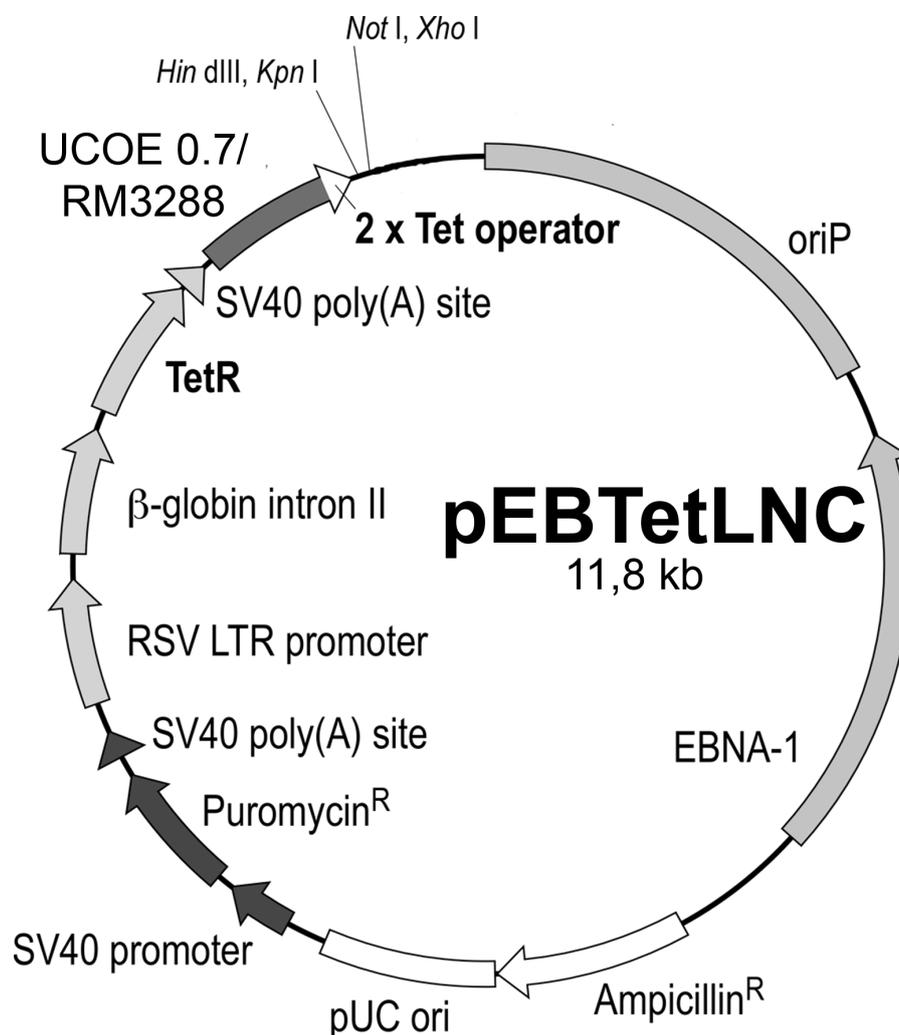


Abb. 12 Schematische Darstellung des pEBTetLNC-Vektors

Mit Pfeilen sind funktionelle Einheiten und deren Orientierung des Expressionssystems pEBTet dargestellt (nach [88]).

### 2.1.6 Bakterienstämme und Kulturmedien

Es handelt sich bei den verwendeten Bakterien um *Escherichia coli* (*E. coli*) des Stammes DH10B (Genotyp: F- *mcrA*  $\Delta$  (*mrr-hsdRMs-mcrBC*),  $\Phi$ 80*dlacZ*  $\Delta$ M15,  $\Delta$ *lacX74*, *deoR*, *recA1*, *araD139*,  $\Delta$  (*ara*, *leu*) 7697, *galU*, *galK*, *rpsL*, *endA1*, *nupG*).

*E. coli* wurden auf Agar-Platten und in Flüssigmedium (2.2.2.1, Seite 42) kultiviert. Zur Selektion wurden 100  $\mu$ g/mL Ampicillin (2.2.2.1.1, Seite 43) verwendet.

### 2.1.7 Zelllinie

Als Zelllinie wurde die HEK-293 (Human embryonic kidney) Zelllinie (American tissue Type Collection 199, ATCC CFL-1573) verwendet. Mittels humanen Adenovirus lassen sich 293-Zellen transfizieren [90].

### 2.1.8 HPLC-Säulen

Für die chromatografische Auftrennung der Substanzen mittels HPLC wurden spezifische Säulen verwendet (Tabelle 4).

Tabelle 4 HPLC-Säulen

Säule	Hersteller	Vorsäule	Abmessungen
DC18	Waters, Dublin, Irland	Partikelgröße 5 µm, Ø 3,9 x 20 mm	Partikelgröße 5 µm, Ø 3 x 100 mm
HILIC	Waters, Dublin, Irland	Partikelgröße 5 µm, Ø 3,9 mm x 20 mm	Partikelgröße 5 µm, Ø 3 x 50 mm
iHILIC	Hilicon, Umea, Schweden	keine Vorsäule	Partikelgröße 5 µm, Ø 2,1 x 100 mm
xBridge Shield RP18	Waters, Dublin, Irland	Partikelgröße 3,5 µm, Ø 3 x 0 mm	Partikelgröße 5 µm, Ø 3 x 100 mm
ZIC-HILIC	Dichrom, Marl, Deutschland	keine Vorsäule	Partikelgröße 5 µm, Ø 2,1 x 100 mm
ZIC-pHILIC	Dichrom, Marl, Deutschland	keine Vorsäule	Partikelgröße 5 µm, Ø 2,1 x 100 mm

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 SLC22A11-Klonierung

Aus humaner RNA wurde SLC22A11 mittels PCR kloniert. Zuerst wurden zwei Teilsequenzen des SLC22A11 mittels PCR amplifiziert und jeweils blunt-end in den pUC19-Vektor kloniert. Per Restriktion wurden beide Teilsequenzen rausgeschnitten und zusammen in pEBTetLNC ligiert (Abb. 13). Die SLC22A11-DNA wurde per Sequenzierung überprüft und mit der Datenbank NCBI (Sequenz: CCDS 8074.1) verifiziert.

## Material und Methoden

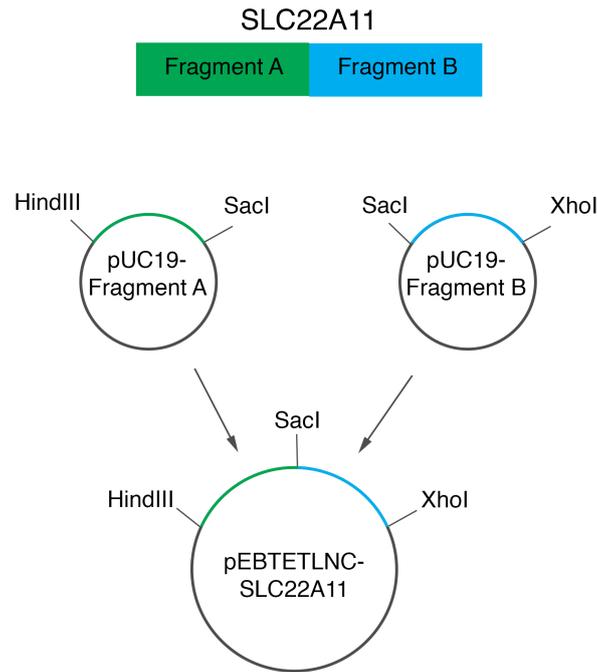


Abb. 13 Klonierung SLC22A11

SLC22A11 wurde mittels zwei Teilfragmenten kloniert. Beide Teilfragmente wurde zuerst in den pUC19-Vektor kloniert, anschließend mittels Restriktionsenzymen (HindIII, SacI, XhoI) ausgeschnitten und in pEBTetLNC ligiert.

Tabelle 5 Primer für die Klonierung des SLC22A11

Primer	Sequenz
F_Fragment A	AGAAAGCTTGCCACCATGGCGTTCTCGAAGCTCTTG
R_Fragment A	TCTGAGCTCCTGAAGTGCTTGGTC
F_Fragment B	AGAGAGCTCAGAAAGGTGGCCAGG
R_Fragment B	tctCTCGAGCTAGAGCGAGGTACTTTCCAC

Tabelle 6 Primer für die Sequenzierung des SLC22A11

<b>Primer</b>	<b>Sequenz</b>
F1_Seq_SLC22A11h	GGTTTCCACAAACATGACCC
F2_Seq_SLC22A11h	GACACTGATGGTGGAGTGGA
F3_Seq_SLC22A11h	CAGAAAGGTGGCCAGGATAA
F4_Seq_SLC22A11h	CTGCCCTCTTGCTCAGTTTC
F7_Seq_SLC22A11h	GGAAAGGGATGTTTTGGGAT
F6_Seq_SLC22A11h	GTCTTCACCTCCACCATCGT
R1_seq_SLC22A11h	ACGATGGTGGAGGTGAAGAC
R2_seq_SLC22A11h	ATCCCAAACATCCCTTCC
F5_Seq_SLC22A11h	AGAGTGGGCTCCTTTATCTGGG

### 2.2.1.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Bei vielen Methoden, wie bei einer Transfektion, oder PCR ist es wichtig die genaue DNA-Konzentration zu wissen. Die Bestimmung der Konzentration erfolgt an einem NanoDrop2000c Spektrophotometer (Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland). Beim NanoDrop2000c handelt es sich um ein spezielles Spektrophotometer, welches die Lichtabsorption bei sehr kleinen Volumina (0,5 – 2  $\mu$ L) messen kann.

Das Licht, welches von einer Xenonlampe emittiert wird, wird über ein Glasfaserkabel zum Probenauftragungspunkt geleitet. Die Probe verändert das Lichtspektrum bzgl. der Absorption. Das transmittierte Licht wird über ein zweites Glasfaserkabel zu einem CCD-Sensor weitergeleitet, wo es erfasst und in ein elektrisches Signal umgewandelt wird.

Vor Beginn der Messung wird ein Nullwert bestimmt, in dem die Intensität der Absorption der Lösung ohne Analyt gemessen wird. Bei darauffolgenden Messungen wird die Intensität der Absorption der Proben ermittelt und mit folgender Formel wird die Absorption berechnet:

Gleichung 1 Absorption

$$Absorption = -\log \left[ \frac{Intensität_{Probe}}{Intensität_{Nullwert}} \right]$$

Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes kann die Konzentration der Probe mittels Absorption bestimmt werden.

Gleichung 2 Lambert-Beerschen Gesetz

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

A = Absorption,  $\varepsilon$  = dekadischer von der Wellenlänge abhängiger Extinktionskoeffizient [L/mol-cm], b = Schichtdicke [cm], c = Konzentration der absorbierenden Substanz [M]

Durch Umstellung der vorherigen Formel ergibt sich:

Gleichung 3 Lambert-Beerschen Gesetz nach c

$$c = \frac{A}{\varepsilon \cdot b}$$

Die Konzentration von Nukleinsäurelösungen wird bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Der Extinktionskoeffizient bei A<sub>260</sub> liegt für doppelsträngige DNA bei 50 ng-cm/ $\mu$ L, für einsträngige DNA bei 33 ng-cm/ $\mu$ L und für RNA bei 40 ng-cm/ $\mu$ L [91]. Des Weiteren wird die Absorption bei 280 nm bestimmt. Das Verhältnis der Absorptionskoeffizienten von 260 nm / 280 nm ist ein Maß für die Reinheit der Probe. Bei einem Wert im Bereich von 1,8 für DNA und für RNA bei 2,0 gilt die Probe als rein.

### 2.2.1.3 Sequenzierung nach Sanger

Alle konstruierten und klonierten Plasmide wurde mittels der Kettenabbruchmethode nach Sanger [92] sequenziert und mit dem Programm MacVektor (Version 14.5.0 , MacVektor Inc., Cambridge, United Kingdom) analysiert und kontrolliert.

Für die Sequenzierung wurde das BigDye Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Forster City, USA) verwendet. Das Kit beinhaltet sowohl mit unterschiedlichen Fluorochromen markierte ddNTPs als auch dNTPs. Beim Einbau eines ddNTPs in den zu

## Material und Methoden

synthetisierenden DNA-Strang kommt es zum Abbruch aufgrund einer fehlenden 3'-Hydroxygruppe, weil das Koppeln eines weiteren Nukleotids nicht erfolgen kann.

Ansatz		
200	ng	DNA
2	pmol	Primer
1	x	Puffer
2	μL	Terminator-Mix
		H <sub>2</sub> O ad 10 μl

Die PCR wurde im Thermocycler (Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg, Deutschland oder T100 Thermocycler, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) durchgeführt. Der Terminator-Mix wurde nach der Initial-Denaturierungsphase hinzugegeben (Hot-Start [93]).

### PCR-Programm:

- 94 °C 5 min.
- Pause Zugabe des Terminator-Mix
- 94 °C 30 sec. ←
- 50 °C 30 sec. ┌ 29 x
- 62 °C 4 min. └
- 62 °C 5 min.

Der Ansatz wurde nach der PCR in 15 μL H<sub>2</sub>O verdünnt, auf einer Sephadex-Platte (Sephadex G-50, Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Deutschland) aufgereinigt, nochmals mit 1x V H<sub>2</sub>O verdünnt und auf eine optischen Platte (MircoAmp Optical 96-well Reaction Plate, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) im 16 Kapillar-Sequenzier (ABI Prism 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Forster City, USA) sequenziert.

Alternativ wurde die Sequenzierung durch die Firma GATC Biotech AG (Köln, Deutschland) durchgeführt. Die Proben wurden entsprechend dem LightRun-Sequenzierungsprotokoll von GATC vorbereitet.

### 2.2.1.4 Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli* ohne Säule

Um Plasmide aus transformierten *E.coli* zu gewinnen, wurde eine Mini-Präparation durchgeführt. Dafür wurden transformierte *E.coli* jeweils in 2 mL Flüssigkultur (LB-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin) über Nacht bei 37 °C und 200 UpM kultiviert (2.2.2.2, Seite 43). Anschließend wurde die Flüssigkultur bei 1.000 g für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das entstandene Pellet wurde in 200 µL P1-Puffer resuspendiert und mit 400 µL P2-Puffer bei Raumtemperatur für 5 min lysiert. Daraufhin wurde die Reaktion mit 300 µL eiskaltem P3-Puffer gestoppt und für 10 min auf Eis inkubiert. Bei der Neutralisation durch Natriumacetat wird die chromosomale DNA renaturiert und bildet einen unlöslichen Komplex. Proteine und andere Zellbausteine fallen als Protein-SDS-Komplexe aus. Die Plasmid-DNA verbleibt in der wässrigen Lösung und kann durch Zentrifugation bei 16.000 g für 10 min abgetrennt werden [94]. Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und per Alkoholpräzipitation konzentriert, in dem 400 µL 100 % Isopropanol zu der wässrigen Phase hinzugefügt und anschließend bei 16.000g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde mit 150 µL 70 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet bei 60 °C getrocknet und in 20 µL 1x TE gelöst.

P1-Puffer für Resuspension		
50	mM	Tris-HCl
10	mM	EDTA
		pH 8,0

alkalischer P2-Puffer für Lyse		
0,2	M	NaOH
1	%	SDS

P3-Puffer für die Neutralisation		
3	M	CH <sub>3</sub> COOK
pH 5,5 mit CH <sub>3</sub> COOH		

### 2.2.1.5 Mini-Präparation & Maxi-Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli*

20 mL Flüssigkultur für eine Mini-Präparation und 200 mL Flüssigkultur für eine Maxi-Präparation mit 100 µg/mL Ampicillin eines *E.coli*-Klons wurden über Nacht bei 37 °C und 200 UpM kultiviert. Die Plasmidextraktion wurde für die 20 mL Flüssigkultur mit dem Plasmid Mini Kit (Qiagen, Düsseldorf, Deutschland) und für die 200 mL Flüssigkultur mit dem Kit NucleoBond Xtra Maxi (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren) nach Herstellerangaben durchgeführt.

## 2.2.2 Mikrobiologische Methoden

Bei Arbeiten mit *Escherichia coli* (*E. coli*) wurde alle verwendeten Glaswerkzeuge flambiert und alle Metallwerkzeuge ausgeglüht. Sonstige verwendete Materiale und Medien wurden vor Gebrauch sterilisiert oder autoklaviert. Die Arbeiten wurden unter einer Reinraumwerkbank (Laminar Flow, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland) durchgeführt.

### 2.2.2.1 Nährmedien

Die Anzucht von *E.coli* erfolgte in Luria Bertani-Medium (LB-Medium) auf LB-Agar, welche nach der Herstellung unverzüglich autoklaviert und bis zur Benutzung bei 4 °C gelagert wurden.

LB-Medium	
10 g/L	Pepton 140
5 g/L	Hefeextrakt
10 g/L	NaCl
autoklaviert	

LB-Agar	
10 g/L	Pepton 140
5 g/L	Hefeextrakt
10 g/L	NaCl
15 g/L	Agar
autoklaviert	

#### 2.2.2.1.1 Antibiotikum

Das Antibiotikum Ampicillin (Amp) wurde für die Selektion von transformierten *E.coli* verwendet. Es wurde eine Stammlösung von 100 mg/mL Ampicillin angesetzt, steril filtriert (sterile Spritzenfilter w/0,2 µm Celluloseacetatmembran, VWR International, Darmstadt, Deutschland), aliquotiert und bei -20 °C gelagert. In einer Endkonzentration von 100 µg/mL wurde es zur Selektion eingesetzt.

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

Die Anzucht von transformierten *E.coli* erfolgte in Flüssigkultur mit 100 µg/mL Ampicillin in sterilisierten Reagenzgläsern mit Kapsenberg-Deckel bei kleinen Volumina oder in einen sterilisierten Schikanekolben bei größeren Volumina. Die Flüssigkultur wurde mit einer

einzigsten Kolonie unter Verwendung von einer ausgeglühten Impföse angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 UpM im Inkubationsschüttler (Minitron HAT, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) inkubiert.

Für Kultivierung von transformierten *E.coli* wurde LB-Agar (2.2.2.1, Seite 42) auf Plastikschalen (10 cm Durchmesser) ausplattiert, welcher zuvor unter Hitze ausgeglüht, abgekühlt und mit 100 µg/mL Ampicillin versetzt wurde. Die *E.coli*-Zellsuspension wurde gleichmäßig auf den Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Glycerolstocks wurden für eine längere Lagerung der *E.coli*-Klone hergestellt. Dafür wurde 1 ml LB-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin angeimpft und für 4 h im Inkubationsschüttler inkubiert. Daraufhin wurde die *E.coli*-Zellsuspension 1:1 mit 20 %-Glycerol LB-Lösung verdünnt, in Kryoröhrchen aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

### **2.2.2.3 Herstellung elektrokompenter *E.coli***

Elektrokompente *E.coli* wurden bei der Transformation von Plasmiden verwendet (2.2.2.4, Seite 45). Dafür wurde ein Verdünnungsausstrich vom Glycerolstock des DH10B-Stammes auf einer Agarplatte ohne Antibiotika erstellt und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden vier Kolonien in jeweils 5 ml SOB-Medium über Nacht bei 37 °C und 200 UpM im Inkubationsschüttler kultiviert. Daraufhin wurden die 5 ml Flüssigkulturen in je 200 ml SOB-Medium überführt und für 2-3 h bei 37 °C und 200 UpM inkubiert. Der Inhalt zweier Schikanekolben wurde zusammengeführt und 15 min auf Eis inkubiert. Darauffolgend wurde die Bakterienkultur bei 3000 g (Sorvall RC 5B Plus, Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland) für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 200 ml vorgekühlter 10 %iger Glycerinlösung auf Eis resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Wasch- und Zentrifugationsschritt wurden zweimal wiederholt. Anschließend wurde das Pellet nach Verwerfung des Überstandes zu je 26 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

SOB-Medium		
20	g/L	Pepton 150
5	g/L	Hefeextrakt
5,8	mM	NaCl
465	μM	KCl

#### 2.2.2.4 Transformation von *E.coli*

Die Transformation von *E.coli* wurde mittels Elektroporation durchgeführt. Für die Transformation wurde 1 ng DNA mit 26 μL elektrokompenten *E.coli* für eine Minute auf Eis inkubiert und in einer vorgekühlte Küvette (EPECU101 50 x 1 mm Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland) überführt. Die Bakterien wurden bei einer Spannung von 1,6 kV, einer Kapazität von 25 μF und einem Widerstand von 200 Ω im Gene Pulser II (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) elektroporiert und unverzüglich in 1 mL SOC-Medium für 1 h bei 37 °C 200 UpM im Inkubationsschüttler in einem sterilen Reagenzglas inkubiert. Bei erfolgreicher Transformation sollte sich eine Ampicillinresistenz gebildet haben, welche auf den jeweiligen Expressionssystemen kodiert ist (2.1.5, Seite 33). 100 μL der Bakteriensuspension wurde direkt und in einer 1:100 Verdünnung auf Agar-Platten mit 100 μg/mL Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

SOC-Medium		
20 g/L		Pepton 150
5 g/L		Hefeextrakt
5,8 mM		NaCl
465 $\mu$ M		KCl
10 mM		MgCl <sub>2</sub>
10 mM		MgSO <sub>4</sub>
20 mM		Glukose

### 2.2.3 Zellbiologische Methoden

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter einer Sicherheitsbank (Hera Safe, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland) mit vertikalem Luftstrom durchgeführt. Es wurden serologische, einzeln verpackte und sterile Einmalpipetten benutzt. Vor Gebrauch der Sicherheitsbank und anderen Materialien wurden diese mit 70 % Isopropanol gesäubert. Alle benötigten Lösungen wurden vorher autoklaviert oder steril gefiltert (0,2  $\mu$ m Porendurchmesser).

#### 2.2.3.1 Kultivierung von 293-Zellen

In einem Inkubator (Hera Cell, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland) wurden 293-Zellen bei 37 °C in einer Wasserdampf gesättigten Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Als Nährmedium diente 37 °C warmes DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) mit 10 % FCS (fetal calf serum, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich). Alle 293-Zellen wurden in sterilen 75 cm<sup>2</sup>- oder 175 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen (Tissue Culture Flask, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) kultiviert.

Um eine Selektion zu gewährleisten, wurde bei transfizierten 293-Zellen 3  $\mu$ g/mL des Antibiotikums Puromycin dem Nährmedium beigefügt. Sowohl bei transfizierten als auch bei

## Material und Methoden

nicht-transfizierten (NT) Zellen wurde das Nährmedium alle zwei bis drei Tage gewechselt. Außerdem wurden die Zellen bei einer Zelldichte von 90-100 % subkultiviert. Hierbei wurden die Zellen in neuem Medium abgeklopft, resuspendiert und in eine neue Zellkulturflasche überführt, in der frisches Medium vorgelegt war.

Um die Expression der cDNA auf dem pEBTetLNC-Vektor (2.1.5, Seite 33) zu induzieren, wurde das Selektionsmedium der transfizierten 293-Zellen durch Selektionsmedium mit 1 µg/mL Doxycyclin (Induktionsmedium) ersetzt (Zellen mit Doxycyclin: Expression ein; Zellen ohne Doxycyclin: Expression aus, Kontrollzellen). Die Induktion der Expression erfolgte 20 h vor Versuchsbeginn.

<b>Nährmedium</b>	
	DMEM
10 %	FCS
100 U/mL	Penicillin
100 µg/mL	Streptomycin

<b>Selektionsmedium</b>	
	DMEM
10 %	FCS
3 µg/mL	Puromycin
100 U/mL	Penicillin
100 µg/mL	Streptomycin

Induktionsmedium	
	DMEM
10 %	FCS
3 µg/mL	Puromycin
1 µg/mL	Doxycyclin
100 U/mL	Penicillin
100 µg/mL	Streptomycin

### 2.2.3.2 Transfektion von 293-Zellen

Für eine stabile episomale Transfektion wurde TurboFect (Thermo Fisher Scientific, St. Leon, Deutschland) verwendet [95]. Das Reagenz ist ein positiv geladenes Polymer, welches sich mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA anlagert. Der DNA-Polymer-Komplex schützt die DNA vor Degradation und ermöglicht eine endozytotische Aufnahme.

10 µg DNA wurde in 1 mL serumfreiem DMEM mit 20 µL TurboFect-Reagenz für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde bei den nicht-transfizierten 293-Zellen mit einer Zelldichte von 70 % in einer 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche das Nährmedium gewechselt. Nach der Inkubationszeit wurde der Transfektionskomplex hinzugefügt. 24 h nach der Transfektion wurden das Nährmedium auf Selektionsmedium (2.2.3.1, Seite 46) gewechselt.

### 2.2.3.3 Aussaat von 293-Zellen

Für Efflux- und Aufnahmeversuche wurden transfizierte 293-Zellen in Polystyrol-Schälchen (Ø 60 mm, Nunclon, Nunc, Wiesbaden, Deutschland bzw. Ø 60 mm, TC-Schale, Sarstedt, Nürnberg) ausgesät. Zwecks besserer Adhärenz der Zellen während der Versuchsdurchführung wurden die Schälchen vor Aussaat mit 2 mL Poly-L-Ornithin beschichtet, 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach mit 3 mL DMEM gewaschen. Pro Schälchen wurden ca.  $2 \times 10^6$  Zellen in 4 mL Selektionsmedium (2.2.3.1, Seite 46) ausgesät. Gemäß 2.2.3.1 „Kultivierung von 293-Zellen“ wurde die Expression des Transporters mindestens 20 h vor Versuchsbeginn induziert.

<b>Poly-L-Ornithin-Lösung</b>		
0,1 g/L	Poly-L-Ornithin	
150 mM	Borsäure	
	pH 8,4 mit NaOH eingestellt	

### 2.2.3.4 Erstellung von Zellysaten

Je nach Experiment ist der Zellaufschluss notwendig, um das Zellinnere zu untersuchen. Für Analysen mittels LC-MS/MS wurden die Zellen dreimal mit KRH-Puffer (Krebs-Ringer-Henseleit-Puffer) gewaschen und in 1 mL 100 % HPLC-reinen Methanol lysiert. Zwecks Proteinbestimmung mittels BCA Protein-Assay (2.2.3.5, Seite 49) wurden die Zellen mit 1 mL 0,1 % Triton-X 100 (v/v) in 5 mM Tris-HCl pH 7,4 lysiert. Bei beiden Methoden betrug die Inkubationszeit jeweils 20 min bei Raumtemperatur (RT). Die Lagerung der Zellysate erfolgt bis zur Analyse bei -20 °C.

### 2.2.3.5 Proteinbestimmung mittels BCA Protein Assay Kit

Die Proteinbestimmung wurde mit einem BCA (bicinchoninic acid) Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) durchgeführt. Dafür wurden bei Versuchsvorbereitung zusätzliche Schälchen mit Zellen ausgesät (2.2.3.3, Seite 48) und lysiert (2.2.3.4, Seite 49).

Bei dieser Methode kommt es zu einem dunkelvioletten Farbumschlag durch eine Biuretreaktion mit BCA bei der  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{Cu}^+$  reduziert werden [96]. Sowohl die Aminosäuren Cystin, Cystein, Tryptophan und Tyrosin als auch Peptidbindungen können  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{Cu}^+$  reduzieren [97]. Die Absorption des Farbumschlags kann bei 568 nm photometrisch gemessen werden.

Das Zellysate wurde 1 min bei 16.000 g zentrifugiert. Es wurde 1:10 in 0,15 M NaCl verdünnt, gevortext und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden 40 µL der jeweiligen Verdünnung dreifach auf eine 96-Well-Platte (Mikrotestplatte 96Well F, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

pipettiert. Zur Standardisierung wurden zwei separat erstellte Eichreihen mit BSA-Konzentrationen (0,00 µg/mL, 59,10 µg/mL, 113,35 µg/mL, 172,75 µg/mL, 227,25 µg/mL) aufgetragen. Jeder aufgetragene Ansatz wurden 200 µL Färbelösung pro Vertiefung zugegeben, bestehend aus einem 50:1-Verhältnis von BCA und 4 %iger Kupfersulfatlösung. Die Absorption wurde nach einer Inkubation bei 37 °C für 30 min mit einem Plate-Reader (Thermo Max Microplate Reader, Molecular Devices Sunnyvale, USA bzw. Nano Quant Infinite M200 Pro, Tecan, Männedorf, Schweiz) bei 568 nm gemessen. Der mittlere Proteingehalt wurde über die Eichreihe ermittelt.

### **2.2.4 Transportanalysen**

Um den Transporter zu charakterisieren wurden verschiedenen Untersuchungen z.B. Aufnahme- und Effluxexperimente durchgeführt. Mit SLC22A11 stabil-transfizierte 293-Zellen wurden in mehreren Schälchen ausgesät (2.2.3.3, Seite 48). Die Expression wurde bei 50% der Schälchen induziert. Nach Versuchsende wurden die Zellen lysiert (2.2.3.4, Seite 49) oder nicht mehr weitergeführt, weshalb die Versuchsdurchführung unter nicht sterilen Bedingungen erfolgte.

#### **2.2.4.1 Vorinkubation und Waschung der 293-Zellen (vor Versuchsbeginn)**

Vor den Substratabgabe- und Substrataufnahmeanalysen wurde das Nährmedium entfernt. Des Weiteren wurden die Zellen dreimal mit jeweils 4 mL Puffer gewaschen, wodurch Serum- und Mediumbestandteile entfernt wurden. Je nach Versuchskonditionen wurden die Zellen im jeweiligen Puffer vorinkubiert. Der verwendete Standardpuffer war ein KRH-Puffer, sofern nicht anders geschrieben.

KRH		
5,6	mM	Glukose
125,0	mM	NaCl
4,8	mM	KCl
1,2	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1,2	mM	CaCl
1,2	mM	MgSO <sub>4</sub>
25,0	mM	HEPES
pH 7,4 mit NaOH		

#### 2.2.4.2 Substrataufnahme von <sup>3</sup>H-Glutamat und -Aspartat

Zwecks Analyse einer Glutamat- und Aspartataufnahme wurden mit SLC22A11 stabil transfizierten 293-Zellen mit 0,1 µM <sup>3</sup>H-Glutamat oder -Aspartat im KRH-Puffer bei ein- und ausgeschalteter Expression inkubiert. Nach 1, 3, 10, 20 und 40 min wurde die Aufnahme durch Absaugen der Aufnahmelösung und anschließender Waschung mit 4 °C kaltem KRH-Puffer gestoppt. Die Zellen wurden in Triton-X-Lyselösung lysiert (2.2.3.4, Seite 49). Zelllysate wurden mittels Flüssigszintillationszählung (2.3, Seite 58) analysiert.

#### 2.2.4.3 Glutamat- und Aspartatefflux

Für die Analyse des Glutamat- und Aspartateffluxes wurde eine KRH-Puffer mit NMDG (N-Methyl-D-Glukosamin) anstatt Natrium verwendet. Dadurch wird eine Aufnahme der Substanzen durch den endogenen exzitatorischen Aminosäuretransporter 1 (EAAT1) verhindert. EAAT1 ist ein Na<sup>+</sup>-getriebener Glutamat-Aspartat Aufnahmetransporter. Des Weiteren wurde Phosphat aus dem Puffer aufgrund von möglichen Interferenzen bei der LC-MS/MS entfernt.

Je Zellschälchen wurde 2 mL oder 2,5 mL Pufferlösung bei 3 bzw. 5 Messzeitpunkten aufgetragen. Pro Messzeitpunkt wurden 200 µL Überstand entnommen und mittels LC-MS/MS analysiert. Eine lineare Regressionsanpassung erfolgte für jedes Zellschälchen bzw. für jede Probe.

<b>KRH ohne Na &amp; P</b>		
5,6	mM	Glukose
125,0	mM	N-Methyl-D-Glukosamin
4,8	mM	KCl
1,2	mM	CaCl
1,2	mM	MgSO <sub>4</sub>
25,0	mM	HEPES
		pH 7,4

### 2.2.4.3.1 IC<sub>50</sub>-Bestimmung von E3S und Probenecid auf den Glutamatefflux

Die Glutamatfreisetzung wurde entsprechend 2.2.4.3 (Seite 51) ohne und mit 0,1 – 1000 µM E3S oder Probenecid im Puffer analysiert. Die Steigung der linearen Regression entspricht der Freisetzungsgeschwindigkeit. Je E3S- bzw. Probenecidkonzentration wurde die mittlere Freisetzungsgeschwindigkeit bei ausgeschalteter Expression von der korrespondierenden Probe bei eingeschalteter Expression subtrahiert. Der IC<sub>50</sub>-Wert wurde mittels nachfolgender Formel bestimmt:

Gleichung 4 Funktion zur Bestimmung des IC<sub>50</sub>

$$y = y_0 / (1 + \frac{x}{IC_{50}}).$$

### 2.2.4.3.2 pH-Abhängigkeit des Glutamateffluxes

Die Durchführung erfolgte entsprechend 2.2.4.3.1 (Seite 52). Jedoch wurde der pH-Wert des natrium- und phosphatfreien KRH-Puffers von pH 6,2 - 8,6 in 0,6er Stufen (pH 6,2 / 6,8 / 7,4 / 8,0 / 8,6) justiert.

Gleichung 5 exponentielle Anpassung

$$(y = y_0 + e^{ax})$$

### 2.2.4.3.3 Chlorid-Abhängigkeit des Glutamateffluxes

Der Glutamatefflux wurde auf eine mögliche Chloridabhängigkeit untersucht. Gemäß 2.2.4.3 (Seite 51) erfolgte die Durchführung. Des Weiteren wurden alle chloridhaltigen Salze durch entsprechende Gluconate substituiert.

KRH ohne Na & P, Cl substituiert		
5,6	mM	Glukose
125,0	mM	N-Methyl-D-Glukosamin
4,8	mM	K-Gluconat
1,2	mM	Ca-Gluconat
1,2	mM	MgSO <sub>4</sub>
25,0	mM	HEPES
pH 7,4		

### 2.2.4.3.4 Transeffekte auf den Glutamatefflux

Ein Transeffekt ist der Einfluss eines Substrates von der gegenüberliegenden Seite (trans) der Zellmembran auf die Transportgeschwindigkeit eines anderen Substrates (Abb. 14).

## Material und Methoden

Beispielsweise wird Glutamat vom Zellinneren nach außen transportiert (Efflux), muss eine Konformationsänderung des Transporters stattfinden, um ein weiteres Molekül Glutamat zu transportieren (orangene Pfeile, Abb. 14 A). Diese Konformationsänderung kann durch ein anderes Substrat von der Transseite beeinflusst werden (Rückstellung). Die Rückstellung wird durch das Substrat verlangsamt (Transinhibition, Abb. 14 B), nicht beeinflusst (Kein Effekt, C) oder beschleunigt (Transstimulation, D).

Es wurden die Transeffekte von Harnsäure, E3S und DHEAS auf den Glutamatefflux untersucht. Dafür wurden die Zellen entsprechend 2.2.4.3 (Seite 51) jeweils mit 1 mM pro Substanz im natrium- und phosphatfreien KRH-Puffer inkubiert.

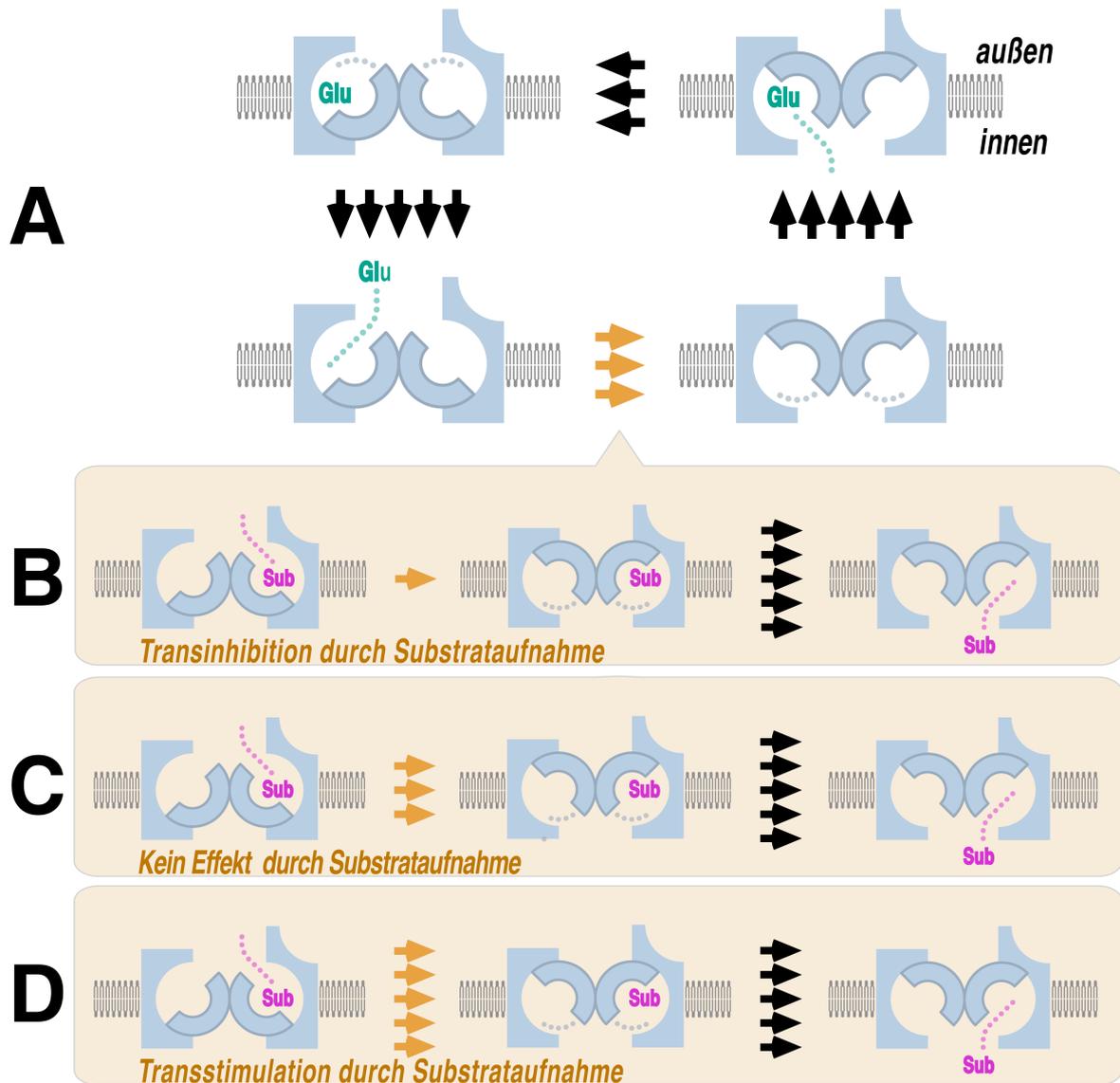


Abb. 14 Mögliche Transeffekte auf den Glutamatefflux

(A) Glutamat wird vom Zellinneren nach außen durch Konformationsänderung des Transporters transportiert. Um ein weiteres Molekül Glutamat innen aufnehmen zu können, muss der Transporter erneut seine Konformation ändern (Rückstellung). Dieser Schritt kann durch ein anderes Substrat von der gegenüberliegenden Seite (trans) bzw. von außen, beeinflusst werden. (B) Bei einer Transinhibition verlangsamt das Substrat die Konformationsänderung. (C) Das Substrat hat keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Rückstellung. (D) Die Substrataufnahme beschleunigt die Rückstellung. Glu: Glutamat, Sub: Substrat. Pfeilanzahl entspricht der Geschwindigkeit (je mehr, desto schneller).

### **2.2.4.4 Substrataufnahme**

Es wurde die SLC22A11 vermittelte Aufnahme von Harnsäure, E3S, DHEAS und 6-Carboxyfluorescein (6CF) in 293-Zellen analysiert.

#### **2.2.4.4.1 Substrataufnahme im Zeitverlauf**

Stabil transfizierte 293-Zellen wurden mit jeweils 10  $\mu$ M E3S, DHEAS, 6CF oder Harnsäure im KRH-Puffer (2.2.4.1, Seite 50) über unterschiedliche Zeit bei 37 °C inkubiert. Die Aufnahme wurde durch vierfache Waschung mit 4 °C kaltem KRH-Puffer gestoppt. Die Zellen wurden in Methanol lysiert (2.2.3.4, Seite 49) und die Lysate mittels LC-MS/MS analysiert.

#### **2.2.4.4.2 Substrataufnahme im Equilibrium**

Entsprechend den Ergebnissen der Substrataufnahme im Zeitverlauf wurde ein definierter Zeitpunkt je Substanz im Equilibrium gewählt; für Harnsäure und 6CF 1h, E3S 30min. Nach Waschung und Zellyse wurden die Proben mittels LC-MS/MS untersucht. Der Hintergrund der Kontrollzellen wurde subtrahiert. Eine bestmögliche graphische Anpassung, linear oder hyperbolisch, wurde entsprechend der jeweiligen Daten berechnet.

#### **2.2.4.4.3 Chloridabhängigkeit bei der Substrataufnahme**

Die Substrataufnahme von Harnsäure und E3S wurde bei SLC22A11 transfizierten 293-Zellen analysiert. Dafür wurden die Zellen jeweils mit 10  $\mu$ M Harnsäure oder E3S im Standard-KRH-Puffer (2.2.4.1, Seite 50) als auch im Chlorid-substituierten KRH-Puffer inkubiert. Beim Chlorid-substituierten Puffer wurden alle Salze durch entsprechende Gluconate substituiert. Nach definierter Aufnahmezeit wurden die Zellen mit dem jeweiligen Puffer ohne Substrat bei 4 °C gewaschen und lysiert. Zelllysate wurde mittels LC-MS/MS untersucht. Eine graphische Anpassung erfolgte gemäß Gleichung 6.

Gleichung 6 Gleichung für einen nicht-linearen Zeitverlauf

$$f(x) = offset + \frac{k_{in}}{k_{out}} * c_{out} * (1 - e^{(-k_{out}*x)})$$

mit  $c_{out}$  [mol],  $k_{in}$  [ $\mu\text{L min}^{-1}$ ],  $k_{out}$  [ $\text{min}^{-1}$ ].

KRH, Clsubstituiert	
5,6 mM	Glukose
125,0 mM	Na-Gluconat
4,8 mM	K-Gluconat
1,2 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1,2 mM	Ca-Gluconat
1,2 mM	MgSO <sub>4</sub>
25,0 mM	HEPES
	pH 7,4

#### 2.2.4.5 Transeffekte bei der Harnsäure und E3S-Freisetzung

Es wurde der Transeffekt von DHEAS, 6CF und Harnsäure auf mit E3S oder Harnsäure vorbeladenen 293-Zellen untersucht. SLC22A11 stabil transfizierte 293-Zellen wurden mit 100  $\mu\text{M}$  Harnsäure oder 10  $\mu\text{M}$  E3S im KRH-Puffer für 1 h vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit substratfreien Puffer gewaschen und ohne bzw. mit 100  $\mu\text{M}$  DHEAS, 100  $\mu\text{M}$  6CF oder 1 mM Harnsäure inkubiert. Überstände wurden für mit E3S vorbeladenen Zellen nach 1,5 min und für mit Harnsäure vorbeladenen Zellen nach 12 min entnommen. Nach Waschung wurden die Zellen lysiert. Der Hintergrund wurde subtrahiert (ausgeschaltete SLC22A11-Expression bei transfizierten Zellen).

Darüber hinaus Zellen, die mit Harnsäure und E3S vorinkubiert wurden, auf einen DHEAS-Transeffekt untersucht. Die Zellen wurden 1. mit 100  $\mu\text{M}$  Harnsäure vorinkubiert,

2. mit 4 °C kalt Puffer gewaschen, 3. mit 100 µM E3S inkubiert, 4. wieder kalt gewaschen, 5. mit 100 µM DHEAS inkubiert und nach 1 min lysiert. Die Zelllysate wurden mittels LC-MS/MS analysiert.

### 2.3 Radioaktivitätsbestimmung

Radioaktiv markierte Substrate wurden zur Quantifizierung mittels Flüssigszintillationszählung analysiert. Dabei wurde der  $\beta$ -Zerfall innerhalb der Proben gemessen. Für die Analyse wurde eine Szintillationsflüssigkeit benötigt. Eine leicht zur Fluoreszenz anregende Verbindung, der Szintillator, sowie ein organisches Lösungsmittel sind Bestandteile dieser Flüssigkeit. Durch den radioaktiven Zerfall einer zu analysierenden Substanz wird Energie auf alle Komponenten der Szintillationsflüssigkeit übertragen. Das organische Lösungsmittel emittiert bei Übergang in den Grundzustand kein Licht. Die angeregten Szintillatoren emittieren beim schnellen Übergang Licht. Dieses Licht wird durch einen Photomultiplier amplifiziert, in ein elektrisches Signal umgewandelt und detektiert. Für die durchgeführten Experimente wurde die Szintillationsflüssigkeit, Ready Flow III (Beckman, USA), sowie der Flüssigszintillationszähler, 1214 Rackbeta (LKB Wallac, Australien), verwendet.

Je Zelllysate wurde 700 µL mit 2,1 mL Szintillationsflüssigkeit im Szintillationsröhrchen zusammengeführt. Zur Bestimmung der Nullrate wurde der verwendete Puffer ohne Substrat mit der Lyselösung und 2,1 mL Szintillationsflüssigkeit gemischt und gemessen. Die Nullrate wurde von jeder Probe abgezogen. Die spezifische Aktivität der eingesetzten Substratlösung wurde als Eichpunkt gesetzt. Hierfür wurde, wie bei der Nullratebestimmung, die Substratlösung mit der Lyselösung und Szintillationsflüssigkeit gemessen. Es kann durch Triton X zur einer Quenchung der Lichtemissionen kommen. Triton-X wird in gleicher Menge in der Lyselösung eingesetzt. Im Szintillationsansatz entsteht die Quenchung durch Substanzen, welche z.B. aus aromatischen Ringsystemen bestehen. Diese Substanzen können  $\beta$ -Strahlung selbst absorbieren. Jede Probe wurde dreimal gezählt. Der Mittelwert der Zählraten wurde bei der Auswertung gebildet.

## 2.4 Liquid Chromotography-Mass Spectrometry (LC-MS)

Ein Massenspektrometer (MS) mit gekoppelter High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Anlage ermöglicht eine detaillierte und hochauflösende Trennung von Analyten bzw. Substanzen. Diese Analyten können entsprechend ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) detektiert sowie durch Fragmentierung spezifisch analysiert werden. Dies bietet die Möglichkeit Strukturen von einzelnen Substanzen, sowie die qualitative und quantitative Analyse von Substanzgemischen zu untersuchen. Die Quantifizierung nicht-radioaktiver Substanzen erfolgte mittels LC-MS/MS.

Die chemische Auftrennung von Verbindungen / Substanzen erfolgte mit einer HPLC-Anlage (SLC-20AD Prominance, Shimadzu, Duisburg, Deutschland). Ein Triplequadrupol-Tandem-Massenspektrometer (Q Trap 4000, AB Sciex, Darmstadt, Deutschland) wurde für die Detektion verwendet.

### 2.4.1 High Performance Liquid Chromatography

Die HPLC ist eine analytische und chromatographische Trennmethode bei der die mobile Phase flüssig und die stationäre Phase fest ist. Der Unterschied zur normalen Flüssigchromatographie ist die größere Trennleistung, welche durch kleinere Packungsteilchen der Säule, hohe Drücke und entsprechende Pump- und Injektionssysteme erreicht wird.

Nach Zentrifugation für 2 min bei 16000 g und Raumtemperatur von gevortexten Proben wurden 10  $\mu\text{L}$  der jeweiligen Probe analysiert. Die chromatographischen Auftrennungen der Substanzen wurden entsprechend den untenstehenden Konditionen durchgeführt (Tabelle 7-11).

Nach der Auftrennung mittels HPLC wird der Eluent (Analytenlösung) zur Elektrosprayionisation des Massenspektrometers weitergeleitet.

Tabelle 7 HPLC-Laufkonditionen für 6CF

	<b>6CF</b>
<b>Säule</b>	iHILIC
<b>Probenart</b>	Lysat, Überstand
<b>Laufmittel A</b>	H <sub>2</sub> O
<b>Laufmittel B</b>	Acetonitril
<b>Flussrate</b>	0,2 mL / min
<b>Fluss</b>	isokratisch: 50 % B
<b>Laufdauer</b>	5 min
<b>Temperatur</b>	40 °C

Tabelle 8 HPLC-Laufkonditionen für DHEAS und E3S

	<b>DHEAS / E3S</b>
<b>Säule</b>	Xbridge Shield RP18
<b>Probenart</b>	Lysat, Überstand
<b>Laufmittel A</b>	10 mM Ammoniumacetat pH 8.9 in H <sub>2</sub> O
<b>Laufmittel B</b>	Methanol
<b>Flussrate</b>	0,2 mL / min
<b>Fluss</b>	Gradient: 70 % B bei 0 min, 70 % B bei 0,5 min, 20 % B bei 3 min, 20 % B bei 4min, 70 % B bei 7 min
<b>Laufdauer</b>	7 min
<b>Temperatur</b>	40 °C

Tabelle 9 HPLC-Laufkonditionen für Harnsäure

	<b>Harnsäure</b>	
<b>Säule</b>	ZIC-pHILIC	
<b>Probenart</b>	Lysat	Überstand
<b>Laufmittel A</b>	10 mM Ammoniumacetat pH 8.9 in H <sub>2</sub> O	5 mM Ammoniumacetat + 0,1 % Ameisensäure in H <sub>2</sub> O
<b>Laufmittel B</b>	Methanol	
<b>Flussrate</b>	0,2 mL / min	
<b>Fluss</b>	Gradient: 80 % B bei 0 min, 80 % B bei 0,25 min, 20 % B bei 4 min, 20 % B bei 5 min, 80 % B bei 10 min	Gradient: 30 % B bei 0 min, 20 % B bei 2 min, 90 % B bei 3min, 90 % B bei 7 min, 75 % B bei 7,5 min, 75 % B bei 15 min, 30 % B bei 16 min, 30 % B bei 20min
<b>Laufdauer</b>	10 min	20 min
<b>Temperatur</b>	40 °C	40 °C

Tabelle 10 HPLC-Laufkonditionen für Glutamat und Aspartat

	<b>Glutamat / Aspartat</b>
<b>Säule</b>	ZIC-HILIC
<b>Probenart</b>	Lysat (Verdünnt 1:50), Überstand (Verdünnt 1:2)
<b>Laufmittel A</b>	0,1 % Ameisensäure in H <sub>2</sub> O
<b>Laufmittel B</b>	0,1 % Ameisenäure in Acetonitril
<b>Flussrate</b>	0,2 mL / min
<b>Fluss</b>	isokratisch: 40 % B
<b>Laufdauer</b>	5 min
<b>Temperatur</b>	35 °C

Tabelle 11 HPLC-Laufkonditionen für Guanidiniumsuccinat (GSA)

	<b>GSA</b>
<b>Säule</b>	HILIC
<b>Probenart</b>	Lysat, Überstand
<b>Laufmittel A</b>	0,1 % Ameisensäure in H <sub>2</sub> O
<b>Laufmittel B</b>	0,1 % Ameisensäure in Methanol
<b>Flussrate</b>	0,4 mL / min
<b>Fluss</b>	Gradient: 80 % B bei 0 min, 80 % B bei 0,25 min, 20 % B bei 3 min, 20 % B bei 4 min, 80 % B bei 6 min
<b>Laufdauer</b>	7 min
<b>Temperatur</b>	40 °C

## 2.4.2 Elektrosprayionisation

Bei der Elektrosprayionisation (ESI) erfolgt die Überführung der Eluenten zu Ionen aus der flüssigen Phase in die Gasphase unter elektrischer Spannung (Abb. 15)[98-101].

Unter Atmosphärendruck wird eine Analytenlösung aus einer LC-Kapillare in ein starkes elektrisches Feld gesprüht. Die an der Kapillarspitze und Gegenelektrode angelegte Hochspannung (4,5 kV) verursacht eine feine Zerstäubung der Analytenlösung. Ein um die Kapillare konzentrisch angeordneter Inertgasstrom (N<sub>2</sub>) wird zur Unterstützung der Vernebelung eingesetzt. Es entstehen kleine positiv oder negativ geladene Tropfen. Diese Tropfen verlieren u.a. durch Verdampfung des Lösemittels an Größe (Mikrotropfen), wodurch die Ladungsdichte an der Tropfenoberfläche zunimmt. Durch eine Coulomb-Explosion zerplatzen die Tropfen. Nach der Evaporation liegen die Analytmoleküle gasförmig in der Ionenquelle vor. Durch die Interfaceplatte erfolgt der Übergang der Analytmoleküle in das Massenspektrometer.

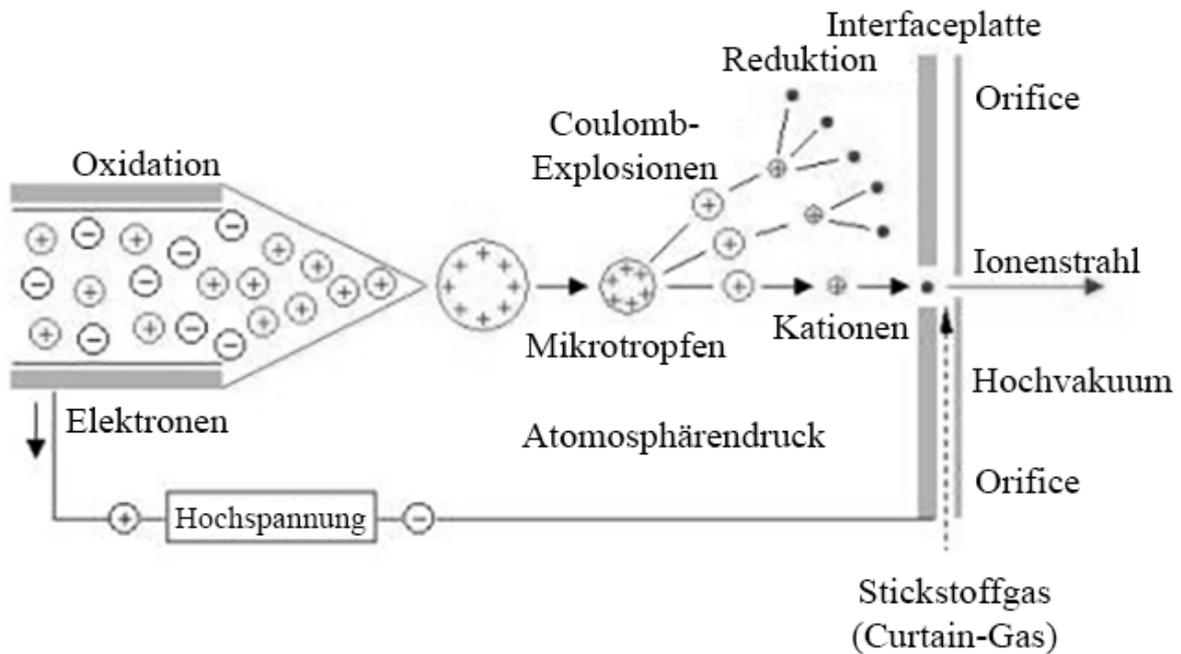


Abb. 15 Elektrosprayionisation

Die Überführung der Eluenten zu Ionen aus einer Flüssigphase in die Gasphase (Elektrosprayionisation, ESI). Durch eine elektrische Hochspannung wird eine Analytenlösung aus einer Kapillare zerstäubt. Mikrotropfen werden aufgrund der Lösemittelverdunstung gebildet. Durch die Zunahme der Ladungsdichte kommt es zur Coulomb-Explosion und somit zum Zerplatzen der Mikrotropfen. Die gasförmigen Analytmoleküle durchqueren zum Massenspektrometer die Interfaceplatte. Modifiziert [102].

### 2.4.3 Massenspektrometer

Das verwendete Massenspektrometer (Q Trap 4000, AB Sciex, Darmstadt, Deutschland) besteht aus Quadrupolen.

Nach der Elektrosprayionisation (2.4.2, Seite 62) gelangen geladene Moleküle in ein Quadrupol. Das Quadrupol besteht aus vier Stäben, auf denen eine wellenlängige entgegengesetzte Spannung anliegt (Abb. 16, y-Achse positiv, x-Achse negativ). Die Ionen werden entlang des elektrischen Potentials im Vakuum beschleunigt. Die Flugbahn der Ionen ist sinusförmig. Je nach eingestellter Spannung und Frequenz passieren nur Moleküle mit passendem Masse-zu-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) den Quadrupol. Andere Moleküle weichen von der Flugbahn ab, kollidieren mit den Stäben und werden entladen.

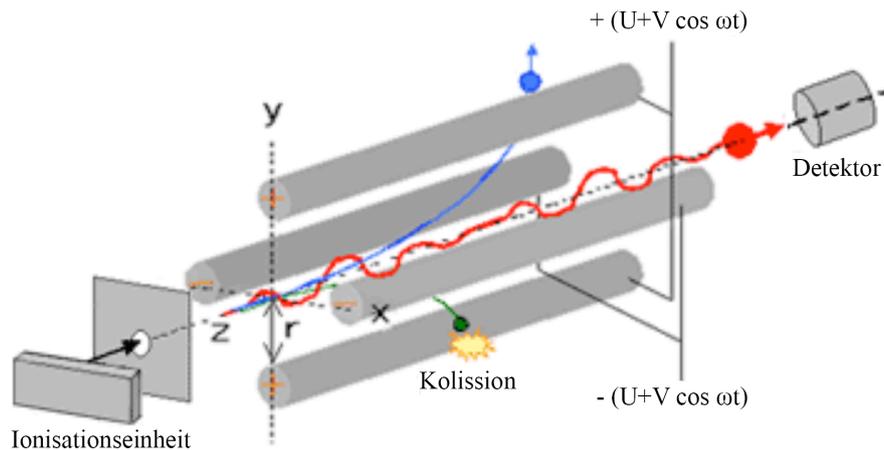


Abb. 16 Flugbahn eines Moleküls durch ein Quadrupol

Nach Ionisation gelangt das geladene Molekül in den Quadrupol. Ein Quadrupol besteht aus vier Stäben mit entgegengesetzter wellenlängiger Spannung. Entsprechend der Einstellungen (Spannung und Frequenz) passieren nur Moleküle mit passenden  $m/z$ -Verhältnis den Quadrupol. Andere Moleküle weichen von der sinusförmigen Flugbahn ab und werden bei Kollision mit den Stäben entladen. Modifiziert [103].

Das Q Trap 4000 Massenspektrometer besteht aus vier Quadrupolen (Q0-Q3) (Abb. 17). Gasförmige Ionen passieren nach der Ionisation Q0, wo sie durch das elektrische Potential beschleunigt werden. Q1 und Q3 fungieren als Massenfilter nach dem  $m/z$ -Verhältnis. In Q2 können die Moleküle durch kinetische Energie sowie Kollision mit Stickstoffatomen fragmentiert werden. Nach Filterung in Q3 werden die Moleküle / Fragmente im Detektor detektiert. Das jeweilige entstandene Fragmentmuster ist spezifisch für das Molekül.

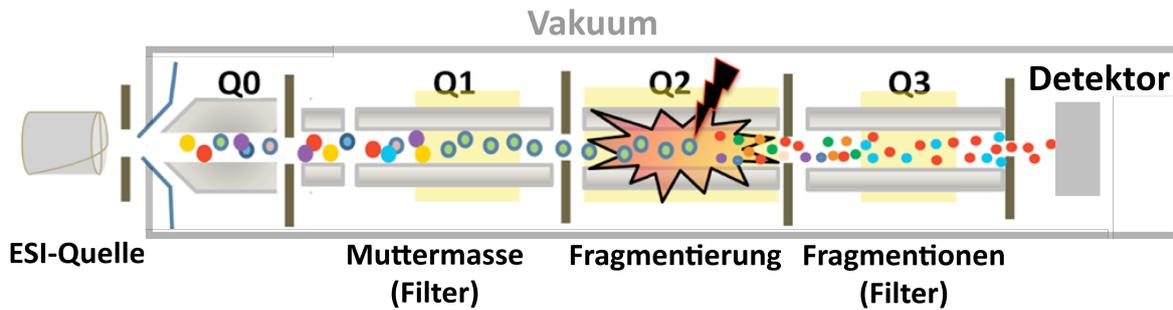


Abb. 17 Detektion eines spezifischen Moleküls in einem Quadrupol-Massenspektrometer  
 Nach Ionisation werden die geladenen Moleküle in Q0 beschleunigt. Q1 passieren nur Moleküle mit entsprechenden  $m/z$ -Verhältnis (Filter). Durch kinetische Energie und Kollision mit Stickstoffatomen wird das Molekül in Q2 fragmentiert. Q3 passiert nur Moleküle / Fragmente, welche entsprechend dem spezifischen  $m/z$ -Verhältnis gefiltert wurden. Am Detektor werden ankommende Moleküle / Fragmente detektiert. Modifiziert [104].

#### 2.4.4 Fullscan Experimente (Q1-Scan)

Zwecks Screening nach potentiellen Substanzen wurden Massenspektren eines definierten Bereichs ( $m/z$ ) mittels Fullscan Experimenten generiert. Für die Erzeugung dieser Massenspektren wurde Q1 des Massenspektrometers benötigt. Q2 und Q3 leiten die Ionen ausschließlich weiter. Massenspektren im Bereich von  $m/z$  70-400 wurden im positiv- und negativ-Modus bei einer Scanzeit von zwei Sekunden generiert. Des Weiteren wurden diverse chromatographische Laufkonditionen verwendet, um ein möglichst großes Substratspektrum zu identifizieren (Tabelle 12-13).

Für Fullscan Analysen wurden SLC22A11 stabil-transfizierte 293-Zellen in mehreren Schälchen ausgesät (2.2.3.3, Seite 48). Die Expression wurde bei 50 % der Schälchen induziert. Mindestens 20 h nach Induktion wurden alle Zellen lysiert (2.2.3.4, Seite 49). Die Zelllysate wurden bei Raumtemperatur und 16000 g für 2 min zentrifugiert. Je Methode wurden 10 bzw. 20  $\mu\text{L}$  (Injektionsvolumen) analysiert.

Die Auswertung der Massenspektren erfolgte mittels LC-MS-Differenz-Abtönung (2.4.4.1, Seite 67).

Tabelle 12 HPLC-Konditionen bei Fullscan-Analysen im positiv Modus

<b>Scan-Modus</b>	<b>positiv</b>		
<b>Säule</b>	<b>DC18</b>	<b>HILIC</b>	<b>ZIC-HILIC</b>
<b>Laufmittel A</b>	0,1 % Ameisensäure in H <sub>2</sub> O	0,1 % Ameisensäure in H <sub>2</sub> O	10 mM Ammoniumformiat pH 3,75
<b>Laufmittel B</b>	0,1 % Ameisenäure in Acetonitril	0,1 % Ameisenäure in Acetonitril	Methanol
<b>Flussrate</b>	0,3 mL/min	0,3 mL/min	0,2 mL/min
<b>Fluss</b>	Gradient: 10 % B bei 0 min; 10 % B bei 0,25 min, 80 % B bei 6 min, 10 % B bei 9 min	Gradient: 90 % B bei 0 min, 90 % B bei 0,5 min, 10 % B bei 9 min, 10 % B bei 10 min, 90 % B bei 14 min	Gradient: 70 % B bei 0 min, 70 % B bei 0,5 min, 30 % B bei 9 min, 30 % B bei 10 min, 70 % B bei 14 min
<b>Laufdauer</b>	11 min	15 min	15 min
<b>Injektionsvolumen</b>	20 µL	10 µL	20 µL
<b>Temperatur</b>	35 °C	40 °C	40 °C

Tabelle 13 HPLC-Konditionen bei Fullscan-Analysen im negativ Modus

Scan-Modus	negativ	
Säule	xBridge Shield RP18	ZIC-pHILIC
Laufmittel A	10 mM Ammoniumacetat pH 8.9	10 mM Ammoniumacetat pH 8.9
Laufmittel B	Methanol	Acetonitril
Flussrate	0,2 mL/min	0,2 mL/min
Fluss	Gradient: 30 % B bei 0 min, 30 % B bei 0,5 min; 70 % B bei 9 min, 70 % B bei 10 min, 30 % B bei 14 min	Gradient: 70 % B bei 0 min, 70 % B bei 0,5 min, 30 % B bei 9 min, 30 % B bei 10 min, 70 % B bei 14 min
Laufdauer	15 min	15 min
Injektionsvolumen	10 µL	10 µL
Temperatur	40 °C	40 °C

#### 2.4.4.1 Differenzabtönung

Die Massenspektren bestehen bei einer Laufzeit von 11 bzw. 15 min und einer Scanzeit von 2 sec. aus 330 bzw. 450 Massenspuren pro LC-MS-Lauf. Des Weiteren wurden Massenspektren für Transporter-exprimierenden Zellen sowie Kontrollzellen bei  $n = 4$  erstellt. Zwecks Auswertung dieser enormen Datenmenge wurden die Programme „DS-Full-View“ und „DS Data Convert“ von Prof. Dr. Gründemann (Zentrum für Pharmakologie, Universität zu Köln) geschrieben [105]. Ein Massenspektrum besteht aus drei Parametern: Retentionszeit, Masse-zu-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) und Intensität (Abb. 18).

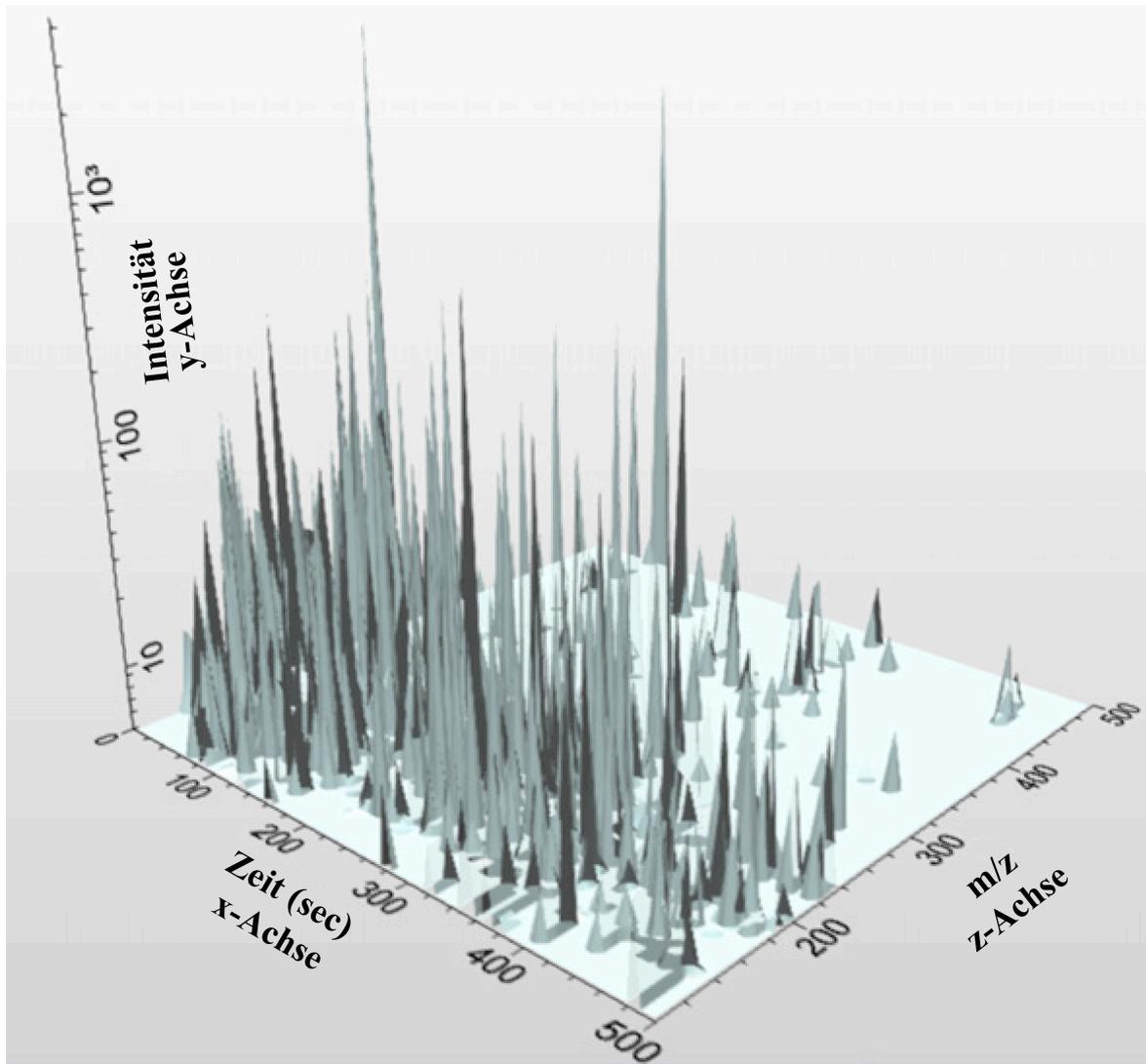


Abb. 18 Massenspektrum eines Fullscan-Experiments

Schematisches Massenspektrum eines Fullscan-Experimentes. Die Retentionszeit ist auf der x-Achse, Intensität auf der y-Achse und Masse-zu-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) auf der z-Achse dargestellt. Modifiziert [106].

Das Massenspektrum wird durch die Software „DS Data Convert“ konvertiert und mittels „DS-Full-View“ visuell dargestellt. Zur besseren visuellen Darstellung erfolgt eine Reduktion der dreidimensionalen Darstellung in eine zweidimensionale im sRGB-Farbraum (Standard Rot Grün Blau-Farbraum). Dabei wird auf der x-Achse  $m/z$  und auf der y-Achse die Retentionszeit dargestellt. Der Intensitätsbereich wird in einem Auswahlfenster abgebildet. Nach Auswahl eines Bereiches wird die Intensität in 256 Graustufen (8bit) abgebildet. Der sRGB-Farbraum besteht auf drei Farbparametern: rot, grün und blau. Daraus resultieren entsprechende Komplementärfarben: Cyan, Magenta und Gelb. Hohe Intensitäten werden hell dargestellt

(weiß sRGB: 255,255,255), entsprechend werden niedrige Intensitäten dunkel dargestellt (schwarz sRGB: 0,0,0, Abb. 19 A). Es wurde das Massenspektrum der Transporter exprimierenden Zellen mit Kontrollzellen verglichen. Zwecks visueller Darstellung wurde die Intensität des Transporterzellen mit den Kontrollzellen verrechnet. Dabei wurde Rotwert aus dem sRGB-Farbraum der Transporterzellen mit den Grün- und Blauwerten der Kontrollzellen zusammengeführt (Abb. 19 b). Wenn die Transporterzellen eine höhere Intensität verschiedener Moleküle als die Kontrollzellen hatten, erschien die Darstellung rot, umgekehrt cyan (Abb. 19 B, C). Gab es keinen Unterschied, erfolgte die Darstellung in 8bit-Graustufen entsprechend der Intensität (Abb. 20).

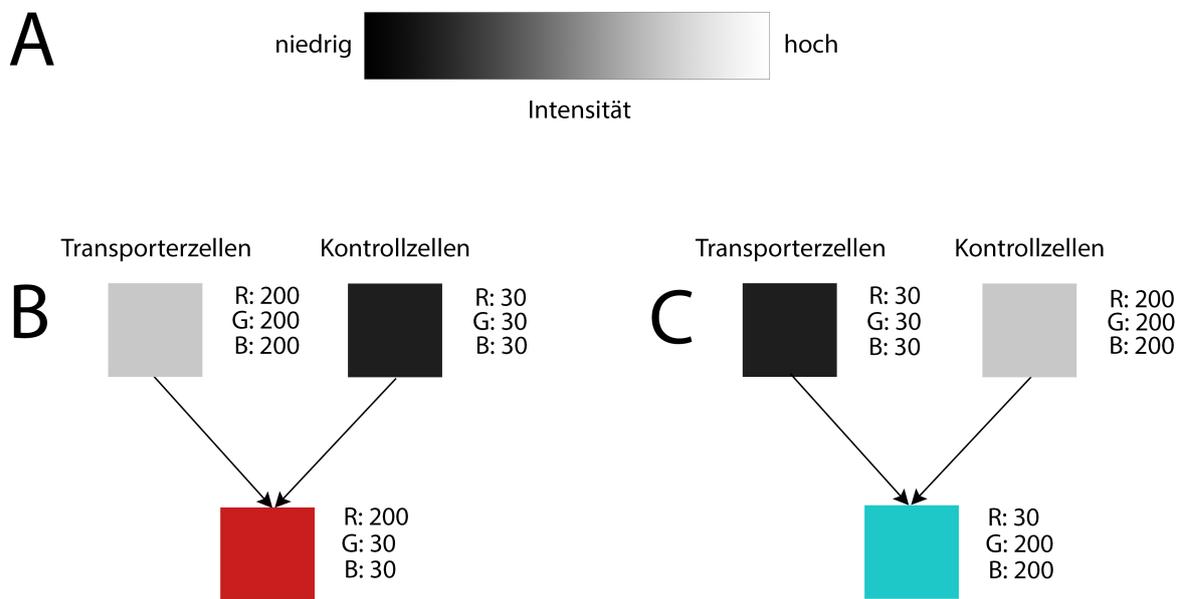


Abb. 19 Berechnung der Intensitäten in der Differenzabtönung

(A) Je Massenspektrum werden die Intensitäten in 8bit Graustufen im sRGB-Farbraum dargestellt. Niedrige Intensitäten dunkel, hohe hell. Es wird der Rotwert der Transporterzellen mit dem Grün- und Blauwert der Kontrollzellen kombiniert (B & C). Bei höherer Intensität von verschiedenen Molekülen der Transporterzellen gegenüber den Kontrollzellen, wird die Intensität rot dargestellt (B), umgekehrt cyan (C).

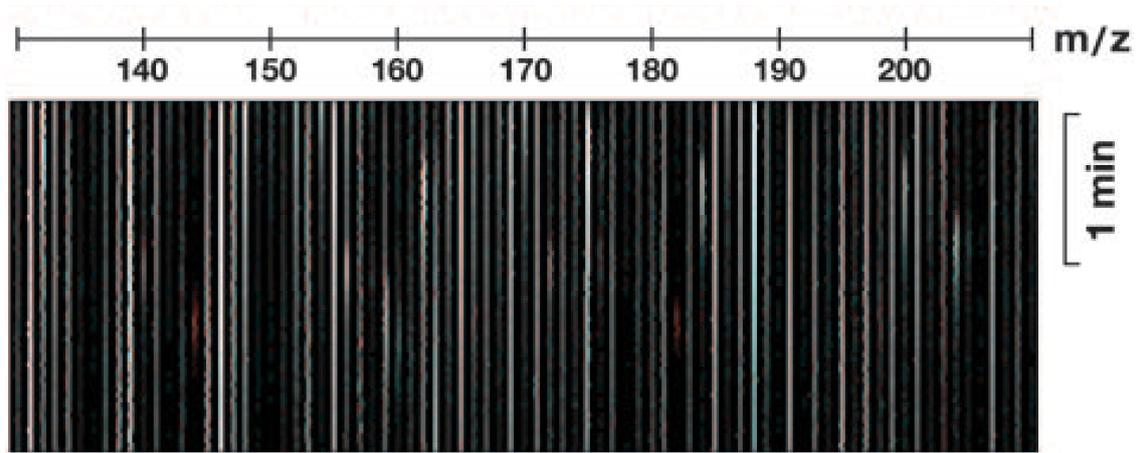


Abb. 20 Darstellung einer LC-MS Differenzabtönung

Dargestellt ist ein Differenzabtönungsbild bei der Untersuchung des Ergothioneintransporters (ETT).  
x-Achse: Masse-zu-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ), y-Achse: Retentionszeit. Modifiziert [105]

#### 2.4.4.2 Produktionenscan

Die in der Differenzabtönung aufgespürten Masse-zu-Ladungsverhältnisse ( $m/z$ ) bzw. Signale müssen fragmentiert werden, damit sie einer Substanz eindeutig zugeordnet werden können. Hierfür wurde die Muttermasse  $[M-H^+]$  bzw.  $[M+H^+]$  isoliert und fragmentiert. Das entstandene Fragmentmuster wurde mit bekannten Fragmentmustern aus Datenbanken und Literatur abgeglichen, um Rückschlüsse auf mögliche Substanzen zu treffen [107, 108].

Die HPLC-Bedingungen entsprechen denen der Fullscan-Methode, in welcher das Signal gefunden wurde. Zwecks Fragmentierung wird eine Kollisionsenergie (CE, collision energy) benötigt. Die CE wurde auf 5, 15 und 25 V eingestellt.

#### 2.4.4.3 Tunen von Referenzsubstanzen

Referenzsubstanzen wurden wie Moleküle aus Fullscan fragmentiert (2.4.4.2). Hierbei wurde Substanz in reinem Methanol gelöst (100-1000 ng/mL) und direkt in das Massenspektrometer mit 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  Flussrate injiziert. Anschließend wurde eine HPLC-Methode entwickelt und validiert. Es wurde u.a. eine Konzentrationsreihe (0 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mL, 400 ng/mL, 800 ng/mL) gemessen und auf Linearität geprüft. Um

Ionisierungsunterschiede zu minimieren, wurden diese Messungen in der Zielmatrix (KRH-Puffer bzw. Zelllysate) durchgeführt.

#### 2.4.4.4 Multiple Reaction Monitoring (MRM)

Zwecks Quantifizierung von Analyten wird der MRM-Modus verwendet. In diesem Modus werden Substanzen mit den spezifischen Fragmentmustern quantifiziert [109, 110](Tabelle 14).

Tabelle 14 Analyse der jeweiligen Substanz im Massenspektrometer mittels MRM

Aufgeführt ist die jeweilige Substanz mit der Muttermasse (m/z), dem Fragment (m/z), der Kollisionsenergie und Polarität.

Substanz	m/z Muttermasse (Q1)	m/z Fragment (Q3)	Kollisionsenergie (V)	Polarität
6CF	375	287	-20	negativ
Aspartat	134	74	21	positiv
DHEAS	367	97	-52	negativ
E3S	349	269	-42	negativ
Glutamat	148	84	25	positiv
GSA	176	88	23	positiv
Harnsäure	167	124	-22	negativ
Prolin	116	70	23	positiv

Hierfür wurde gemäß 2.4.4.3 (Seite 70) eine Konzentrationsreihe in der Zielmatrix erstellt und eine lineare Regression (Konzentration [ng/mL] ~ Peakfläche [counts]) durchgeführt. Anschließend wurde die Peakfläche der Analytenprobe durch die Steigung der Regressionsgerade dividiert, um die Analytenkonzentration (ng/mL) in der Probe zu berechnen (Gleichung 7). Die Stoffmenge wurde durch Division der Analytenkonzentration (ng/mL) durch die molare Masse des Analyten bestimmt (Gleichung 8). Die Zellzahl pro Schälchen

wurde entsprechend der Proteinkonzentration (2.2.3.5, Seite 49) oder Prolinkonzentration normiert (Gleichung 9). Die intrazelluläre Prolinkonzentration wird massenspektrometrisch analysiert und korreliert mit der Proteinkonzentration [111].

Gleichung 7 Berechnung der Analytkonzentration [ng/mL]

$$\text{Analytkonzentration} \left[ \frac{\text{ng}}{\text{mL}} \right] = \frac{\text{Analyt Peakfläche [counts]}}{m \left[ \frac{\text{Peakfläche [counts]}}{\frac{\text{ng}}{\text{mL}}} \right]}$$

Gleichung 8 Berechnung der Analytkonzentration [pmol/mL]

$$\text{Analytkonzentration} \left[ \frac{\text{pmol}}{\text{mL}} \right] = \frac{\text{Analytkonzentration} \left[ \frac{\text{ng}}{\text{mL}} \right]}{\text{Analyt molare Masse} \left[ \frac{\text{g}}{\text{mol}} \right] * 1000}$$

Gleichung 9 Berechnung der Analytkonzentration [pmol/mg Protein]

$$\text{Analytkonzentration} \left[ \frac{\text{pmol}}{\text{mg Protein}} \right] = \frac{\text{Analytkonzentration} \left[ \frac{\text{pmol}}{\text{mL}} \right]}{\text{Proteinkonzentration} \left[ \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right]}$$

## 3 Ergebnisse

Aufgrund der hohen Transporteranzahl, welche E3S transportieren, und der atypischen Substratstruktur im Vergleich zu anderen Substraten der SLC22-Familie war es das Ziel der Arbeit, den E3S-Transportmechanismus des SLC22A11 zu analysieren. Dies sollte im direkten Vergleich zum Transportmechanismus für Harnsäure durchgeführt werden.

Die Lokalisation von SLC22A11 wurde bereits in vorherigen Arbeiten definiert (1.3, Seite 24) [20, 49, 50]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass SLC22A11 nicht nativ in 293-Zellen exprimiert ist [112]. Jedoch ist eine funktionelle Charakterisierung mittels Expressionsvektor in 293-Zellen möglich [53, 112-114].

### 3.1 Substratsuche mittels Fullscan und LC-MS-Differenzabtönung

Im Zuge dieser Arbeit wurde nach weiteren Substraten des SLC22A11 gesucht, um mögliche Auswirkungen von E3S und Harnsäure auf andere Substrate zu vergleichen.

Die Substratsuche erfolgte mittels Fullscan-Experimenten (2.4.4, Seite 65) und LC-MS-Differenzabtönung (2.4.4.1, Seite 67). Hierbei wurden Massenspektren mit pEBTetLNC-SLC22A11 stabil transfizierten 293-Zellen bei induzierter und nicht-induzierter Expression verglichen.

Transfizierte 293-Zellen wurden ausgesät und die SLC22A11-Expression wurde durch Inkubation mit Doxycyclin induziert. Nach 20 h wurden die Zellen im KRH-Puffer gewaschen, mit Methanol lysiert und mittels LC-MS analysiert.

Die Erstellung der Fullscans erfolgte unter verschiedenen chromatographischen Bedingungen, um möglichst viele potenzielle Substrate zu analysieren (2.4.4, Seite 65). Die Proben wurden positiv ( $M+H^+$ ) oder negativ ( $M-H^+$ ) ionisiert. Die Auswertung erfolgt mit der von Prof. Dr. Dirk Gründemann entwickelten Software DS Fullview (2.4.4.1, Seite 67).

Signale, welche stärker in Kontrollzellen sind, werden im Differenzabtönungsbild (Abb. 21) cyan dargestellt, umgekehrt rot. Die Massen-zu-Ladungsverhältnisse ( $m/z$ ) 132, 146 und 174  $m/z$  wurden mit einer größeren Signalstärke in den Kontrollzellen und 166  $m/z$  mit einer

## Ergebnisse

besseren Signalstärke in SLC22A11 exprimierenden Zellen (Fullscanbild nicht gezeigt) identifiziert.

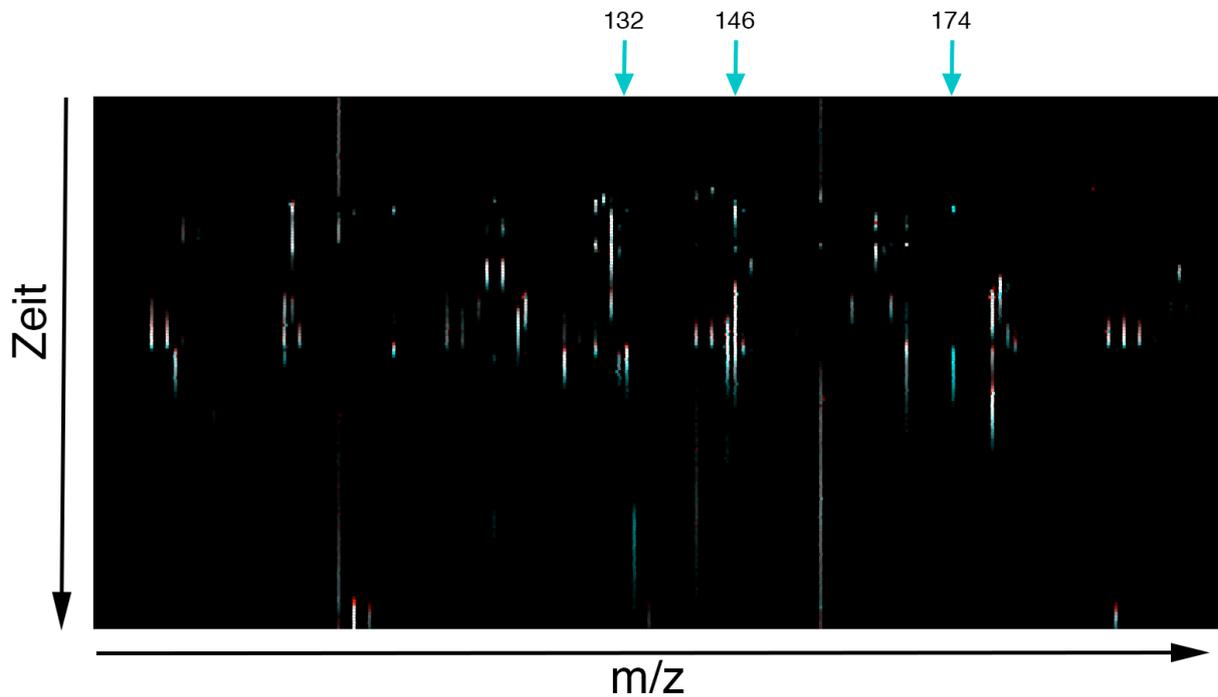


Abb. 21 Differenzabtönungsbild im Intensitätsbereich  $10^6$ - $10^7$  (cps)

Dargestellt ist die jeweilige Retentionszeit gegenüber dem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) mit der spezifischen farbigen Signalstärke. Cyanfarbige Signale haben eine höhere Signalstärke in Kontrollzellen, rotfarbige in Transporterzellen. m/z 132, 146 und 174 haben entsprechend ein höhere Signalstärke in Kontrollzellen. Ionisierung: negativ ( $M-H^+$ ). Counts per Second (cps). Säule: ZIC-pHILIC, durchgeführt von Samira Boussettaoui.

Anschließend wurden die jeweiligen Massenspuren im Detail hinsichtlich der Intensitätsunterschiede bei induzierter und nicht-induzierter SLC22A11-Expression untersucht sowie die Signale fragmentiert.

## Ergebnisse

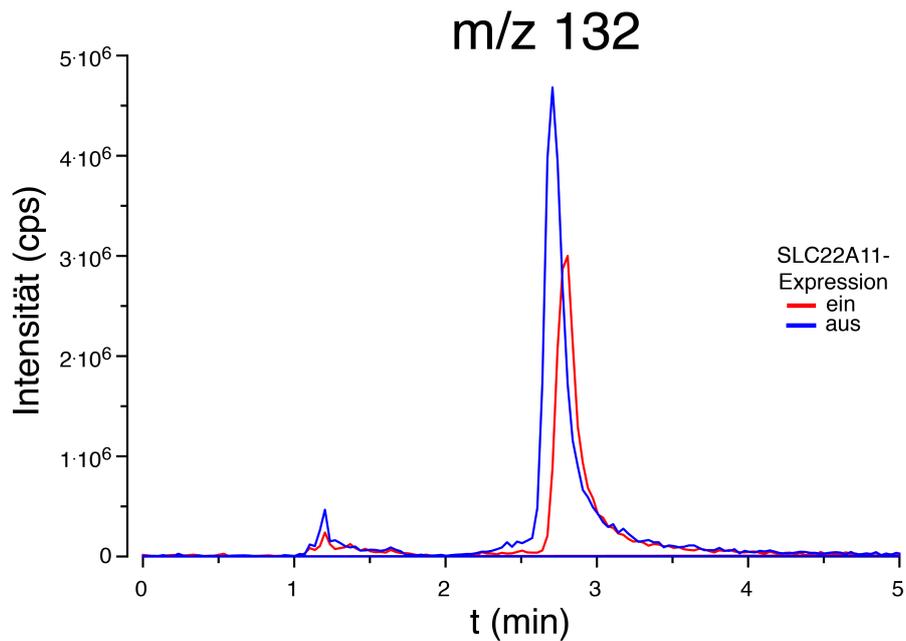


Abb. 22 Intensität der Massenspur m/z 132 aus Fullscanmessung

Dargestellt ist die Intensität der Massenspur m/z 132 gegenüber der Retentionszeit bei ein- (rot) und ausgeschalteter (blau) SLC22A11-Expression in 293-Zellen. Counts per Second (cps). Ionisierung: negativ ( $M-H^+$ ). Gesamtlaufzeit des Fullscans: 15 min.

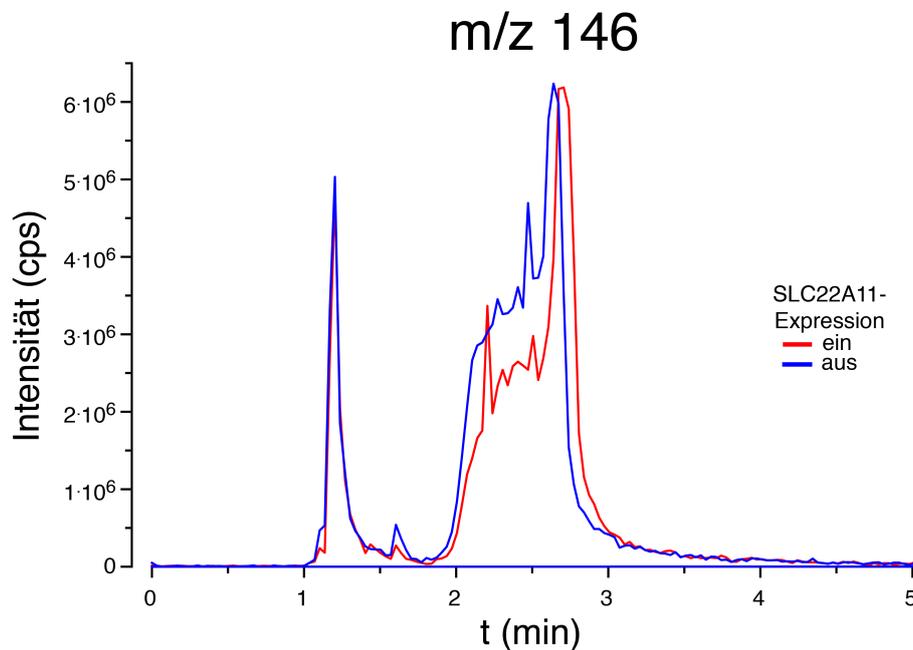


Abb. 23 Intensität der Massenspur m/z 146 aus Fullscanmessung

Dargestellt ist die Intensität der Massenspur m/z 146 m/z gegenüber der Retentionszeit bei ein- (rot) und ausgeschalteter (blau) SLC22A11-Expression in 293-Zellen. Ionisierung: negativ ( $M-H^+$ ). Gesamtlaufzeit des Fullscans: 15 min.

## Ergebnisse

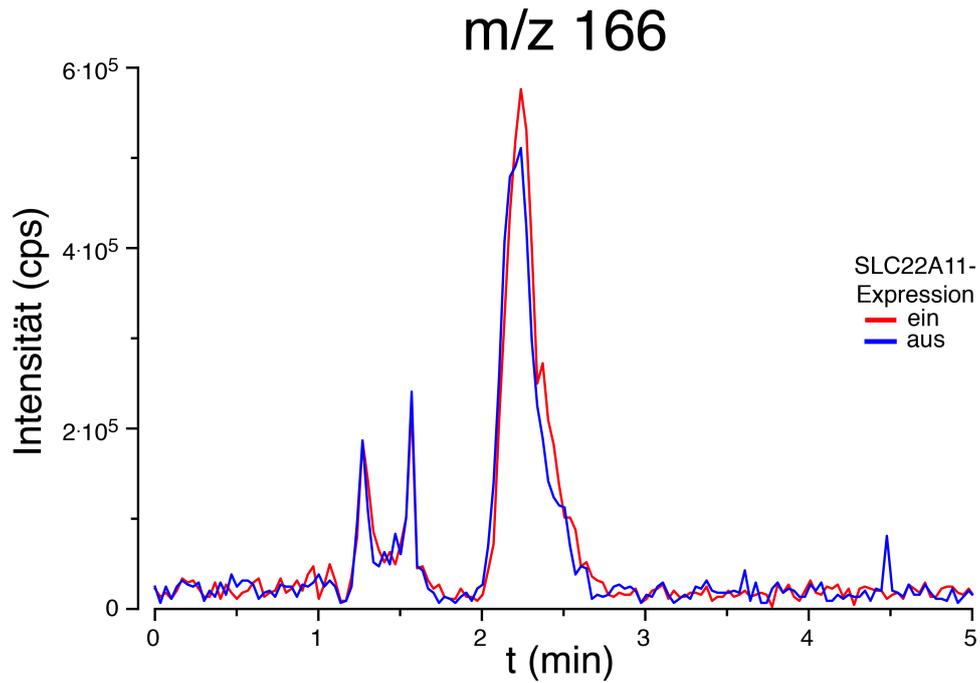


Abb. 24 Intensität der Massenspur m/z 166 aus Fullscanmessung

Dargestellt ist die Intensität der Massenspur m/z 166 gegenüber der Retentionszeit bei ein- (rot) und ausgeschalteter (blau) SLC22A11-Expression in 293-Zellen. Ionisierung: negativ ( $M-H^+$ ). Gesamtlaufzeit des Fullscans: 15 min.

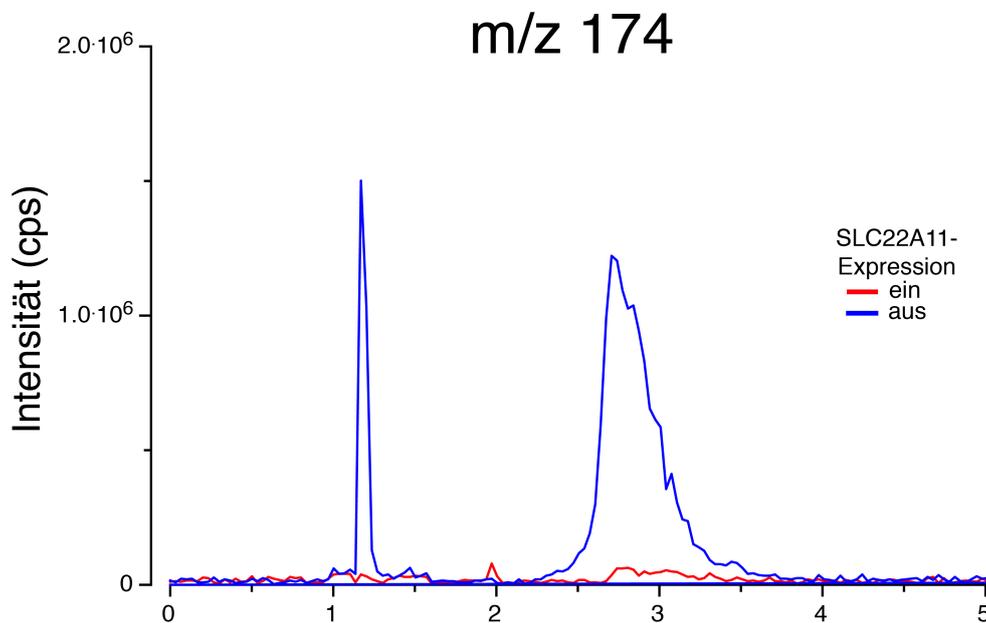


Abb. 25 Intensität der Massenspur m/z 174 aus Fullscanmessung

Dargestellt ist die Intensität der Massenspur m/z 174 gegenüber der Retentionszeit bei ein- (rot) und ausgeschalteter (blau) SLC22A11-Expression in 293-Zellen. Ionisierung: negativ ( $M-H^+$ ). Gesamtlaufzeit des Fullscans: 15 min.

### 3.1.1 Fragmentierung

Die Moleküle aus den Fullscans wurden fragmentiert, um diese eindeutig zuordnen zu können und Rückschlüsse auf eine spezifische Substanz zu ziehen.

Hierbei wurden die Signale aus dem Fullscan sowie bekannte Substanzen (6CF, DHEAS, E3S), welche durch SLC22A11 transportiert werden sollen, fragmentiert. Die Fragmentmuster wurden u.a. mit Datenbanken abgeglichen [107, 108]. Aufgrund der Fragmentierungen wurden die Moleküle aus den Fullscans, wie folgt, zugeordnet: m/z 132 Aspartat, m/z 146 Glutamat, m/z 166 Guanidiniumsuccinat (GSA), m/z 174 Harnsäure.

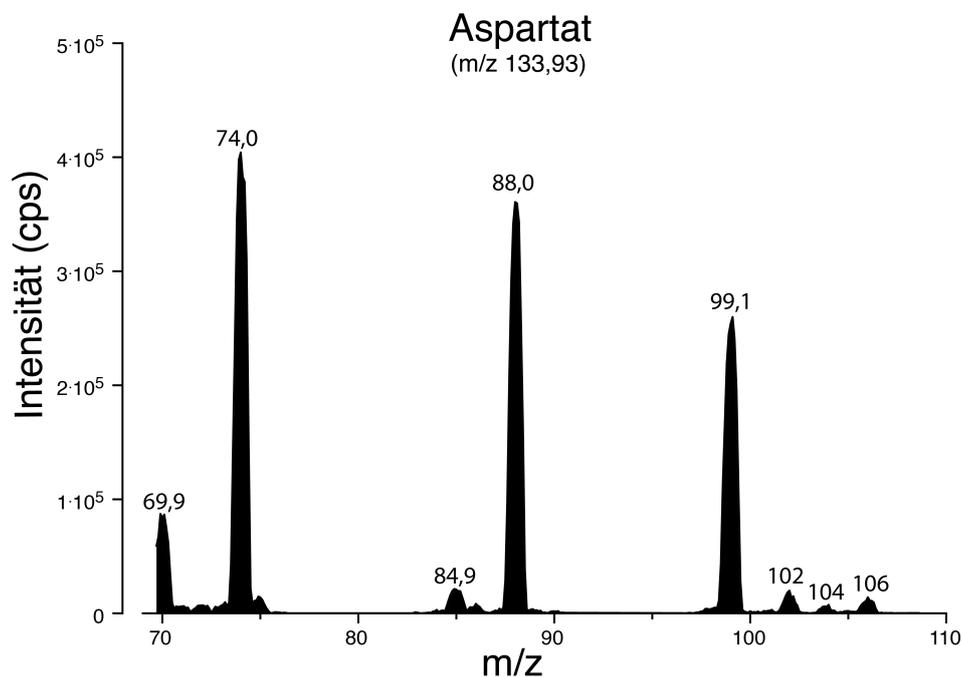


Abb. 26 Fragmentierung von Aspartat

Dargestellt ist das Fragmentmuster von Aspartat. Kollisionsenergie: 25 V, Ionisierung: positiv ( $M+H^+$ ).

## Ergebnisse

### 6 Carboxyfluorescein

(m/z 374,87)

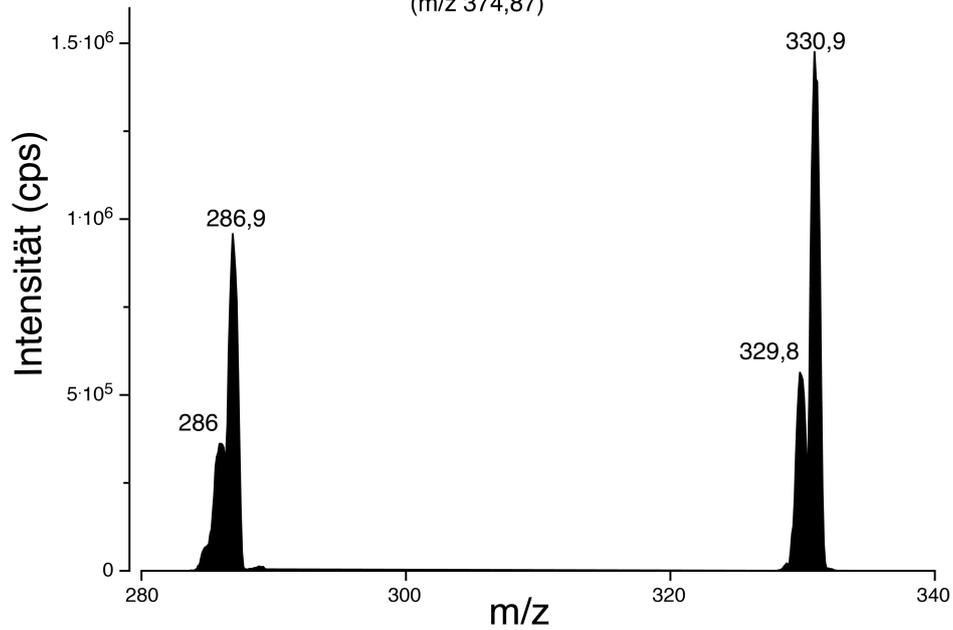


Abb. 27 Fragmentierung von 6 Carboxyfluorescein (6CF)

Dargestellt ist das Fragmentmuster von 6 Carboxyfluorescein. Kollisionsenergie: -36 V, Ionisierung: negativ ( $M-H^+$ ).

### DHEAS

(m/z 366,88)

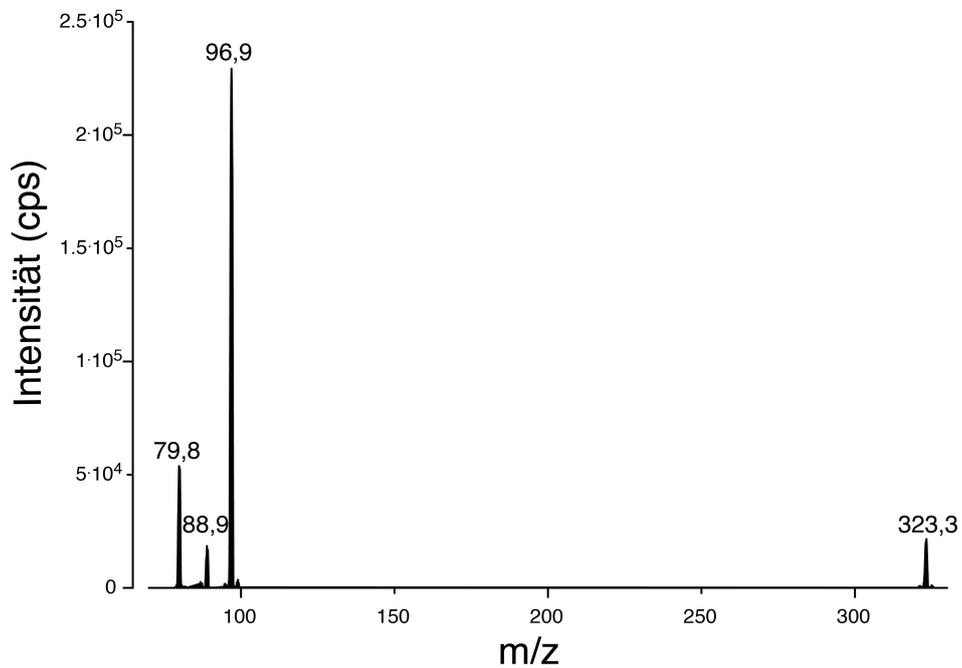


Abb. 28 Fragmentierung von DHEAS

Dargestellt ist das Fragmentmuster von DHEAS. Kollisionsenergie: -120 V, Ionisierung: negativ ( $M-H^+$ ).

## Ergebnisse

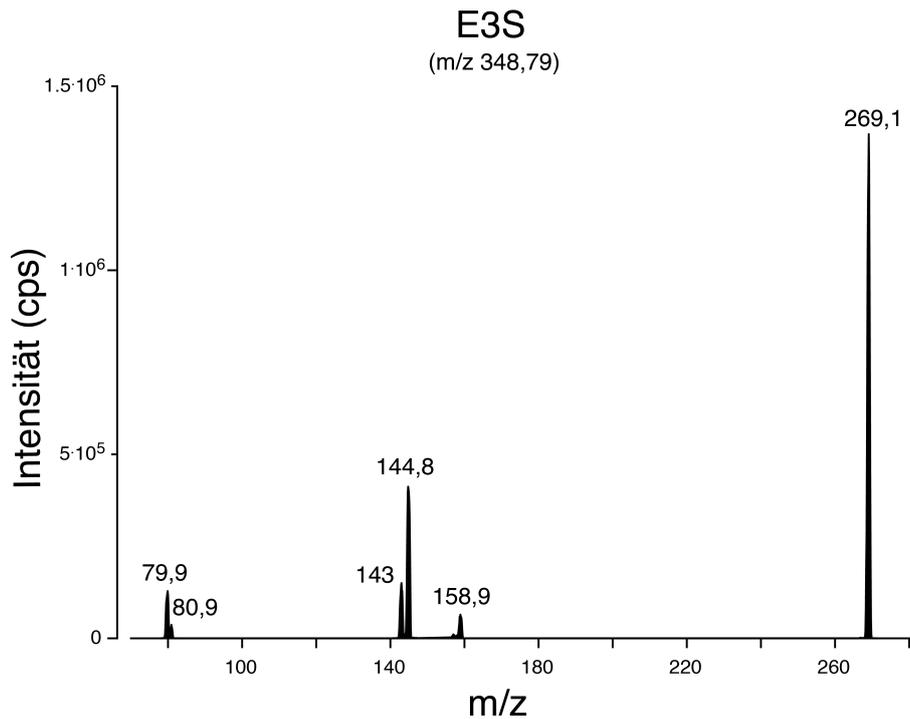


Abb. 29 Fragmentierung von E3S

Dargestellt ist das Fragmentmuster von E3S. Kollisionsenergie: -70 V, Ionisierung: negativ ( $M-H^+$ ).

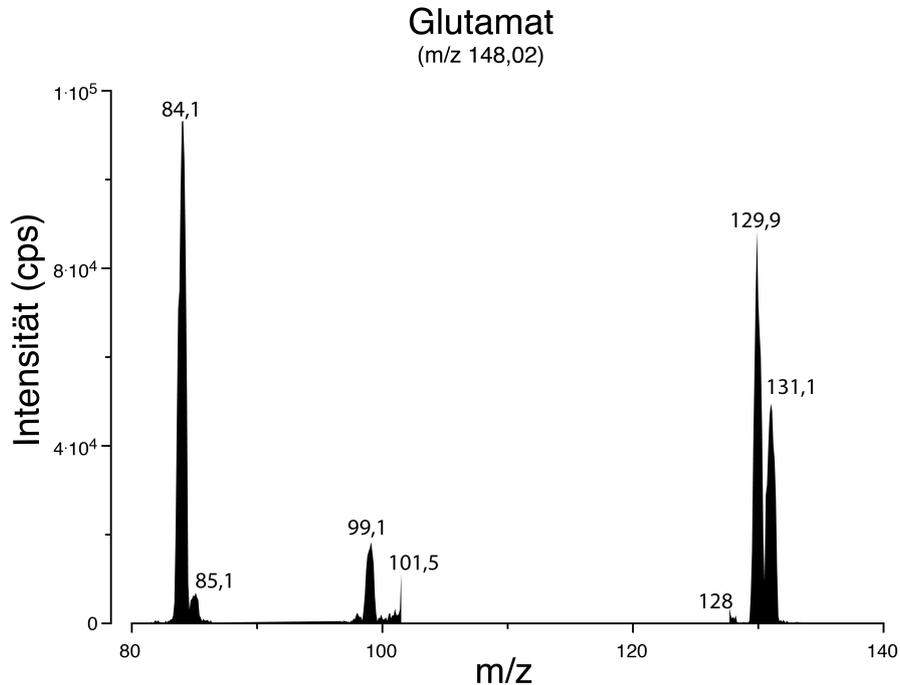


Abb. 30 Fragmentierung von Glutamat

Dargestellt ist das Fragmentmuster von Glutamat. Kollisionsenergie: 25 V, Ionisierung: positiv ( $M+H^+$ ).

## Ergebnisse

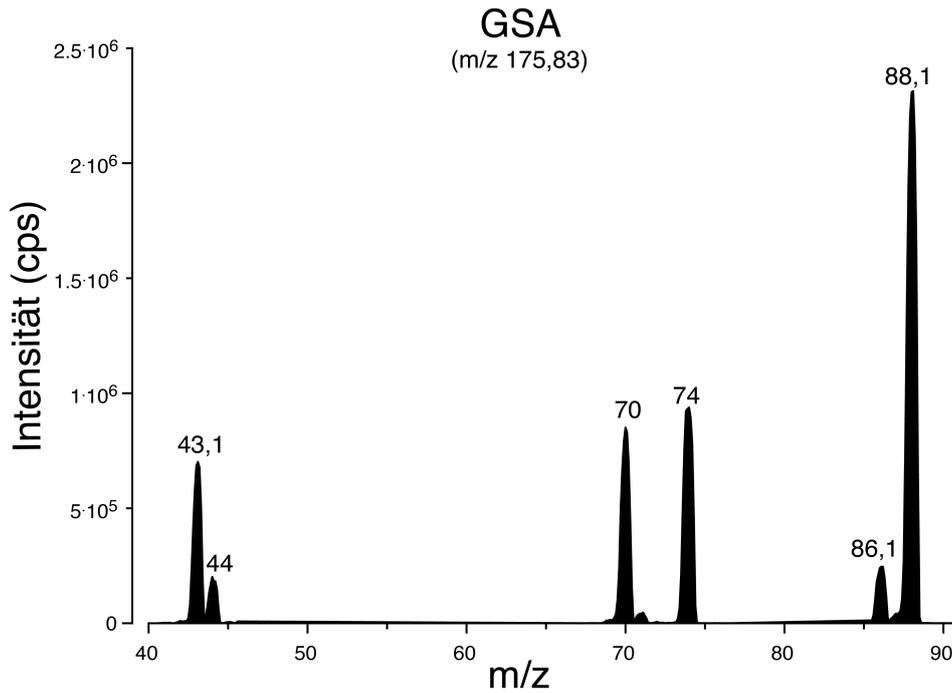


Abb. 31 Fragmentierung von GSA

Dargestellt ist das Fragmentmuster von GSA. Kollisionsenergie: 53 V, Ionisierung: positiv ( $M+H^+$ ).

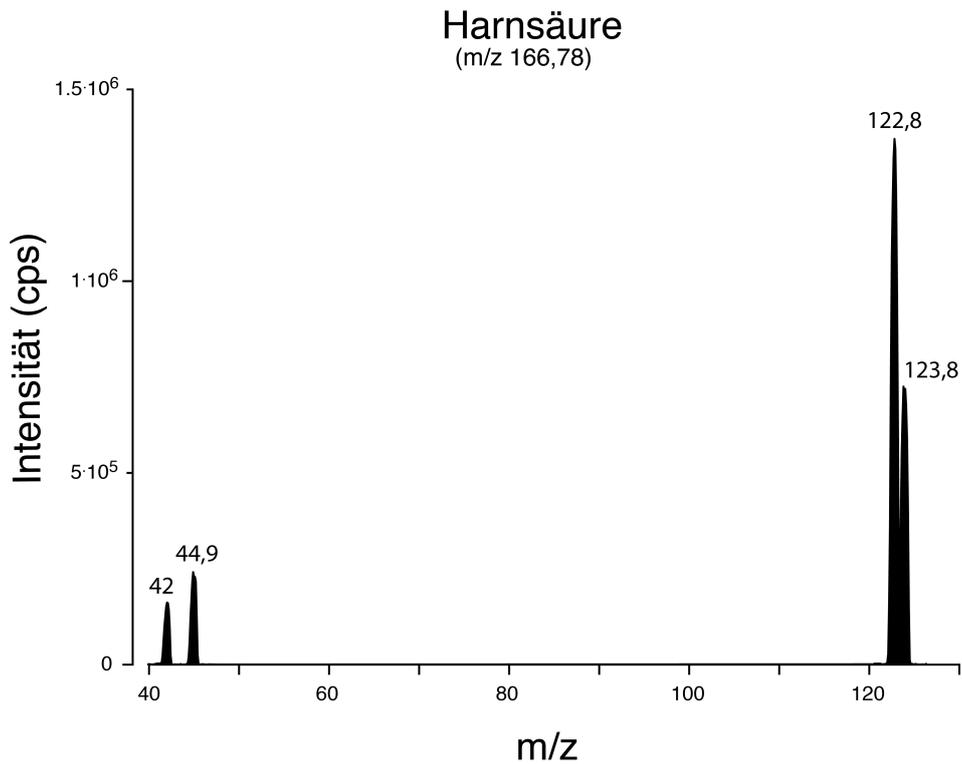


Abb. 32 Fragmentierung von Harnsäure

Dargestellt ist das Fragmentmuster von Harnsäure. Kollisionsenergie: -40 V, Ionisierung: negativ ( $M-H^+$ ).

### 3.2 Guanidiniumsuccinat (GSA)

Aufgrund der im Fullscan ermittelten Signale wurde Guanidiniumsuccinat als Substrat für den SLC22A11 getestet. Bei Effluxexperimenten war die Freisetzung bei SLC22A11 exprimierenden Zellen gegenüber der Kontrolle kaum erkennbar (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren war eine Akkumulation von GSA bei einer Inkubation mit 1 mM GSA in KRH-Puffer und einer 20 h-Inkubation kaum erkennbar. Aus diesen Gründen wurden keine weiteren Analysen unternommen.

### 3.3 Akkumulation von <sup>3</sup>H-Glutamat durch SLC22A11

Es wurde der Einfluss von SLC22A11 auf die Akkumulation von <sup>3</sup>H-Glutamat in SLC22A11 transfizierten 293-Zellen analysiert (2.2.4.2, Seite 51). Die Expression von SLC22A11 wurde durch Inkubation mit Doxycyclin induziert (Abb. 33, Expression ein, volle Punkte). Nach Waschung wurden die Zellen mit 0,1  $\mu$ M <sup>3</sup>H-Glutamat bei 37 °C für eine definierte Zeit inkubiert, gewaschen und lysiert. Die Zelllysate wurden mittels Szintillationszähler analysiert.

Durch den endogen in 293-Zellen exprimierten und natriumgetriebenen Transporter EAAT1 kommt es zur einer gleichmäßigen Glutamat- und Aspartataufnahme sowohl in SLC22A11 exprimierenden Zellen als auch in den Kontrollzellen.

Gemäß der Gleichung 6 (Seite 57) für die Berechnung des Zeitverlaufs ergibt sich für die SLC22A11 exprimierenden Zellen (Abb. 33, Expression ein, volle Punkte)  $k_{in} = 34 \pm 4 \mu\text{L min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$  und für die Kontrolle (Abb. 33, Expression aus, offene Punkte)  $k_{in} = 49 \pm 9 \mu\text{L min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$ . Dies bedeutet, dass die Akkumulation von <sup>3</sup>H-Glutamat in 293-Zellen durch die SLC22A11-Expression vermindert wird.

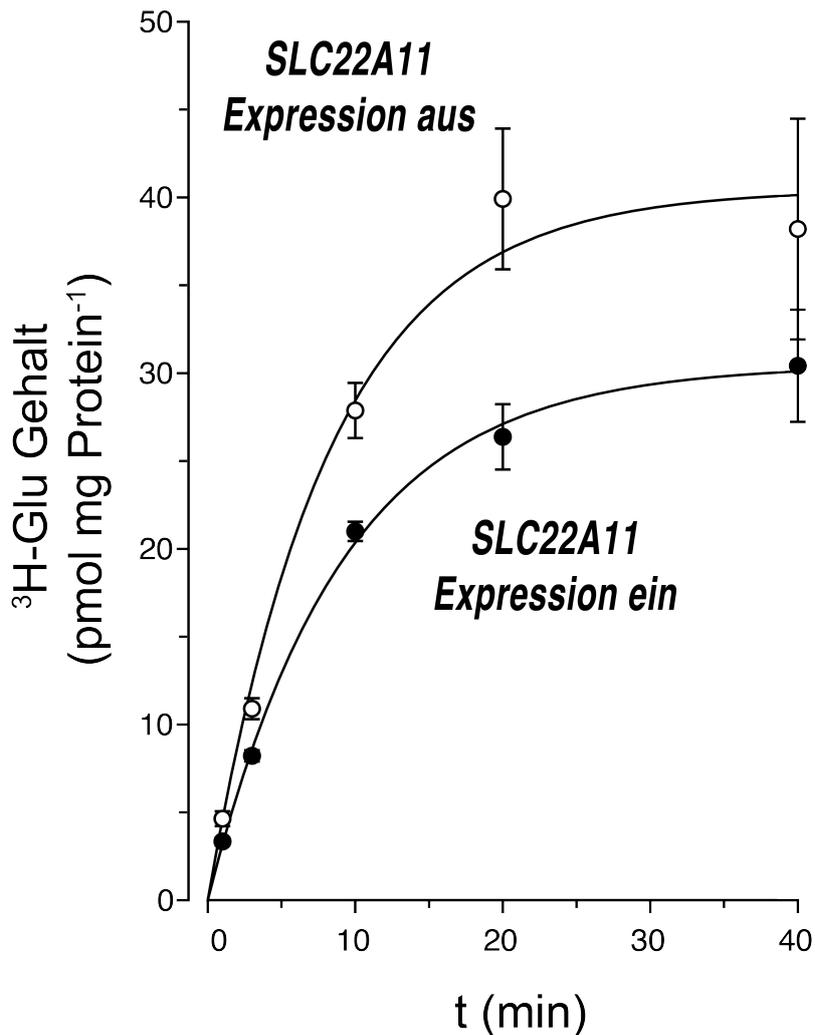


Abb. 33 SLC22A11 reduziert in 293-Zellen die Akkumulation von <sup>3</sup>H-Glutamat  
 Mit pEBTetLNC-SLC22A11 transfizierte 293-Zellen wurden mit 1 µg/mL Doxycyclin (ein) oder ohne (aus) 20 h vor Versuchsbeginn inkubiert, um die Expression von SLC22A11 zu induzieren. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, bei 37 °C mit 0,1 µM <sup>3</sup>H-Glutamat für eine definierte Zeit inkubiert, gewaschen und lysiert. Die Zelllysate wurden mittels Szintillationszähler analysiert. (Mittelwert ± SEM, n = 3), modifiziert aus [115].

### 3.4 Akkumulation von <sup>3</sup>H-Aspartat durch SLC22A11

Analog zu 3.3 (Akkumulation von <sup>3</sup>H-Glutamat durch SLC22A11) wurde die Aufnahme von <sup>3</sup>H-Aspartat durch SLC22A11 untersucht.

<sup>3</sup>H-Aspartat wird durch die Expression von SLC22A11 hinaus transportiert (Abb. 34, Expression ein:  $k_{in} = 9 \pm 1 \mu\text{L min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ , Expression aus:  $k_{in} = 14 \pm 4 \mu\text{L min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ ).

Im Vergleich zum  $^3\text{H}$ -Glutamat ist der  $^3\text{H}$ -Aspartat-Efflux dreifach geringer (Differenz bei  $k_{\text{in}}$  zwischen Expression ein und aus, für  $^3\text{H}$ -Glutamat  $\Delta k_{\text{in}} = 15 \pm 5 \mu\text{L min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ , für  $^3\text{H}$ -Aspartat  $\Delta k_{\text{in}} = 5 \pm 3 \mu\text{L min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ ).

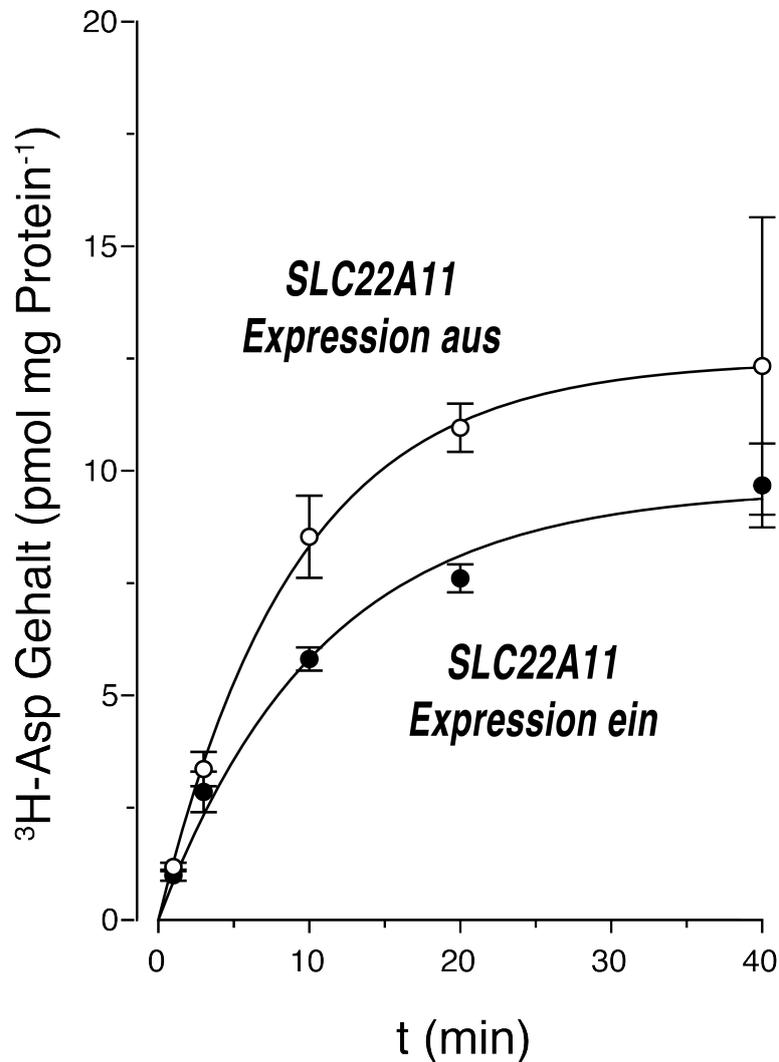


Abb. 34 Die Akkumulation von  $^3\text{H}$ -Aspartat wird durch SLC22A11 reduziert  
 Entsprechend zu Abb. 33 wurde die Akkumulation von  $^3\text{H}$ -Aspartat analysiert. (Mittelwert  $\pm$  SEM,  $n = 3$ ).

### 3.5 Efflux von Glutamat und Aspartat

Aufgrund der Resultate bei der Glutamat- und Aspartatakkumulation wurde der Efflux der jeweiligen Substanzen bei den humanen Transportern SLC22A11 und SLC22A13 untersucht (2.2.4.3, Seite 51).

## Ergebnisse

293-Zellen wurden jeweils mit pEBTetLNC-SLC22A11h oder pEBTetD-SLC22A13h transfiziert. Durch die Inkubation der Zellen mit Doxycyclin wurde die Expression der jeweiligen Transporter induziert (Glu-Efflux Abb. 35 & Asp-Efflux Abb. 36, Expression ein, volle Punkte).

Die Zellen wurden mit natrium- und phosphatfreien Puffer gewaschen und mit 2 mL Puffer inkubiert, um eine Wiederaufnahme von Glutamat bzw. Aspartat durch den endogen exprimierten EAAT1-Transporter zu verhindern. Aufgrund von Interferenz bei der MS-Messung wurde phosphatfreier Puffer verwendet. Bei 10, 20 und 30 min wurden Überstandproben entnommen. Der freigesetzte Glutamat- und Aspartatgehalt wurde per LC-MS/MS analysiert.

Tabelle 15 Glutamat- und Aspartatefflux von SLC22A11 und SLC22A13

	<b>SLC22A11</b>	<b>SLC22A13</b>
<b>Glutamatefflux</b>		
Transporterzellen	$1,8 \pm 0,4$ nmol min <sup>-1</sup> mg Protein <sup>-1</sup>	$1,2 \pm 0,1$ nmol min <sup>-1</sup> mg Protein <sup>-1</sup>
Kontrollzellen	$0,08 \pm 0,08$ nmol min <sup>-1</sup> mg Protein <sup>-1</sup>	$-0,01 \pm 0,09$ nmol min <sup>-1</sup> mg Protein <sup>-1</sup>
<b>Aspartatefflux</b>		
Transporterzellen	$0,5 \pm 0,1$ nmol min <sup>-1</sup> mg Protein <sup>-1</sup>	$1,5 \pm 0,1$ nmol min <sup>-1</sup> mg Protein <sup>-1</sup>
Kontrollzellen	$0,06 \pm 0,04$ nmol min <sup>-1</sup> mg Protein <sup>-1</sup>	$0,02 \pm 0,03$ nmol min <sup>-1</sup> mg Protein <sup>-1</sup>

Bei eingeschalteter SLC22A11-Expression stieg der Glutamat- sowie der Aspartat-Efflux (Tabelle 15). Es wird dreifach mehr Glutamat als Aspartat durch SLC22A11 hinaus transportiert. Im Vergleich ist beim SLC22A13 der Aspartatefflux höher als der Glutamatefflux.

Ergebnisse

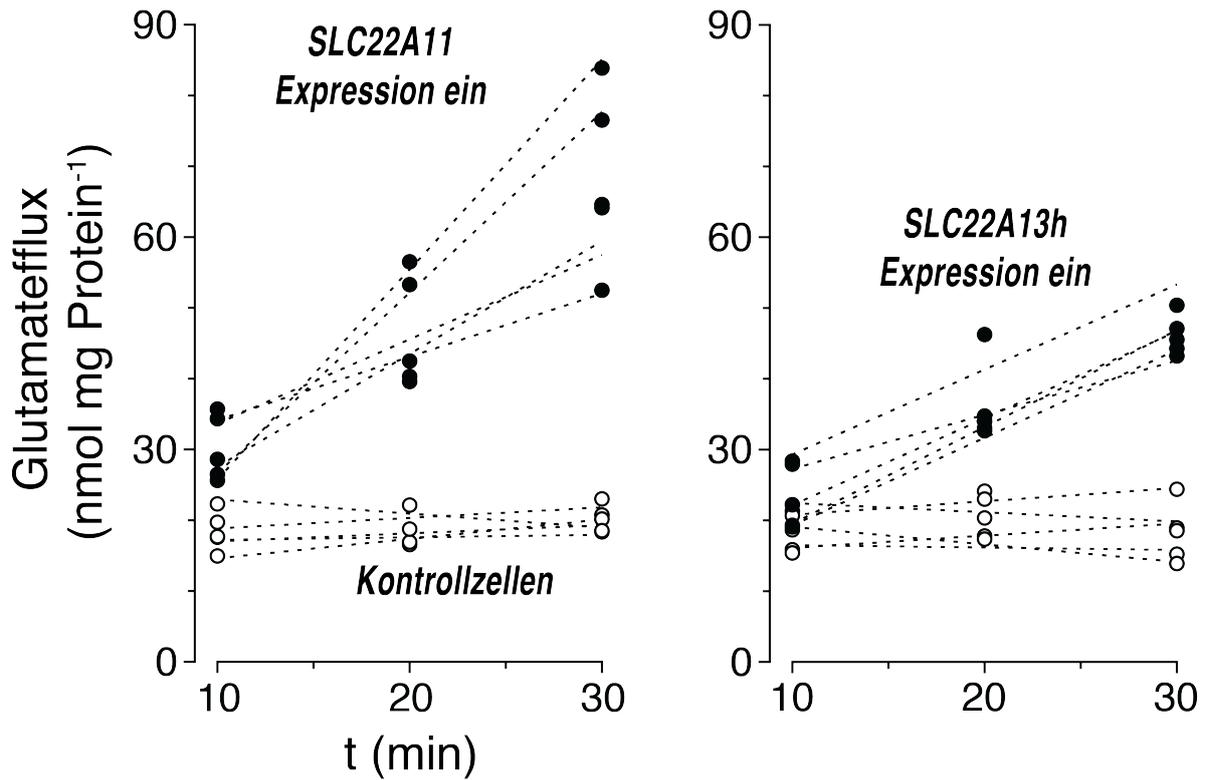


Abb. 35 Glutamatefflux vom humanen SLC22A11 gegenüber SLC22A13h

Dargestellt ist der Glutamatefflux des SLC22A11 gegenüber SLC22A13h bei ein- (ein, volle Punkte) und ausgeschalteter Expression (Kontrollzellen, offene Punkte) von 293-Zellen, welche jeweils mit pEBTetLNC-SLC22A11 oder pEBTetD-SLC22A13h transfiziert wurden. Zellen wurde zweimal mit natrium- und phostatfreiem KRH-Puffer bei 37 °C gewaschen und anschließend mit 2 mL Puffer inkubiert. Pro Schälchen wurden Überstandsproben bei 10, 20, 30 min entnommen. Der Glutamatgehalt wurde mittels LC-MS/MS bestimmt. Eine lineare Regression wurde für jedes Schälchen durchgeführt. (n=5), modifiziert aus [115].

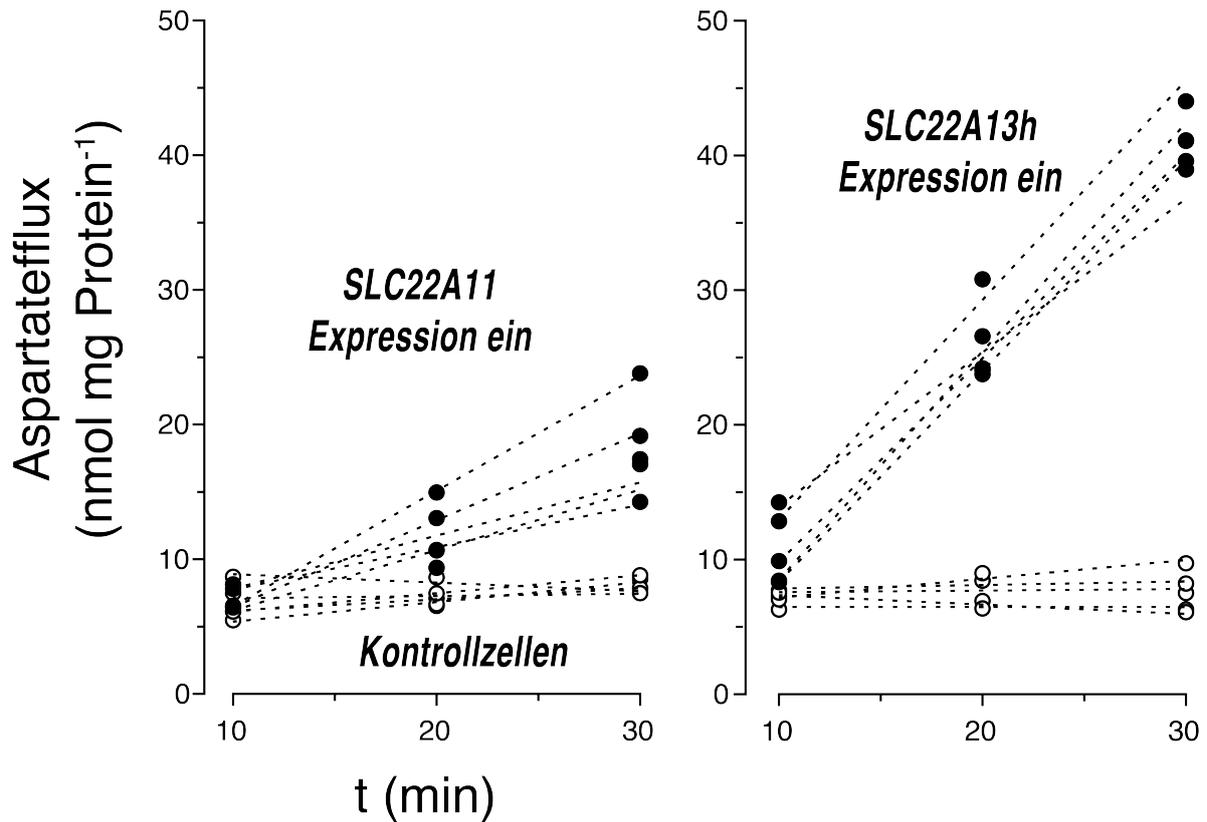


Abb. 36 Aspartatefflux vom humanen SLC22A11 gegenüber SLC22A13h

Dargestellt ist der Aspartatefflux des SLCexpr22A11 gegenüber SLC22A13h bei ein- (ein, volle Punkte) und ausgeschalteter Expression (Kontrollzellen, offene Punkte). Der Versuchsaufbau erfolgte wie in Abb. 35 beschrieben.

### 3.6 Zeitliche Substratakkumulation vermittelt durch SLC22A11

#### 3.6.1 Zeitverlauf der Akkumulation von Harnsäure durch SLC22A11

Es wurde die Aufnahme von Harnsäure durch SLC22A11 untersucht (2.2.4.4.1, Seite 56). Dafür wurden stabil transfizierte Zellen bei induzierter und nicht-induzierter Expression mit 10  $\mu$ M Harnsäure für eine definierte Zeit inkubiert (Abb. 37), anschließend gewaschen und lysiert. Die Lysate wurden mittels LC-MS/MS analysiert.

Die Expression von SLC22A11 resultierte in einer signifikant erhöhten Harnsäure-Akkumulation ( $k_{in} = 2,0 \pm 0,2 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$ ;  $k_{out} = 0,047 \pm 0,009 \text{ min}^{-1}$ ) gegenüber den Kontrollzellen (Expression aus,  $P = 0,0002$ ).

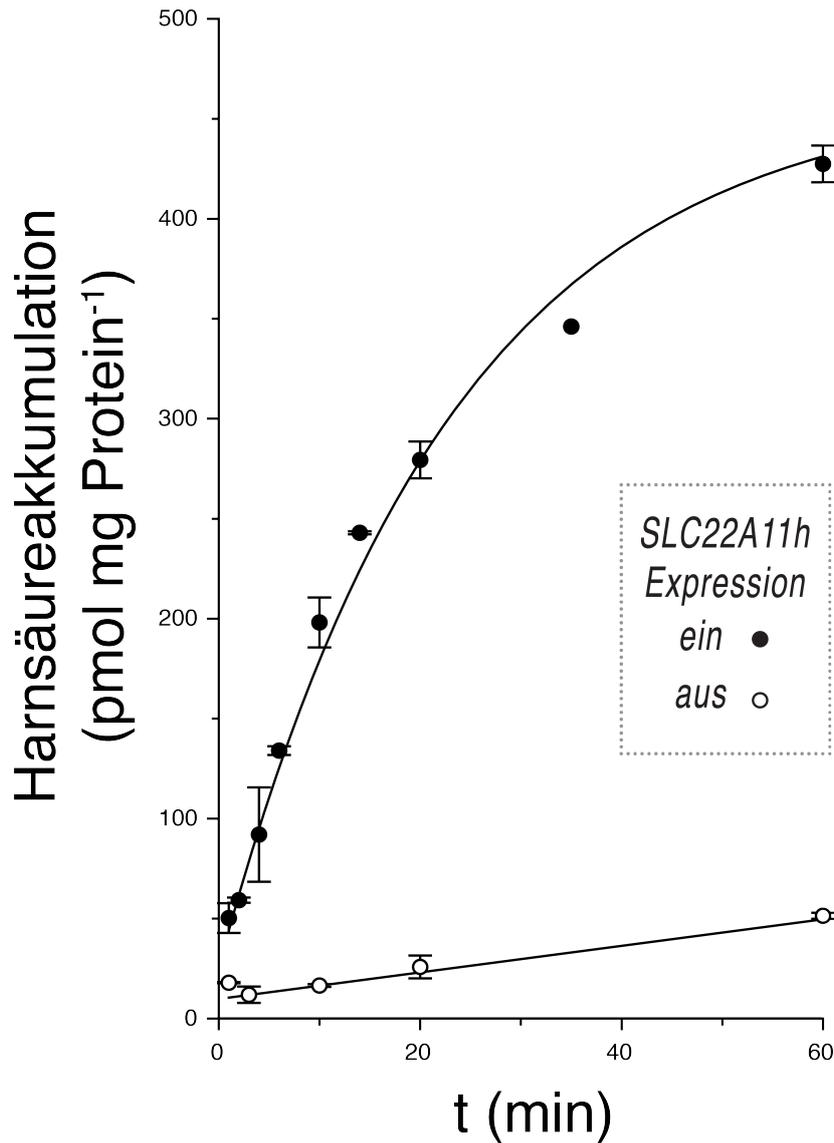


Abb. 37 Zeitverlauf der Akkumulation von Harnsäure durch SLC22A11

Dargestellt ist der Zeitverlauf der Harnsäureakkumulation durch SLC22A11. Stabil transfizierte 293-Zellen wurden für 20 h in Schälchen mit (Expression ein) oder ohne (Expression aus) 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Doxycyclin kultiviert. Die Zellen wurden gewaschen und eine definierte Zeit mit 10  $\mu\text{M}$  Harnsäure im KRH-Puffer inkubiert, anschließend gewaschen und lysiert. Die Lysate wurden per LC-MS/MS analysiert. (Mittelwert  $\pm$  SEM,  $n=2$ ), modifiziert aus [115].

### 3.6.2 Zeitverlauf der Akkumulation von E3S

Analog zu 3.6.1 (Zeitverlauf der Akkumulation von Harnsäure durch SLC22A11) wurde die E3S-Akkumulation untersucht. Dafür wurden die Zellen mit 10  $\mu\text{M}$  E3S inkubiert.

## Ergebnisse

Die Akkumulation von E3S war gegenüber der Harnsäure-Akkumulation 20-fach schneller ( $k_{in} = 40 \pm 6 \mu\text{L min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$ , Abb. 38). Des Weiteren wurde das Equilibrium rapide nach ca. 5 min erreicht. Ebenso war  $k_{out}$  10-fach höher ( $k_{out} = 0,47 \pm 0,07 \text{ min}^{-1}$ ). Dies bedeutet, dass bei SLC22A11 exprimierenden Zellen mit einer Proteinmenge von 1 mg 40  $\mu\text{L}$  E3S aus dem Inkubationsmedium aufgenommen wird, während gleichzeitig 47% des zellulären E3S freigesetzt werden.

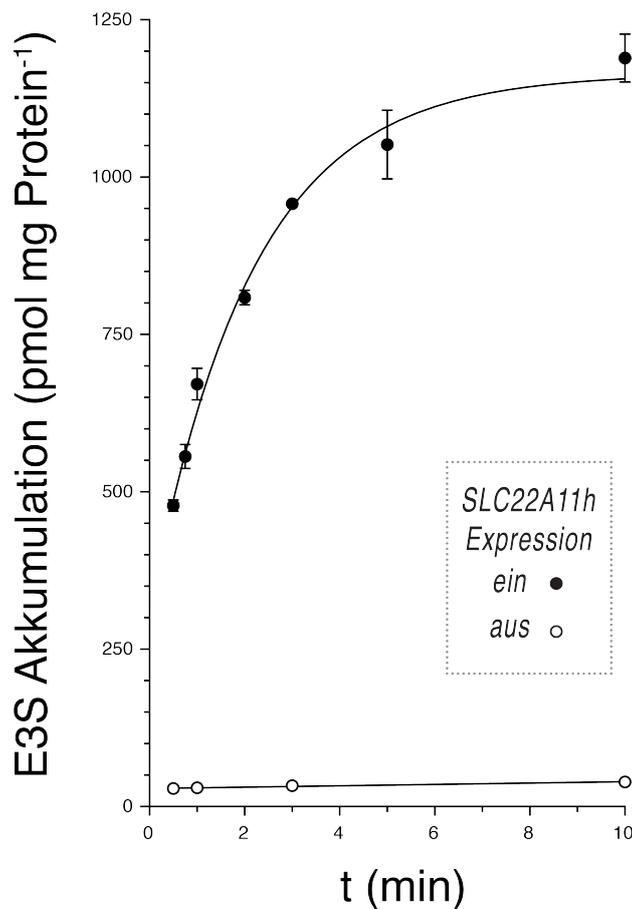


Abb. 38 Zeitverlauf Akkumulation von E3S durch SLC22A11

Dargestellt ist der Zeitverlauf der Estrone-3-Sulfatakkumulation durch SLC22A11. Analog zu Abb. 37 wurden die Zellen mit 10  $\mu\text{M}$  E3S inkubiert. (Mittelwert  $\pm$  SEM,  $n=2$ ), modifiziert aus [115].

### 3.6.2.1 Bestimmung des $K_m$ -Werts von E3S

Es wurde der  $K_m$ -Wert für E3S analysiert. Hierfür wurde die E3S-Aufnahmegeschwindigkeit bei unterschiedlichen E3S-Konzentrationen (1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ ) im KRH-

## Ergebnisse

Puffer nach 1 min Inkubation für stabil transfizierte Zellen bestimmt. Es wurde die Akkumulation im Zelllysate mittels LC-MS/MS analysiert. Der jeweilige Hintergrund (Expression aus) wurde subtrahiert (Abb. 39).

Gleichung 10  $K_m$ -Wert

$$y = \frac{V_{max} * [S]}{K_m + [S]}$$

[S] = Substratkonzentration, [56]

Der  $K_m$ -Wert von E3S ist  $8,8 \pm 0,9 \mu\text{M}$  und  $V_{max}$  beträgt  $1,41 \pm 0,04 \text{ nmol} * \text{min}^{-1}$ .

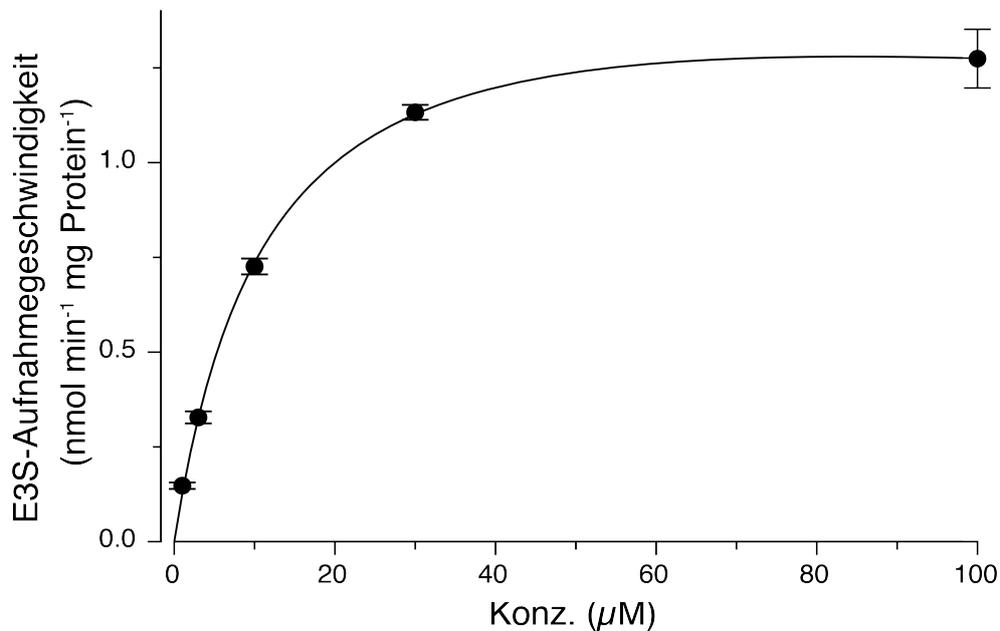


Abb. 39  $K_m$ -Wertbestimmung von E3S

Stabil transfizierte Zellen wurden mit unterschiedlichen E3S-Konzentrationen für 1 min inkubiert. Nach Zelllyse wurde die E3S-Konzentration mittels LC-MS/MS bestimmt. Der Hintergrund (Expression aus) wurde subtrahiert. Die Anpassung der hyperbolischen Kurve erfolgt nach Gleichung 10. ( $n=3$ , Mittelwert  $\pm$  SEM).

### 3.6.2.2 E3S-Akkumulation bei 4 °C

Zwecks weiterer Untersuchung einer transporterabhängigen E3S-Aufnahme wurde eine einminütige Aufnahme bei 4 °C und 37 °C durchgeführt. Bei 4 °C ist eine stark verminderte Transporteraktivität zu erwarten. Die SLC22A11 vermittelte Aufnahme bei 4 °C im Vergleich zu 37 °C betrug  $1,0 \pm 2,2$  %.

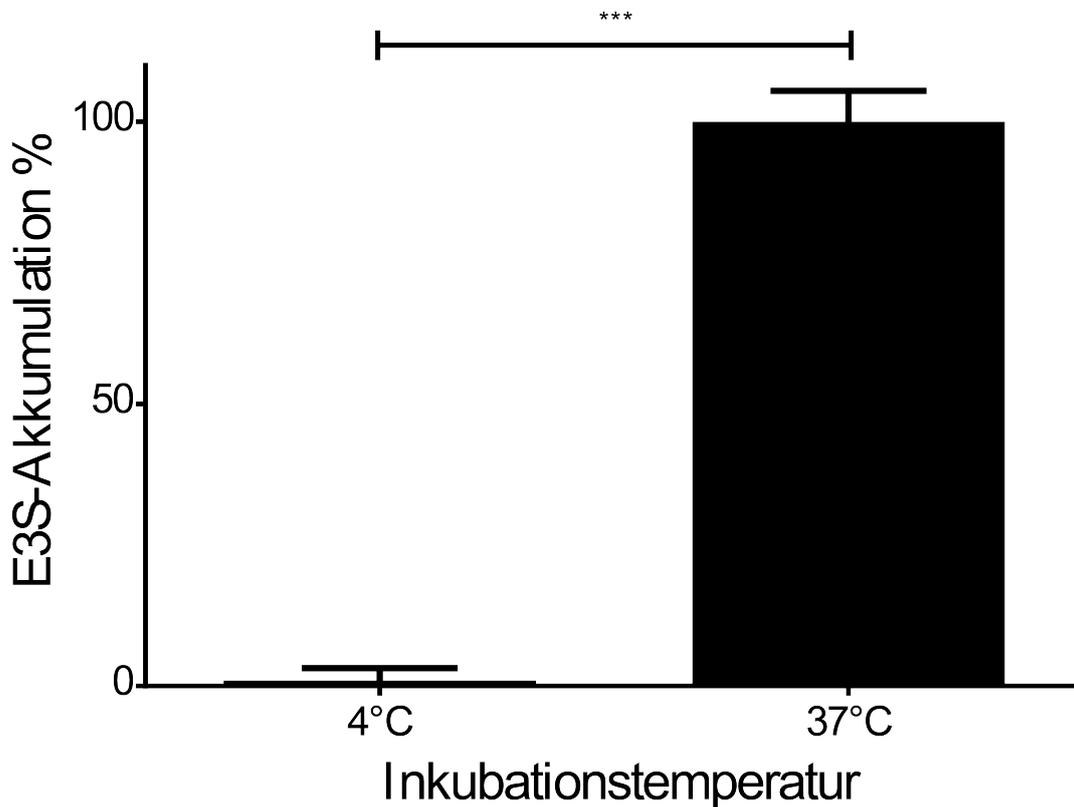


Abb. 40 E3S-Akkumulation bei 4 °C und 37 °C

Mit SLC22A11 stabil transfizierte Zellen wurden mit 10 µM E3S bei 4 °C und 37 °C sowie ein- und ausgeschalteter Expression für 1 min inkubiert. Anschließend gewaschen und lysiert. Die Lysaten wurde mittels LC-MS/MS analysiert. Der jeweilige Hintergrund (Expression aus) wurde subtrahiert. ( $p = 0,0008$ , durchgeführt von Samira Boussettaoui, Mittelwert  $\pm$  SEM,  $n=3$ ).

### 3.6.3 Zeitliche Akkumulation von DHEAS

DHEAS ist strukturähnlich zu E3S (Abb. 9-10), weshalb die DHEAS-Akkumulation untersucht wurde. Die Durchführung erfolgte entsprechend 3.6.1. Die Zellen wurden mit 10 µM DHEAS inkubiert.

## Ergebnisse

DHEAS akkumuliert im Vergleich zur Harnsäure 13-fach schneller ( $k_{in} = 26 \pm 9 \mu\text{L min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$ , Abb. 41).  $k_{out}$  war 7,8-fach erhöht ( $k_{out} = 0,37 \pm 0,22 \text{ min}^{-1}$ ). Die E3S-Akkumulation ist 1,5-fach höher als bei DHEAS. Das Equilibrium wurde nach ca. 10 min erreicht.

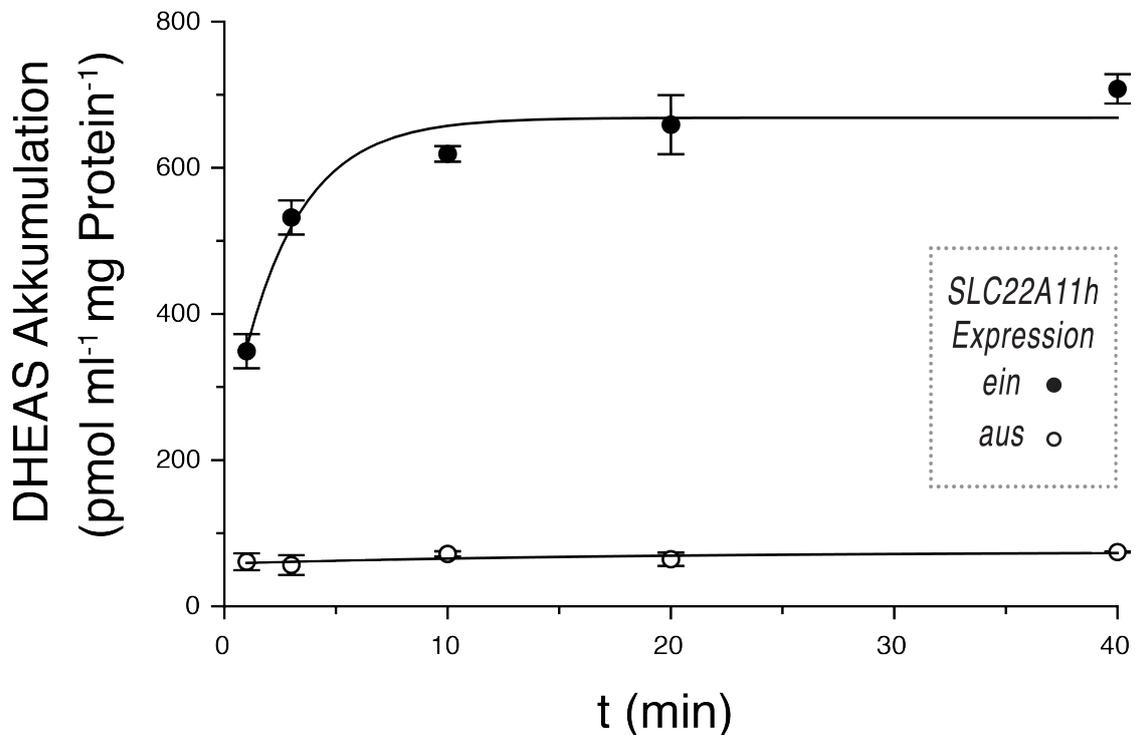


Abb. 41 Zeitliche Akkumulation von DHEAS durch SLC22A11

Dargestellt ist der Zeitverlauf der DHEAS durch SLC22A11. Analog zu Abb. 37 wurde die Zellen mit 10  $\mu\text{M}$  DHEAS inkubiert. (Mittelwert  $\pm$  SEM,  $n = 3$ ).

### 3.6.4 Akkumulation von 6-Carboxyfluorescein

Entsprechend 3.6.1 wurde auch die 6CF-Akkumulation analysiert. Hierfür wurden die Zellen mit 10  $\mu\text{M}$  6CF inkubiert.

6CF akkumuliert im Vergleich zu Harnsäure, E3S und DHEAS am langsamsten (Abb. 42,  $k_{in} = 0,65 \pm 0,05 \mu\text{L min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$ ,  $k_{out} = 0,10 \pm 0,01 \text{ min}^{-1}$ ).

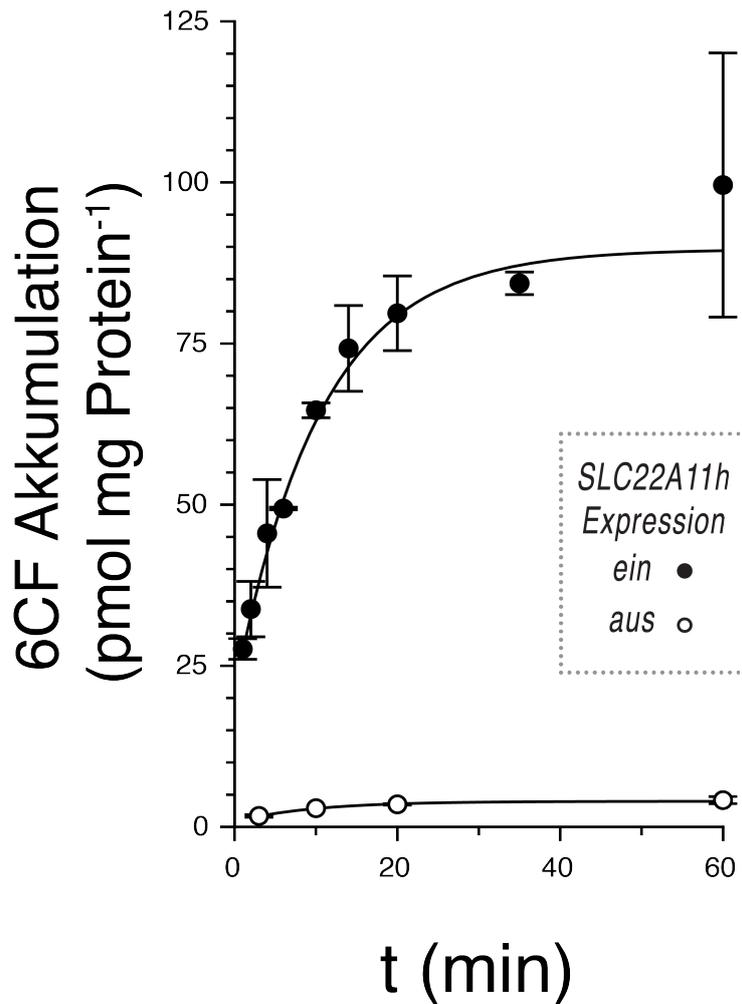


Abb. 42 Zeitliche Akkumulation von 6CF durch SLC22A11

Dargestellt ist der Zeitverlauf der DHEAS durch SLC22A11. Entsprechend Abb. 37 wurde die Zellen mit 10  $\mu$ M 6CF inkubiert. (Mittelwert  $\pm$  SEM, n=2).

### 3.7 Transeffekte

Es wurde der Transeffekt von Harnsäure und E3S auf den SLC22A11 vermittelten Glutamatefflux analysiert (2.2.4.3.4, Seite 53). Ein Transeffekt ist der Einfluss eines Substrates von der gegenüberliegenden Seite (trans) der Zellmembran auf die Transportgeschwindigkeit eines anderen Substrates.

Dafür wurden SLC22A11 transfizierte Zellen mit 1 mM Harnsäure, E3S oder nur im natrium- und phosphatfreien KRH-Puffer inkubiert. Es wurde das freigesetzte Glutamat im Überstand mittels LC-MS/MS bestimmt (Abb. 43).

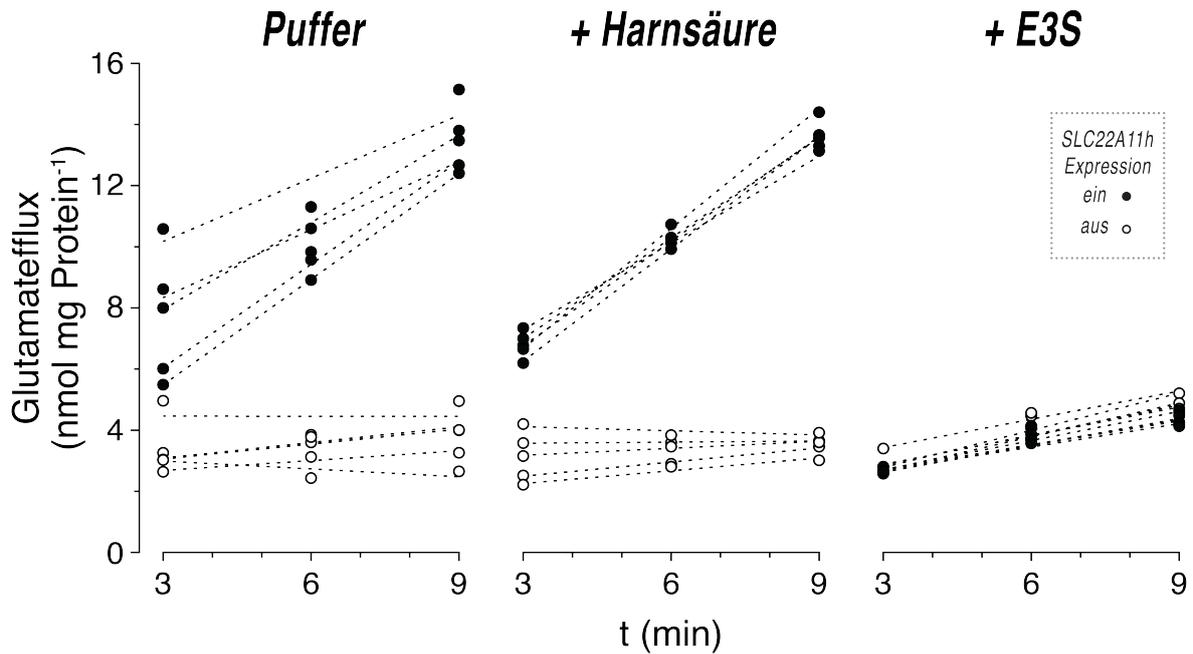


Abb. 43 Transeffekte von Harnsäure und E3S auf den Glutamatefflux von SLC22A11

Dargestellt ist der Glutamatefflux stabil-transfizierter 293-Zellen bei ein- (ein, volle Punkte) und ausgeschalteter SLC22A11-Expression (aus, offene Punkte) von 293-Zellen. Die Zellen wurde zweimal mit natrium- und phostatfreien KRH-Puffer bei 37 °C gewaschen, anschließend mit 2 mL Puffer mit oder ohne 1mM Harnsäure oder E3S inkubiert. Pro Schälchen wurden Überstandsproben bei 3, 6 und 9 min entnommen. Der Glutamatgehalt wurde mittels LC-MS/MS bestimmt. Eine lineare Regression wurde für jedes Schälchen durchgeführt. (n=5)., modifiziert aus [115].

## Ergebnisse

Tabelle 16 Transeffekte von Harnsäure und E3S auf den Glutamatefflux von SLC22A11.

SLC22A11-Expression	Glutamateffluxgeschwindigkeit	
	induziert	nicht-induziert
KRH-Puffer (natrium- und phosphatfrei)	0,93 ± 0,01 nmol min <sup>-1</sup> mg Protein <sup>-1</sup>	0,07 ± 0,04 nmol min <sup>-1</sup> mg Protein <sup>-1</sup>
+ 1mM Harnsäure	1,14 ± 0,06 nmol min <sup>-1</sup> mg Protein <sup>-1</sup>	0,07 ± 0,04 nmol min <sup>-1</sup> mg Protein <sup>-1</sup>
+1 mM E3S	0,29 ± 0,01 nmol min <sup>-1</sup> mg Protein <sup>-1</sup>	0,33 ± 0,03 nmol min <sup>-1</sup> mg Protein <sup>-1</sup>

Der Glutamatefflux war mit 1 mM Harnsäure im Puffer gegenüber der Kontrolle nicht signifikant abweichend (Tabelle 16, P = 0,10). Im Gegensatz war der transportervermittelte Glutamatefflux mit 1mM E3S im Puffer komplett inhibiert.

Im weiterführenden Ansatz wurde der Unterschied zwischen DHEAS und E3S analysiert. Die Zellen wurden mit 1mM DHEAS, 1mM E3S oder nur im natrium- und phosphatfreien KRH-Puffer inkubiert (Abb. 44). DHEAS inhibiert den Glutamatefflux schwächer als E3S (Tabelle 17).

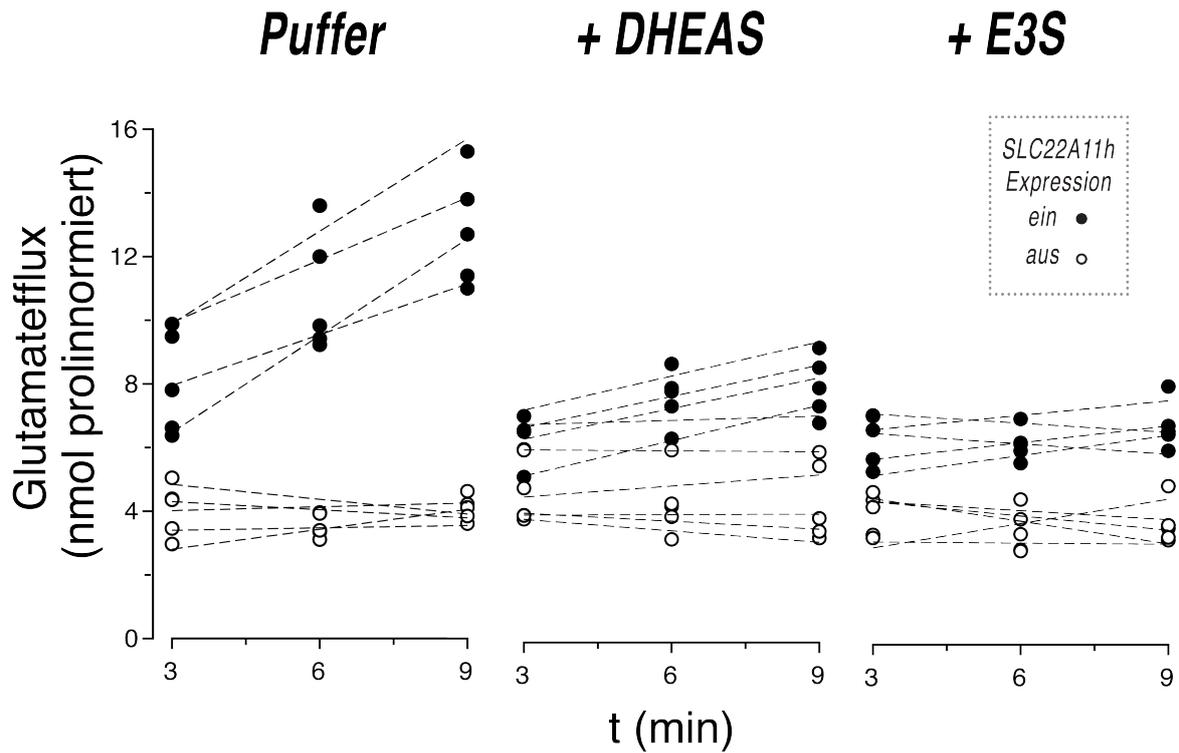


Abb. 44 DHEAS und E3S inhibieren den transportervermittelten Glutamatefflux

Analog zu Abb. 43 wurden die Zellen jeweils mit 1mM DHEAS, 1mM E3S oder nur im natrium- und phosphatfreien KRH Puffer inkubiert. (n=5).

Tabelle 17 Transeffekte von E3S und DHEAS auf den Glutamatefflux von SLC22A11.

SLC22A11-Expression	Glutamateffluxgeschwindigkeit	
	induziert	nicht-induziert
KRH-Puffer (natrium- und phosphatfrei)	$0,80 \pm 0,09$ nmol min <sup>-1</sup> prolinnormiert	$0,01 \pm 0,06$ nmol min <sup>-1</sup> prolinnormiert
+1 mM DHEAS	$0,28 \pm 0,06$ nmol min <sup>-1</sup> prolinnormiert	$-0,02 \pm 0,04$ nmol min <sup>-1</sup> prolinnormiert
+ 1mM E3S	$0,10 \pm 0,02$ nmol min <sup>-1</sup> prolinnormiert	$-0,05 \pm 0,08$ nmol min <sup>-1</sup> prolinnormiert

### 3.7.1 Inhibitorisches Potential von E3S und Probenecid auf den Glutamatefflux

Da DHEAS und E3S inhibitorisch auf den SLC22A11 vermittelten Glutamatefflux wirken, wurden der  $IC_{50}$  von E3S und Probenecid auf den Glutamatefflux analysiert (2.2.4.3.1, Seite 52). Probenecid ist ein bekannter Hemmstoff für den SLC22A11 sowie für weitere OATs [52, 72, 116, 117].

Stabil transfizierte 293-Zellen wurden im natrium- und phosphatfreien KRH-Puffer mit oder ohne E3S (Abb. 45) oder Probenecid (Abb. 46) in unterschiedlichen Konzentration inkubiert. Die freigesetzte Glutamatkonzentration wurde mittels LC-MS/MS bestimmt. Die Effluxgeschwindigkeit wurde aus der Steigung der linearen Anpassung auf die Glutamatfreisetzung ermittelt.  $IC_{50}$ -Werte wurden anhand der Effluxgeschwindigkeitsdaten berechnet.

Der  $IC_{50}$  für Probenecid ist  $21,4 \pm 6,3 \mu\text{M}$ . Entsprechend ist das inhibitorische Potential von E3S auf den Glutamatefflux 6-fach höher als von Probenecid ( $IC_{50}$ :  $3,5 \pm 0,8 \mu\text{M}$ ).

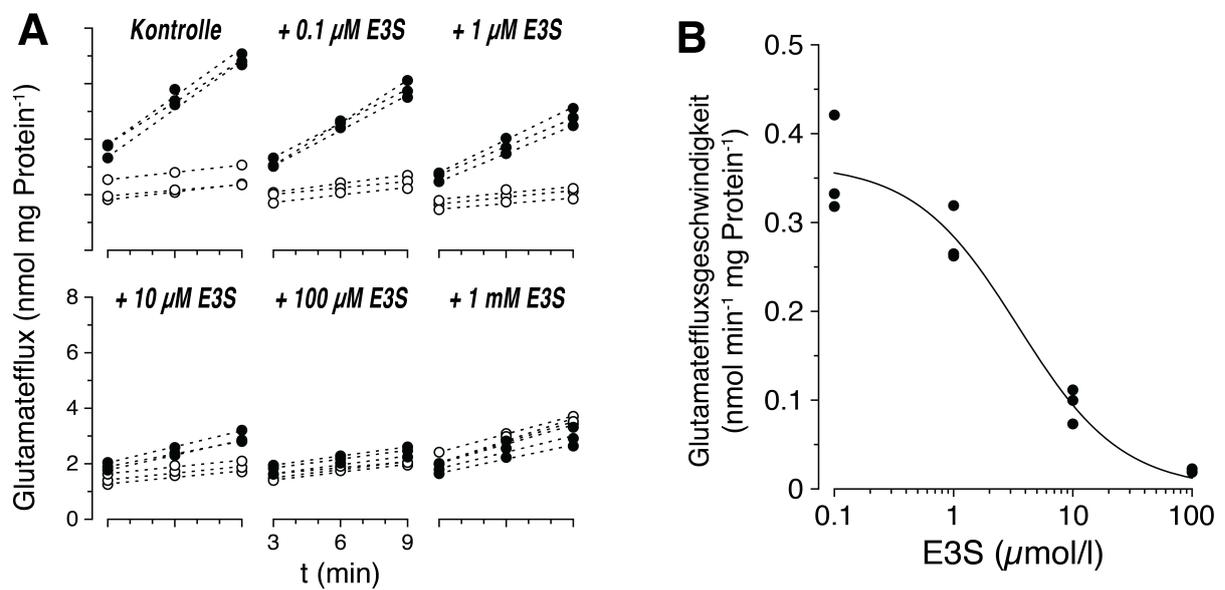


Abb. 45 Inhibitorische Potenz von E3S auf den transportervermittelten Glutamatefflux

(A) Zeitverlauf der Glutamatfreisetzung. Der Versuchsaufbau erfolgte entsprechend Abb. 42. Stabil transfizierte 293-Zellen wurden im Puffer mit oder ohne E3S inkubiert. (volle Punkte: SLC22A11 Expression ein, offene Punkte Expression aus).  $n = 3$ . (B) Die Geschwindigkeit der Glutamatfreisetzung gegenüber der E3S-Konzentration im Puffer als Funktion nach Gleichung 4 auf Basis der Steigungen von A, modifiziert aus [115].

## Ergebnisse

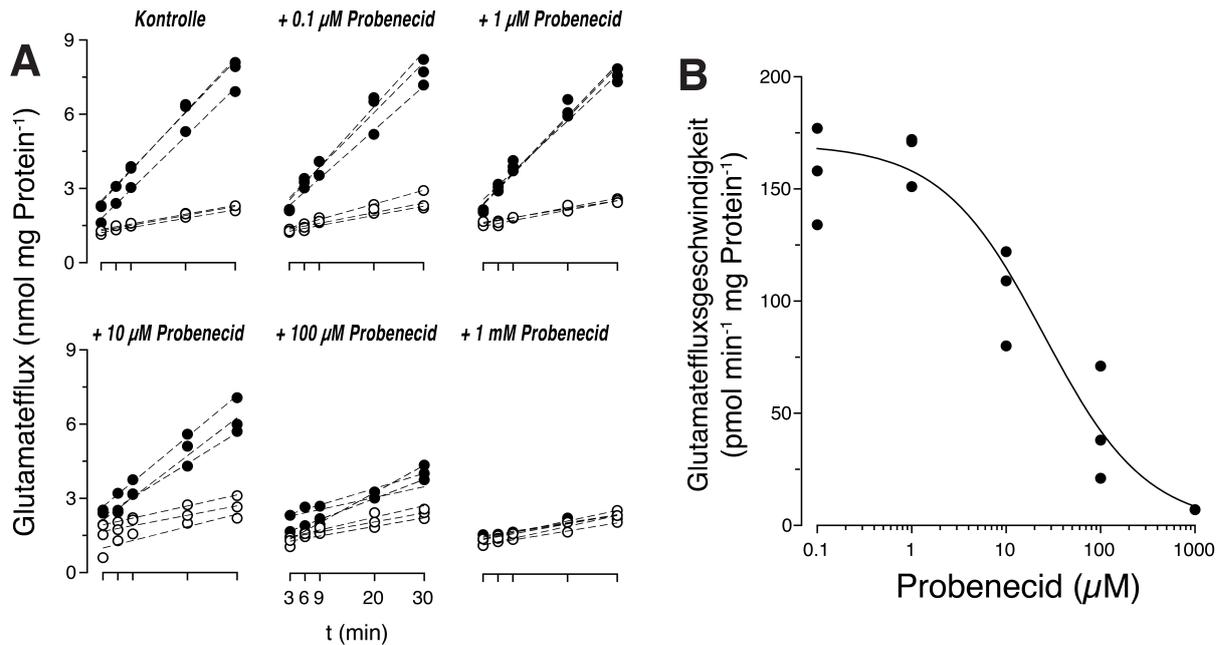


Abb. 46 Inhibitorische Potenz von Probenecid auf den Glutamaefflux von SLC22A11

Analog zu Abb. 45 (A) Zeitverlauf der Glutamatfreisetzung. Zellen wurden mit oder ohne Probenecid im Puffer inkubiert. (B) Die Geschwindigkeit der Glutamatfreisetzung gegenüber der Probenecidkonzentration. n=3.

### 3.7.1.1 E3S-Einfluss auf die Harnsäureakkumulation

Aufgrund der inhibitorischen Potenz von E3S wurde dieser Einfluss auf die die SLC22A11-vermittelte Harnsäureakkumulation untersucht. Stabil transfizierte 293-Zellen wurden mit 100  $\mu$ M Harnsäure ohne oder mit E3S (1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 100 $\mu$ M) im KRH-Puffer für 15 min inkubiert, gewaschen und lysiert. Die Zellysate wurden mittels LC-MS/MS analysiert.

Mit steigender E3S-Konzentration kommt es zur einer Reduktion der Harnsäureaufnahme (Abb. 47).

## Ergebnisse

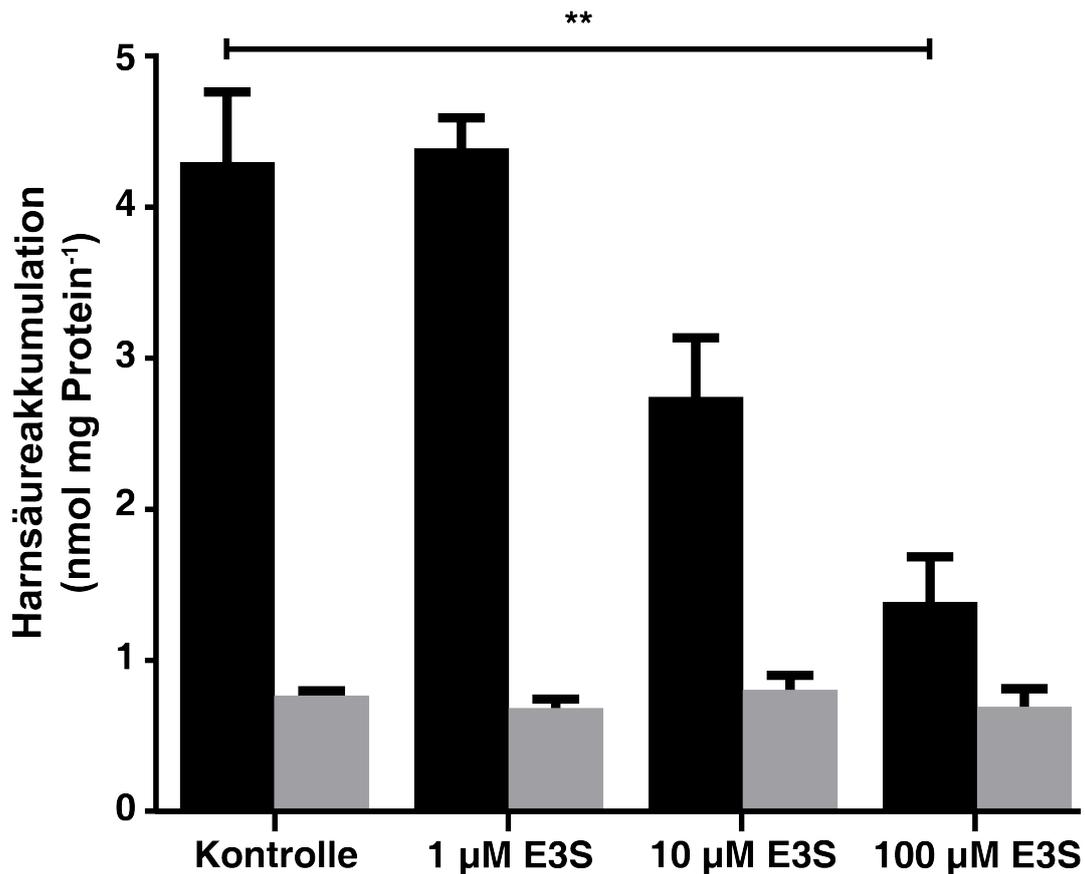


Abb. 47 Harnsäureakkumulation in Anwesenheit von E3S

Stabil-transfizierte Zellen wurden mit 100 µM Harnsäure sowie ohne oder mit E3S im KRH-Puffer für 15 min inkubiert, gewaschen und lysiert. Die Zellysate wurden mittels LC-MS/MS analysiert. Induzierte SLC22A11-Expression (schwarze Balken), nicht-induzierte Expression (grau), Mittelwert  $\pm$  SEM,  $n=3$ , \*\*  $p = 0,0195$ .

### 3.8 pH-abhängiger Glutamatefflux

Aufgrund vorherigen Studien wurde die pH-Abhängigkeit des Glutamatefflux untersucht [52](2.2.4.3.2, Seite 53). Stabil transfizierte Zellen wurden im natrium- und phosphatfreien KRH-Puffer mit verschiedenen pH-Werten inkubiert. Analog zu Abb. 45 B wurde die Glutamateffluxgeschwindigkeit untersucht (Abb. 48). Eine exponentielle Anpassung gemäß Gleichung 5 wurde durchgeführt.

Durch eine Steigerung des pH-Wertes im Puffer kommt es zur einer Steigerung der Glutamateffluxgeschwindigkeit (pH 7,4  $\rightarrow$  pH 8,8: Steigerung um  $323 \pm 13$  %,  $y = (-70,3 \pm 26,6) + e^{(0,806 \pm 0,06)x}$  ).

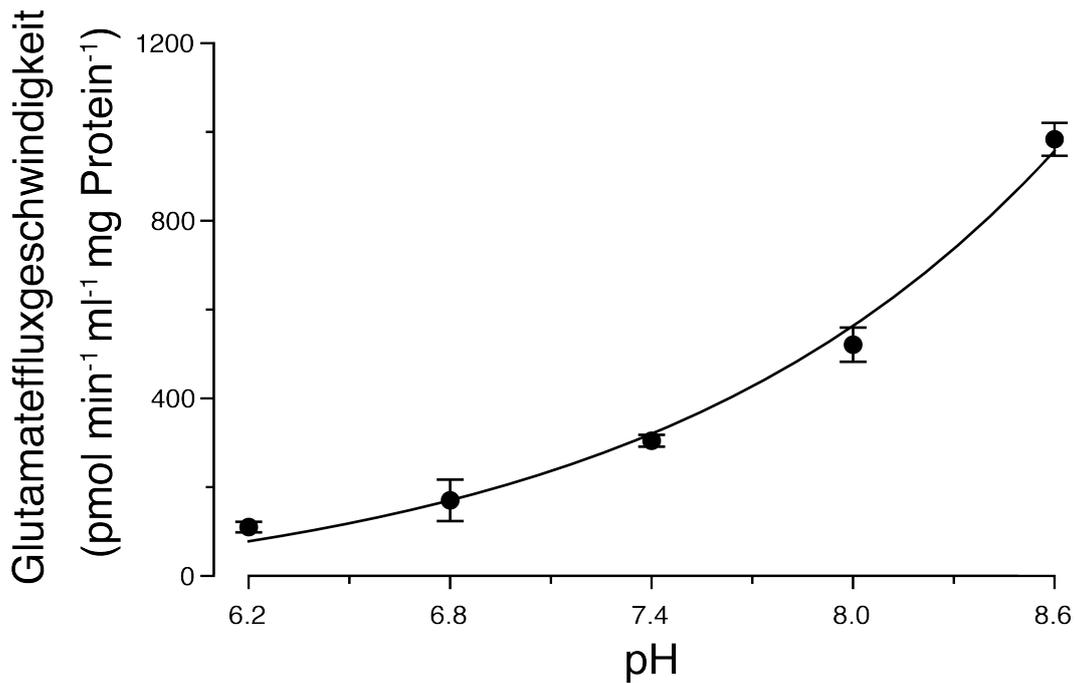


Abb. 48 pH-Abhängigkeit der Glutamateffluxgeschwindigkeit

Im natrium- und phosphatfreien Puffer mit verschiedenen pH-Konzentrationen wurden stabil transfizierte Zellen inkubiert. Die Glutamateffluxgeschwindigkeit wurde entsprechend zu Abb. 45 B analysiert. Eine exponentielle Anpassung wurde durchgeführt ( $y = y_0 + e^{ax}$ ). (n = 5, Mittelwert ± SEM).

### 3.9 Transeffekte auf die E3S und Harnsäurefreisetzung

Analog zur Glutamattransinhibition (3.7, Seite 92) wurde in Zellen, welche mit E3S oder Harnsäure vorbeladen wurden, die Freisetzung dieser Substanzen auf mögliche Transeffekte analysiert. Hierfür wurden die Zellen zusätzlich mit DHEAS, E3S, Harnsäure und 6CF inkubiert (2.2.4.5, Seite 57).

293-Zellen wurden jeweils mit E3S oder Harnsäure vorinkubiert, gewaschen und anschließend mit oder ohne DHEAS, Harnsäure oder 6CF im KRH-Puffer inkubiert (Abb.49). Es wurde die Harnsäure- und E3S-Konzentration im Überstand als auch im Zelllysat über die Zeit analysiert.

Die Zugabe von 1mM Harnsäure hat keinen Effekt auf den E3S-Efflux (Abb.49, B). DHEAS transstimuliert den E3S-Efflux, da die E3S-Freisetzung durch Inkubation mit 100 µM DHEAS im Puffer beschleunigt wird. Dies wurde auch in den Überstandsprouben bestätigt (Abb.49, A). In mit Harnsäure vorbeladenen Zellen wurde die Harnsäurefreisetzung durch DHEAS inhibiert

(Abb.49, D), analog zur Transinhibition des Glutamateffluxes durch DHEAS und E3S (Abb. 44).

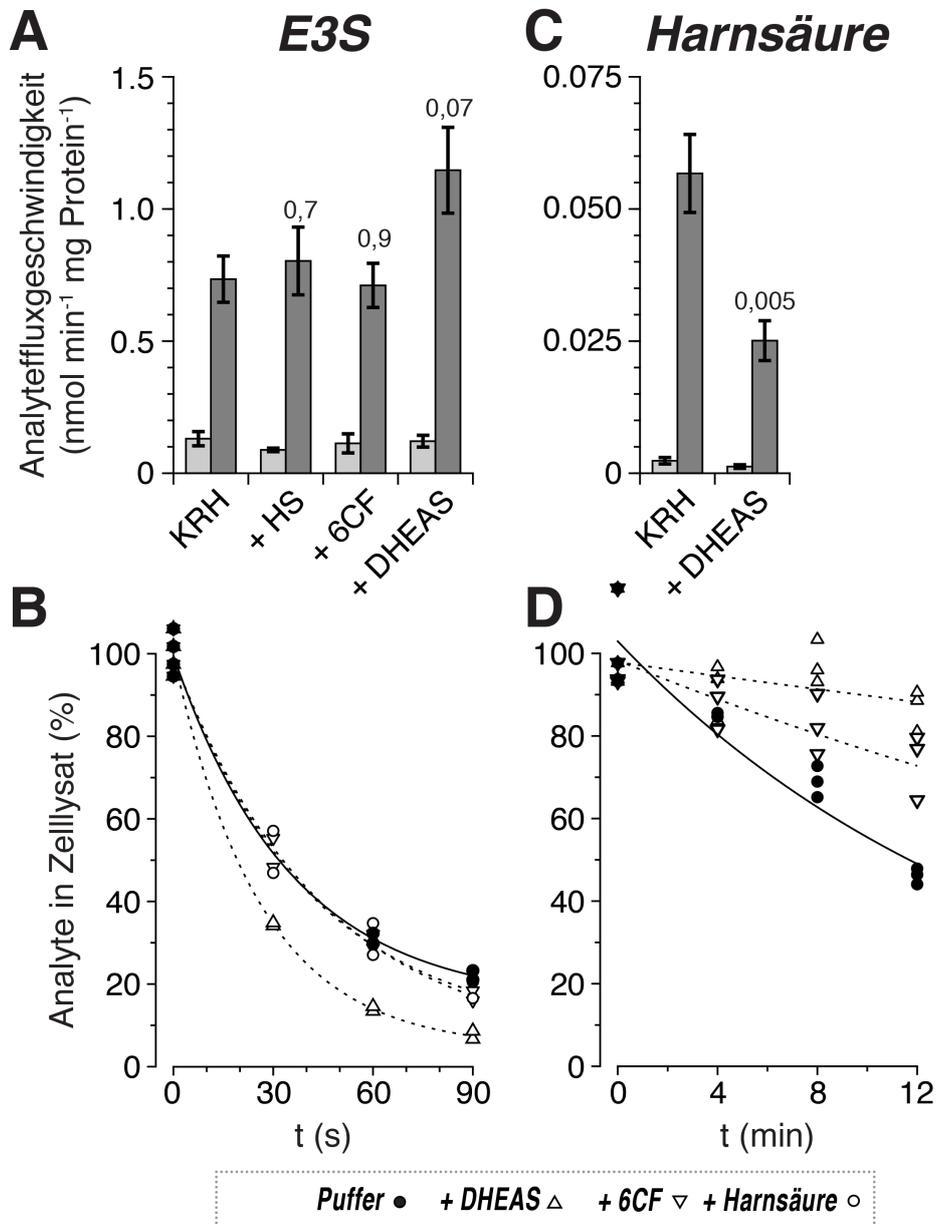


Abb.49 Transeffekte auf die E3S und Harnsäurefreisetzung

SLC22A11 transfizierte Zellen wurden mit 10  $\mu$ M E3S oder 100  $\mu$ M Harnsäure (HS) für 1h vorinkubiert, gewaschen und anschließend mit oder ohne 100  $\mu$ M DHEAS, 100  $\mu$ M 6CF und 1mM Harnsäure im Aufnahmebuffer inkubiert (B, D Messpunktdarstellung). Überstände wurden für mit E3S vorbeladenen Zellen nach 1,5 min und für mit Harnsäure vorbeladenen Zellen nach 12 min entnommen (A, C Mittelwert  $\pm$  SEM, p-Werte angegeben). Nach Waschung wurde die Zellen lysiert und die Lysate mittels LC-MS/MS analysiert. Der Hintergrund (nicht-induzierte Expression) wurde subtrahiert. Aufgrund von MS Interferenzen konnte der Effekt von 6CF im Überstand nicht analysiert werden (C). n=3, modifiziert aus [115].

## Ergebnisse

Des Weiteren wurde der Transeffekt von DHEAS auf Zellen untersucht, welche mit E3S und Harnsäure vorinkubiert wurden (Abb. 50). Stabil transfizierte 293-Zellen wurden erst mit 100  $\mu$ M Harnsäure und anschließend mit 100  $\mu$ M E3S vorbeladen, gewaschen und ohne oder mit 100  $\mu$ M DHEAS inkubiert. Nach Zelllyse wurde die E3S- und Harnsäurekonzentration mittels LC-MS bestimmt.

In Zellen, welche mit E3S und Harnsäure vorbeladen wurden, transstimuliert DHEAS nur den E3S-Efflux (E3S-Konzentration im Zelllysate: Inkubation mit DHEAS  $27 \pm 2,2$  %; ohne DHEAS  $66 \pm 4,6$  %), jedoch nicht die Harnsäurefreisetzung (Harnsäure-Konz. im Zelllysate: mit DHEAS  $87 \pm 3,4$  %; ohne DHEAS  $89 \pm 0,1$  %).

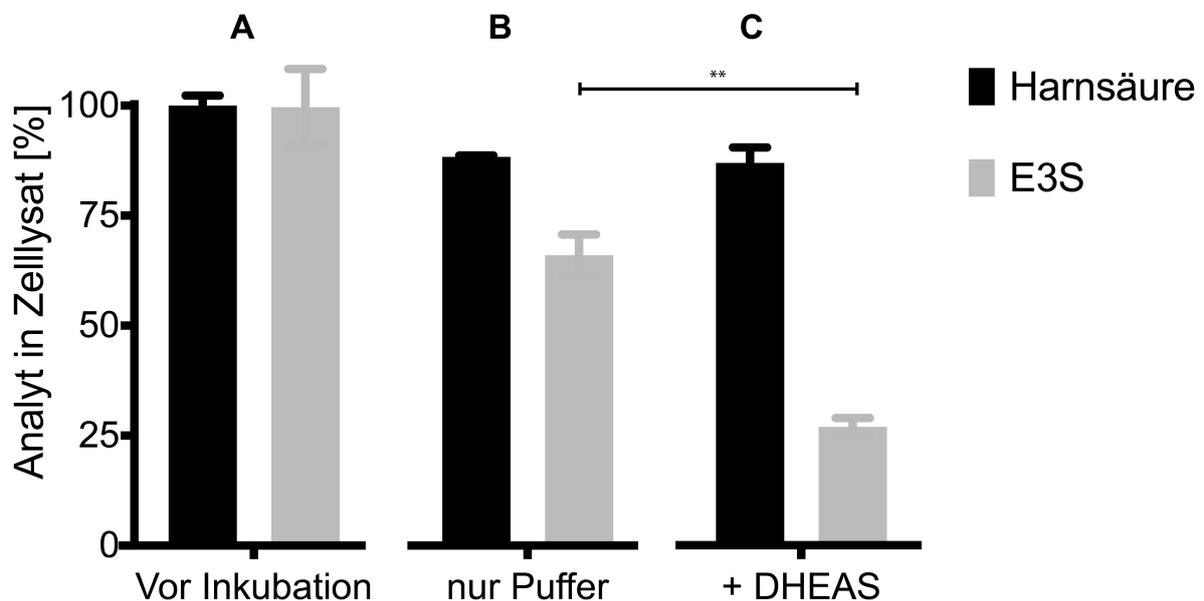


Abb. 50 DHEAS stimuliert den E3S-Efflux, jedoch nicht den Harnsäureefflux

Stabil transfizierte Zellen wurden 60 min mit 100  $\mu$ M Harnsäure im Puffer inkubiert, gewaschen, mit 100  $\mu$ M E3S für 10 min inkubiert, gewaschen und anschließend ohne (B) und mit (C) 100  $\mu$ M DHEAS im Puffer für 1 min inkubiert und lysiert. Des Weiteren wurden Zelllysate vor Inkubation mit und ohne DHEAS erstellt (A). Nach Zelllyse wurde die E3S und Harnsäurekonzentration mittels LC-MS/MS analysiert. (n =3, Mittelwert  $\pm$  SEM, \*\* p = 0,0042).

### 3.10 Chloridabhängigkeit von SLC22A11

In einer Studie wurde eine 4-fache Erhöhung der E3S-Aufnahme durch eine Cl<sup>-</sup>-Substitution im Aufnahmepuffer gezeigt [52]. Eine mögliche Heterogenität im Transportmechanismus von SLC22A11 durch eine Cl<sup>-</sup>-Substitution des Puffers wurde auf die Substrate Harnsäure, E3S und Glutamat analysiert.

Mit SLC22A11 stabil transfiziert 293-Zellen wurden mit 10  $\mu$ M Harnsäure oder E3S im Standard- und im Chlorid-substituierten Aufnahmepuffer inkubiert (2.2.4.4.3, Seite 56). Beim Chlorid-substituierten Aufnahmepuffer wurden alle Chloridsalze durch korrespondierende Gluconatsalze ersetzt. Nach entsprechender Zeit wurden die Zellen mit dem jeweiligen Puffer gewaschen und lysiert. Die Harnsäure oder E3S-Konzentration wurde mittels LC-MS/MS analysiert.

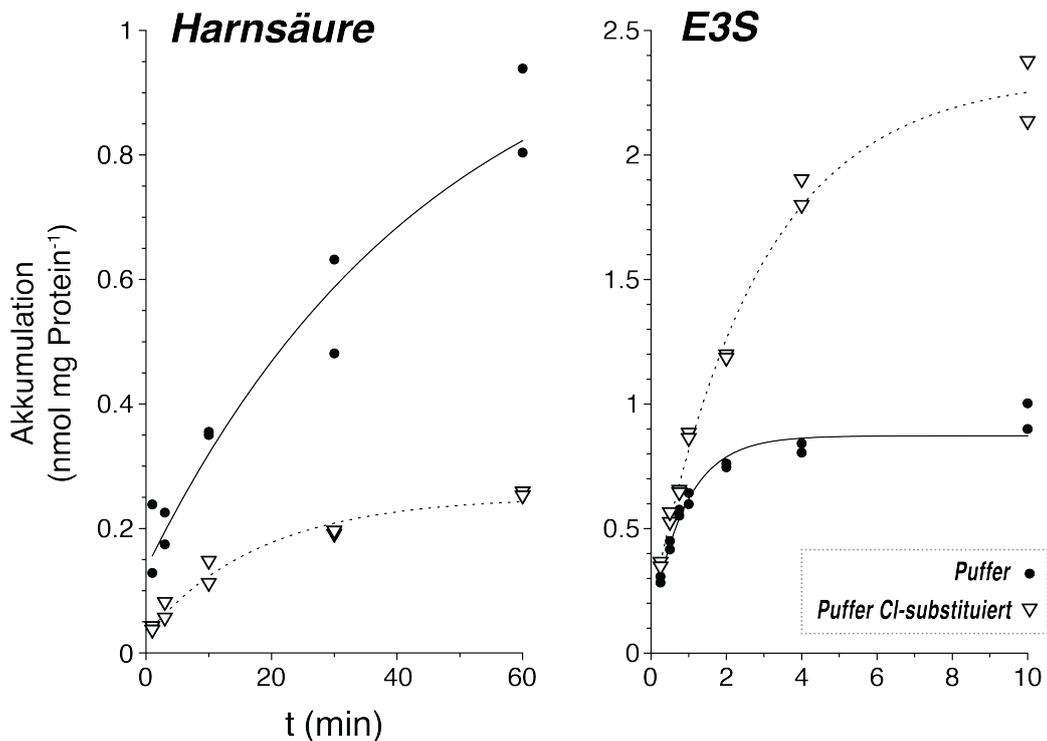


Abb. 51 Chlorid-Abhängigkeit der Harnsäure- und E3S-Akkumulation

SLC22A11 transfizierte 293-Zellen wurden in entsprechenden Puffer gewaschen und bei 37 °C mit 10  $\mu$ M Harnsäure oder E3S im Standardpuffer oder im Chlorid-substituierten Puffer inkubiert. Beim Chlorid-substituierten Puffer wurde alle Chloridsalze durch entsprechende Gluconatsalze ersetzt. Zur definierten Zeit wurde die Aufnahme durch Waschung der Zellen mit jeweiligem 4 °C kalten Puffer gestoppt. Die Zellen wurden lysiert und die Lysate wurden mittels LC-MS/MS analysiert. n=2, modifiziert aus [115].

Tabelle 18 Chloridabhängigkeit der Harnsäure- und E3S-Akkumulation beim SLC22A11

<b>KRH-Puffer:</b>	<b>Standard</b>	<b>Chlorid-substituiert</b>
<b>E3S-Akkumulation</b>		
$k_{out}$	$1,1 \pm 0,1 \text{ min}^{-1}$	$0,36 \pm 0,03 \text{ min}^{-1}$
$k_{in}$	$82 \pm 11 \text{ } \mu\text{L min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$	$76 \pm 5 \text{ } \mu\text{L min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$
<b>Harnsäureakkumulation</b>		
$k_{out}$	$0,016 \pm 0,02 \text{ min}^{-1}$	$0,063 \pm 0,02 \text{ min}^{-1}$
$k_{in}$	$1,8 \pm 0,7 \text{ } \mu\text{L min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$	$1,4 \pm 0,3 \text{ } \mu\text{L min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$

In Abb. 51 ist die E3S-Akkumulation nach einer langen Inkubationsphase auch erhöht. Durch die Substitution aller Chloridsalze kam es zu einer 3-fachen Erniedrigung von  $k_{out}$  bei der E3S-Akkumulation (Tabelle 18).  $k_{in}$  war nicht betroffen. Ein entgegengesetzten Effekt wurde bei der Harnsäureakkumulation beobachtet. Die Akkumulation war signifikant erniedrigt.  $k_{out}$  war 4-fach erhöht, während  $k_{in}$  ähnlich blieb.

Für die Analyse des Glutamateffluxes wurden hinsichtlich der Chloridabhängigkeit die Zellen im Puffer mit und ohne Chloridsubstitution inkubiert (2.2.4.3.3, Seite 53). Es wurde das freigesetzte Glutamat im Überstand bestimmt. Im Standardpuffer ist ein 2,5-facher Unterschied zwischen induzierter und nicht-induzierter SLC22A11-Expression in der Glutamateffluxgeschwindigkeit zu beobachten (Abb. 52, Tabelle 19). Durch die Chloridsubstitution ist kein Unterschied in der Glutamateffluxgeschwindigkeit zwischen ein- und ausgeschalteter SLC22A11-Expression vorhanden.

## Ergebnisse

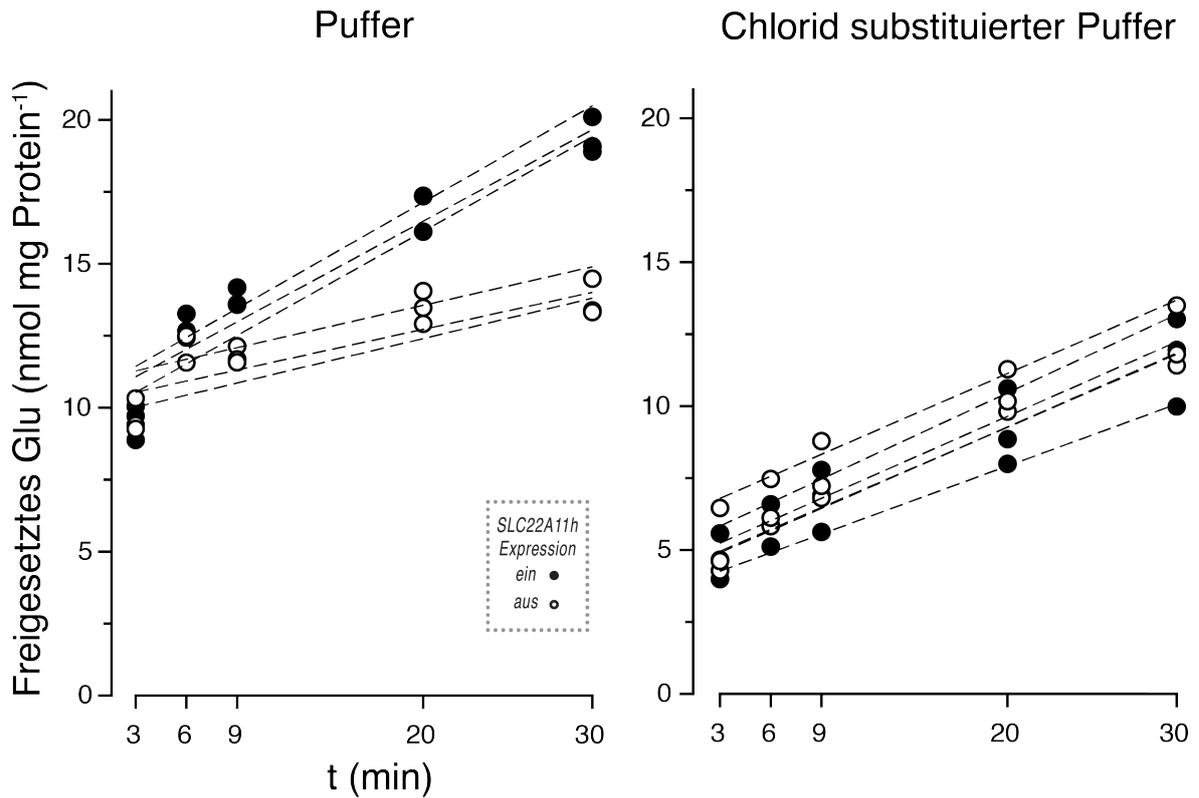


Abb. 52 Chlorid-Abhängigkeit des Glutamateffluxes von SLC22A11

Stabil transfizierte 293-Zellen wurden mit Standardpuffer oder mit Chlorid-substituierten Puffer gewaschen, inkubiert. Pro Schälchen wurden Überstandsproben bei 3, 6, 9, 20, 30 min entnommen. Der Glutamatgehalt wurde mittels LC-MS/MS bestimmt. Eine lineare Regression wurde für jedes Schälchen durchgeführt. (n=3).

Tabelle 19 Chloridabhängigkeit des Glutamateffluxes beim SLC22A11

KRH-Puffer:	Glutamateffluxgeschwindigkeit	
	Standard	Chlorid-substituiert
induzierte SLC22A11-Expression	0,328 ± 0,005 nmol min <sup>-1</sup> mg Protein <sup>-1</sup>	0,247 ± 0,017 nmol min <sup>-1</sup> mg Protein <sup>-1</sup>
nicht-induzierte SLC22A11-Expression	0,134 ± 0,003 nmol min <sup>-1</sup> mg Protein <sup>-1</sup>	0,257 ± 0,001 nmol min <sup>-1</sup> mg Protein <sup>-1</sup>

### 3.11 SLC22A11 vermittelte Equilibriumakkumulation

Der Transporterumsatz führt zum Equilibrium zwischen intra- und extrazellulärem Substrat nach langer Inkubation. Entsprechend vorherigen Resultaten bei der zeitlichen Akkumulation von Harnsäure, E3S und 6CF wurden die jeweiligen Zeitpunkte für die entsprechende Akkumulation im Equilibrium gewählt (Abb. 37, 38, 42). Stabil transfizierte 293-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentration von Harnsäure (für 1h), E3S (für 30min) und 6CF (für 1h) im Aufnahmepuffer inkubiert (2.2.4.4.2, Seite 56). Nach Waschung und Zelllyse wurde die Analytkonzentration per LC-MS/MS bestimmt.

Bei Harnsäure und 6CF ist eine lineare SLC22A11-vermittelte Zunahme der Akkumulation im Equilibrium zu beobachten (Abb. 53). Im Gegensatz dazu kommt es bei E3S zur einer Limitierung der Akkumulation (hyperbolische Kurve).

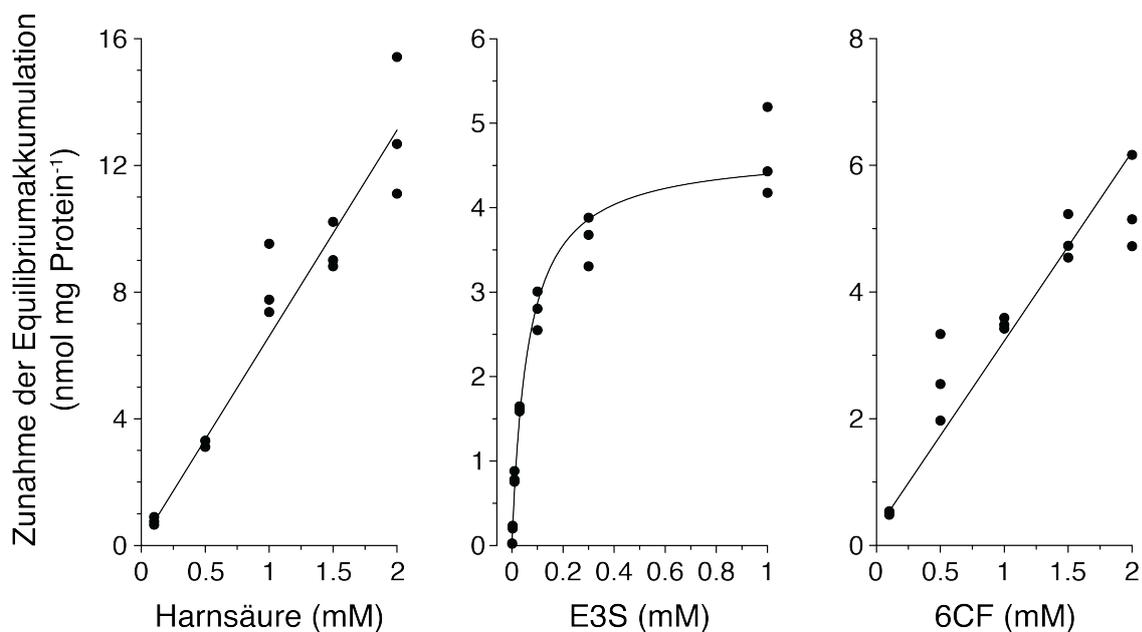


Abb. 53 Equilibriumakkumulation von Harnsäure, E3S und 6CF

Mit SLC22A11 transfizierte 293-Zellen wurden mit angegebenen Konzentrationen von Harnsäure (für 1h), E3S (für 30min) und 6CF (für 1h) inkubiert. Nach Zelllyse wurde die Analytkonzentration per LC-MS/MS bestimmt. Der jeweilige Hintergrund der Kontrollzellen wurde subtrahiert. (n=3), modifiziert aus [115].

## 4 Diskussion

Nur in Menschen und höheren Primaten wird SLC22A11 im proximalen Tubulus auf der apikalen Seite der Niere sowie in der Plazenta exprimiert [20, 42, 49, 50]. SLC22A11 transportiert Harnsäure [52]. Erhöhte Harnsäurespiegel im menschlichen Blut führen zu Gicht und sind mit anderen Krankheiten, wie Hypertonie und Diabetes, assoziiert. Des Weiteren wurde ein E3S-Transport für SLC22A11 berichtet [43]. E3S hat keine östrogenartige Aktivität und dient im Menschen als Langzeitreservoir. Es wird im Menschen zum wichtigen Hormon, dem Estron, umgewandelt und umgekehrt. E3S ist ein atypisches Molekül hinsichtlich seiner Struktur im Vergleich zu anderen Substraten der SLC22-Familie (Abb. 11). Bemerkenswert ist, dass zuzüglich zu SLC22A11 18 weitere Transporter aus unterschiedlichsten Familien beschrieben wurden, welche E3S aufnehmen können (Tabelle 2). In den meisten Veröffentlichungen wird nur E3S als Referenzsubstrat für SLC22A11 genutzt (4.2.1, Seite 108). Aufgrund der Bedeutsamkeit von E3S und Harnsäure war der Fokus dieser Arbeit, den Transportmechanismus beider Verbindungen zu vergleichen.

### 4.1 Glutamat- und Aspartatefflux von SLC22A11

Die SLC22A11-Expression in 293-Zellen resultiert in einem starken Efflux von Glutamat (Abb. 35) und Aspartat (Abb. 36). Eine Aufnahme beider Substanzen durch SLC22A11 ist nicht nachgewiesen (Abb. 33, 34). Entsprechend ist der Glutamat- und Aspartattransport unidirektional. Die Transporteffizienz ist für Glutamat höher als für Aspartat beim SLC22A11. Dieses Charakteristikum ist umgekehrt auch beim SLC22A13 vorhanden (Aspartat > Glutamat) [14].

In einer jüngst veröffentlichten Publikation wurde erstaunlicherweise in *Xenopus*-Oozyten, welche mit  $^{14}\text{C}$ -Glutamat vorbeladen wurden, kein Efflux vom intrazellulären  $^{14}\text{C}$ -Glutamat durch SLC22A11 berichtet [118]. Dies könnte an der Verwendung von  $\text{Na}^+$ -haltigen Puffer liegen, welcher eine endogene Aufnahme analog zum EAAT1 begünstigt und einen Efflux maskiert. Ebenso wurde ein transstimulierender Effekt bei sehr hohen Konzentrationen von E3S (10 mM bzw. 20 mM) und Bromosulphothalein (BSP, 20 mM) auf den Glutamatefflux gezeigt [118]. Dies widerspricht anderen Publikationen, in welchen BSP neben Probenecid als

Inhibitor für SLC22A11 verwendet wird [43, 56, 119]. Des Weiteren hat in Experimenten die Verwendung einer radioaktiv-markierten Verbindung zur Detektion Nachteile gegenüber LC-MS/MS Bestimmungen. Wenn die Verbindung metabolisiert wird, erfolgt keine Differenz bei der Detektion der Radioaktivität zwischen der Ursprungsverbindung und der verstoffwechselten Verbindung. Glutamat ist Bestandteil des cytosolischen Metabolismus. Aus diesem Grunde ist bei Glutamateffluxanalysen in dieser Arbeit eine spezifische Detektion per LC-MS/MS zu bevorzugen.

Des Weiteren wurde erstmalig ein pH-abhängiger Glutamatefflux analysiert und demonstriert (Abb. 48). Die Glutamateffluxgeschwindigkeit steigt von pH 6,2 zu 8,6. Dies ist entgegengesetzt zu einer anderen Veröffentlichung, in welcher die E3S-Akkumulation mit sinkendem pH zunimmt (bei pH 7,4 100% E3S-Akkumulation, bei pH 5,5 156 %) [52]. Für Perfluorooctanoat (PFO) wurde ebenfalls eine Steigerung der Akkumulation bei sinkendem pH demonstriert (pH 8 zu 5: 250 % Akkumulation) [56](Abb. 56). PFO akkumuliert ähnlich schnell wie E3S in Chinese Hamster Ovary (CHO)-Zellen mit SLC22A11 (Equilibrium für PFO nach ca. 30 s, für E3S nach ca. 20 s, Anhang [56]). Die Auswirkungen von PFO auf den Glutamatefflux beim SLC22A11 sind nicht erforscht. Außerdem ist PFO kein physiologisches Substrat. Der gesteigerte Glutamatefflux bei erhöhtem pH könnte zur einer verminderten E3S-Akkumulation führen.

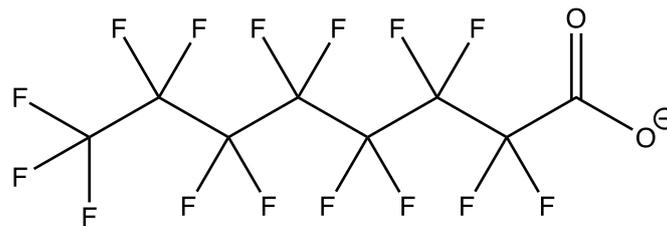


Abb. 54 Perfluorooctanoate

Struktur von Perfluorooctanoate unter physiologischen Bedingungen (pH 7,4).

## 4.2 Harnsäure vs E3S

Hauptsächlich wird E3S als Referenzsubstrat bei SLC22A11-Studien verwendet. Des Weiteren ist die Studienlage zu SLC22A11 und Harnsäure als Substrat rar [52]. Deshalb sind detaillierte Studien, bei denen Harnsäure und E3S direkt verglichen werden, nicht vorhanden.

#### 4.2.1 Akkumulation und Freisetzung

E3S wird viel schneller mittels SLC22A11 in 293-Zellen akkumuliert und freigesetzt als Harnsäure (Abb. 37, 38). Aus diesem Grunde wird E3S gegenüber der Harnsäure als Referenzsubstrat für SLC22A11 verwendet [52, 113, 120]. Der ermittelte  $K_m$ -Wert ( $8,8 \pm 0,9 \mu\text{M}$ ) für E3S steht in Einklang mit früheren Studien ( $1,01 - 38,1 \mu\text{M}$  [43, 56, 121-124], Abb. 39). Die Affinität eines Substrats zu einem Transporter beweist keinen unterschiedlichen Transportmechanismus für beide Substanzen. Aus diesem Grunde müssen weitere Konditionen (siehe unten) analysiert werden.

#### 4.2.2 Transeffekte auf den Glutamatefflux

Extrazelluläre Harnsäure hat keinen Einfluss auf den SLC22A11-vermittelten Glutamatefflux. Dagegen inhibiert E3S diesen vollständig (Abb. 43, Abb. 55 B). Das Fehlen einer Transstimulation durch Harnsäure kann durch den Transportmechanismus begründet werden, bei dem der Glutamateffluxschritt langsamer ist als die Umkehrung des unbeladenen bzw. mit Harnsäure beladenen Transporter (Abb. 55 A, C). Würde E3S denselben Transportmechanismus verwendet, dürfte der Glutamatefflux nicht inhibiert sein, da die E3S-Aufnahme 20-fach schneller ist als die Harnsäureaufnahme. Die zu E3S strukturähnliche Substanz DHEAS inhibiert ebenso den Glutamatefflux (Abb. 44).

## Diskussion

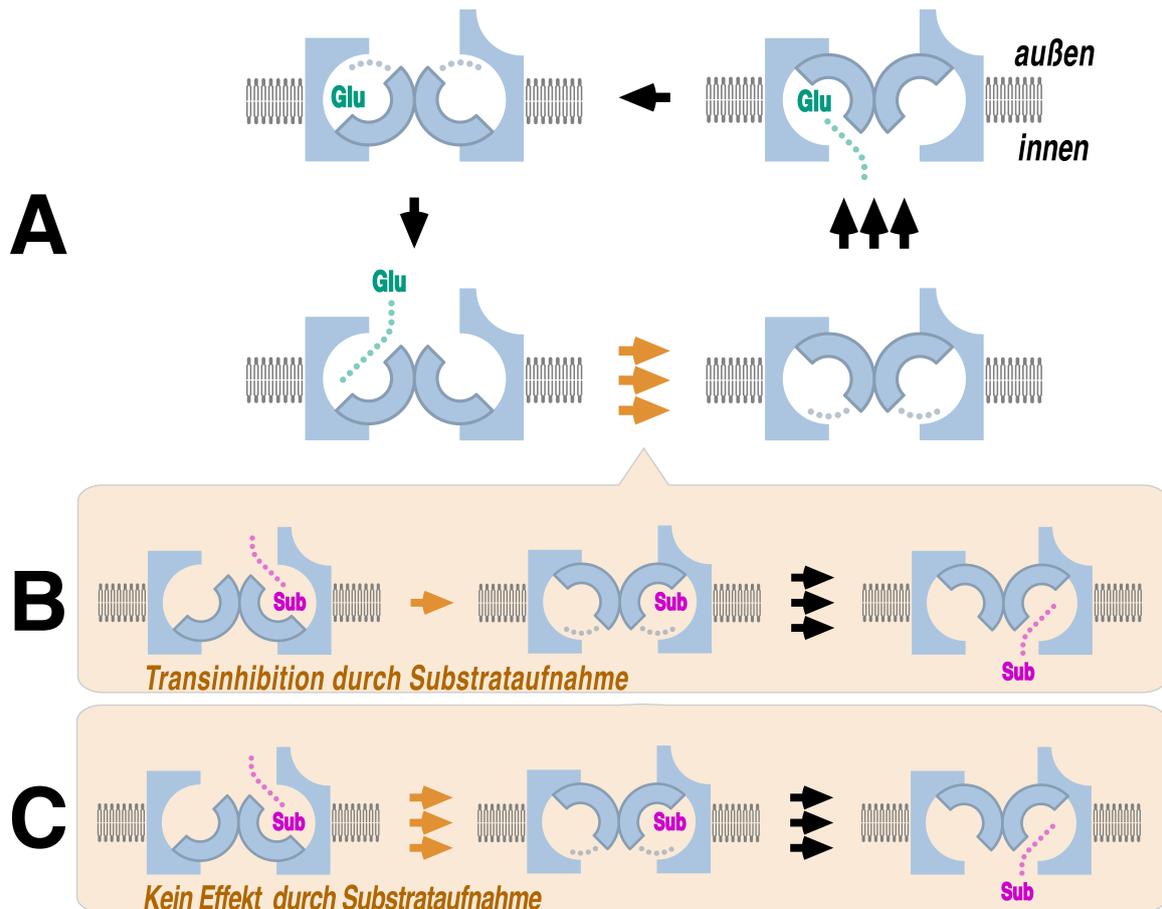


Abb. 55 Transeffekte auf den Glutamatefflux

(A) Glutamat wird vom Zellinneren nach außen durch Konformationsänderung des Transporters transportiert. Um ein weiteres Molekül Glutamat innen aufnehmen zu können, muss der Transporter erneut seine Konformation ändern (Rückstellung). Dieser Schritt ist schneller und kann durch ein anderes Substrat von der gegenüberliegenden Seite (trans) bzw. von außen, beeinflusst werden. (B) Bei einer Transinhibition verlangsamt das Substrat die Konformationsänderung. (C) Das Substrat hat keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Rückstellung. Glu: Glutamat, Sub: Substrat. Pfeilanzahl entspricht der Geschwindigkeit (je mehr, desto schneller).

Der  $IC_{50}$  von E3S ( $3,5 \pm 0,8 \mu\text{M}$ , Abb. 45) und Probenecid ( $21,4 \pm 6,3 \mu\text{M}$ , Abb. 46) bezogen auf den Glutamatefflux wurde nie in vorherigen Studien bestimmt. Die inhibitorische Potenz von E3S ist 6-fach stärker als Probenecid. Dies kann an der stärkeren Affinität von E3S zu SLC22A11 liegen. Probenecid ist ein bekannter Inhibitor für SLC22A11 [43, 52, 124-128]. In S2 SLC22A11-Zellen wurde der  $K_i$  von Probenecid auf die E3S-Aufnahme durch Inkubation mit  $200 \mu\text{M}$  Probenecid und unterschiedlichen E3S-Konzentrationen analysiert ( $55 \pm 3 \mu\text{M}$ )

[127]. Jedoch ist diese Publikation mit dieser Arbeit aufgrund der unterschiedlichen Konditionen nicht vergleichbar. Ebenso ist die Hemmung der Harnsäureakkumulation bei gleichzeitiger E3S-Akkumulation mit der Transinhibition des Glutamateffluxes durch E3S nicht direkt vergleichbar (Abb. 47). Bei der gleichzeitigen Akkumulation von Harnsäure und E3S kann es sich um einen kompetitiven Mechanismus handeln. Nichtsdestotrotz nutzt SLC22A11 aufgrund der Transinhibition einen anderen Transportmechanismus für E3S im Vergleich zur Harnsäure und Glutamat.

### **4.2.3 Transeffekt von DHEAS auf E3S und Harnsäure**

Die E3S-Freisetzung wird signifikant durch extrazelluläres DHEAS transstimuliert, wohingegen die Harnsäurefreisetzung blockiert wird (Abb.49). Dies bedeutet, dass der E3S-Effluxschritt schneller ist als die Rückstellung des unbeladenen Transporters (Abb. 14). Selbst bei Zellen, welche mit beiden Substanzen (E3S und Harnsäure) vorbeladen sind, transstimuliert DHEAS nur die E3S-Freisetzung (Abb. 50). Dieser Befund wird durch eine andere Publikation unterstützt, in welcher demonstriert wurde, dass DHEAS die Freisetzung von E3S in mit SLC22A11 transfizierten CHO-Zellen stimuliert [129]. Die unterschiedlichen Effekte von DHEAS auf Harnsäure und E3S sind ein weiterer Hinweis für unterschiedliche Transportmechanismen dieser Substanzen beim SLC22A11.

### **4.2.4 Auswirkungen einer Chloridsubstitution**

In einer früheren Publikation wurde eine erhöhte E3S-Akkumulation durch eine Chloridsubstitution im Aufnahmepuffer demonstriert. Dabei wurde nur bei einem Zeitpunkt gemessen [52]. Die Daten dieser Arbeit stimmen damit überein. Jedoch gibt es keine Literatur hinsichtlich der Analyse einer Chloridsubstitution auf die Harnsäureakkumulation sowie auf den Glutamatefflux durch SLC22A11. Durch die Chloridsubstitution kommt es zu einer Steigerung der E3S-Akkumulation im Equilibrium (Abb. 51). Im Gegensatz dazu wird die Harnsäureakkumulation sowie der Glutamat-Efflux durch die Substitution vermindert (Abb. 52).  $k_{in}$  wird bei der Harnsäureakkumulation nicht verändert. Dem entsprechend wird Chlorid

nicht als Austauschkanion bei der Aufnahme benötigt. Durch die Chloridsubstitution kommt es zu einem verminderten Glutamatefflux sowie zu einer verminderten Harnsäureakkumulation, bei E3S zum gegenseitigen Effekt.

#### 4.2.5 Zusammenfassung der Unterschiede

Die E3S-Akkumulation ist 20-fach schneller als von Harnsäure. Dies ist kein Hinweis für einen unterschiedlichen Transportermechanismus. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es folgende Hinweise für einen unterschiedlichen Transportmechanismus gibt: (1) E3S inhibiert im Gegensatz zur Harnsäure den Glutamatefflux, (2) DHEAS stimuliert den E3S-Efflux und inhibiert den Harnsäureefflux, (3) die E3S-Akkumulation nimmt durch eine Chloridsubstitution des Aufnahmepuffers zu. Die Harnsäureakkumulation nimmt ab (Tabelle 20).

Tabelle 20 Zusammenfassung der Unterschiede zwischen E3S und Harnsäure

Kondition	E3S	Harnsäure
Akkumulation	$k_{in} = 40 \pm 6 \mu\text{L min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$	$k_{in} = 2,0 \pm 0,2 \mu\text{L min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$
Glutamatefflux	Inhibition $IC_{50} 3,5 \pm 0,8 \mu\text{M}$	keine Inhibition
Transeffekt von DHEAS	Stimulation der E3S-Effluxes	Inhibition des Harnsäureeffluxes
Chloridsubstitution	Steigerung der E3S-Aufnahme ( $k_{out} \uparrow$ )	Abnahme der Harnsäureaufnahme ( $k_{out} \downarrow$ )

### 4.3 Akkumulation im Equilibrium

Nach langer Inkubationsphase kommt es beim Transporterumsatz zum Equilibrium zwischen intra- und extrazellulären Substratkonzentration. Bei der graphischen Darstellung der intrazellulären Akkumulation als Funktion der extrazellulären Substratkonzentration wird ein lineares Verhältnis erwartet. Dieses ist z.B. beim Ergothionein und dem Ergothioneintransporter (interne und unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe: Daten nicht gezeigt) sowie bei der Paraaminohippursäure (PAH) und dem humanen OAT1 gegeben (Abb. 56).

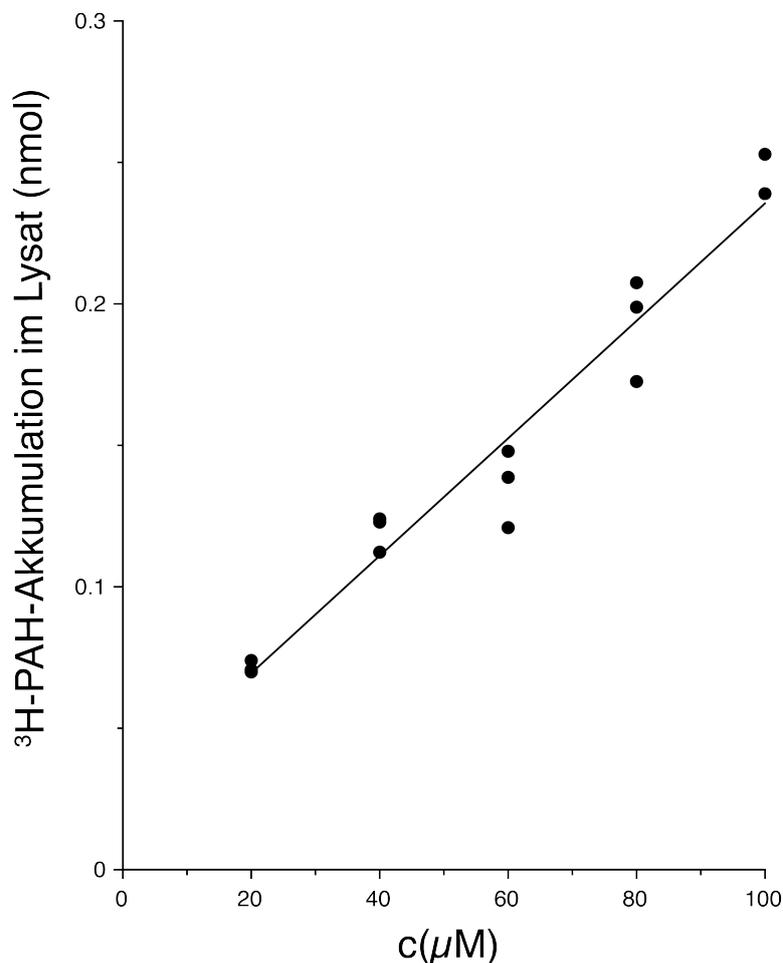


Abb. 56 PAH Akkumulation im Equilibrium durch den humanen OAT1

In OAT1h stabil transfizierte 293-Zellen wurde durch Inkubation ohne und mit Doxycyclin die Expression aus- bzw. eingeschaltet. Die Aufnahme erfolgt bei unterschiedlichen  $^3\text{H}$ -PAH-Konzentrationen 30 min lang. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und lysiert. Die  $^3\text{H}$ -PAH-Konzentration wurde im Lysat mittels Szintillationszähler analysiert. PAH: Paraaminohippursäure. (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe, durchgeführt von Samira Boussettaoui, n=3).

## Diskussion

Beim SLC22A11 wurde dieses lineare Verhältnis für die Substrate Harnsäure und 6CF demonstriert. Für E3S war eine lineare Anpassung nicht möglich, sondern nur eine hyperbolische (Abb. 53). Es ist eindeutig eine Limitierung der E3S-Akkumulation zu beobachten.

Dies kann z.B. durch eine Bindung an den Transporter entstehen, welches durch eine Kalkulation überprüfbar ist (Gleichung 11). Hinsichtlich einer E3S-Mizellenbildung wurden keine Veröffentlichungen gefunden. Mittels einer E3S-Mizellenbildung könnten mehrere E3S-Moleküle an einen Transporter binden. Für die folgende Berechnung wurde eine einfache Bindung angenommen, ein E3S-Molekül pro Transporter:

Gleichung 11 Berechnung einer möglichen E3S-Bindung an SLC22A11

$$\begin{aligned} B_{max} &= 5 \frac{nmol}{mg \text{ Protein}} \leftrightarrow \frac{5 * 10^{-9} mol}{mg \text{ Protein}} \\ &= \frac{5 * 10^{-9} * 6,022 * 10^{23} \text{ Moleküle}}{mg \text{ Protein}} \\ &\leftrightarrow \frac{3,011 * 10^{15} \text{ Moleküle}}{mg \text{ Protein}} \end{aligned}$$

Aus vorangegangenen Analysen innerhalb der Arbeitsgruppe entspricht 1 mg Protein  $10^7$  Zellen.

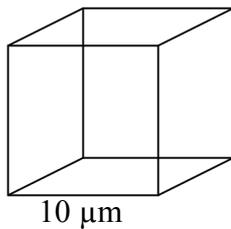
$$\frac{3,011 * 10^{15} \text{ Moleküle}}{10^7 \text{ Zellen}} = 3,011 * 10^8 \frac{\text{Moleküle}}{\text{Zelle}}$$

Bei einer einfachen Bindung würde eine Zelle  $3 \times 10^8$  Transporter exprimieren. Dies ist unrealistisch, da es im Vergleich zur Literaturdaten überexprimierter Systeme 1000 x höher wäre. Der Noradrenalintransporter wird in LLC-PK<sub>1</sub> Zellen  $0,4 \times 10^5$ -mal exprimiert, Glukosetransporter in Erythrozyten  $2 \times 10^5$ , Serotonintransporter in 293-Zellen  $4 \times 10^5$  (bestes Expressionssystem innerhalb der Studie) [130-132]. Des Weiteren ist die E3S-Aufnahme von der SLC22A11-Aktivität abhängig, da bei 4 °C keine transportervermittelte Akkumulation stattfindet (Abb. 40). Humane Transporter und Zellsysteme benötigen Energie.

Alternativ ist die limitierte E3S-Akkumulation durch die Anreicherung in einem kleineren Kompartiment als dem Cytosol erklärbar: der Plasmamembran. Das Volumen der

## Diskussion

Plasmamembran ist im Vergleich zum Volumen des Cytosol nicht vernachlässigbar. Das durchschnittliche Volumen einer kultivierten Zelle beträgt ca. 1000 fl (1 fl = 1  $\mu\text{m}^3$ ) [133]. Zwecks Veranschaulichung entspricht dies einem Kubus mit 10  $\mu\text{m}$  Kantenlänge und 600  $\mu\text{m}^2$  Oberfläche. Mit 4 nm Zellmembrandicke ergibt sich ein Membranvolumen von 2,4  $\mu\text{m}^3$  (Abb. 57).



$$600 \mu\text{m}^2 \text{Oberfläche} \times 0,004 \mu\text{m Membrandicke} \\ = 2,4 \mu\text{m}^3 \text{Membranvolumen}$$

Abb. 57 Membranvolumen

Bei Vernachlässigung intrazellulärer Kompartimente sowie cytosolischer und membranständiger Proteine ist das cytosolische Volumen  $\sim 415$  fach größer. Entsprechend beträgt das Membranvolumen 0,24 % des cytosolischen Volumens. Das Membranvolumen bietet somit Kapazität z.B. für die Akkumulation hydrophober Substraten.

Reguläre Substrate, welche ins Cytosol translokiert werden, würden ein Akkumulationslimit im Equilibrium erst bei viel höher intrazellulären Konzentrationen erreichen. Harnsäure wird dieses Akkumulationslimit aufgrund der Löslichkeit nicht erreichen (1.2).

Die Experimente dieser Arbeit zeigten, dass SLC22A11 die E3S-Insertion in die Plasmamembran katalysiert. Aufgrund der hydrophoben Steroidstruktur kann E3S leicht in die Membran integriert werden und sich lateral bewegen, ähnlich wie Cholesterol, unter der Voraussetzung, dass der hydrophile Sulfatrest nicht in die Membran gerichtet ist. Die E3S-Freisetzung ist auch durch SLC22A11 vermittelt. Durch die Transstimulation der E3S-Freisetzung mittels DHEAS kann dies erläutert werden (Abb.49, 50), da es sich bei einer Transstimulation um einen aktiven Transport handelt. SLC22A11 inseriert E3S in die Plasmamembran und translokiert Harnsäure ins Cytosol.

#### 4.4 E3S als Substrat

E3S ist ein besonderes Substrat für SLC22A11 aufgrund der Membraninsertion im Vergleich zur Harnsäure. Des Weiteren erklärt dies die unterschiedlichen Konditionen beim Transportmechanismus verglichen mit Harnsäure, 6CF und Glutamat, welche experimentell belegt wurden.

Es ist vorstellbar, dass E3S mit dem Transporter interagiert, leicht in den Transporter bewegt wird und seitlich durch einen hydrophoben Spalt in die Membran inseriert wird. Tatsächlich gibt es Hinweise von Interaktionen hydrophober Substanzen mit Transmembransegmenten. Nach Strukturanalysen interagiert Cholesterol mit den Transmembransegmenten des Dopamintransporters (DAT) in *Drosophila melanogaster* (Abb. 58) [134].

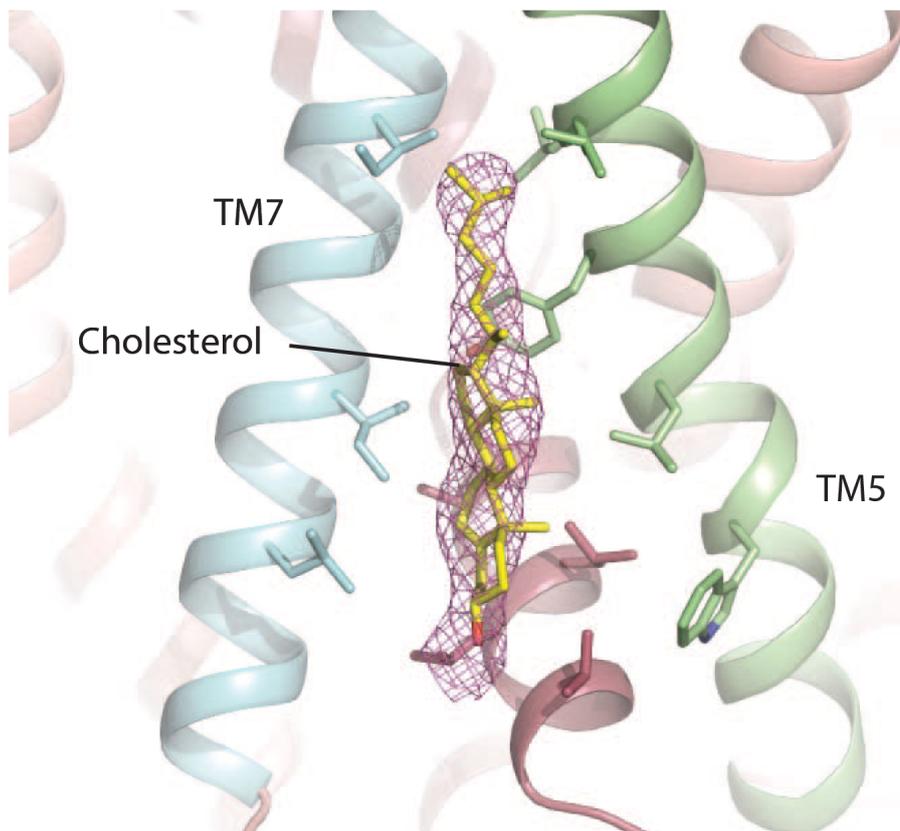


Abb. 58 Dopamintransporter mit Cholesterol

Cholesterol interagiert mit Transmembransegment (TM) 5 & 7 des *Drosophila melanogaster* Dopamintransporters. Dargestellt ist die Kristallstruktur. Modifiziert nach [134]

## Diskussion

Dieser Mechanismus könnte auf einem einfachen Strukturmotiv basieren und erklären, warum E3S bei vielen nicht verwandten und unterschiedlichen Transportern als Substrat berichtet wurde. Des Weiteren gibt es Hinweise, dass E3S ein atypisches Substrat ist [83, 135]. In MDCKII Zellen wurde der Transporter OATP4C1 analysiert. Hierbei wurden die Zellen mit  $^3\text{H}$ -E3S oder  $^3\text{H}$ -Digoxin mit verschiedenen Digoxin- bzw. E3S-Konzentrationen inkubiert (Abb. 59)[83]. Digoxin ist ein typisches Substrat von OATP4C1 [136-138]. Mit steigender Digoxinkonzentration wurde eine Abnahme der E3S-Akkumulation demonstriert (Abb. 59 A), umgekehrt jedoch nicht (B). Die Autoren schlussfolgern, dass E3S an einer anderen Bindungsstelle als Digoxin bei OATP4C1 bindet.

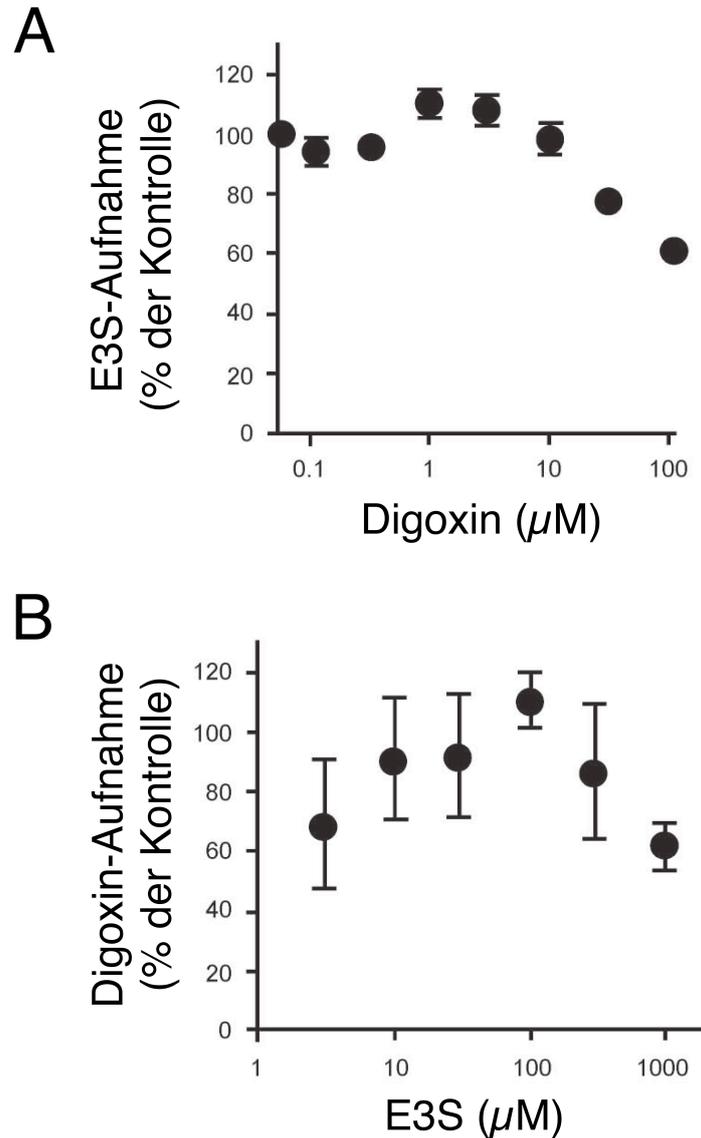


Abb. 59 E3S- und Digoxinaufnahme bei OATP4C1

Mit OAPT4C1 transfizierte MDCKII Zellen und Kontrollzellen wurden mit 8,7 nM  $^3\text{H}$ -E3S oder 42,6 nM  $^3\text{H}$ -Digoxin für 2 min mit verschiedenen Digoxin- bzw. E3S-Konzentrationen inkubiert. Die unspezifische Aufnahme der Kontrollzellen wurde subtrahiert. Mittelwert  $\pm$  SEM. n = 3. Modifiziert nach [83].

In SER-Vesikel (engl. smooth endoplasmic reticulum, glattes ER) aus Hepatozyten der Ratte wurde die Aufnahme für E3S, Taurocholat und Estradiol-17 $\beta$ -glucuronid (E17 $\beta$ G) mittels Osmolaritätsplots untersucht [135]. Hierbei wurde die extravesikuläre Osmolarität durch Steigerung der Sucrosekonzentration erhöht. Dies resultierte in einer geänderten Geschwindigkeit beim Substrattransporter. Durch Erhöhung der Osmolarität wurde die Taurocholat und E17 $\beta$ G-Akkumulation vermindert (Abb. 60 B, C). Die E3S-Akkumulation

blieb unverändert (Abb. 60 A). Die Autoren sahen als eine mögliche Erklärung eine partielle E3S-Insertion in die Vesikelmembran.

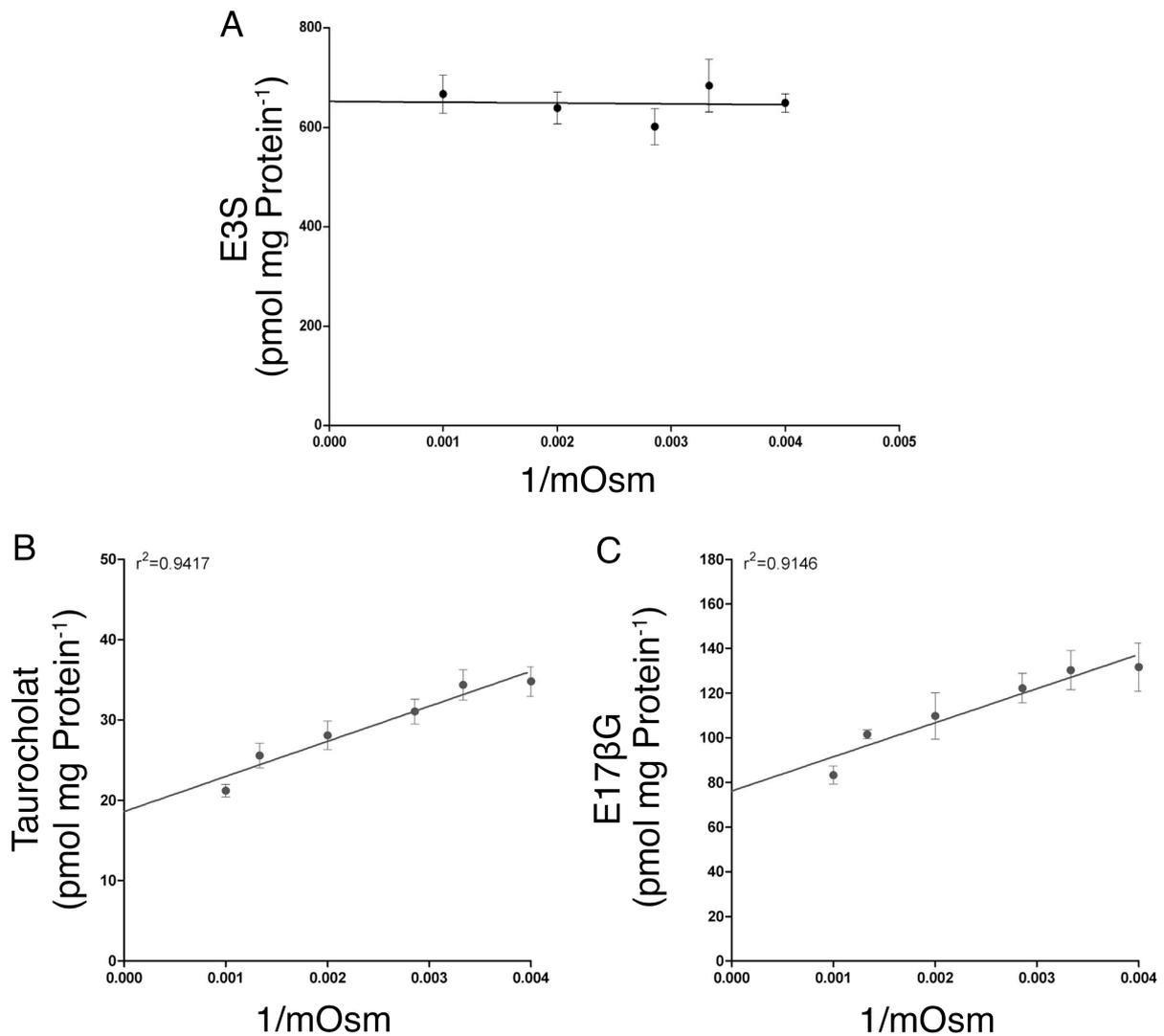


Abb. 60 E3S-, Taurocholat- und E17βG-Akkumulation in ratSER-Vesikel

Die Akkumulation von E3S (5 μM), Taurocholat (1 μM) und E17βG (5 μM) über 10 min bei 37 °C wurde mittels Osmolaritätsplots in SER-Vesikel (engl. smooth ER, glattes ER) aus Hepatozyten der Ratte untersucht. Die extravesikuläre Osmolarität (Osm) wurde durch Zugabe von Sucrose (50 – 800 mM) erhöht. Mittelwert ± SD, modifiziert nach [135].

## 4.5 Fazit

In dieser Arbeit konnte eindeutig ein unidirektionaler Glutamat- und Aspartatefflux mittels SLC22A11 demonstriert werden. Des Weiteren wurden essentielle Unterschiede im

Transportmechanismus von E3S und Harnsäure dargestellt. Aufgrund der nicht linearen E3S-Akkumulation im Equilibrium wird geschlossen, dass E3S nicht ins Cytosol transportiert wird, im Gegensatz zur Harnsäure. SLC22A11 katalysiert die Insertion und Extraktion von E3S in die Plasmamembran (Abb. 61).

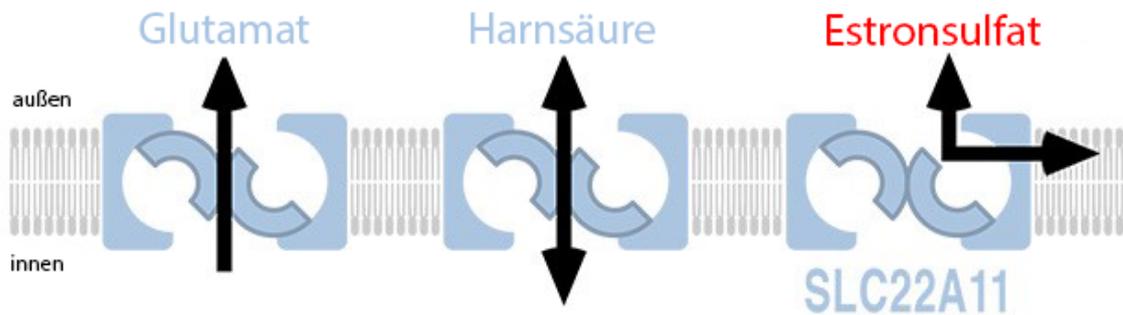


Abb. 61 Graphische Zusammenfassung  
Modifiziert aus [115].

## 4.6 Ausblick

Es wurden unterschiedliche Transportmechanismen für E3S und Harnsäure beim SLC22A11 in dieser Arbeit demonstriert. Des Weiteren wird u.a. aufgrund der limitierten E3S-Akkumulation und der E3S-Struktur angenommen, dass SLC22A11 E3S in die Membran inseriert. Ein direkter Nachweis von E3S in der Plasmamembran fehlt jedoch. Ein mögliches Verfahren wäre z.B. durch eine Extraktion der Membran nach Inkubation mit E3S und anschließender Beschichtung der Membranfragmente durch Nanopartikel [139-141]. Im Gegensatz zu anderen Membranextraktionsverfahren [142, 143] wird bei diesem Verfahren eine Dichtezentrifugation nicht zwingend durchgeführt. Angemerkt sei hierbei jedoch, dass sowohl die Insertion als auch Extraktion von E3S durch SLC22A11 schnell vermittelt wird. Dies sollte bei der Methodenwahl berücksichtigt werden, um sicherzustellen, dass der Transporter inaktiv und die Verfahrensdauer kurz ist. Durch Labelling mittels eines Fluoreszenzmoleküls mit E3S könnte eine visuelle Bestätigung erfolgen [144]. Jedoch jegliche Änderungen an der E3S-Molekülstruktur könnten Änderung in der Interaktion mit SLC22A11

## Diskussion

zu Folge haben. Des Weiteren wäre eine Kristallstruktur von SLC22A11 in Interaktion mit E3S vorteilhaft.

Neben SLC22A11 wurden mindestens 18 Transporter aus verschiedenen Familien postuliert, welche E3S als Substrat aufnehmen (Tabelle 2, Seite 30). Aufgrund der in dieser Arbeit dargestellten Transportunterschiede wäre vielleicht eine weitere detailliertere Begutachtung dieser 18 Transporter sinnvoll. Dies sollte im Vergleich zu anderen Referenzsubstraten dieser Transporter durchgeführt werden.

## 5 Zusammenfassung

Estronsulfat alias Estron-3-sulfat (E3S) ist wesentlich größer und hydrophober als andere typische Substrate der SLC22-Familie. Des Weiteren ist es verwunderlich, dass über 18 weitere Transporter aus unterschiedlichen Familien berichtet wurde, welche E3S transportieren. Deshalb wurde der Transportmechanismus von E3S durch SLC22A11 (OAT4) im direkten Vergleich zur Harnsäure, einem wichtigen physiologischen Substrat, hinterfragt. Die Expression von SLC22A11 in humanen 293-Zellen resultierte in einem starken unidirektionalen Glutamat- und Aspartatefflux. Die E3S-Aufnahme war 20-fach schneller als die Harnsäureaufnahme. Der Glutamatefflux wird durch extrazelluläres E3S inhibiert, jedoch nicht durch Harnsäure. Außerdem ist der Glutamatefflux pH-abhängig. Nach Vorbeladung wurde der E3S-Efflux durch extrazelluläres Dehydroepiandrosteronsulfate (DHEAS) transstimuliert, jedoch nicht die Harnsäure- oder 6-Carboxyfluoresceinfreisetzung (6CF). Die Equilibriumakkumulation von E3S wurde mittels Chloridsubstitution durch Gluconat 3-fach gesteigert. Der entgegengesetzte Effekt wurde bei der Harnsäureakkumulation und beim Glutamatefflux beobachtet. Diese Resultate demonstrieren, dass SLC22A11 einen unterschiedlichen Transportmechanismus für Harnsäure und E3S nutzt. Daher sollte E3S nicht als Referenzsubstanz bei der Charakterisierung von SLC22A11 genutzt werden. Des Weiteren war bei Equilibriumexperimenten die transportervermittelte Akkumulation von Harnsäure und 6CF linear. Im Gegensatz dazu war die E3S-Akkumulation bei gleichen Konzentrationen hyperbolisch. Dies legt dar, dass SLC22A11 E3S in ein kleineres Kompartiment inseriert: die Plasmamembran. Die Datenlage unterstützt, dass SLC22A11 ebenso E3S aus der Membran extrahiert.

## 6 Abstract

Estrone sulfate alias estrone-3-sulfate (E3S) is considerably larger and much more hydrophobic than typical substrates of SLC22 transporters. It is puzzling that many otherwise unrelated transporters have been reported to transport E3S. Here we scrutinized the mechanism of transport of E3S by SLC22A11 (alias OAT4), by direct comparison with uric acid (UA), an important physiological substrate. Heterologous expression of SLC22A11 in human 293 cells gave rise to a huge unidirectional efflux of glutamate (Glu) and aspartate, as determined by LC-MS/MS. The uptake of E3S was 20-fold faster than the uptake of UA. Yet, the outward transport of Glu was inhibited by extracellular E3S, but not by UA. In addition, the efflux of Glu is pH-dependent. After preloading the release of E3S was trans-stimulated by extracellular dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS), but neither by UA nor 6-carboxyfluorescein (6CF). The equilibrium accumulation of E3S was enhanced 3-fold by replacement of chloride with gluconate, but the opposite effect was observed for UA accumulation and Glu efflux. These results establish that SLC22A11 provides entirely different transport mechanisms for E3S and UA. Therefore, E3S must not be used as a substitute for UA to assay the function of SLC22A11. In equilibrium accumulation experiments, the transporter-mediated uptake was a linear function of the concentration of UA and 6CF. By contrast, in the same concentration range the graph for E3S was hyperbolic. This suggests that SLC22A11 inserts E3S into a small volume with limited capacity, the plasma membrane. Our data support the notion that the reverse process, extraction from the membrane, is also catalyzed by the carrier.

(text passages mostly cited [115]).

## 7 Literaturverzeichnis

1. Hediger M.A., Clemencon B., Burrier R.E., Bruford E.A., *The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): introduction*. Molecular Aspects of Medicine, 2013. **34**(2-3): p. 95.
2. Landowski C.P., Suzuki Y., Hediger M.A., *The Mammalian Transporter Families*. Physiology and Pathophysiology, 2008. **1**: p. 91.
3. Brilliant M.H., *The mouse p (pink-eyed dilution) and human P genes, oculocutaneous albinism type 2 (OCA2), and melanosomal pH*. Pigment Cell Research, 2001. **14**(2): p. 86.
4. Klepper J., Willemsen M., Verrips A., Guertsen E., Herrmann R., Kutzick C., Florcken A., Voit T., *Autosomal dominant transmission of GLUT1 deficiency*. Human Molecular Genetics, 2001. **10**(1): p. 63.
5. Hediger M.A., Romero M.F., Peng J.B., Rolfs A., Takanaga H., Bruford E.A., *The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins Introduction*. Pflugers Archiv (European Journal of Physiology), 2004. **447**(5): p. 465.
6. Zhang Y., *I-TASSER server for protein 3D structure prediction*. BMC Bioinformatics, 2008. **9**: p. 40.
7. Yang J., Zhang Y., *I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(W1): p. W174.
8. Yang J., Yan R., Roy A., Xu D., Poisson J., Zhang Y., *The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction*. Nature Methods, 2015. **12**(1): p. 7.
9. Roy A., Kucukural A., Zhang Y., *I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction*. Nature Protocols, 2010. **5**(4): p. 725.
10. Rizwan A.N., Burckhardt G., *Organic anion transporters of the SLC22 family: biopharmaceutical, physiological, and pathological roles*. Pharmaceutical Research, 2007. **24**(3): p. 450.
11. Koepsell H., Endou H., *The SLC22 drug transporter family*. Pflugers Archiv (European Journal of Physiology), 2004. **447**(5): p. 666.
12. Macias R.I., Marin J.J., Serrano M.A., *Excretion of biliary compounds during intrauterine life*. World Journal of Gastroenterology, 2009. **15**(7): p. 817.

13. Ito K., Suzuki H., Horie T., Sugiyama Y., *Apical/basolateral surface expression of drug transporters and its role in vectorial drug transport*. *Pharmaceutical Research*, 2005. **22**(10): p. 1559.
14. Schulz C., Fork C., Bauer T., Golz S., Geerts A., Schomig E., Grundemann D., *SLC22A13 catalyses unidirectional efflux of aspartate and glutamate at the basolateral membrane of type A intercalated cells in the renal collecting duct*. *Biochemical Journal*, 2014. **457**(2): p. 243.
15. Roy A., Al-bataineh M.M., Pastor-Soler N.M., *Collecting duct intercalated cell function and regulation*. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 2015. **10**(2): p. 305.
16. Carraro-Lacroix L.R., Malnic G., *Acid-base transport by the renal distal nephron*. *Journal of Nephrology*, 2010. **23 Suppl 16**: p. S19.
17. Schuster V.L., *Function and regulation of collecting duct intercalated cells*. *Annual Review of Physiology*, 1993. **55**: p. 267.
18. Wagner C.A., Devuyst O., Bourgeois S., Mohebbi N., *Regulated acid-base transport in the collecting duct*. *Pflugers Archiv (European Journal of Physiology)*, 2009. **458**(1): p. 137.
19. Enomoto A., Kimura H., Chairoungdua A., Shigeta Y., Jutabha P., Cha S.H., 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. **417**(6887): p. 447.
20. Ikarashi R., Shibasaki K., Yamaguchi A., *Immunohistochemical studies of organic anion transporters and urate transporter 1 expression in human salivary gland*. *Acta Odontologica Scandinavica*, 2013. **71**(2): p. 312.
21. Hediger M.A., Johnson R.J., Miyazaki H., Endou H., *Molecular physiology of urate transport*. *APS (American Physiological Society) Physiology*, 2005. **20**: p. 125.
22. Eckert R., Randall D., Gurggren W., French K., *Tierphysiologie*. Vol. 4. 2002: Thieme. 915.
23. Oda M., Satta Y., Takenaka O., Takahata N., *Loss of urate oxidase activity in hominoids and its evolutionary implications*. *Molecular Biology and Evolution*, 2002. **19**(5): p. 640.

24. Wu X.W., Muzny D.M., Lee C.C., Caskey C.T., *Two independent mutational events in the loss of urate oxidase during hominoid evolution*. Journal of Molecular Evolution, 1992. **34**(1): p. 78.
25. Wu X.W., Lee C.C., Muzny D.M., Caskey C.T., *Urate oxidase: primary structure and evolutionary implications*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1989. **86**(23): p. 9412.
26. Marchetti M., Liuzzi A., Fermi B., Corsini R., Folli C., Speranzini V., Gandolfi F., Bettati S., Ronda L., Cendron L., Berni R., Zanotti G., Percudani R., *Catalysis and Structure of Zebrafish Urate Oxidase Provide Insights into the Origin of Hyperuricemia in Hominoids*. Scientific Reports - Nature, 2016. **6**: p. 38302.
27. So A., Thorens B., *Uric acid transport and disease*. Journal of Clinical Investigation, 2010. **120**(6): p. 1791.
28. Campion E.W., Glynn R.J., DeLabry L.O., *Asymptomatic hyperuricemia. Risks and consequences in the Normative Aging Study*. American Journal of Medicine, 1987. **82**(3): p. 421.
29. Vargas-Santos A.B., Taylor W.J., Neogi T., *Gout Classification Criteria: Update and Implications*. Current Rheumatology Reports, 2016. **18**(7): p. 46.
30. Richette P., Bardin T., *Gout*. The Lancet, 2010. **375**(9711): p. 318.
31. Winnard D., Wright C., Taylor W.J., Jackson G., Te Karu L., Gow P.J., Arroll B., Thornley S., Gribben B., Dalbeth N., *National prevalence of gout derived from administrative health data in Aotearoa New Zealand*. Rheumatology (Oxford), 2012. **51**(5): p. 901.
32. Zhu Y., Pandya B.J., Choi H.K., *Prevalence of gout and hyperuricemia in the US general population: the National Health and Nutrition Examination Survey 2007-2008*. Arthritis & Rheumatism, 2011. **63**(10): p. 3136.
33. Rothenbacher D., Primatesta P., Ferreira A., Cea-Soriano L., Rodriguez L.A., *Frequency and risk factors of gout flares in a large population-based cohort of incident gout*. Rheumatology (Oxford), 2011. **50**(5): p. 973.
34. Feig D.I., Johnson R.J., *Hyperuricemia in childhood primary hypertension*. Hypertension, 2003. **42**(3): p. 247.
35. Maesaka J.K., Fishbane S., *Regulation of renal urate excretion: a critical review*. American Journal of Kidney Diseases, 1998. **32**(6): p. 917.
36. Lipkowitz M.S., *Regulation of uric acid excretion by the kidney*. Current Rheumatology Reports, 2012. **14**(2): p. 179.

37. Guan M., Zhang J., Chen Y., Liu W., Kong N., Zou H., *High-resolution melting analysis for the rapid detection of an intronic single nucleotide polymorphism in SLC22A12 in male patients with primary gout in China*. Scandinavian Journal of Rheumatology, 2009. **38**(4): p. 276.
38. Dehghan A., Kottgen A., Yang Q., Hwang S.J., Kao W.L., Rivadeneira F., Boerwinkle E., Levy D., Hofman A., Astor B.C., Benjamin E.J., van Duijn C.M., Witteman J.C., Coresh J., Fox C.S., *Association of three genetic loci with uric acid concentration and risk of gout: a genome-wide association study*. Lancet, 2008. **372**(9654): p. 1953.
39. Doring A., Gieger C., Mehta D., Gohlke H., Prokisch H., Coassin S., Fischer G., Henke K., Klopp N., Kronenberg F., Paulweber B., Pfeufer A., Rosskopf D., Volzke H., Illig T., Meitinger T., Wichmann H.E., Meisinger C., *SLC2A9 influences uric acid concentrations with pronounced sex-specific effects*. Nature Genetics, 2008. **40**(4): p. 430.
40. Matsuo H., Yamamoto K., Nakaoka H., Nakayama A., Sakiyama M., Chiba T., Takahashi A., Nakamura T., Nakashima H., Takada Y., Danjoh I., Shimizu S., Abe J., Kawamura Y., Terashige S., Ogata H., Tatsukawa S., Yin G., Okada R., Morita E., Naito M., Tokumasu A., Onoue H., Iwaya K., Ito T., Takada T., Inoue K., Kato Y., Nakamura Y., Sakurai Y., Suzuki H., Kanai Y., Hosoya T., Hamajima N., Inoue I., Kubo M., Ichida K., Ooyama H., Shimizu T., Shinomiya N., *Genome-wide association study of clinically defined gout identifies multiple risk loci and its association with clinical subtypes*. Annals of the Rheumatic Diseases, 2016. **75**(4): p. 652.
41. Vitart V., Rudan I., Hayward C., Gray N.K., Floyd J., Palmer C.N., Knott S.A., Kolcic I., Polasek O., Graessler J., Wilson J.F., Marinaki A., Riches P.L., Shu X., Janicijevic B., Smolej-Narancic N., Gorgoni B., Morgan J., Campbell S., Biloglav Z., Barac-Lauc L., Pericic M., Klaric I.M., Zgaga L., Skaric-Juric T., Wild S.H., Richardson W.A., Hohenstein P., Kimber C.H., Tenesa A., Donnelly L.A., Fairbanks L.D., Aringer M., McKeigue P.M., Ralston S.H., Morris A.D., Rudan P., Hastie N.D., Campbell H., Wright A.F., *SLC2A9 is a newly identified urate transporter influencing serum urate concentration, urate excretion and gout*. Nature Genetics, 2008. **40**(4): p. 437.
42. Eraly S.A., Hamilton B.A., Nigam S.K., *Organic anion and cation transporters occur in pairs of similar and similarly expressed genes*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003. **300**(2): p. 333.
43. Cha S.H., Sekine T., Kusuhara H., Yu E., Kim J.Y., Kim D.K., Sugiyama Y., Kanai Y., Endou H., *Molecular cloning and characterization of multispecific organic anion*

- transporter 4 expressed in the placenta*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(6): p. 4507.
44. Kolz M., Johnson T., Sanna S., Teumer A., Vitart V., Perola M., Mangino M., Albrecht E., Wallace C., Farrall M., Johansson A., Nyholt D.R., Aulchenko Y., Beckmann J.S., Bergmann S., Bochud M., Brown M., Campbell H., Consortium E., Connell J., Dominiczak A., Homuth G., Lamina C., McCarthy M.I., Consortium E., Meitinger T., Mooser V., Munroe P., Nauck M., Peden J., Prokisch H., Salo P., Salomaa V., Samani N.J., Schlessinger D., Uda M., Volker U., Waeber G., Waterworth D., Wang-Sattler R., Wright A.F., Adamski J., Whitfield J.B., Gyllensten U., Wilson J.F., Rudan I., Pramstaller P., Watkins H., Consortium P., Doering A., Wichmann H.E., Study K., Spector T.D., Peltonen L., Volzke H., Nagaraja R., Vollenweider P., Caulfield M., Wtccc, Illig T., Gieger C., *Meta-analysis of 28,141 individuals identifies common variants within five new loci that influence uric acid concentrations*. PLoS Genetics, 2009. **5**(6): p. e1000504.
45. van der Harst P., Bakker S.J., de Boer R.A., Wolffenbuttel B.H., Johnson T., Caulfield M.J., Navis G., *Replication of the five novel loci for uric acid concentrations and potential mediating mechanisms*. Human Molecular Genetics, 2010. **19**(2): p. 387.
46. Zhou F., Pan Z., Ma J., You G., *Mutational analysis of histidine residues in human organic anion transporter 4 (hOAT4)*. Biochemical Journal, 2004. **384**(Pt 1): p. 87.
47. Zhou F., Tanaka K., Pan Z., Ma J., You G., *The role of glycine residues in the function of human organic anion transporter 4*. Molecular Pharmacology, 2004. **65**(5): p. 1141.
48. Shima J.E., Komori T., Taylor T.R., Stryke D., Kawamoto M., Johns S.J., Carlson E.J., Ferrin T.E., Giacomini K.M., *Genetic variants of human organic anion transporter 4 demonstrate altered transport of endogenous substrates*. American Journal of Physiology - Renal Physiology, 2010. **299**(4): p. F767.
49. Ekaratanawong S., Anzai N., Jutabha P., Miyazaki H., Noshiro R., Takeda M., Kanai Y., Sophasan S., Endou H., *Human organic anion transporter 4 is a renal apical organic anion/dicarboxylate exchanger in the proximal tubules*. Journal of Pharmacological Sciences, 2004. **94**(3): p. 297.
50. Ugele B., St-Pierre M.V., Pihusch M., Bahn A., Hantschmann P., *Characterization and identification of steroid sulfate transporters of human placenta*. American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, 2003. **284**(2): p. E390.

51. Wang H., Xu D., Toh M.F., Pao A.C., You G., *Serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK2 regulates human organic anion transporters 4 via ubiquitin ligase Nedd4-2*. *Biochemical Pharmacology*, 2016. **102**: p. 120.
52. Hagos Y., Stein D., Ugele B., Burckhardt G., Bahn A., *Human renal organic anion transporter 4 operates as an asymmetric urate transporter*. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2007. **18**(2): p. 430.
53. Noguchi S., Nishimura T., Fujibayashi A., Maruyama T., Tomi M., Nakashima E., *Organic Anion Transporter 4-Mediated Transport of Olmesartan at Basal Plasma Membrane of Human Placental Barrier*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015. **104**(9): p. 3128.
54. Sato M., Iwanaga T., Mamada H., Ogihara T., Yabuuchi H., Maeda T., Tamai I., *Involvement of uric acid transporters in alteration of serum uric acid level by angiotensin II receptor blockers*. *Pharmaceutical Research*, 2008. **25**(3): p. 639.
55. Zhang Y., Han Y.H., Putluru S.P., Matta M.K., Kole P., Mandlekar S., Furlong M.T., Liu T., Iyer R.A., Marathe P., Yang Z., Lai Y., Rodrigues A.D., *Diclofenac and Its Acyl Glucuronide: Determination of In Vivo Exposure in Human Subjects and Characterization as Human Drug Transporter Substrates In Vitro*. *Drug Metabolism and Disposition*, 2016. **44**(3): p. 320.
56. Yang C.H., Glover K.P., Han X., *Characterization of cellular uptake of perfluorooctanoate via organic anion-transporting polypeptide 1A2, organic anion transporter 4, and urate transporter 1 for their potential roles in mediating human renal reabsorption of perfluorocarboxylates*. *Toxicological Sciences*, 2010. **117**(2): p. 294.
57. Longcope C., *Androgen metabolism and the menopause*. *Seminars in Reproductive Endocrinology*, 1998. **16**(2): p. 111.
58. Ibanez L., Potau N., Marcos M.V., de Zegher F., *Exaggerated adrenarche and hyperinsulinism in adolescent girls born small for gestational age*. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1999. **84**(12): p. 4739.
59. Harrington L.B., Marck B.T., Wiggins K.L., McKnight B., Heckbert S.R., Woods N.F., LaCroix A.Z., Blondon M., Psaty B.M., Rosendaal F.R., Matsumoto A.M., Smith N.L., *Cross-sectional association of endogenous steroid hormone, sex hormone-binding globulin, and precursor steroid levels with hemostatic factor levels in postmenopausal women*. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2017. **15**(1): p. 80.

60. Longcope C., Gorbach S., Goldin B., Woods M., Dwyer J., Warram J., *The metabolism of estradiol; oral compared to intravenous administration*. Journal of Steroid Biochemistry, 1985. **23**(6A): p. 1065.
61. Stanczyk F.Z., Archer D.F., Bhavnani B.R., *Ethinyl estradiol and 17beta-estradiol in combined oral contraceptives: pharmacokinetics, pharmacodynamics and risk assessment*. Contraception, 2013. **87**(6): p. 706.
62. Remy-Martin A., Prost O., Nicollier M., Burnod J., Adessi G.L., *Estrone sulfate concentrations in plasma of normal individuals, postmenopausal women with breast cancer, and men with cirrhosis*. Clinical Chemistry, 1983. **29**(1): p. 86.
63. Pan C.C., Woolever C.A., Bhavnani B.R., *Transport of equine estrogens: binding of conjugated and unconjugated equine estrogens with human serum proteins*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1985. **61**(3): p. 499.
64. Rosenthal H.E., Pietrzak E., Slaunwhite W.R., Jr., Sandberg A.A., *Binding of estrone sulfate in human plasma*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1972. **34**(5): p. 805.
65. Kuhl H., *Pharmacology of estrogens and progestogens: influence of different routes of administration*. Climacteric, 2005. **8 Suppl 1**: p. 3.
66. Stanway S.J., Delavault P., Purohit A., Woo L.W., Thurieau C., Potter B.V., Reed M.J., *Steroid sulfatase: a new target for the endocrine therapy of breast cancer*. Oncologist, 2007. **12**(4): p. 370.
67. Goodall B.L., Robinson A.M., Brosseau C.L., *Electrochemical-surface enhanced Raman spectroscopy (E-SERS) of uric acid: a potential rapid diagnostic method for early preeclampsia detection*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2013. **15**(5): p. 1382.
68. Qian Y.M., Song W.C., Cui H., Cole S.P., Deeley R.G., *Glutathione stimulates sulfated estrogen transport by multidrug resistance protein 1*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(9): p. 6404.
69. Li L., Sham Y.Y., Bikadi Z., Elmquist W.F., *pH-Dependent transport of pemetrexed by breast cancer resistance protein*. Drug Metabolism and Disposition, 2011. **39**(9): p. 1478.
70. Marada V.V., Florl S., Kuhne A., Muller J., Burckhardt G., Hagos Y., *Interaction of human organic anion transporter 2 (OAT2) and sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) with antineoplastic drugs*. Pharmacological Research, 2015. **91**: p. 78.

71. Fietz D., Bakhaus K., Wapelhorst B., Grosser G., Gunther S., Alber J., Doring B., Kliesch S., Weidner W., Galuska C.E., Hartmann M.F., Wudy S.A., Bergmann M., Geyer J., *Membrane transporters for sulfated steroids in the human testis--cellular localization, expression pattern and functional analysis*. PLoS ONE, 2013. **8**(5): p. e62638.
72. Jutabha P., Kanai Y., Hosoyamada M., Chairoungdua A., Kim D.K., Iribe Y., Babu E., Kim J.Y., Anzai N., Chatsudthipong V., Endou H., *Identification of a novel voltage-driven organic anion transporter present at apical membrane of renal proximal tubule*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(30): p. 27930.
73. 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])*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2005. **57**(5): p. 573.
74. Asif A.R., Steffgen J., Metten M., Grunewald R.W., Muller G.A., Bahn A., Burckhardt G., Hagos Y., *Presence of organic anion transporters 3 (OAT3) and 4 (OAT4) in human adrenocortical cells*. Pflugers Archiv (European Journal of Physiology), 2005. **450**(2): p. 88.
75. Ahn S.K., Suh C.K., Cha S.H., *Polymorphisms of SLC22A9 (hOAT7) in Korean Females with Osteoporosis*. Korean Journal of Physiology & Pharmacology, 2015. **19**(4): p. 319.
76. Kaler G., Truong D.M., Sweeney D.E., Logan D.W., Nagle M., Wu W., Eraly S.A., Nigam S.K., *Olfactory mucosa-expressed organic anion transporter, Oat6, manifests high affinity interactions with odorant organic anions*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006. **351**(4): p. 872.
77. Tanihara Y., Masuda S., Sato T., Katsura T., Ogawa O., Inui K., *Substrate specificity of MATE1 and MATE2-K, human multidrug and toxin extrusions/H(+)-organic cation antiporters*. Biochemical Pharmacology, 2007. **74**(2): p. 359.
78. Seward D.J., Koh A.S., Boyer J.L., Ballatori N., *Functional complementation between a novel mammalian polygenic transport complex and an evolutionarily ancient organic solute transporter, OSTalpha-OSTbeta*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(30): p. 27473.
79. Chan T., Zheng J., Zhu L., Grewal T., Murray M., Zhou F., *Putative transmembrane domain 6 of the human organic anion transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2) influences transporter substrate binding, protein trafficking, and quality control*. Molecular Pharmaceutics, 2015. **12**(1): p. 111.

80. Noe J., Portmann R., Brun M.E., Funk C., *Substrate-dependent drug-drug interactions between gemfibrozil, fluvastatin and other organic anion-transporting peptide (OATP) substrates on OATP1B1, OATP2B1, and OATP1B3*. Drug Metabolism and Disposition, 2007. **35**(8): p. 1308.
81. Maeda T., Irokawa M., Arakawa H., Kuraoka E., Nozawa T., Tateoka R., Itoh Y., Nakanishi T., Tamai I., *Uptake transporter organic anion transporting polypeptide 1B3 contributes to the growth of estrogen-dependent breast cancer*. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2010. **122**(4): p. 180.
82. Tamai I., Nezu J., Uchino H., Sai Y., Oku A., Shimane M., Tsuji A., *Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter (OATP) family*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000. **273**(1): p. 251.
83. Yamaguchi H., Sugie M., Okada M., Mikkaichi T., Toyohara T., Abe T., Goto J., Hishinuma T., Shimada M., Mano N., *Transport of estrone 3-sulfate mediated by organic anion transporter OATP4C1: estrone 3-sulfate binds to the different recognition site for digoxin in OATP4C1*. Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 2010. **25**(3): p. 314.
84. Norrander J., Kempe T., Messing J., *Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis*. Gene, 1983. **26**(1): p. 101.
85. Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J., *Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors*. Gene, 1985. **33**(1): p. 103.
86. Balbas P., Soberon X., Merino E., Zurita M., Lomeli H., Valle F., Flores N., Bolivar F., *Plasmid vector pBR322 and its special-purpose derivatives--a review*. Gene, 1986. **50**(1-3): p. 3.
87. Kohfeldt E., Maurer P., Vannahme C., Timpl R., *Properties of the extracellular calcium binding module of the proteoglycan testican*. FEBS Letters, 1997. **414**(3): p. 557.
88. Bach M., Grigat S., Pawlik B., Fork C., Utermohlen O., Pal S., Banczyk D., Lazar A., Schomig E., Grundemann 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 Journal, 2007. **274**(3): p. 783.
89. Yates J.L., Warren N., Sugden B., *Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells*. Nature, 1985. **313**(6005): p. 812.

90. Graham F.L., Smiley J., Russell W.C., Nairn R., *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. Journal of General Virology, 1977. **36**(1): p. 59.
91. Scientific T., *NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer V1.0 User Manual*. Vol. V1.0. 2009: Thermo Scientific.
92. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R., *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1977. **74**(12): p. 5463.
93. Kellogg D.E., Rybalkin I., Chen S., Mukhamedova N., Vlasik T., Siebert P.D., Chenchik A., *TaqStart Antibody: "hot start" PCR facilitated by a neutralizing monoclonal antibody directed against Taq DNA polymerase*. BioTechniques, 1994. **16**(6): p. 1134.
94. H.C. Birnboim J.D., *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Research, 1979. **7**: p. 1513.
95. Van Craenenbroeck K., Vanhoenacker P., Haegeman G., *Episomal vectors for gene expression in mammalian cells*. European Journal of Biochemistry, 2000. **267**(18): p. 5665.
96. Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Analytical Biochemistry, 1985. **150**(1): p. 76.
97. Wiechelman K.J., Braun R.D., Fitzpatrick J.D., *Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation*. Analytical Biochemistry, 1988. **175**(1): p. 231.
98. Bruins A.P., *Mechanistic aspects of electrospray ionization*. Journal of Chromatography A, 1998. **794**(1-2): p. 345.
99. Kebarle P., Tang L., *From ions in solution to ions in the gas phase - the mechanism of electrospray mass spectrometry*. Analytical Chemistry, 1993. **65**(22): p. 972A.
100. Gaskell S., *Electrospray: Principles and practice (vol 32, pg 677, 1997)*. Journal of Mass Spectrometry, 1997. **32**(12): p. 1378.
101. Banks J.F., Jr., Whitehouse C.M., *Electrospray ionization mass spectrometry*. Methods in Enzymology, 1996. **270**: p. 486.
102. Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum B. *Elektrosprayionisation (ESI)*. [Image] 2016 [cited 2016 13.12.2016]; Available from: <http://www.bmfz.hhu.de>.
103. Shimadzu. *Diagram of Quadrupole MS*. [cited 2017 05.02.2017]; Available from: <http://www.shimadzu.com/an/lcms/support/intro/lib/lctalk/61/61intro.html>.

## Literaturverzeichnis

104. Ramirez-Correa G.A., Martinez-Ferrando M.I., Zhang P., Murphy A.M., *Targeted proteomics of myofilament phosphorylation and other protein posttranslational modifications*. Proteomics. Clinical Applications, 2014. **8**(7-8): p. 543.
105. Grundemann D., Harlfinger S., Golz S., Geerts A., Lazar A., Berkels R., Jung N., Rubbert A., Schomig E., *Discovery of the ergothioneine transporter*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(14): p. 5256.
106. Theodoridis G.A., Gika H.G., Want E.J., Wilson I.D., *Liquid chromatography-mass spectrometry based global metabolite profiling: a review*. Analytica Chimica Acta, 2012. **711**: p. 7.
107. Project M. *Massbank - High Quality Mass Spectral Database*. [cited 2017 07.02.2017]; Available from: <http://www.massbank.jp>.
108. Institute T.S.R. *Metlin*. [cited 2017 07.02.2017]; Available from: <https://metlin.scripps.edu>.
109. Kondrat R.W., McClusky G.A., Cooks R.G., *Multiple reaction monitoring in mass spectrometry/mass spectrometry for direct analysis of complex mixtures*. Analytical Chemistry, 1978. **50**(14): p. 2017.
110. de Hoffmann E., *Tandem mass spectrometry: A primer*. Journal of Mass Spectrometry, 1996. **31**(2): p. 129.
111. Harlfinger S., *Identifizierung des physiologischen Substrates und funktionelle Charakterisierung des organischen Kationentransporters OCTN1 mittels LC-MS/MS* 2005, Universität Bonn: 31.05.2005. p. 148.
112. Tomi M., Eguchi H., Ozaki M., Tawara T., Nishimura S., Higuchi K., Maruyama T., Nishimura T., Nakashima E., *Role of OAT4 in Uptake of Estriol Precursor 16alpha-Hydroxydehydroepiandrosterone Sulfate Into Human Placental Syncytiotrophoblasts From Fetus*. Endocrinology, 2015. **156**(7): p. 2704.
113. Hagos Y., Hundertmark P., Shnitsar V., Marada V.V., Wulf G., Burckhardt G., *Renal human organic anion transporter 3 increases the susceptibility of lymphoma cells to bendamustine uptake*. American Journal of Physiology - Renal Physiology, 2015. **308**(4): p. F330.
114. Grosser G., Doring B., Ugele B., Geyer J., Kulling S.E., Soukup S.T., *Transport of the soy isoflavone daidzein and its conjugative metabolites by the carriers SOAT, NTCP, OAT4, and OATP2B1*. Archives of Toxicology, 2015. **89**(12): p. 2253.

115. Skwara P., Schomig E., Grundemann D., *A novel mode of operation of SLC22A11: Membrane insertion of estrone sulfate versus translocation of uric acid and glutamate.* Biochemical Pharmacology, 2017. **128**: p. 74.
116. Burckhardt G., Burckhardt B.C., *In vitro and in vivo evidence of the importance of organic anion transporters (OATs) in drug therapy.* Handbook of Experimental Pharmacology, 2011(201): p. 29.
117. Bahn A., Hagos Y., Reuter S., Balen D., Brzica H., Krick W., Burckhardt B.C., Sabolic I., Burckhardt G., *Identification of a new urate and high affinity nicotinate transporter, hOAT10 (SLC22A13).* Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(24): p. 16332.
118. Lofthouse E.M., Brooks S., Cleal J.K., Hanson M.A., Poore K.R., O'Kelly I.M., Lewis R.M., *Glutamate cycling may drive organic anion transport on the basal membrane of human placental syncytiotrophoblast.* Journal of Physiology, 2015. **593**(20): p. 4549.
119. Han Y.H., Busler D., Hong Y., Tian Y., Chen C., Rodrigues A.D., *Transporter studies with the 3-O-sulfate conjugate of 17alpha-ethinylestradiol: assessment of human kidney drug transporters.* Drug Metabolism and Disposition, 2010. **38**(7): p. 1064.
120. Wang L., Sweet D.H., *Competitive inhibition of human organic anion transporters 1 (SLC22A6), 3 (SLC22A8) and 4 (SLC22A11) by major components of the medicinal herb Salvia miltiorrhiza (Danshen).* Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 2013. **28**(3): p. 220.
121. Islam R., Anzai N., Ekaratanawong S., Kundu-Srivastava S., Jin C., Noshiro-Kofuji R., Miyao K., Yamanishi A., Fukutomi T., Kanai Y., *Characterization of Human Organic Anion Transporter 4 (hOAT4) as a Low Affinity p-aminohippurate (PAH) Transporter.* Journal of the Kyorin Medical Society, 2007. **Vol. 38**: p. 61.
122. Ugele B., Bahn A., Rex-Haffner M., *Functional differences in steroid sulfate uptake of organic anion transporter 4 (OAT4) and organic anion transporting polypeptide 2B1 (OATP2B1) in human placenta.* Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2008. **111**(1-2): p. 1.
123. Zhou F., Illsley N.P., You G., *Functional characterization of a human organic anion transporter hOAT4 in placental BeWo cells.* European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2006. **27**(5): p. 518.
124. Yamashita F., Ohtani H., Koyabu N., Ushigome F., Satoh H., Murakami H., Uchiumi T., Nakamura T., Kuwano M., Tsujimoto M., Sawada Y., *Inhibitory effects of angiotensin II receptor antagonists and leukotriene receptor antagonists on the*

- transport of human organic anion transporter 4*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2006. **58**(11): p. 1499.
125. Takeda M., Khamdang S., Narikawa S., Kimura H., Hosoyamada M., Cha S.H., Sekine T., Endou H., *Characterization of methotrexate transport and its drug interactions with human organic anion transporters*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2002. **302**(2): p. 666.
126. Babu E., Takeda M., Narikawa S., Kobayashi Y., Enomoto A., Tojo A., Cha S.H., Sekine T., Sakthisekaran D., Endou H., *Role of human organic anion transporter 4 in the transport of ochratoxin A*. Biochimica et Biophysica Acta, 2002. **1590**(1-3): p. 64.
127. Enomoto A., Takeda M., Shimoda M., Narikawa S., Kobayashi Y., Kobayashi Y., Yamamoto T., Sekine T., Cha S.H., Niwa T., Endou H., *Interaction of human organic anion transporters 2 and 4 with organic anion transport inhibitors*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2002. **301**(3): p. 797.
128. Hashimoto T., Narikawa S., Huang X.L., Minematsu T., Usui T., Kamimura H., Endou H., *Characterization of the renal tubular transport of zonampanel, a novel alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor antagonist, by human organic anion transporters*. Drug Metabolism and Disposition, 2004. **32**(10): p. 1096.
129. Zhou F., Xu W., Hong M., Pan Z., Sinko P.J., Ma J., You G., *The role of N-linked glycosylation in protein folding, membrane targeting, and substrate binding of human organic anion transporter hOAT4*. Molecular Pharmacology, 2005. **67**(3): p. 868.
130. Gu H., Wall S.C., Rudnick G., *Stable expression of biogenic amine transporters reveals differences in inhibitor sensitivity, kinetics, and ion dependence*. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(10): p. 7124.
131. Tate C.G., Haase J., Baker C., Boorsma M., Magnani F., Vallis Y., Williams D.C., *Comparison of seven different heterologous protein expression systems for the production of the serotonin transporter*. Biochimica et Biophysica Acta, 2003. **1610**(1): p. 141.
132. Kahlenberg A., Urman B., Dolansky D., *Preferential uptake of D-glucose by isolated human erythrocyte membranes*. Biochemistry, 1971. **10**(16): p. 3154.
133. Tzur A., Kafri R., LeBleu V.S., Lahav G., Kirschner M.W., *Cell growth and size homeostasis in proliferating animal cells*. Science, 2009. **325**(5937): p. 167.
134. Penmatsa A., Wang K.H., Gouaux E., *X-ray structure of dopamine transporter elucidates antidepressant mechanism*. Nature, 2013. **503**(7474): p. 85.

135. Wlcek K., Hofstetter L., Stieger B., *Transport of estradiol-17beta-glucuronide, estrone-3-sulfate and taurocholate across the endoplasmic reticulum membrane: evidence for different transport systems*. *Biochemical Pharmacology*, 2014. **88**(1): p. 106.
136. Mikkaichi T., Suzuki T., Onogawa T., Tanemoto M., Mizutamari H., Okada M., Chaki T., Masuda S., Tokui T., Eto N., Abe M., Satoh F., Unno M., Hishinuma T., Inui K., Ito S., Goto J., Abe T., *Isolation and characterization of a digoxin transporter and its rat homologue expressed in the kidney*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004. **101**(10): p. 3569.
137. Chu X.Y., Bleasby K., Yabut J., Cai X., Chan G.H., Hafey M.J., Xu S., Bergman A.J., Braun M.P., Dean D.C., Evers R., *Transport of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin by human organic anion transporter 3, organic anion transporting polypeptide 4C1, and multidrug resistance P-glycoprotein*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2007. **321**(2): p. 673.
138. He J., Yu Y., Prasad B., Chen X., Unadkat J.D., *Mechanism of an unusual, but clinically significant, digoxin-bupropion drug interaction*. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 2014. **35**(5): p. 253.
139. Chaney L.K., Jacobson B.S., *Coating cells with colloidal silica for high yield isolation of plasma membrane sheets and identification of transmembrane proteins*. *Journal of Biological Chemistry*, 1983. **258**(16): p. 10062.
140. Choksawangkarn W., Kim S.K., Cannon J.R., Edwards N.J., Lee S.B., Fenselau C., *Enrichment of plasma membrane proteins using nanoparticle pellicles: comparison between silica and higher density nanoparticles*. *Journal of Proteome Research*, 2013. **12**(3): p. 1134.
141. Rahbar A.M., Fenselau C., *Integration of Jacobson's pellicle method into proteomic strategies for plasma membrane proteins*. *Journal of Proteome Research*, 2004. **3**(6): p. 1267.
142. Chang J., Ruiz V., Vancura A., *Purification of yeast membranes and organelles by sucrose density gradient centrifugation*. *Methods in Molecular Biology*, 2008. **457**: p. 141.
143. Schaller G.E., *Localization of the Ethylene-Receptor Signaling Complex to the Endoplasmic Reticulum: Analysis by Two-Phase Partitioning and Density-Gradient Centrifugation*. *Methods in Molecular Biology*, 2017. **1573**: p. 113.

## Literaturverzeichnis

144. Mot A.C., Prell E., Klecker M., Naumann C., Faden F., Westermann B., Dismeyer N., *Real-time detection of PROTEOLYSIS1 (PRT1)-mediated ubiquitination via fluorescently labeled substrate probes*. New Phytologist, 2017.

## 8 Anhang

### 8.1 Sequenzdaten zum phylogenetischen Stammbaum (Abb. 4)

Für die Erstellung des phylogenetischen Baumes wurden die Sequenzen entsprechend der Verweise von HUGO bei Uniprot verwendet. Verwendete Einträge aus der Uniprot Datenbank: A6NK97, A1A5C7, A6NKX4, O76082, Q96S37, Q9Y267, Q6T423, Q9H015, Q4U2R8, Q8IVM8, Q86VW1, O15244, Q8TCC7, Q9Y226, Q8IZD6, Q96BI1, O15245, O75751, Q8WUG5, Q9Y694, Q63ZE4, Q9NSA0, Q8N4F4.

### 8.2 Sequenz des SLC22A11

Darstellt ist die SLC22A11-Sequenz aus dem verwendeten Konstrukt pEBTetLNC-SLC22A11. Die Sequenz wurde positiv mit der Datenbank NCBI (Sequenz: CCDS 8074.1) verifiziert.

```

1  ATG GCG TTC TCG AAG CTC TTG GAG CAA GCC GGA GGC GTG GGC
   TAC CGC AAG AGC TTC GAG AAC CTC GTT CGG CCT CCG CAC CCG
1▶ M  A  F  S  K  L  L  E  Q  A  G  G  V  G

43  CTC TTC CAG ACC CTG CAG GTG CTC ACC TTC ATC CTC CCC TGC
   GAG AAG GTC TGG GAC GTC CAC GAG TGG AAG TAG GAG GGG ACG
15▶ L  F  Q  T  L  Q  V  L  T  F  I  L  P  C

85  CTC ATG ATA CCT TCC CAG ATG CTC CTG GAG AAC TTC TCA GCC
   GAG TAC TAT GGA AGG GTC TAC GAG GAC CTC TTG AAG AGT CGG
29▶ L  M  I  P  S  Q  M  L  L  E  N  F  S  A

127 GCC ATC CCA GGC CAC CGA TGC TGG ACA CAC ATG CTG GAC AAT
   CGG TAG GGT CCG GTG GCT ACG ACC TGT GTG TAC GAC CTG TTA
43▶ A  I  P  G  H  R  C  W  T  H  M  L  D  N

169 GGC TCT GCG GTT TCC ACA AAC ATG ACC CCC AAG GCC CTT CTG
   CCG AGA CGC CAA AGG TGT TTG TAC TGG GGG TTC CGG GAA GAC
57▶ G  S  A  V  S  T  N  M  T  P  K  A  L  L

211 ACC ATC TCC ATC CCG CCA GGC CCC AAC CAG GGG CCC CAC CAG
   TGG TAG AGG TAG GGC GGT CCG GGG TTG GTC CCC GGG GTG GTC
71▶ T  I  S  I  P  P  G  P  N  Q  G  P  H  Q

```

## Anhang

253 TGC CGC CGC TTC CGC CAG CCA CAG TGG CAG CTC TTG GAC CCC  
 ACG GCG GCG AAG GCG GTC GGT GTC ACC GTC GAG AAC CTG GGG  
 85▶ C R R F R Q P Q W Q L L D P

295 AAT GCC ACG GCC ACC AGC TGG AGC GAA GCT GAC ACG GAG CCG  
 TTA CGG TGC CGG TGG TCG ACC TCG CTT CGA CTG TGC CTC GGC  
 99▶ N A T A T S W S E A D T E P

337 TGT GTG GAC GGC TGG GTC TAT GAC CGC AGC GTC TTC ACC TCC  
 ACA CAC CTG CCG ACC CAG ATA CTG GCG TCG CAG AAG TGG AGG  
 113▶ C V D G W V Y D R S V F T S

379 ACC ATC GTG GCC AAG TGG GAC CTG GTG TGC AGC TCC CAG GGC  
 TGG TAG CAC CGG TTC ACC CTG GAC CAC ACG TCG AGG GTC CCG  
 127▶ T I V A K W D L V C S S Q G

421 TTG AAG CCC CTA AGC CAG TCC ATC TTC ATG TCC GGG ATC CTG  
 AAC TTC GGG GAT TCG GTC AGG TAG AAG TAC AGG CCC TAG GAC  
 141▶ L K P L S Q S I F M S G I L

463 GTG GGC TCC TTT ATC TGG GGC CTC CTC TCC TAC CGG TTT GGG  
 CAC CCG AGG AAA TAG ACC CCG GAG GAG AGG ATG GCC AAA CCC  
 155▶ V G S F I W G L L S Y R F G

505 AGG AAG CCG ATG CTG AGC TGG TGC TGC CTG CAG TTG GCC GTG  
 TCC TTC GGC TAC GAC TCG ACC ACG ACG GAC GTC AAC CGG CAC  
 169▶ R K P M L S W C C L Q L A V

547 GCG GGC ACC AGC ACC ATC TTC GCC CCA ACA TTC GTC ATC TAC  
 CGC CCG TGG TCG TGG TAG AAG CGG GGT TGT AAG CAG TAG ATG  
 183▶ A G T S T I F A P T F V I Y

589 TGC GGC CTG CGG TTC GTG GCC GCT TTT GGG ATG GCC GGC ATC  
 ACG CCG GAC GCC AAG CAC CGG CGA AAA CCC TAC CGG CCG TAG  
 197▶ C G L R F V A A F G M A G I

631 TTT CTG AGT TCA CTG ACA CTG ATG GTG GAG TGG ACC ACG ACC  
 AAA GAC TCA AGT GAC TGT GAC TAC CAC CTC ACC TGG TGC TGG  
 211▶ F L S S L T L M V E W T T T

673 AGC AGG AGG GCG GTC ACC ATG ACG GTG GTG GGA TGT GCC TTC  
 TCG TCC TCC CGC CAG TGG TAC TGC CAC CAC CCT ACA CGG AAG  
 225▶ S R R A V T M T V V G C A F

715 AGC GCA GGC CAG GCG GCG CTG GGC GGC CTG GCC TTT GCC CTG  
 TCG CGT CCG GTC CGC CGC GAC CCG CCG GAC CGG AAA CGG GAC  
 239▶ S A G Q A A L G G L A F A L

## Anhang

715	AGC	GCA	GGC	CAG	GCG	GCG	CTG	GGC	GGC	CTG	GCC	TTT	GCC	CTG
	TCG	CGT	CCG	GTC	CGC	CGC	GAC	CCG	CCG	GAC	CGG	AAA	CGG	GAC
239▶	S	A	G	Q	A	A	L	G	G	L	A	F	A	L
757	CGG	GAC	TGG	AGG	ACT	CTC	CAG	CTG	GCA	GCA	TCA	GTG	CCC	TTC
	GCC	CTG	ACC	TCC	TGA	GAG	GTC	GAC	CGT	CGT	AGT	CAC	GGG	AAG
253▶	R	D	W	R	T	L	Q	L	A	A	S	V	P	F
799	TTT	GCC	ATC	TCC	CTG	ATA	TCC	TGG	TGG	CTG	CCA	GAA	TCC	GCC
	AAA	CGG	TAG	AGG	GAC	TAT	AGG	ACC	ACC	GAC	GGT	CTT	AGG	CGG
267▶	F	A	I	S	L	I	S	W	W	L	P	E	S	A
841	CGG	TGG	CTG	ATT	ATT	AAG	GGC	AAA	CCA	GAC	CAA	GCA	CTT	CAG
	GCC	ACC	GAC	TAA	TAA	TTC	CCG	TTT	GGT	CTG	GTT	CGT	GAA	GTC
281▶	R	W	L	I	I	K	G	K	P	D	Q	A	L	Q
883	GAG	CTC	AGA	AAG	GTG	GCC	AGG	ATA	AAT	GGC	CAC	AAG	GAG	GCC
	CTC	GAG	TCT	TTC	CAC	CGG	TCC	TAT	TTA	CCG	GTG	TTC	CTC	CGG
295▶	E	L	R	K	V	A	R	I	N	G	H	K	E	A
925	AAG	AAC	CTG	ACC	ATA	GAG	GTG	CTG	ATG	TCC	AGC	GTG	AAG	GAG
	TTC	TTG	GAC	TGG	TAT	CTC	CAC	GAC	TAC	AGG	TCG	CAC	TTC	CTC
309▶	K	N	L	T	I	E	V	L	M	S	S	V	K	E
967	GAG	GTG	GCC	TCT	GCA	AAG	GAG	CCG	CGG	TCG	GTG	CTG	GAC	CTG
	CTC	CAC	CGG	AGA	CGT	TTC	CTC	GGC	GCC	AGC	CAC	GAC	CTG	GAC
323▶	E	V	A	S	A	K	E	P	R	S	V	L	D	L
1009	TTC	TGC	GTG	CCC	GTG	CTC	CGC	TGG	AGG	AGC	TGC	GCC	ATG	CTG
	AAG	ACG	CAC	GGG	CAC	GAG	GCG	ACC	TCC	TCG	ACG	CGG	TAC	GAC
337▶	F	C	V	P	V	L	R	W	R	S	C	A	M	L
1051	GTG	GTG	AAT	TTC	TCT	CTA	TTG	ATC	TCC	TAC	TAT	GGG	CTG	GTC
	CAC	CAC	TTA	AAG	AGA	GAT	AAC	TAG	AGG	ATG	ATA	CCC	GAC	CAG
351▶	V	V	N	F	S	L	L	I	S	Y	Y	G	L	V
1093	TTC	GAC	CTG	CAG	AGC	CTG	GGC	CGT	GAC	ATC	TTC	CTC	CTC	CAG
	AAG	CTG	GAC	GTC	TCG	GAC	CCG	GCA	CTG	TAG	AAG	GAG	GAG	GTC
365▶	F	D	L	Q	S	L	G	R	D	I	F	L	L	Q
1135	GCC	CTC	TTC	GGG	GCC	GTG	GAC	TTC	CTG	GGC	CGG	GCC	ACC	ACT
	CGG	GAG	AAG	CCC	CGG	CAC	CTG	AAG	GAC	CCG	GCC	CGG	TGG	TGA
379▶	A	L	F	G	A	V	D	F	L	G	R	A	T	T
1177	GCC	CTC	TTG	CTC	AGT	TTC	CTT	GGC	CGC	CGC	ACC	ATC	CAG	GCG
	CGG	GAG	AAC	GAG	TCA	AAG	GAA	CCG	GCG	GCG	TGG	TAG	GTC	CGC
393▶	A	L	L	L	S	F	L	G	R	R	T	I	Q	A

## Anhang

1219	GGT	TCC	CAG	GCC	ATG	GCC	GGC	CTC	GCC	ATT	CTA	GCC	AAC	ATG
	CCA	AGG	GTC	CGG	TAC	CGG	CCG	GAG	CGG	TAA	GAT	CGG	TTG	TAC
407▶	G	S	Q	A	M	A	G	L	A	I	L	A	N	M
1261	CTG	GTG	CCG	CAA	GAT	TTG	CAG	ACC	CTG	CGT	GTG	GTC	TTT	GCT
	GAC	CAC	GGC	GTT	CTA	AAC	GTC	TGG	GAC	GCA	CAC	CAG	AAA	CGA
421▶	L	V	P	Q	D	L	Q	T	L	R	V	V	F	A
1303	GTG	CTG	GGA	AAG	GGA	TGT	TTT	GGG	ATA	AGC	CTA	ACC	TGC	CTC
	CAC	GAC	CCT	TTC	CCT	ACA	AAA	CCC	TAT	TCG	GAT	TGG	ACG	GAG
435▶	V	L	G	K	G	C	F	G	I	S	L	T	C	L
1345	ACC	ATC	TAC	AAG	GCT	GAA	CTC	TTT	CCA	ACG	CCA	GTG	CGG	ATG
	TGG	TAG	ATG	TTC	CGA	CTT	GAG	AAA	GGT	TGC	GGT	CAC	GCC	TAC
449▶	T	I	Y	K	A	E	L	F	P	T	P	V	R	M
1387	ACA	GCA	GAT	GGC	ATT	CTG	CAT	ACA	GTG	GGC	CGG	CTG	GGG	GCT
	TGT	CGT	CTA	CCG	TAA	GAC	GTA	TGT	CAC	CCG	GCC	GAC	CCC	CGA
463▶	T	A	D	G	I	L	H	T	V	G	R	L	G	A
1429	ATG	ATG	GGT	CCC	CTG	ATC	CTG	ATG	AGC	CGC	CAA	GCC	CTG	CCC
	TAC	TAC	CCA	GGG	GAC	TAG	GAC	TAC	TCG	GCG	GTT	CGG	GAC	GGG
477▶	M	M	G	P	L	I	L	M	S	R	Q	A	L	P
1471	CTG	CTG	CCT	CCT	CTC	CTC	TAT	GGC	GTT	ATC	TCC	ATT	GCT	TCC
	GAC	GAC	GGA	GGA	GAG	GAG	ATA	CCG	CAA	TAG	AGG	TAA	CGA	AGG
491▶	L	L	P	P	L	L	Y	G	V	I	S	I	A	S
1513	AGC	CTG	GTT	GTG	CTG	TTC	TTC	CTC	CCG	GAG	ACC	CAG	GGA	CTT
	TCG	GAC	CAA	CAC	GAC	AAG	AAG	GAG	GGC	CTC	TGG	GTC	CCT	GAA
505▶	S	L	V	V	L	F	F	L	P	E	T	Q	G	L
1555	CCG	CTC	CCT	GAC	ACT	ATC	CAG	GAC	CTG	GAG	AGC	CAG	AAA	TCA
	GGC	GAG	GGA	CTG	TGA	TAG	GTC	CTG	GAC	CTC	TCG	GTC	TTT	AGT
519▶	P	L	P	D	T	I	Q	D	L	E	S	Q	K	S
1597	ACA	GCA	GCC	CAG	GGC	AAC	CGG	CAA	GAG	GCC	GTC	ACT	GTG	GAA
	TGT	CGT	CGG	GTC	CCG	TTG	GCC	GTT	CTC	CGG	CAG	TGA	CAC	CTT
533▶	T	A	A	Q	G	N	R	Q	E	A	V	T	V	E
1639	AGT	ACC	TCG	CTC	TAG									
	TCA	TGG	AGC	GAG	ATC									
547▶	S	T	S	L	•									

# 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, Karten 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 der Promotionsordnung sind mir bekannt.

Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Ulf-Ingo Flügge betreut worden.

Dormagen, den 08.06.2017

---

Peter Skwara

Teilpublikationen:

Skwara P., Schömig E., Gründemann D., *A novel mode of operation of SLC22A11: Membrane insertion of estrone sulfate versus translocation of uric acid and glutamate*. *Biochemical Pharmacology*, 2017. **128**: p. 74.