

**SLC22A13 katalysiert
den unidirektionalen Efflux von Aspartat
und Glutamat**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Christian Schulz

aus Siegburg

Köln, Dezember 2014

aus dem Institut für Pharmakologie
der Universitätsklinik Köln

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Peter Proksch

Korreferent: Prof. Dr. Dirk Gründemann

Tag der mündlichen Prüfung:

Für meine Eltern und Melina.

„Beim Erforschen und Versuchen
hört man auch die Frömmsten fluchen.“

- Hans-Jürgen Quadbeck-Seeger -

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis.....	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Die Barrierefunktion der Zellmembran	1
1.2 Major Facilitator Superfamilie (MFS).....	2
1.3 Aminosäure-Transporter.....	3
1.4 Transportproteine in der Niere	3
1.4.1 Anatomie der Niere	4
1.4.2 Das Nephron	5
1.5 Die SLC 22 Transporterfamilie	7
1.5.1 SLC22A13 – Lokalisation und postulierte Funktion.....	9
1.6 Substratsuche via LC-MS/MS-Technik	11
1.7 Ziel der Arbeit	12
2 Material und Methoden	14
2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial	14
2.2 Lösungen und Puffer	15
2.3 Enzyme	15
2.4 Kit-Systeme	16
2.5 Bakterienstamm und Zelllinie	17
2.6 Expressionssystem pEBTetD	17
2.7 Oligonukleotide	19
2.8 Mikrobiologische Methoden	19
2.8.1 Nährmedien	20
2.8.2 Kultur und Lagerung von <i>E. coli</i>	21
2.8.3 Herstellung elektrokompenter Bakterien und Elektroporation.....	21
2.9 Molekularbiologische Methoden.....	23
2.9.1 <i>In vitro</i> Mutagenese von Plasmid DNA	23
2.9.2 Phenol-Chloroform-Extraktion.....	24
2.9.3 Alkohol-Fällung	25
2.9.4 Gelelektrophorese und –extraktion.....	25
2.9.5 Restriktion von DNA.....	27
2.9.6 Ligation.....	27
2.9.7 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	28

2.9.8	Sequenzierung	29
2.9.9	Plasmidpräparation aus <i>E.coli</i>	30
2.9.10	Konzentrationsbestimmung von DNA	30
2.10	Zellbiologische Methoden	30
2.10.1	Kultivierung und Passage von HEK-293-Zellen	31
2.10.2	Stabile Transfektion von HEK-293-Zellen	31
2.11	Charakterisierung von Transportproteinen	32
2.11.1	Aussaat der Zellen	32
2.11.2	Vorinkubation	33
2.11.3	Substrataufnahme	33
2.11.4	Zellaufschluss	34
2.11.5	Efflux-Messungen	34
2.12	Bestimmung der Radioaktivität	35
2.13	Proteinbestimmung	36
2.14	LC-MS/MS-Analytik	36
2.14.1	Chromatographische Verfahren	37
2.14.2	Massenspektrometrie	38
2.14.3	LC-MS-Differenz-Abtönung	42
3	Ergebnisse	44
3.1	Substratsuche mittels LC-MS-Differenz-Abtönung	44
3.1.1	Die chemische Struktur der potentiellen Substrate	48
3.2	Aufnahmeversuche	49
3.3	Zeitverlauf der Substrataufnahme durch SLC22A13	49
3.3.1	Orotsäure	50
3.3.2	Asparaginsäure	51
3.3.3	Glutaminsäure	52
3.3.4	Taurin	54
3.4	24 h Inkubation von Aspartat	55
3.5	trans-Stimulationsversuche mit Orotsäure	56
3.6	cis-Inhibition der Taurinaufnahme	57
3.7	Zeitverlauf der Efflux-Transportaktivität	59
3.8	Konzentrationsabhängigkeit des Effluxtransports	63
3.9	pH-Abhängigkeit	65
3.10	Ionenabhängigkeit von SLC22A13	66
4	Diskussion	67
4.1	Methodische Aspekte	67
4.2	Nikotinsäure als physiologisches Substrat	68
4.3	Substratsuche über Differenz-Abtönung	70

4.4	Mögliche Substrate im Zeitverlauf.....	71
4.5	Versuch der trans-Stimulation und cis Inhibition.....	73
4.6	SLC22A13 funktioniert als Effluxtransporter von Aminosäuren - Substratspektrum	74
4.7	Welche Triebkraft steht hinter dem unidirektionalen Efflux durch SLC22A13	75
4.8	Mögliche physiologische Funktion des Transportproteins SLC22A13 in den Typ-A- Schaltzellen.....	77
4.9	Pharmakologische Anwendbarkeit.....	80
4.10	Ausblick.....	81
5	Zusammenfassung	82
6	Abstract	83
7	Abkürzungsverzeichnis.....	84
	Literaturverzeichnis	87
	Danksagung	97
	Eidesstattliche Versicherung	98

Abbildungsverzeichnis

Abb.1.1	Längsschnitt durch die Niere.	4
Abb. 1.2	Schematische Darstellung zweier Nephrone.	5
Abb. 1.3.	Organische Anionen und Kationen Transporter.	7
Abb. 1.4.	Evolutionstammbaum der humanen SLC22-Familie.	8
Abb. 1.5.	Schematische Darstellung von Schaltzellen.	10
Abb. 1.6.	Schematische Darstellung der Substratidentifizierung mittels LC-MS/MS Screening.	12
Abb. 2.1.	Schematische Darstellung des pEBTet-Expressionsvektors.	18
Abb 2.2.	Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers.	38
Abb. 2.3.	Elektrosprayionisierung.	39
Abb 2.4.	Schematischer Aufbau eines Quadropol-Massen-Analysators.	40
Abb 2.5	Schematische Darstellung der Differenz Abtönung.	43
Abb. 3.1.	Ergebnis der Differenz-Abtönung von Zelllysaten.	45
Abb.3.2.	Ergebnis der Differenzabtönung nach Orotat Vorbeladung.	46
Abb.3.3.	Intensität der Massenspuren.	47
Abb. 3.4.	Strukturformeln der identifizierten Substanzen.	48
Abb. 3.5.	Zeitverlauf der ^3H -Orotsäureaufnahme über SLC22A13h.	50
Abb. 3.6.	Zeitverlauf der ^3H -Aspartataufnahme über SLC22A13h.	52
Abb. 3.7.	Zeitverlauf der ^3H -Glutamataufnahme über 40 min.	53
Abb. 3.8.	Zeitverlauf der ^3H -Taurinaufnahme.	54
Abb. 3.9.	24 h Inkubation von Aspartat in Puffer und Medium.	55
Abb. 3.10.	trans-Stimulation mit ^3H -Orotsäure.	57
Abb. 3.11.	cis-Inhibition der ^3H -Taurin Aufnahme.	58

Abb. 3.12.	Efflux von Aspartat, Taurin und Glutamat.	59
Abb. 3.13.	SLC22A13 stimuliert den Efflux von Aminosäuren.	60
Abb. 3.14.	Steigerung der Effluxgeschwindigkeit durch vorbeladen.	64
Abb. 3.15.	Effluxgeschwindigkeit gegen den pH-Wert der Pufferlösung.	65
Abb. 3.16.	Relativer Efflux für Aspartat in verschieden zusammengesetzten KRH-Pufferlösungen.	66
Abb. 4.1.	Strukturformel von Nikotinsäure.	69
Abb. 4.2.	trans-Stimulations und cis-Inhibitions Reaktion.	73
Abb. 4.3.	Schematische Darstellung des Sammelrohrepitels.	79

1 Einleitung

1.1 Die Barrierefunktion der Zellmembran

Zellen sind die Organisation des Lebens. Das Leben kann einem dabei als einzelne Zelle oder als vielzellige Gemeinschaft, in denen verschiedene Zellgruppen spezielle Funktionen ausüben und miteinander verbunden sind, begegnen (Alberts et al., 2011). Um die Ordnung einer Zelle aufrecht zu erhalten nutzt jede bekannte Zelle eine biologische Membran bestehend aus einer Phospholipiddoppelschicht. Diese Barriere ist aufgrund einfacher Diffusion schnell durchlässig für kleine Moleküle die unpolar sind, wie z. B. Wasser, Sauerstoff oder Stickstoffmonoxid. Größere und/oder geladene Moleküle wie beispielsweise Ionen, Aminosäuren und Nukleotide können die Membran nicht ohne Hilfe passieren.

Zum Transport dieser Substanzen werden unterschiedliche Proteine genutzt, Kanal- und Transporterproteine. Beide Proteinklassen haben gemeinsam, dass ihre Polypeptidkette die Lipid-Doppelschicht mehrfach durchquert, wodurch den gelösten Stoffen (Soluten) ermöglicht wird die Membran zu durchqueren, ohne mit dem hydrophoben Innenbereich in Kontakt zu kommen. Der Unterschied besteht in der Art des Transports. Kanäle bilden wässrige Poren und ermöglichen in der Regel anorganischen Ionen den Durchtritt. Transporter binden das zu transportierende Molekül und befördern dieses über Konformationsänderungen auf die andere Seite der Membran. Des Weiteren ist der Transport über Kanäle passiv und folgt ausschließlich dem elektrochemischen Gradienten. Bei Transporterproteinen erfolgt der Transport entweder aktiv oder passiv. Das Solut kann somit gegen den elektrochemischen Gradienten befördert werden. Die Transportproteine sind insgesamt hoch spezifisch, z. B. lassen Kanäle nicht jedes Ion passieren und Transporter unterscheiden nicht nur in Substanzklassen wie Kohlenhydrat oder Aminosäure, sondern transportieren in den Stoffklassen selektiv einzelne Vertreter.

So ist es nicht überraschend, dass die Sequenzierung des menschlichen Genoms ergab, dass wir über etwa 2000 verschiedene transporter verwandte Gene verfügen. (Landowski et al., 2007; Ballatori 2005). Das Ergebnis verdeutlicht die enorme Vielfalt und Signifikanz dieser Proteinklasse. Manche ererbte oder erlangte Krankheit ist auf defekte Transporter oder fehlerhafte Regulation ihrer Expression zurückzuführen. In den letzten Jahrzehnten ist es gelungen die physiologische Funktion vieler Transporterproteine aufzuklären, jedoch sind genauso zahlreiche Vertreter noch funktionell unbeschrieben. Um diese zu definieren, müssen das Substratspektrum und die Lokalisation bekannt sein.

1.2 Major Facilitator Superfamilie (MFS)

Generell wird zwischen zwei Klassen von Transporterproteinen unterschieden. Den Adenosin-Triphosphat (ATP)-Binding Cassette Transporter (ABC-Transporter) und den Major Facilitator Superfamilie (MFS-) Transportern. Erstere werden als primäre Transportsysteme bezeichnet und nutzen die Energie aus der Hydrolyse von ATP, um Moleküle zu transportieren. Die Mitglieder der zweiten Gruppe werden als sekundäre Transporter oder Carrier bezeichnet [Pao et al., 1998]. Der Transportvorgang wird in dieser Klasse durch die Energie bewerkstelligt, die in Form eines Konzentrationsgradienten entlang der Plasmamembran gespeichert ist. Dabei kommt es häufig zu einem sogenannten sekundär aktiven Transport, bei welchem der bergauf gerichtete Transport eines Soluts mit dem bergab gerichteten Strom eines anderen verbunden ist.

Allgemein spricht man von drei verschiedenen Arten der Transporter vermittelten Bewegung; dem Uniport, Symport und Antiport. Beim Uniport wird der Transport durch die Konzentrationsdifferenz der zu transportierenden Substanz in eine Richtung getrieben. Der Symport ist ein gekoppelter Transport eines Soluts, verbunden mit dem gleichzeitigen Transfer eines Zweiten in dieselbe Richtung. Beim Antiport werden zwei Substrate gegeneinander bewegt. Die MF-Superfamilie besteht aus 58 verschiedenen Familien mit bisher etwa 5000 sequenzierten Mitgliedern (Law et al., 2008). Die MFS-Transporter sind in allen Organismen und Zellen vertreten und bestehen fast ausschließlich nur aus einer Polypeptidkette, die sich im Durchschnitt aus 400 - 600 Aminosäuren zusammensetzt. Strukturell besitzen die meisten Mitglieder 12 Transmembran- α -helicale-Segmente (Lemieux et al., 2007).

1.3 Aminosäure-Transporter

Aminosäuren sind neben Nukleinsäuren, Kohlenhydraten und Lipiden die wesentlichen Moleküle der Zelle. Sie sind die molekularen Bausteine der Proteine, wie z. B. Enzyme, Transportproteine, Rezeptoren oder Cytoskelettfilamente. Da Aminosäuren Zellmembranen nicht via Diffusion passieren können und häufig nicht alle vor Ort in der Zelle gebildet werden, haben sich unterschiedliche Transportsysteme entwickelt. Seit den 1960er Jahren wurden zahlreiche As-Transporter identifiziert und die physiologische Funktion dieser Proteine im eukaryotischen System beschrieben (Christensen 1990). Aufgrund bestimmter Merkmale für Aminosäuretransporter wurde zur Klassifizierung der Begriff des Systems eingeführt (Langen und Broer 2004). In tierischen Geweben gibt es mehr als 20 verschiedene Systeme (Karlsons Biochemie, 2005). Wie sich später herausstellen soll ist für diese Arbeit besonders der Transport von L-Glutamat und L-Aspartat interessant. Der Transfer dieser beiden Aminosäuren findet hauptsächlich in dem System X_{AG} statt. Ein Transportersystem, das aus Na^+ - und K^+ -abhängigen Aminosäuretransportern besteht, die eine hohe Affinität zu Glutamat und Aspartat besitzen. Bekannteste Vertreter sind die excitatorischen Aminosäure Transporter (EAAT) 1 - 5. Ihre Hauptlokalisation ist das Gehirn, wobei sie auch im Herz- sowie Skelettmuskel, im Dünndarm, in der Leber, in der Niere, in der Lunge und in der Plazenta vorkommen (Palacin et al., 1998).

1.4 Transportproteine in der Niere

Die Niere ist neben der Leber das essentielle Organ zur Elimination von endogenen Substanzen, wie bspw. anfallenden Nebenprodukten des Stoffwechsels sowie exogenen Substanzen. Sie spielt zudem eine entscheidende Rolle bei der Rückgewinnung von Verbindungen und Ionen. Dabei werden diese Verbindungen von einem Kompartiment (Blut) in ein anderes (Urin) befördert, bzw. vom Urin zurück zum Blut und müssen auf diesem Weg eine Barriere passieren, die Tubuluszellen. Für diesen Transfer bedarf es der Hilfe von Transportproteinen, welche Ionen oder Moleküle aus dem jeweiligen Kompartiment in die Zelle schleusen und von dort über einen Efflux in das gegensätzli-

1.4.2 Das Nephron

Das strukturelle Grundelement der Nierenfunktion ist das Nephron. Es besteht aus einem Nierenkörperchen (Glomerulus) und einem Tubulussystem. Die Niere des erwachsenen Menschen enthält ca. 1 Millionen Nephrone (Karlsons Biochemie, 2005; Hughson et al., 2003). Der Glomerulus setzt sich aus einem Knäuel von Blutkapillaren und der diese umgebende Bowman-Kapsel zusammen. Das innere Epithel der Bowman-Kapsel bedeckt die Glomeruluskapillaren und das äußere Epithel begrenzt den Kapselraum nach außen und geht in das Tubulussystem über. In dem Kapillarknäuel eines Glomerulus strömt Blut über die zuführende Arteriole ein und verlässt ihn über die abführende (Karlsons Biochemie, 2005). Im Nierenkörperchen wird aus dem Plasma ein nahezu eiweißfreies Ultrafiltrat gebildet (glomeruläre Filtration), der sogenannte Primärharn. Dieser fließt anschließend durch das Tubulussystem, bestehend aus proximalem Tubulus [Abb. 1.3 (2, 3, 4)], Henle-Schleife [Abb. 1.3 (4, 5, 6)] und distalem Tubulus [Abb. 1.3 (6, 8)]. Abschließend durchströmt der Harn das Sammelrohrsystem [Abb. 1.3 (9, 10, 11, 12)] wird im Nierenbecken gesammelt und verlässt über den Harnleiter die Niere.

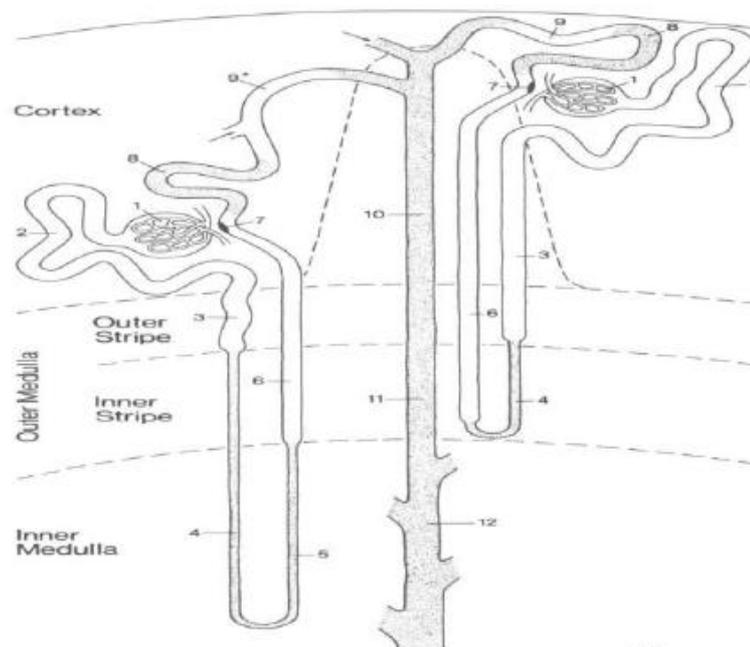


Abb. 1.2: Schematische Darstellung zweier Nephrone die gemeinsam in ein Sammelrohr münden. Linke Seite = Lang-Loop-Nephron mit langer Henle-Schleife, rechte Seite Kurz- Loop-Nephron mit kurzer Henle-Schleife. 1 = Nierenkörperchen, 2 = proximales Konvolut, 3 = Pars recta des proximalen Tubulus, 4 = absteigender dünner Schleifenschenkel der Henle-Schleife, 5 = aufsteigender dicker Schleifenschenkel der Henle-Schleife, 6 = Pars recta des distalen Tubulus, 7 = Macula densa, 8 = distales Konvolut, 9 = Verbindungstubulus, 10 = Kortikales Sammelrohr, 11 = äußeres medulläre Sammelrohr, 12 = inneres medulläre Sammelrohr. Abbildung von Kriz und Bankir 1988.

Während der Passage durch die verschiedenen Tubulusabschnitte verändert sich die Zusammensetzung des Primärharns aufgrund von Resorption und Sekretion grundlegend. Die resorbierenden und sekretorischen Mechanismen bestehen aus mindestens zwei Stufen. Für die Resorption gilt: (I) Aufnahme über die apikale Membran vom Tubuluslumen in die Tubuluszelle und (II) Abgabe von der Zelle über die basolaterale Membran ins Blut bzw. ins Interstitium. Für die Sekretion: (I) Aufnahme vom Interstitium über die basolaterale Membran und (II) Abgabe über die apikale Membran ins Tubuluslumen. Durch die glomeruläre Filtration und die tubuläre Sekretion werden Substanzen über die Niere exkretiert (Burckhardt et al., 2001).

Im proximalen Tubulus werden die meisten filtrierte organischen Anionen und Kationen aus dem Primärharn resorbiert und/oder vom Blut ins Tubuluslumen sekretiert. Hierbei sind Solute-Like-Carrier aus der Gruppe der SLC5, SLC13, SLC17, SLC22, SLC21/SLC0 und SLC26 beteiligt (Abb. 1.4). Insbesondere Transporter aus der SLC22-Familie spielen hierbei eine eminente Rolle. Die Zellen der Henle-Schleife sind sehr flach und durchlässig für Wasser, Ionen und gelöste Stoffe (Horn et al. Biochemie des Menschen, 2005). Wichtigste Aufgabe ist die Harnkonzentrierung, wodurch 70-80% des Wassers aus dem Primärharn rückresorbiert werden. Der distale Tubulus ist der Hauptort für die Na^+ und Cl^- Resorption durch den Na^+/Cl^- -Symporter (NCC/TSC) in der apikalen Membran. Des Weiteren ist dieser Tubulusabschnitt involviert in die Resorption von Calcium und Magnesium mittels einer Ca^{2+} -, Mg^{2+} -ATPase in der basolateralen Membran von distalen Tubuluszellen (Madsen et al., 2008). Das System der Sammelrohre startet mit dem Verbindungstubulus [Abb. 1.3 (9)], welches in die kortikalen Sammelrohre einmündet [Abb. 1.3 (10)]. Sie sind der finale Abschnitt der Niere, um den Elektrolyt- und Wasserhaushalt zu beeinflussen. Die Sammelrohre verlaufen gestreckt in Richtung Mark [Abb. 1.3 (11)], wo sie untereinander zusammenfließen [Abb. 1.3 (12)].

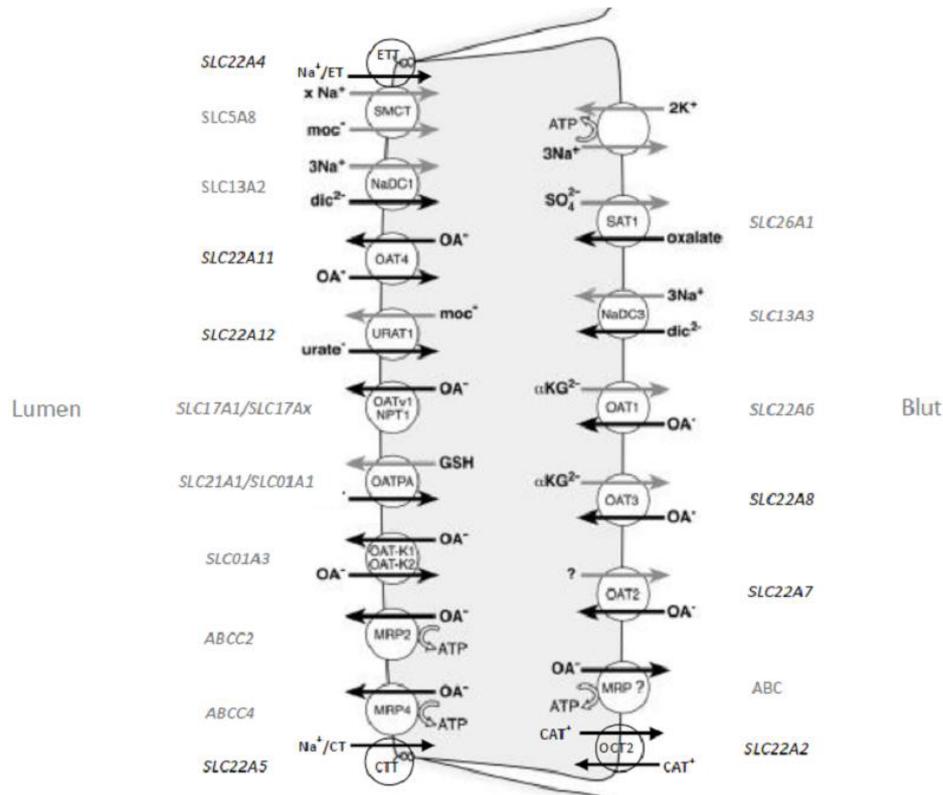


Abb. 1.3: Organische Anionen und Kationen Transporter in proximalen Tubuluszellen. Linke Seite = Tubuluslumen (Primärharn), rechte Seite = Interstitium (Blut). Die Gensymbole der Transporter aus der SLC22-Familie sind fettgedruckt. CTT = Carnitin Transporter, ETT = Ergothionein-Transporter, MRP = Multidrug Resistance-Associated Protein, NaDC = Natrium-Dicarboxylate Cotransporter, NPT1 = Natrium-Dependent Phosphate Transporter 1, OAT = Organic Anion Transporter, OATv1 = Voltage-Sensitive Organic Anion Transporter 1, OCT = Organic Cation Transporter, SAT1 = Sulfate/Anion Exchanger, SMCT = Natrium-Monocarboxylate Cotransporter, URAT1 = Urate Anionen Transporter 1. α KG $^{2-}$ = α -Ketoglutarat, dic $^{2-}$ = Dicarboxylate, moc $^{-}$ = Monocarboxylate, CAT $^{+}$ = Organische Kationen, OA $^{-}$ = Organische Anionen. Abbildung modifiziert aus Seldin and Giebisch's The Kidney 2007; Burckhardt und Koepsell.

1.5 Die SLC 22 Transporterfamilie

Die Familie der Solute-Like-Carrier (SLC) ist ein wichtiger Bestandteil der MFS. Sie ist aufgeteilt in 52 Unterfamilien mit über 300 Proteinen (Hediger et al. 2004). SLC22 ist eine der Unterfamilien bestehend aus organischen Kation-/Anion- und Zwitterion Transportern (Koepsell et al., 2007). Dabei bezieht sich die Bezeichnung SLC22 auf das jeweilige Gensymbol des Transporters. Eine andere Bezeichnung, die auf die Natur der Substrate zurückgeht, ist Amphiphilic Solute Facilitator (ASF) (Schömig et al. 1998).

Die Mitglieder der SLC22-Familie werden meist in der Niere und Leber exprimiert. Ihre Aufgabe in diesen Organen wird zur Zeit dahingehend interpretiert, dass sie bei der hepatobiliären sowie renalen Ausscheidung und Rückgewinnung von endogenen und xenobiotischen Substanzen involviert sind (Rizwan and Burckhardt, 2007; Koepsell et al., 2007; Macias et al., 2009). Der phylogenetische Stammbaum dieser Familie (Abb. 1.5) lässt sich in mehrere Untergruppen einteilen (Koepsell und Endou, 2004), wozu die die Zwitterionen-Transporter (ETT, CTT, (früher OCTN)), die organischen Kationen-Transporter (OCT, organic cation transporter) und die organischen Anionen-Transporter (OAT, organic anion transporter) zählen.

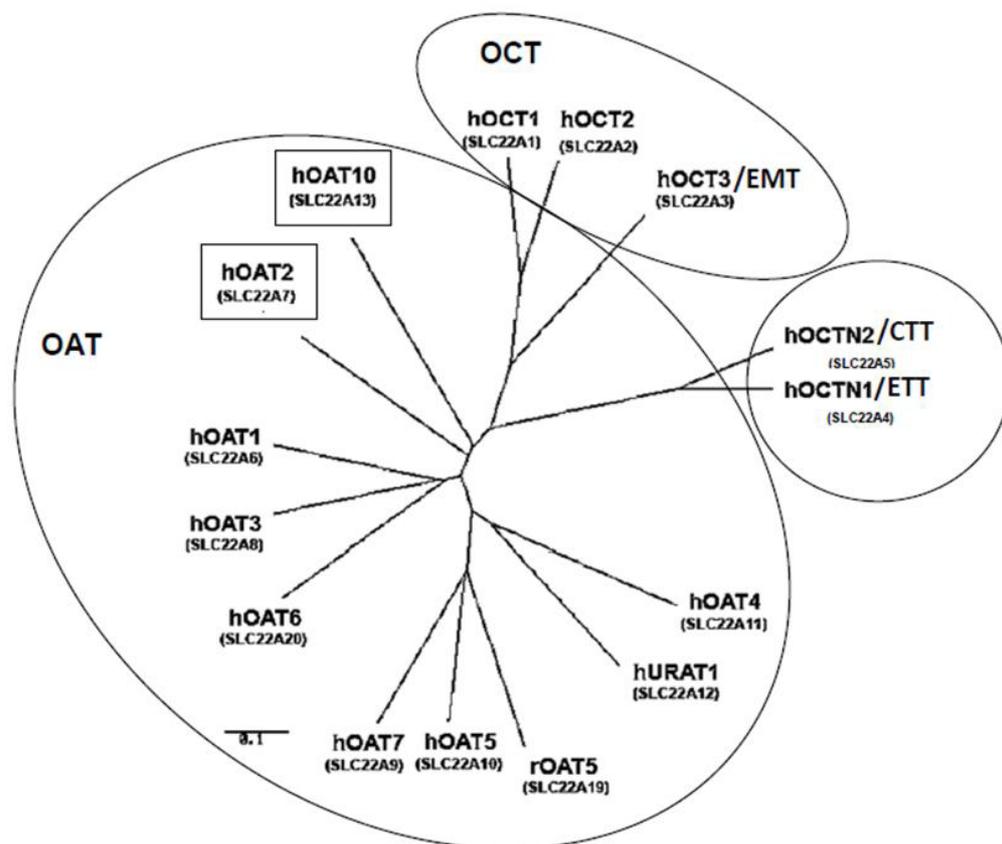


Abb. 1.4: Evolutionsstammbaum der humanen SLC22-Familie. Je kürzer der Abstand zwischen zwei Transportern, desto höher ist der Verwandtschaftsgrad zwischen den Proteinen. Basieren nach Homologie ihrer Aminosäuresequenz. OAT = organic anion transporter, OCT = organic cation transporter. Abbildung modifiziert nach Bahn et al., 2008.

1.5.1 SLC22A13 – Lokalisation und postulierte Funktion

SLC22A13 ist in Vertebraten ein evolutionär konserviertes Transporterprotein in der Plasmamembran. Bei Mensch und Ratte ist es vorwiegend in der Niere lokalisiert. Immunhistochemische Analysen haben gezeigt, dass SLC22A13 in der basolateralen Membran der Typ-A-Schaltzellen der Niere exprimiert wird. Dabei sind Typ-A-Schaltzellen im Epithel des distalen Tubulus, dem Verbindungstubulus und Sammelrohr zu finden. Wobei man das Sammelrohr noch in die Regionen Rinde und äußeres oder inneres Mark unterscheiden kann. Eine Antikörperfärbung konnte zeigen, dass SLC22A13 hauptsächlich im äußeren Mark des Sammelrohrs zu finden ist. In dieser Region sind Typ-A-Zellen der vorwiegende Typus an Schaltzellen (Kriz et al., 2008), welche morphologisch und funktionell in drei verschiedene Arten unterteilt werden; A-Typ, B-Typ und „non A-non B“-Typ. A-Typ Schaltzellen zeichnen sich besonders durch eine stark gewölbte apikale Membran aus, die ins Sammelrohlumen hineinreicht (Abb. 1.5). Außerdem sind sie charakterisiert durch eine Protonen-Efflux Pumpe (H^+ -ATPase) in der luminalen Membran sowie dem Anionenaustauscher 1 (AE1, SLC4A1, eine Spleißvariante des AEs aus Erythrozyten) in der basolateralen Membran. Schaltzellen haben wichtige Aufgaben im Säure-Base-Haushalt (Carraro-Lacroix and Malnic, 2010; Schuster, 1993; Wagner et al., 2009). A-Typ Zellen scheiden bei einer Azidose Protonen über die apikale H^+ -ATPase ins Sammelrohlumen und führen Hydrogencarbonat durch den AE1 dem Blut zu. Typ-B-Zellen wirken umgekehrt, sie transportieren bei Bedarf Protonen in das Blut. Die Bedeutung der A-Typ Zellen wird deutlich bei einer Störung der H^+ -Sekretion z. B. durch genetische Transporterdefekte oder durch eine Autoimmunerkrankung (Sjögren-Syndrom) (Wagner et al., 2009). Hierbei kommt es zu einer distalen RTA (renal tubular acidosis), d.h. zu einem pathologischen Anstieg des pH-Wertes im Blut.

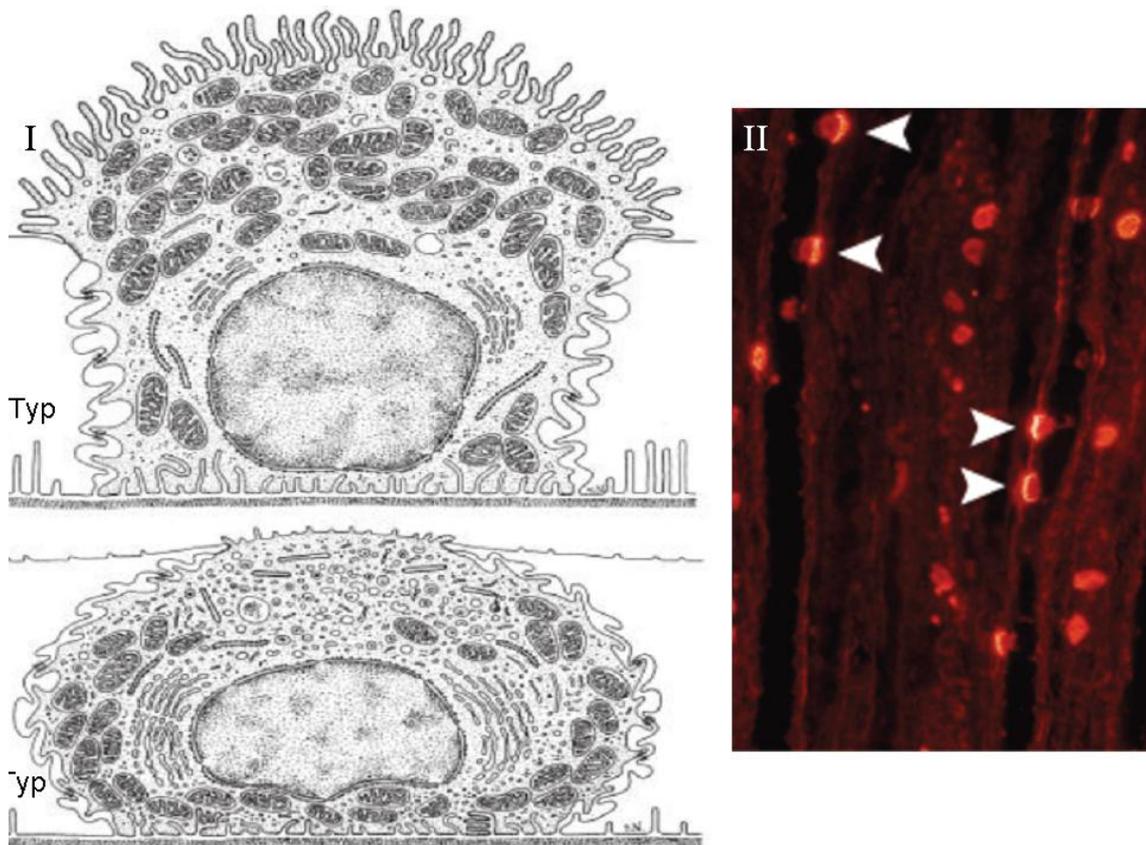


Abb. 1.5: (I) Schematische Darstellung von Schaltzellen. A-Typ (oben) und B-Typ (unten) im Sammelrohrsystem. Aus Seldin and Giebisch's The Kidney Vol. 4. (II) Immunfluoreszenzaufnahme des Rattennierenmarks (7 μm Paraffinschnitte) mit einem Antikörper gegen SLC22A13r. Zellen der medullären Sammelrohre zeigen eine basolaterale Antikörperfärbung. Pfeilspitzen: Zellen, deren apikale Membran stark in das Sammelrohr lumen hineinreicht.

Welche Rolle SLC22A13 in der basolateralen Membran der Schaltzellen spielt ist bisher nicht geklärt. Das Gen *Slc22a13* wurde 1998 durch das Japanese Human Genome Projekt entdeckt und befindet sich auf dem dritten Chromosom des Menschen (3p21.3) (Nishiwaki et al., 1998). Der in dieser Arbeit als SLC22A13 bezeichnete Transporter wurde zunächst als ORCTL3 (organic cation transporter-like 3) benannt (Nishiwaki et al., 1998) und galt lange als orphan transporter, d.h. es waren keine Substrate bekannt. 2008 hat die Gruppe von G. Burckhardt berichtet, dass der humane SLC22A13 bei Expression in *Xenopus*-Oozyten die Aufnahme von Nikotinsäure, p-Aminohippurat (PAH) und Harnsäure katalysiert (Radiotracer-Assay) (Bahn et al., 2008). Dabei war Nikotinsäure mit Abstand das beste Substrat. Die Transporteffizienz (= Aufnahmegeschwindigkeit / Substratkonzentration) lag bei $2.5 \mu\text{l Oocyte}^{-1} 30 \text{ min}^{-1}$. Eine heterologe Expression in einer Mammalia-Zelllinie wurde nicht durchgeführt. Die geprüften Verbin-

dungen sind bekannte Substrate der Transporter OAT1 (*slc22a6*) und URAT1 (*slc22a12*). Die vorgeschlagene Substratspezifität wirft jedoch Fragen zu der Lokalisation in dem basolateralen Kompartiment der Plasmamembran der Typ-A-Schaltzellen auf. Der physiologische Nutzen einer Aufnahme oder Abgabe von Nikotinsäure bleibt offen, weshalb die endgültige Substratspezifität dieses Transporters als unbeantwortet anzusehen ist.

1.6 Substratsuche via LC-MS/MS-Technik

Die Aufklärung der physiologischen Funktion von Transportproteinen ist von grundlegendem Interesse. Dabei erschließt sich der Nutzen eines Transporters erst aus der Verbindung von Lokalisation und Substratspezifität. Das Substratspektrum erfährt hierbei besondere Beachtung. Erst wenn ein physiologisches Substrat entdeckt ist, kann seine Bedeutung im Organismus erklärt und pathophysiologische Konsequenzen erforscht werden. In der Regel werden Transportmechanismen mit radioaktiv markierten Substanzen untersucht (Radio Tracer Assays). Diese Methode setzt jedoch eine Vorstellung des Substrates voraus, da die Substanz entsprechend markiert, erworben oder synthetisiert werden muss. Was die zur Verfügung stehenden Substrat-Kandidaten limitiert. Wird ein Transporter mit unbekanntem Substratspektrum untersucht, werden üblicherweise zunächst die Substrate der nächstverwandten bekannten Transporter getestet. Auf diese Weise kann das physiologische Substrat möglicherweise übersehen werden.

Um dies zu vermeiden, wurden in dieser Arbeit die analytischen Möglichkeiten der Massenspektrometrie eingesetzt. Dieses Verfahren ermöglicht eine spezifische Erkennung unmarkierter Substanzen aus komplexen Verbindungsgemischen. Dabei werden die Gemische durch die Kopplung von Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie zweidimensional (Zeitachse und m/z -Achse) aufgetrennt und detektiert (Siuzdak, 1994). Die beiden Datensätze werden dann, um Unterschiede aufzuspüren, durch einen selbstentwickelten Algorithmus verglichen (Gründemann et al., 2005). Wir bezeichnen das Verfahren als LC-MS-Differenz-Abtönung (engl. LC-MS difference shading). Die angewandte Strategie zur Substratsuche ist zur Veranschaulichung in Abb. 1.6 dargestellt. Mit Hilfe der Methode der LC-MS Differenz Abtönung konnte das physiologi-

sche Substrat für den Ergothionein-Transporter aufgedeckt werden (Gründemann et al., 2005) sowie Orotsäure und Glutamat als Substrate für OAT2 (Fork, 2011).

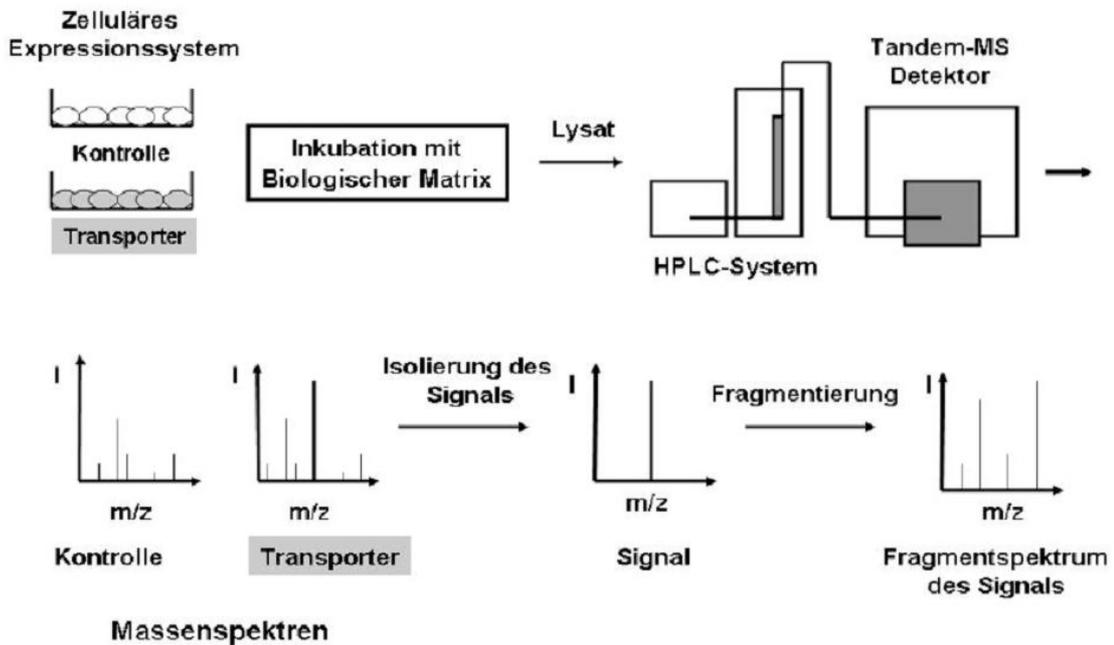


Abb. 1.6: Schematische Darstellung der Substratidentifizierung mittels LC-MS/MS Screening. I = Intensität, m/z = Masse durch Ladung. Dissertation S. Harlfinger, 2005 (AG Gründemann).

1.7 Ziel der Arbeit

Die physiologische und pathophysiologische Bedeutung des Transporters SLC22A13 ist bislang nicht geklärt. Aufschluss über die natürliche Rolle eines Transporters geben zwei Merkmale: das Substratspektrum und die Lokalisation im Körper. Basierend auf den Vorarbeiten von Dr. Christian Fork ist die Lokalisation des Transporters als aufgeklärt anzusehen. Die gewählten Methoden (Antikörpernachweis im Rattennierenschnitt, validiert durch real-time PCR von Nierenzonen und Western-Blot) lassen kaum einen Zweifel an ihrer Richtigkeit zu. SLC22A13 wird ausschließlich in der basolateralen Membran der Typ-A-Schaltzellen im äußeren Mark des Sammelrohrs exprimiert. Es ist jedoch fraglich, warum dieser Transporter nur an diesem Standort exprimiert wird. Einen besonderen Bedarf für die Aufnahme oder die Abgabe von Nikotinsäure, wie von

Bahn et al. vorgeschlagen, ist hier schwer zu erkennen. Der heterolog in 293-Zellen exprimierte Transporter SLC22A13h wird umfassend per LC-MS-Differenz-Abtönung untersucht. Moleküle, die auf diesem Weg in den Fokus geraten werden auf ihre Transportfähigkeiten durch SLC22A13 mittels LC-MS/MS und/oder Radiotracer Assays untersucht. In Voruntersuchungen wurde gemessen, dass Orotsäure um den Faktor 10 stärker in der Zelle angereichert wird, als nach dem elektrochemischen Gleichgewicht zu erwarten wäre. Die zugrunde liegende Triebkraft soll durch trans-Stimulation von ausströmender ^3H -Orotsäure aufgeklärt werden.

Final soll die transportkinetische Charakterisierung des physiologischen Substrates erfolgen, um so die physiologische und pathophysiologische Bedeutung von SLC22A13 zu verstehen.

2 Material und Methoden

Alle für diese Arbeit durchgeführten Experimente wurden im Institut für Pharmakologie der Universität zu Köln in der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Dirk Gründemann durchgeführt.

2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

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

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

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

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

2.2 Lösungen und Puffer

Lösungen bzw. deren Stammlösungen und Puffer wurden mit deionisiertem Wasser aus einer Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q Advantage A10 (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) bei Raumtemperatur angesetzt und anschließend autoklaviert oder steril filtriert (Steril Syringe Filter w/0,2 µm Polyethersulfon Membran, VWR International, Leuven, Niederlande). Bei flüssigem Autoklaviergut wurde die Flasche stets nur zu 2/3 befüllt und der Deckel im Autoklaven leicht aufgedreht um ein Überlaufen oder eine Explosion der Flasche zu verhindern. Der pH-Wert der jeweiligen Lösungen und Puffer wurde mittels pH-Meter (Typ 761 Calimatic, Knick, Berlin, Deutschland) gemessen. Die Zusammensetzungen der verwendeten Puffer und Lösungen sind bei den entsprechenden Methoden angegeben.

2.3 Enzyme

Die Enzyme wurden in allen Ansätzen in einer einfachen Pufferlösung verwendet.

Tab. 2.1: Restriktionsendonukleasen.

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

Tab. 2.2: Enzyme für die Klonierung

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

Tab. 2.3: Enzyme für die PCR.

Bezeichnung	Hersteller
BigDye® Terminator Mix v 1.1	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
GoTaq Polymerase	Promega (Madison, WI, USA)
High Fidelity PCR-Enzym-Mix	MBI Fermentas (St.Leon Rot, Deutschland)

2.4 Kit-Systeme

Folgende Kit-Systeme wurden nach den Herstellerangaben verwendet.

Bezeichnung	Hersteller
BCA Protein Assay Kit	Pierce Biotechnology (Rockford, IL, USA)
Plasmid Maxi Purification Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Plasmid Mini Purification Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Tfx TM -50-Transfection Kit	Promega (Madison, WI, USA)

2.5 Bakterienstamm und Zelllinie

Bei den verwendeten Bakterien handelte es sich um *Escherichia coli* (*E. coli*) des Stamms DH10B (Genotyp: F-, *mcrA*, (*mrr-hsdRMs-mcrBC*), *80dlacZ* M15, *lacX74*, *deoR*, *recA1*, *araD139*, (*ara, leu*) 7697, *galU*, *galK*, *rpsL*, *endA1*, *nupG*). *E. coli* wurde in Flüssigmedium und auf Agar-Platten kultiviert. Zur Selektion wurde Ampicillin verwendet.

Die Transporterexpression fand in der Zelllinie Human Embryonic Kidney (HEK-293) American Tissue Type Culture Collection 1988, ATCC CRL-1573 HEK293-Zellen, statt.

2.6 Expressionssystem pEBTetD

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

Das Epstein-Barr-Virus ist ein humanpathogenes DNA-Virus, das zur Familie der Herpesviren gezählt wird. Es wurden zwei Regionen der Virus-DNA identifiziert, die eine autonome Replikation zirkulärer DNA erlauben: der Replikationsursprung oriP und das DNA-Bindeprotein EBNA-1 (Epstein-Barr nuclear antigen) (Yates et al., 1985). Da sich alle notwendigen Bestandteile für die induzierbare Expression, im Gegensatz zu anderen Expressionssystemen (z. B. Flp-InTM-T-RexTM-System, FIT-System, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), auf einem einzigen Vektor befinden, ist eine Zelllinie schon nach einer einzigen Transfektion und anschließender Selektionsphase etabliert, was eine Zeitersparnis von ca. 2 - 9 Wochen gegenüber anderen Systemen, wie dem FIT-System, bedeutet.

In Abbildung 2.1 ist der schematische Aufbau des Vorläufer-Vektors pEBTet dargestellt. Zur Vermehrung in Bakterien enthält pEBTet einen pUC-Replikationsursprung (engl., plasmid of the University of California) mit einer Ampicillin-Resistenz-Kassette.

Weiterhin enthält dieser Vektor einen SV40 Promotor (Simianes Virus 40), der in humanen Zelllinien nach erfolgreicher Transfektion eine konstante Puromycinresistenz aufrecht erhält. Der Tet-Repressor wird kontinuierlich exprimiert und bildet Homodimere, die an die Tet-Operatoren binden und so die Transkription der stromabwärts liegenden cDNA verhindert. Durch die Bindung von Doxozyklin an den Tet-Repressor ändert sich dessen Konformation, wodurch er nicht mehr an den Operator binden kann und somit die Transkription freigibt.

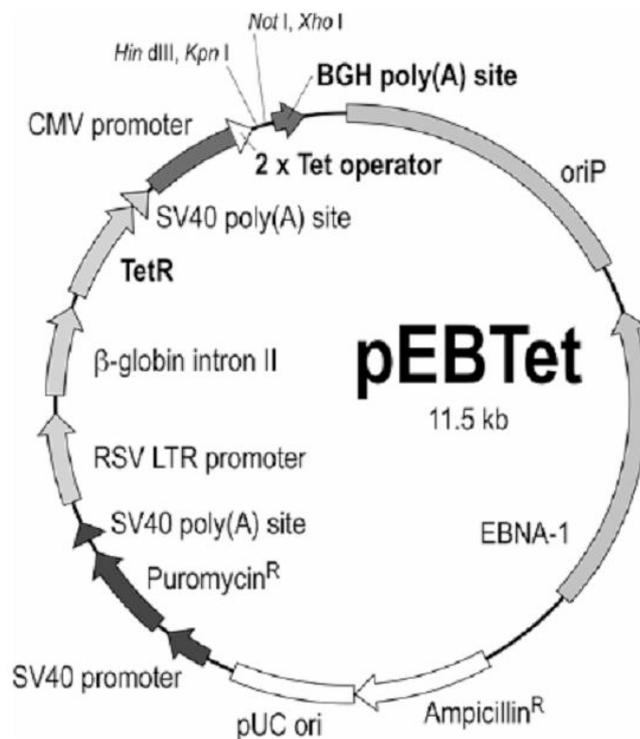


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des pEBTet-Expressionsvektors. Die funktionellen Elemente und deren Orientierung sind durch Pfeile dargestellt. Außerhalb des Vektors sind die verwendeten Schnittstellen für die Klonierung (*Not I*, *Xho I*, *Kpn I* und *Hind III*) dargestellt.

Da der ursprüngliche pEBTet-Vektor im nicht-induzierten Zustand eine gewisse Grundexpression besaß, ergab sich ein Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis auf mRNA-Ebene von 100:1 (Bach et al., 2007). Die mRNAs der exprimierten Transportproteine wiesen jedoch eine hohe Stabilität auf. Aufgrund der hohen Translationseffizienz führte dieser geringe mRNA-Hintergrund im nicht-induzierten Zustand bei der funktionellen Charakterisierung der Transporter zu einem starken Hintergrund in der Substrataufnahme. Dieses Problem konnte behoben werden indem die BGH poly-(A)-site (bovine growth

hormone) stromabwärts der cDNA aus dem Vektor pEBTet entfernt wurde. Bei dem so entstandenen Vektor pEBTetD (D, Deletion) erfolgt die Termination der Transkription durch den oriP (Yates et al., 2000) was auch durch die Länge der mRNAs bestätigt wurde. Der fehlende poly-(A)-Schwanz führt zu einer instabileren mRNA und die Anzahl translaterter Proteine pro mRNA-Molekül wird verringert (Kahvejian et al., 2005; Kozak, 2004).

2.7 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden bei der Firma Biomers.net bestellt und in sterilem 1x TE gelöst. Die Konzentration der Stammlösungen betrug 50 - 100 μM .

Name	Orientierung	Sequenz
FSLC22A13r#85	Sense	GCCAGACCCTGAAGGACA
RSLC22A13r#85	Antisense	TCTTTGGGGTGCAGTTTTGT

2.8 Mikrobiologische Methoden

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

2.8.1 Nährmedien

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

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

Agarplatten: Um Agarplatten herzustellen, wurde LB-Medium mit 15 g/l Agar versetzt, autoklaviert und anschließend bei 4 °C gelagert. Vor dem Gießen der Platten wurde der Agar aufgeköcht, und nach dem Abkühlen auf 50 °C wurde er mit der entsprechenden Menge Antibiotikum versetzt und in sterile Petrischalen (Durchmesser 10 mm) gegossen. Nach dem Aushärten wurden die Platten bei 4 °C gelagert.

LB-Medium

10 g/l Casein Hydrolysat

5 g/l Hefeextrakt

5 g/l NaCl

LB-Agar

10 g/l Casein Hydrolysat

5 g/l Hefeextrakt

5 g/l NaCl

15 g/l Agar

SOC-Medium

10 mM MgCl₂

10 mM MgSO₄

20 mM Glukose

in SOB-Mg Medium aufgenommen

SOB-Mg Medium

20 g/l Casein Hydrolysat

5 g/l Hefeextrakt

10 mM NaCl

2,5 mM KCl

Ampicillin 100

100 mg/ml Ampicillin, steril filtriert

2.8.2 Kultur und Lagerung von *E. coli*

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

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

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

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

2.8.3 Herstellung elektrokompetenter Bakterien und Elektroporation

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

Eine Einzelkolonie von *E. coli* DH10B wurde über Nacht in 5 ml SOB-Mg bei 37 °C und 200 UpM inkubiert. Am folgenden Tag wurden 4 ml dieser Vorkultur in 200 ml SOB-Mg suspendiert und für 2,5 h inkubiert (37 °C, 200 UpM). Anschließend wurde die Kultur 10 min auf Eis inkubiert, zentrifugiert (10 min, 4 °C, 3000 x g) und der Überstand vollständig ab dekantiert. Das Bakterienpellet wurde daraufhin in 100 ml eiskalter 10%iger Glycerol-Lösung resuspendiert. Daran schließt sich erneut die beschriebene Zentrifugation an und der Waschschrift wurde wiederholt. Nach erneuter Aufnahme der Pellets in 100 ml 10%iger Glycerol-Lösung erfolgte eine weitere Zentrifugation (10 min, 300 x g). Der Überstand wurde daraufhin verworfen und das Pellet im Restüberstand aufgenommen. Die Zellsuspension wurde zu je 26 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Elektroporation:

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

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

überführt und 1 h bei 37 °C, 200 UpM inkubiert. Während dessen wird die auf dem Plasmid kodierte β -Lactamase exprimiert, die eine Ampicillinresistenz vermittelt. Anschließend wurden 100 μ l der Kultur, sowie eine 1:100 Verdünnung in LB-Medium auf Agarplatten mit Antibiotikum-Zusatz ausplattiert.

2.9 Molekularbiologische Methoden

2.9.1 *In vitro* Mutagenese von Plasmid DNA

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

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

NZY+

10 g/l	Casein-Hydrolysat
5 g/l	Hefeextrakt
5 g/l	NaCl
12,5 ml	1 M MgCl ₂
12,5 ml	1 M MgSO ₄
20 ml	Glukose 20% (w/v)

2.9.2 Phenol-Chloroform-Extraktion

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

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

Zur Extraktion von Nukleinsäuren, wurde die Nukleinsäurelösung mit einem gleichem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, 10 sec gut gemischt und zentrifugiert (1 min, 16000 x g). Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Die untere organische Phase wurde mit 0,5 x Volumen TE wie beschrieben extrahiert. Die wässrigen Phasen wurden vereinigt. Anschließend wur-

de, um die verbleibenden Phenolreste aus der Lösung zu entfernen, gleiches Volumen CIA Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zur wässrigen Phase gegeben, gut durchmischt und zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde erneut abgenommen und die DNA durch Fällung mit Alkohol (siehe 2.5.2.3) konzentriert.

2.9.3 Alkohol-Fällung

Zur Konzentrierung und Reinigung werden Nukleinsäuren mit Alkohol gefällt. Lösungen von DNA wurden mit 0,1 x Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 2,5 x Volumen 96% Ethanol bzw. 1 x Volumen Isopropanol versetzt, gut gemischt und zentrifugiert (10 min, 16000 x g). Bei Nukleinsäurekonzentrationen $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ wurde vor der Fällung lineares Polyacrylamid als Fällhilfe zugesetzt (Gaillard und Strauss, 1989). Nach der Zentrifugation wurde das DNA-Pellet mit 150 μl 70% Ethanol gewaschen und zentrifugiert (5min, 1600 x g). Der Überstand wurde daraufhin abgenommen und die DNA bei 60 °C bis zum verschwinden letzter Flüssigkeitstropfen getrocknet. Das Pellet wurde in TE aufgenommen. □

2.9.4 Gelelektrophorese und –extraktion

Gelelektrophorese:

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

perspiralisierung abhängig. Durch Zugabe von Ethidiumbromid, das zwischen die Basenpaare der DNA interkaliert, kann die DNA unter UV-Licht durch die Fluoreszenzstrahlung (590 nm) des Ethidiumbromid-DNA-Komplexes identifiziert werden.

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

Gelextraktion:

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

TAE:

40 mmol/l

Tris

1 mmol/l

EDTA

pH 8 mit Essigsäure

Gelbeladungspuffer:

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

2.9.5 Restriktion von DNA

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

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

2.9.6 Ligation

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

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

Ansatz: Blunt-end Ligation

150 fmol DNA-Fragment

50 fmol Vektor pUC19 mit Sma I oder HincII linearisiert und dephosphoryliert

1 x Puffer T4 DNA-Ligase

15 U T4 DNA-Ligase

H₂O ad 10 µl

Ansatz: Sticky End Ligation

Je 150 fmol DNA-Fragment

50 fmol Vektor pEPTet mit *Hind*III und *Xho*I geschnitten

1 x Puffer für T4 DNA-Ligase

2,5 U T4 DNA-Ligase

H₂O ad 20 µl

2.9.7 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Für die Amplifizierung von DNA wurde die Polymerase-Kettenreaktion verwendet. Sie ist ein Verfahren zur selektiven Amplifikation von DNA Sequenzen, die durch Bindung zweier Primer an eine DNA-Matrize begrenzt werden (Mullis et al. 1987). Die PCR besteht aus einem Denaturierungsschritt, bei der sich die beiden Stränge der Template-DNA trennen, aus einem Annealingschritt bei der die Temperatur gesenkt wird, so dass die Primer an ihrer komplementären Sequenz der Template-DNA hybridisieren können, sowie aus einem Elongationsschritt bei der die Polymerase die Nukleotide an die 3'-OH-Primer-Enden anheftet und so die restliche komplementäre Sequenz synthetisiert

bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt. Daraufhin erfolgt erneut die Denaturierung und der Zyklus beginnt von neuem.

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

Die Polymerase wurde direkt vor dem Start der PCR dazugegeben. Nach Durchmischung wurde der Ansatz im PCR-Thermoblock (Mastercycler Personal, Eppendorf, Deutschland) 5 min bei 96 °C denaturiert. Zur Amplifizierung schlossen sich folgende Temperaturzyklen in 30-facher Wiederholung an:

Denaturierung	94 °C	30 sec
Anlagerung	55 °C	60 sec
Elongation	72 °C	60 sec

Zur Optimierung der PCR konnten einzelne Parameter variiert werden, z. B. die Anlagerungstemperatur und die Anzahl der Zyklen.

2.9.8 Sequenzierung

Zur Sequenzierung der klonierten Fragmente wurde das BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v1.1 benutzt (T-Mix). Die Analyse erfolgt durch den 16 Kappilar-Sequencer (ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems Hitachi, Foster City, CA, USA). Die Sequenzier-Reaktion erfolgt nach der Didesoxymethode nach

Sanger (Sanger et al., 1977). Jedes der vier ddNTPs ist mit einem Unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff markiert, der während der Elektrophorese mittels Laser angeregt und gemessen wird. Die Zugabe des T-Mixs erfolgte nach der ersten Denaturierung.

2.9.9 Plasmidpräparation aus *E.coli*

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

2.9.10 Konzentrationsbestimmung von DNA

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

2.10 Zellbiologische Methoden

Alle Arbeitsschritte, wurden unter einer Sicherheitsbank (Hera Safe, Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland) mit vertikalem Luftstrom durchgeführt. Medien und Puffer wurden vor dem Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt. Alle Puffer und Lösungen wurden vor dem Gebrauch autoklaviert. Antibiotika, die nicht autoklaviert werden konnten, wurden durch Filtration (Steril Syringe Filter w/0,2 µm Polyethersulfon Membran, VWR International, Darmstadt, Deutschland) sterilisiert. Alle Gegenstände wurden vor dem Gebrauch unter der Sicherheitsbank mit 70 % (v/v) Isopropanol desinfiziert.

2.10.1 Kultivierung und Passage von HEK-293-Zellen

Die Kultivierung der HEK-293-Zellen (human embryonic kidney, American Tissue Type Culture Collection 1988, ATCC CRL-1573) erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre (Hera Cell, Hereus, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland). Die Zellen wurden in 175 cm² Plastikkulturflaschen (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) kultiviert. Als Wachstumsmedium wurde ein mit 10 % hitzeinaktiviertem (60 min, 56 °C) fötalem Kälberserum (FCS, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) versetztes Dulbeco's Modified Eagle Medium (DMEM, Life Technologies, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt. Die Subkultivierung (Passage) der Zellen erfolgte stets zu einem Zeitpunkt, an dem die Zellen fast zu 100 % konfluent waren. Je nach Bedarf wurden 10 - 40 % der Zellen verwendet, um die Kultur fortzusetzen. Die Zellen wurden in eine neue 175 cm² Kulturflasche gegeben und auf ein Volumen von 30 ml mit DMEM mit 10 % FCS aufgefüllt.

2.10.2 Stabile Transfektion von HEK-293-Zellen

Wird Fremd-DNA in eukaryotische Zellen eingebracht so bezeichnet man diesen Vorgang als Transfektion. Dabei kann man unterscheiden zwischen dem temporären Einbringen (transiente Transfektion) des Plasmides in die Wirtszelle und einem dauerhaften Einbau (stabile Transfektion).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen über Lipofektion (Sambrook und Russell, 2001) mit einem Transfektionsreagenz transfiziert. Das verwendete TfxTM-50 Reagenz (Promega Madison, WI, USA) besteht aus den kationischen Liposomen-bildenden Molekülen N,N,N',N'-Tetramethyl-N,N'-(bis(2-hydroxyethyl)-2,3,-dioleoyloxy)-1,4-butandiammoniumiodid und L-Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE) (Chen et al., 1998). Die Durchführung der Transfektion erfolgte nach Herstellerprotokoll. Nach der Inkubation wurde das Gemisch aus den Kulturflaschen entfernt und durch 15 ml DMEM mit 10 % FCS ersetzt. Am nächsten Tag erfolgte die Umstellung auf Selekti-

onsmedium, das sich aus dem Wachstumsmedium DMEM, 10 % FCS und Puromycin (MP Biomedicals, Eschwege, Deutschland), in einer Endkonzentration von 3 µg/ml, zusammensetzte.

2.11 Charakterisierung von Transportproteinen

2.11.1 Aussaat der Zellen

Für die Aktivitätstests wurden die transfizierten Zellen in Polystyrol-Schälchen (Ø 60 mm, Nunclon™, Nunc, Wiesbaden, Deutschland) ausgesät. Um eine bessere Adhärenz der Zellen während des Aufnahmeversuches zu gewährleisten wurden die Polystyrol-Schälchen zuvor mit 2 ml steril filtriertem Poly-L-Ornithin beschichtet und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Schälchen wurden mit 3 ml serumfreiem DMEM gewaschen und anschließend ca. 2 Mio. Zellen in 4 ml DMEM mit 10 % FCS und 3 µg/ml Puromycin ausgesät. Mindestens 20 h vor dem Aufnahmeversuch wurde die Expression der Transporter durch Mediumwechsel mit dem Zusatz von 1 µg/ml Doxyzyklin induziert. Zum Zeitpunkt der Aufnahmeversuche lag die Konfluenz der Zellen bei mindestens 70 %.

Poly-L-Ornithin Lösung

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

2.11.2 Vorinkubation

Die Aktivitätstests wurden nicht unter sterilen Bedingungen durchgeführt, da die Zellen entweder unmittelbar nach dem Versuch lysiert oder nicht mehr weitergeführt wurden. Vor der Substrataufnahme bzw. -abgabe wurde das Wachstumsmedium der Zellen entfernt und sie wurden für mindestens 20 min bei 37°C mit 4 ml KRH vorinkubiert. Serum- und Mediumbestandteile werden dadurch entfernt und die Zellen equilibrieren in der KRH-Lösung. Sollten z. B. die Auswirkungen verschiedener pH-Werte oder Ionenkonzentrationen der Aufnahmelösung auf den Transportvorgang untersucht werden, so schloss sich an die Vorinkubation noch ein Umpuffern oder Waschen der Zellen mit Pufferlösungen (den Aufnahmebedingungen entsprechend) an.

KRH

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

2.11.3 Substrataufnahme

Vor der Substrataufnahme wurde die Vorinkubationslösung entfernt. Das Substrat wurde, wenn nicht anders beschrieben, den Zellen in einem physiologischen Puffer (KRH, 37°C) angeboten. Zwei ml der entsprechenden Aufnahmelösung wurden jeweils in die Schälchen gegeben. Enthielt die Aufnahmelösung radiomarkierte Substratmoleküle, wurden Konzentrationen von 0,1 µmol/l eingesetzt. Wurden die Proben der Aufnahme-

versuche mittels LC-MS/MS quantifiziert, betrug die Konzentration der unmarkierten Substrate in der Regel 10 $\mu\text{mol/l}$. Zur Bestimmung initialer Aufnahmeraten betrug die Aufnahmezeit 1 min. Die Aufnahmezeit variierte entsprechend bei der Untersuchung von Zeitverläufen der Substrataufnahme. Wenige Sekunden vor Beendigung der Aufnahmezeit wurde die Aufnahmelösung entfernt, so dass genau zur Beendigung der Aufnahmezeit die Aufnahme durch Waschen der Zellen mit 4 ml KRH (4°C) gestoppt werden konnte. Bei dieser Temperatur zeigt der Transporter keine Aktivität mehr. Der eiskalte KRH wurde sofort wieder entfernt und der Waschschrift wurde insgesamt drei mal wiederholt, um sämtliche Substratmoleküle, die noch außen an den Zellen gebunden oder adsorbiert sein könnten, zu entfernen.

2.11.4 Zellaufschluss

Je nach Quantifizierungsmethode wurden die Zellen mit dem Ziel der Bestimmung der unterschiedlichen Substratmenge mit verschiedenen Lösungen lysiert. Bei Radiotracer Assays sowie für die Proteinbestimmung erfolgte die Lyse durch Zugabe von 1 ml Triton X-100 in 5 M Tris, pH 7,4. Wurden die Lysate mittels LC-MS/MS quantifiziert, so wurde 100% MeOH in gleichem Volumen verwendet. Die Inkubationsdauer betrug immer 30 min. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Lysate durch Auf- und Abpipetieren homogenisiert und aliquotiert. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

2.11.5 Efflux-Messungen

Für die Efflux-Messungen wurde ebenfalls mit KRH als physiologischen Puffer gearbeitet, jedoch wurde der Puffer ohne KH_2PO_4 hergestellt. Da das Phosphat die die LC-MS/MS Messung stark beeinflusst. Nach der Vorinkubationsphase wurde zunächst der KRH-Puffer entfernt. Der Effluxversuch begann mit Zugabe von 2 ml KRH zu den Zellen. Zur Probenentnahme wurde zu den angegebenen Zeitpunkten jeweils 200 μl des Aufnahmepuffers entnommen. Nach dem Versuch konnten die Zellen für die Proteinbestimmung in 1 ml Triton X-100 in 5 M Tris, pH 7,4 lysiert werden.

2.12 Bestimmung der Radioaktivität

Zur Quantifizierung der Substratkonzentrationen radioaktiv markierter Substrate wurde die Flüssigszintillationszählung eingesetzt. Dabei wird der β -Zerfall in den Proben detektiert. Voraussetzung für die Detektion ist die so genannte Szintillationsflüssigkeit. Sie enthält ein organisches Lösungsmittel und eine leicht zur Fluoreszenz anzuregende Verbindung, den so genannten Szintillator. Das organische Lösungsmittel wird durch die Energie des radioaktiven Zerfalls angeregt, überschüssige Energie wird von den Lösungsmittelmolekülen auf die Szintillatoren transferiert. Diese werden ebenfalls angeregt und gehen unter Emission von Licht schnell wieder in den Grundzustand über. Die Lichtblitze werden von einem Photomultiplier in ein elektrisches Signal umgewandelt und detektiert. Die Lösungsmittel emittieren bei ihrem Übergang in den Grundzustand selbst kein Licht. Als Szintillationsflüssigkeit wurde Ready Flow III der Firma Beckman, USA eingesetzt, der Flüssigszintillationszähler war ein 1214 Rackbeta von LKB Wallac. Von den Zellysaten wurden jeweils 700 μl mit 2,1 ml Szintillationsflüssigkeit in einem Szintillationsröhrchen gemischt. Von allen Zählraten wurde die so genannte Nullrate abgezogen, hierfür wurden 100 μl Vorinkubationslösung (KRH, pH 7,4) und 700 μl Lyselösung (0,1 % (v/v) Triton X-100 in 5 mmol/l Tris, pH 7,4) mit 2,1 ml Szintillationsflüssigkeit gemischt und gemessen. Als Eichpunkt für die Konzentrationsbestimmung wurden von den Aufnahmelösungen jeweils 100 μl mit 700 μl Lyselösung und 2,1 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt, bei einer Substratkonzentration von 0,1 $\mu\text{mol/l}$ entspricht diese Zählrate dann einer Stoffmenge von 0,01 nmol. Da das Detergenz Triton X-100 zu einem so genannten Quenching der erzeugten Lichtemission führt, ist darauf zu achten, dass in allen Proben jeweils das gleiche Volumen Lyselösung enthalten ist. Quenching kommt im Szintillationsansatz zustande, wenn Substanzen enthalten sind, vor allem aromatische Ringsysteme, die die β -Strahlung oder die Energie der Lösungsmittelmoleküle selbst absorbieren. Jedes Röhrchen wurde dreimal für 10 min im Flüssigszintillationszähler gezählt. Bei der Auswertung wurde aus den Zählraten der Mittelwert gebildet.

2.13 Proteinbestimmung

Aufgrund der Tatsache, dass sich die ermittelten spezifischen Transportaktivitäten auf mg Protein beziehen, war es essentiell den Proteingehalt der Zelllysate zu bestimmen. Dazu wurde die BCA-Methode verwendet (Smith et al., 1985). Hierzu wurde der BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) benutzt. Die Methode beruht auf der Tatsache, dass Proteine in alkalischen Milieu Cu^{2+} zu Cu^+ reduzieren (Biuret-Reaktion). Die Bichinolin-4-Carbonsäure (BCA) bildet einen wasserlöslichen und intensiv purpur gefärbten Chelatkomplex mit den Cu^+ -Ionen. Die Aufnahmeproben wurden 1:10 mit 0,15 mol/l NaCl-Lösung verdünnt. 40 μl dieser Verdünnung wurden jeweils in Vertiefungen einer 96-Well-Platte pipettiert. 200 μl Färbelösung wurden hinzugefügt. Danach wurde die Platte für 30 min bei 37°C inkubiert, bevor die photometrische Quantifizierung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 568 \text{ nm}$ am Elisa-Reader (Thermo Max Microplate Reader, Molecular Devices) erfolgte. Mit Hilfe einer Eichreihe aus Rinder-Serum-Albumin (BSA) konnte die Proteinkonzentration im Zelllysate bestimmt werden. Die BCA-Methode konnte zur Proteinbestimmung der Zelllysate eingesetzt werden, die durch Lyse der Zellen mit 0,1% (v/v) Triton X-100 in 5 mmol/l Tris, pH 7,4 erhalten werden. Für die Aufnahmeversuche die per LC-MS/MS quantifiziert werden sollten, bei denen mit MeOH lysiert wurde, mussten jeweils zusätzliche Zellen ausgesät werden, die mit dem Detergenz lysiert wurden und deren Proteingehalt direkt bestimmt wurde.

2.14 LC-MS/MS-Analytik

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

Instrumente: Grundsätzlich lassen sich mittlerweile alle bekannten Massenspektrometer mit einer HPLC kombinieren. Grund hierfür ist die Entwicklung kompatibler Ionenquellen (Vogel und Kibat, 1998). In der vorliegenden Arbeit wurde für die massenspektrometrische Detektion das Triplequadrupol-Tandem-Massenspektrometer Q Trap 4000 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die chemische Auftrennung der Verbindungen erfolgte mit einer HPLC-Anlage (High Performance Liquid Chromatography) der Firma Shimadzu (SLC-20AD Prominace, Shimadzu, Kyoto, Japan).

2.14.1 Chromatographische Verfahren

Um den polaren Verbindungen ausreichend Retention an der stationären Phase zu vermitteln, wurde eine HILIC (Hydrophilic Interaction Chromatography) Silika-Säule (Atlantis HILIC Silica 5 μm , 3 x 50 mm, Waters, Milford, USA) bzw. zic-pHILIC (5 μm , 2.1 x 100 mm, SeQuant) und eine Reversephasesäule (Atlantis dC18, 5 μm , 3 x 100 mm bzw. Atlantis XBridge Shield RP18 3,5 μm , 3 x 100 mm, Waters, Milford, USA) mit zugehöriger Vorsäule verwendet. Jeder chromatographische Lauf betrug 10 min, bei einer Flussrate zwischen 200 und 400 μl . Die Temperatur der Säule im Säulenofen (CTO-20AC Prominace) betrug 35 – 40 °C und das Injektionsvolumen des Autosamplers (SIL-20A10 Prominace) je 10 – 20 μl . Die Proben wurden auf 6 °C gekühlt. Zwischen den Injektionen wurde das Injektionssystem mit MeOH gespült, um Verschleppungen zu vermeiden. Es wurden die folgenden LC Bedingungen genutzt: **Asparaginsäure**, **Glutaminsäure**, SeQuant ZIC-HILIC Säule (Partikelgröße 5 μm , Durchmesser x Länge = 2.1 x 100 mm; Merck, Darmstadt, Germany); A: 0.1% Ameisensäure, B: 0.1% Ameisensäure in Azetonitril; isokratischer Fluss: 0.2 ml/min, 40% B, Stopp bei 4 min; **Taurin** SeQuant ZIC-pHILIC Säule (5 μm , 2.1 x 100 mm; Merck); A: 10 mM Ammoniumacetat pH 8.9, B: Azetonitril; isokratischer Fluss: 0.3 ml/min, 70% B, Stopp bei 4.5 min; **Orotsäure**, XBridge Shield RP18 Säule (3.5 μm , 3.0 x 100 mm; Waters, Eschborn, Germany); A: 10 mM Ammoniumacetat pH 8.9, B: ACN; Gradient: 0.3 ml/min, 10% B bei 0 min, 80% B bei 5.5 min, 10% B bei 8 min, Stopp bei 9 min; **PAH**, Atlantis HILIC Silica Säule (5 μm , 3.0 x 50 mm; Waters); 10 mM Ammoniumacetat pH 4.5, B: Methanol; Gradient: 0.3 ml/min, 90% B bei 0 min, 10% B bei 4 min, 10% B bei 5 min, 90% B bei 8 min, Stopp bei 9 min; **GSA**, Atlantis HILIC Silica Säule (5 μm , 3.0

x 50 mm; Waters); 10 mM Ammoniumacetat pH 4.3, 0.1% Ameisensäure in Methanol, Gradient: 0.3 ml/min, 90% B bei 0 min, 10% B bei 5 min, 90% B bei 8 min, Stopp bei 10 min. Die anderen Aminosäuren wurden wie Asp und Glu analysiert.

2.14.2 Massenspektrometrie

Um Verbindungen in komplexen Matrices mit hoher Spezifität und Sensitivität zu identifizieren, ist die Massenspektrometrie heute die Methode der Wahl. Das Detektionsprinzip beruht auf der Ionisierung der Analytmoleküle, welche anhand ihres Masse/Ladungsverhältnisses m/z getrennt und detektiert werden (Budzikiewicz, 1998) Diese physikalische Trennungsart haben alle Massenspektrometer gemeinsam. Der generelle Aufbau eines Massenspektrometers setzt sich aus Einlasssystem, Ionenquelle, Trennsystem und Detektor zusammen.

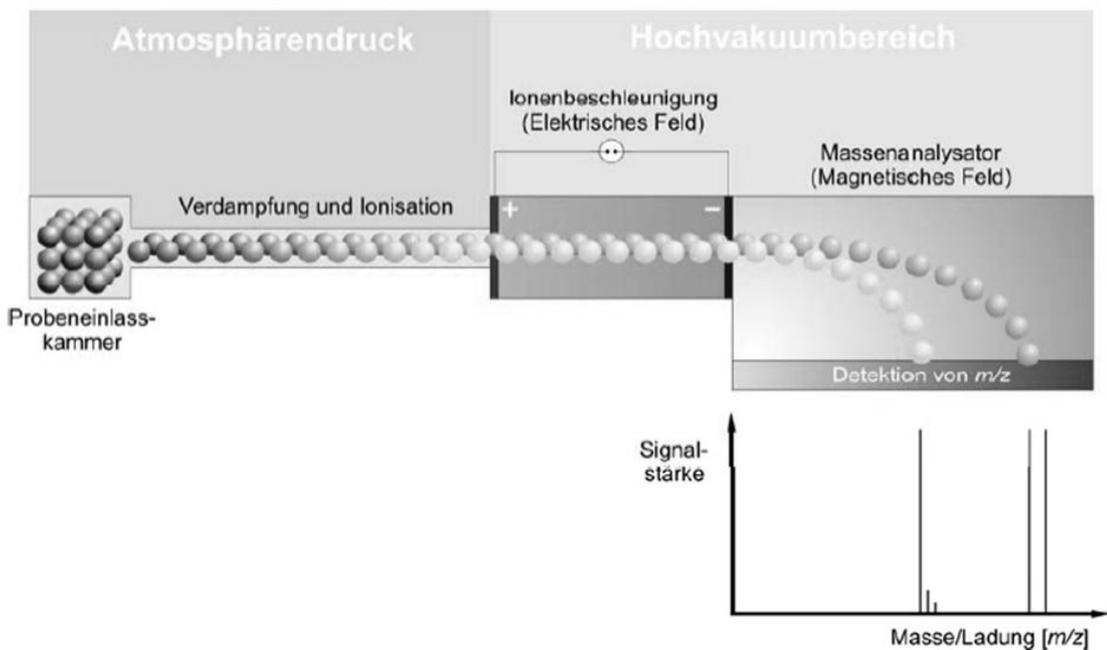


Abb 2.2. Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers. (aus Dissertation von R.Schmidt, Frankfurt, 2006).

2.14.2.1 Elektrosprayionisation (ESI)

Charakteristisch für die Elektrosprayionisation ist die Überführung der Ionen aus der Flüssig- in die Gasphase (Bruins, 1998).

Die Vernebelung der flüssigen Probe erfolgt mittels Stickstoff-Gas in ein Hochspannungsfeld. Dabei entstehen kleine positiv oder negativ geladene Tröpfchen. Im weiteren Prozess der Lösungsmittelverdampfung verkleinert sich der Tröpfchenradius, wodurch sich die Oberflächenspannung bis zu einer kritischen Größe erhöht und der Tropfen zerplatzt (Coloumb-Explosion). Das Lösungsmittel verdampft und die geladenen Analytmoleküle liegen aufgrund der Evaporation am Ende gasförmig in der Ionenquelle vor (Abb. 2.3). Beim Eintritt in den MS Detektor passieren die Analytmoleküle eine beheizbare Kapillare (350 - 400°C), in der die letzten Lösungsmittelreste entfernt werden (Fenn et al., 1989).

Die Ionisierung mittels Elektrospray wird erheblich unterstützt, wenn bereits im Laufmittel Zusätze enthalten sind, die eine Protonierung bzw. Deprotonierung der jeweiligen Analyten ermöglichen.

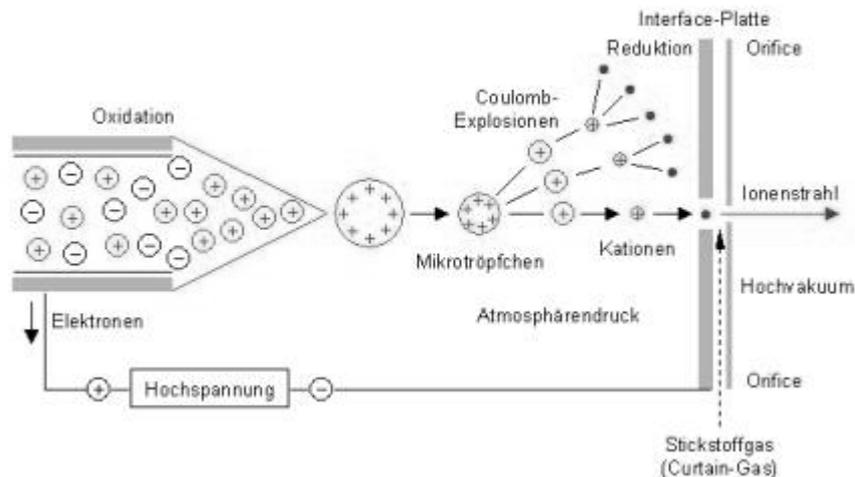


Abb. 2.3 Elektrosprayionisierung. (aus <http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/BMFZ/>).

Hierfür kann das Laufmittel einen sauren (z. B. Ameisensäure, 0,1-1%) oder basischen Zusatz (z. B. Ammoniumacetat, 1-10 mM) enthalten. Die Laufmittel sollten des Weiteren unbedingt flüchtig sein, da ansonsten die Bestandteile in der Ionenquelle auskristallisieren.

2.14.2.2 Aufbau des Quadropols

Nach dem Eintritt der geladenen Analyten in das Massenspektrometer erreichen die Ionen drei hintereinander liegende Kammern (Q1, Q2, Q3). In welchen schrittweise ein Hochvakuum ($10^{-7} - 10^{-5}$ Torr) aufgebaut wird. Jede Kammer enthält einen Quadropol. Dieser ist ein Massenfilter aus vier parallelen Metallstäben, durch die unter vorgegebenen physikalischen Bedingungen nur Ionen mit bestimmtem Masse/Ladungsverhältnis m/z den Detektor erreichen (Abb 2.4). Die Ionentrennung erfolgt mittels elektrischer Felder. Dabei werden an die sich gegenüberliegenden Stäbe jeweils eine positive bzw. eine negative Gleichspannung angelegt. Eine zweite Wechselfspannung ist um π versetzt. Durch die Wechselfspannung entstehen relativ zur Mittelachse abwechselnd positive und negative Felder. So werden während der positiven Phase positive Ionen zur Mittelachse und während der negativen Phase zu den Metallstäben hin beschleunigt. Die Ablenkung der Ionen ist abhängig von der angelegten Spannung, der Frequenz und der Masse der jeweiligen Ionen. Durch Anlegen einer spezifischen Spannung wird z. B. erreicht, dass nur Ionen einer Masse den Quadropol durchqueren können.

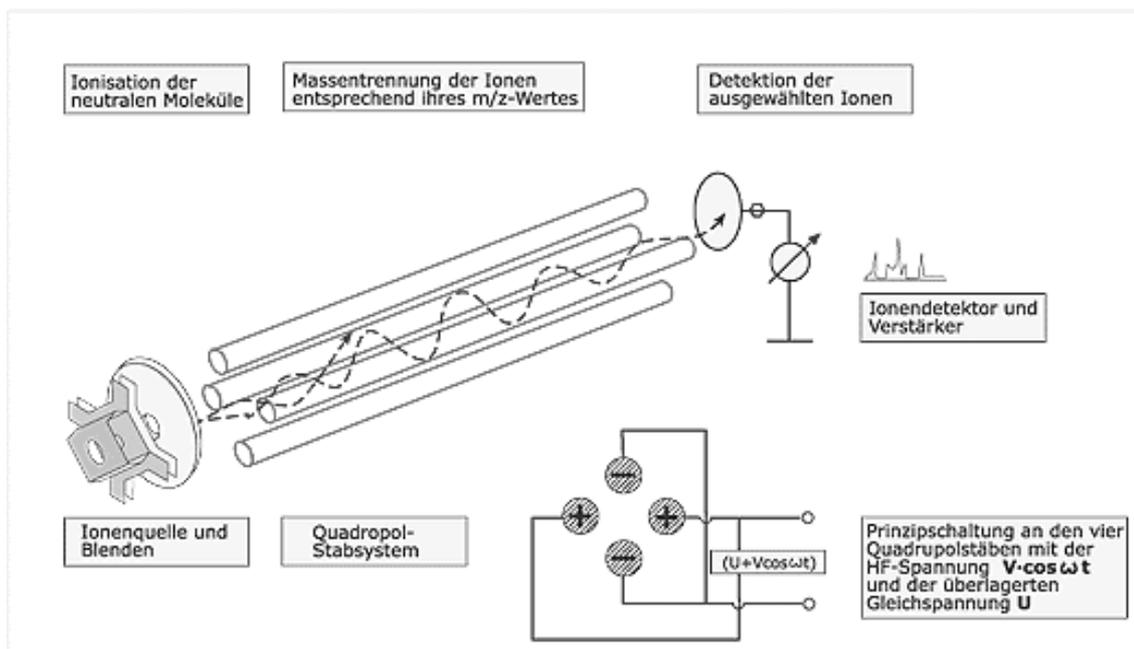


Abb 2.4 Schematischer Aufbau eines Quadropol-Massen-Analysators (aus http://www.analyticjournal.de/glossar_beaetrage_einzeln/massenspektrometrie.html).

2.14.2.3 Messungen

MRM-Scan (Q1 und Q3 Scan): Die Detektion der Massen erfolgte im MRM-Modus (Multiple Reaction Monitoring). Da nur Verbindungen in der Gasphase gemessen werden können, müssen polare oder geladene Moleküle in positiv oder negativ geladene Gasphasenionen überführt werden. Die Ionisierung erfolgte mittels Elektrospray-Ionisierung (ESI) (Sprayvoltag; positiv 5500 V, negativ -4500 V). Dieser Prozess wurde unterstützt durch zusätzliches Stickstoffgas und zwei beheizbare Turboheater (400 °C). Anschließend konnten die protonierten oder deprotonierten Moleküle im Hochvakuum des Quadrupols analysiert werden. Die geladenen Analyten wurden durch ein elektrisches Potential CE (collision energy) beschleunigt und in der Kollisionzelle Q2 fragmentiert. Vor einer Messung wurden die Verbindungen in einer Konzentration von 100 – 300 ng/ml direkt in das Massenspektrometer infundiert (10 µl/min) und die Fragmente sowie die entsprechende Kollisionsenergien ermittelt. Die folgenden Substanzen wurden in dieser Arbeit mittels LC-MS/MS unter den angegebenen Bedingungen analysiert: (m/z Muttermasse, m/z Fragment, Kollisionsenergie (V), Ion Detektion: N/P = negative/positive): Glutamat: 148, 84, 25, P; Aspartat: 134, 74, 21, P; Orotsäure: 155, 111, -16, N; PAH: 195, 120, 15, P; Asparagin: 133, 74, 21, P; Glutamin: 147, 84, 23, P; Alanin: 90, 44, 19, P; Glycin: 76, 76, 5, P; Isoleucin: 132, 69, 21, P; Leucin: 132, 44, 35, P; Methionin: 150, 133, 15, P; Phenylalanin: 166, 120, 17, P; Prolin: 116, 70, 26, P; Serin: 106, 60, 19, P; Threonin: 120, 74, 17, P; Tryptophan: 205, 188; 15, P; Tyrosin: 182, 136, 21, P; Valin: 118, 72, 15, P; Taurin: 124, 80, -28, N; GSA: 176, 134, -19, N.

Full Scan Experimente (Q1-Scan): Im Full Scan Experiment werden Massenspektren generiert, die einen bestimmten Massenbereich (m/z) abdecken. In der vorliegenden Arbeit wurden Massenspektren im Bereich von 50 – 400 aufgezeichnet. Dieser Größenbereich deckt die zu erwartenden Substrate ab. Die Scanzeit betrug 2 Sekunden. Die Auswertung der Full Scan Spektren erfolgte mittels LC-MS Differenz-Abtönung.

Kalibrierung und Vorbereitung der Probe: Für jede Messung wurde eine Eichgerade mit sieben Konzentrationen des Analyten erstellt (0 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 400 ng/ml, 800 ng/ml). Um eine gute Vergleichbarkeit herzustellen und Unterschiede bei der Ionisierung zwischen Eichreihe und Proben zu vermeiden, wurden die Eichproben ebenfalls in Zelllysat bzw. KRH angesetzt. Die Versuchsproben

wurden vor der Messung Resuspendiert und zentrifugiert (1 min, 16000 x g). Anschließend wurden 100 µl der Probe in die Mikroeinsätze der Glasvials überführt.

2.14.2.4 Auswertung

Die LC-MS/MS-Daten wurden mit der Analyst Software quantifiziert. Dabei wurden die Peaks nach der Vorgabe eines Standardpeaks in allen Proben automatisch gesucht und integriert. Zur Berechnung der spezifischen Aufnahme wurde vom gemessenen Gesamtgehalt die unspezifische Aufnahme, die z. B. über Endozytose oder Diffusion entstand, abgezogen. Der endogene Substratgehalt, welcher vor dem Versuch bereits in den Zellen vorlag, wurde ebenfalls ermittelt und abgezogen. Die spezifische Aktivität hängt proportional von den Transportproteinen in der Membran ab. Die Anzahl der Transporter ist jedoch nur schwer messbar, weshalb die Zellzahl der einzelnen Schälchen über die Proteinkonzentration korrigiert wurde (siehe 2.13).

2.14.3 LC-MS-Differenz-Abtönung

Auf der Suche nach dem physiologische Substrat mit Hilfe der LC-MS/MS wurden die Massenspektren von induzierten (Transporterzellen) und nicht-induzierten HEK293-Zellen (Kontrolle) verglichen. Ein optischer Vergleich dieser komplexen Massenspektren ist jedoch schwer. Insbesondere unter dem Aspekt, dass bei einem chromatographischen Lauf von 10 min mit einer Scanzeit von 2 sec jeweils 300 Massenspektren entstehen die mit ihren jeweiligen Kontrollzellen verglichen werden müssen. Erleichtert wurde die Auswertung durch die Software „MS-FullView“ (entwickelt von Dirk Gründemann, Institut für Pharmakologie Köln). Die Software macht Intensitätsunterschiede in den Massensignalen der Spektren von induzierten und nicht-induzierten Zellen zweidimensional sichtbar, was als Differenz-Abtönung bzw. Difference Shading bezeichnet wird (Gründemann et al., 2005).

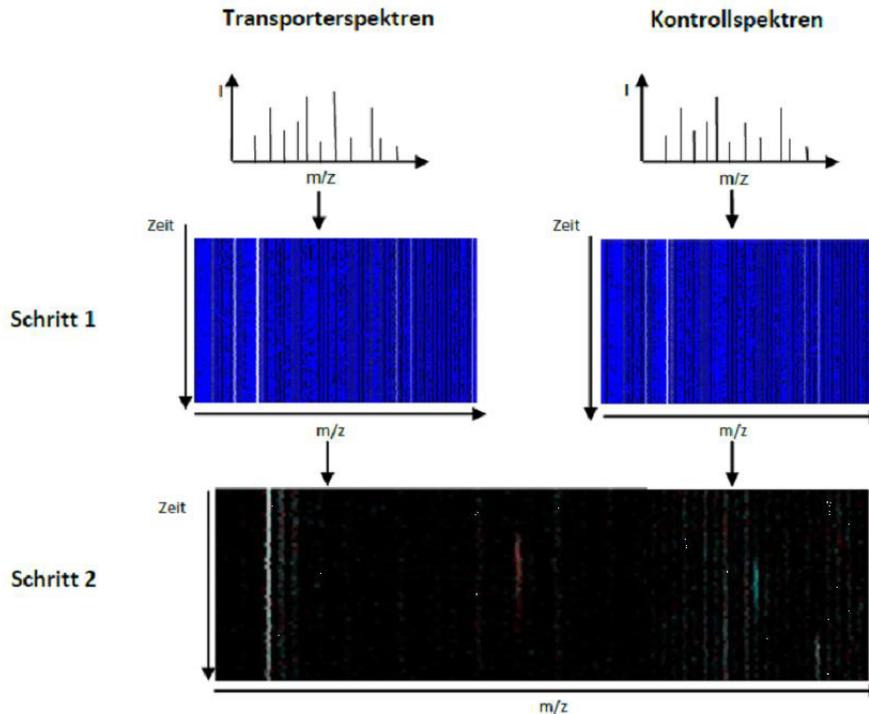


Abb. 2.5 Schematische Darstellung der Differenz Abtönung.

Die Rohdatensätze der Massenspektren eines chromatographischen Laufs bestehen aus den Dimensionen Intensität, m/z (Masse/Ladung) und Retentionszeit. Im ersten Schritt werden die Daten in eine zweidimensionale Ebene projiziert. Dabei wird die Retentionszeit auf die Y-Achse und m/z auf der X-Achse aufgetragen. Die Intensität wird sigmoidal in 256 Graustufen abgebildet. Signale von niedriger Intensität ergeben dabei schwarze Banden und Signale hoher Intensität weiße Banden (Abb. 2.5 Schritt 1). Im zweiten Schritt werden die auf die beschriebene Art und Weise hergestellten zweidimensionalen Ebenen von Transporter exprimierenden Zellen mit dem dazu gehörigen Kontrollspektrum zur Deckung gebracht. Dabei wird den Signalen der Transportspektren ein roter RGB-Farbkanal zugewiesen und den Signalen der Kontrolle ein grün/blauer RGB-Farbkanal. Auf diese Weise wird ein gemeinsames Bild generiert, in welchem Signale mit einer höheren Intensität in den Transportspektren rote Banden erzeugt und in den Kontrollzellen türkise Banden. Bei Gleichheit der Signale in den verglichenen Spektren sind die Banden weiß bzw. haben mit abnehmender Intensität dunklere Graustufen. Schwarz bedeutet, dass kein Signal zu detektieren war (Abb. 2.5 Schritt 2).

3 Ergebnisse

Die Lokalisation des Transporters SLC22A13 wurde bereits eindeutig entschlüsselt (Schulz et al., 2014, Einleitung). Der Transporter ist nahezu ausschließlich in der basolateralen Membran der Typ-A-Schaltzellen im Sammelrohr der Niere zu finden. Die physiologische Bedeutung blieb jedoch ungeklärt. Bahn et al. haben mit Nikotinsäure, PAH und Harnsäure bekannte Substrate der Transporter OAT1 (SLC22A6) und URAT1 (SLC22A12) geprüft und Nikotinsäure als physiologisches Substrat vorgeschlagen (Bahn et al., 2008). Die Substratspezifität passt jedoch schwerlich zur Lokalisation von SLC22A13.

In dieser Arbeit soll das physiologisch relevante Substrat identifiziert werden, um so die Funktion von SLC22A13 in den Schaltzellen besser deuten zu können.

3.1 Substratsuche mittels LC-MS-Differenz-Abtönung

Die Suche nach möglichen Substraten wurde über die Methode der LC-MS-Differenz-Abtönung ermöglicht. Diese Methode wurde von Prof. Dr. Dirk Gründemann entwickelt, um die Massenspektren von Zellkulturproben paarweise miteinander vergleichen zu können (siehe 2.14.3). SLC22A13h und SLC22A13r cDNA wurden jeweils gesondert in den durch Doxycyclin induzierbaren Expressionsvektor pEBTetD eingefügt (Schulz et al., 2014), woraufhin das Plasmid in humane embryonale Nierenzellen (HEK293) transfiziert wurde. Diese Zellen exprimieren SLC22A13 unter nativen Bedingungen nicht. Somit weisen mit Doxycyclin induzierte Zellen den gleichen genetischen Hintergrund auf wie nicht-induzierte Zellen. Dies ermöglicht die Vergleichbarkeit in der Differenz-Abtönungsanalyse und schließt eine Verfälschung der Daten aufgrund unterschiedlicher Stoffwechselwege aus. Induzierte (Transporter exprimierende) Zellen und nicht-induzierte Zellen wurden in Methanol lysiert und anschließend wurde ein Massenspektrum der Zellysate aufgenommen.

Die LC-MS/MS Detektion wurde unter differierenden Bedingungen durchgeführt. Die Proben wurden positiv bzw. negativ ionisiert und entweder über eine HILIC (Hydrophile Interaktionschromatographie) oder über eine ZIC-pHILIC Säule gemessen. Beide Säulen weisen eine Retention für polare und hydrophile Verbindungen auf. Da die meisten gelösten Verbindungen in Zellen diesen Eigenschaften entsprechen, können über die Analyse per Differenz-Abtönung potentielle Substrate von SLC22A13 entdeckt werden. Dabei eignet sich die HILIC für Messungen im sauren pH-Bereich, was normalerweise positiv geladenen Molekülen entspricht ($M + H^+$), und die ZIC-pHILIC für Trennungen im alkalischen pH-Bereich, also die Analyse negativ geladener Moleküle ($M - H^+$). Das messbare Angebot an Verbindungen wird noch erhöht durch den Einsatz von zwei verschiedenen organischen Laufmitteln (MeOH und ACN), die als Gradient in der HPLC laufen.

In diesen Standardmessungen konnten Signale bei m/z 174 und 146 (Abb. 3.1; Negativ-Modus) gefunden werden. Die Substanzen wurden daraufhin mit Hilfe von Internet-Datenbanken (Metlin, Massbank) und über anschließende Fragmentierungen identifiziert. Bei den Signalen handelt es sich um Guanidiniumsuccinat (GSA) und N-Acetylserin. GSA war bereits untersucht worden. Es zeigte sich jedoch nach einer langzeitigen Inkubation mit sehr hoher GSA Konzentration (24 h, 1 mmol/l) messbare Aufnahmeaktivitäten (Schulz et al., 2014), die jedoch zu gering für ein physiologisches Substrat sind. Mit N-Acetylserin wurden Aufnahmeversuche durchgeführt, die keinen Unterschied zwischen induzierten Zellen und Kontrollzellen zeigten (Daten nicht gezeigt).

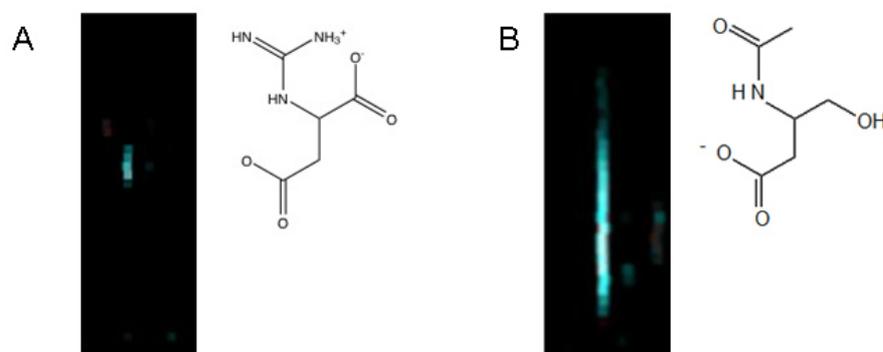


Abb. 3.1 Ergebnis der Differenz-Abtönung von Zelllysaten. A zeigt das Signal bei m/z 174 und B zeigt m/z 146. Rechts neben dem jeweiligen Signal ist die Strukturformel der identifizierten Substanz abgebildet.

Aufgrund der wenig aufschlussreichen Ergebnisse aus den Standardmessungen, wurden die Versuchsbedingungen zur Differenzabtönung modifiziert. SLC22A13 exprimierende Zellen und Kontrollzellen wurden bei pH 5 eine Stunde mit Orotsäure (1mM) inkubiert, bevor sie mit MeOH lysiert wurden. In vorangegangenen Versuchen hat Christian Fork bereits gezeigt, dass SLC22A13 die Aufnahme von Orotsäure ($4 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$) ermöglicht. Der pH-Wert wurde im sauren Bereich gewählt, weil die Lokalisation des Transporters die Möglichkeit einer Protonenabhängigkeit zulässt. Unter diesen Bedingungen wurden für die negative Ionisierung reproduzierbare Signale über die ZIC-pHILIC-Säule bei m/z 124, 132, 146, 155, 174 und 194 gemessen (Abb. 3.2). Der Vergleich der jeweiligen Massenspuren zeigt zum Teil starke Unterschiede in der Peakintensität (Abb. 3.3) Hervorzuheben sind die Unterschiede bei m/z 132, 155 und 174. Die Signale wurden als Taurin (m/z 124), Aspartat (m/z 132), Glutamat (m/z 146), Orotsäure (m/z 155), GSA (m/z 174) und MES (m/z 194) identifiziert. Das deutliche rote Signal für Orotsäure ist mit der Vorbeladung durch diese zu erklären. Rot zeigt hier die erhöhte Konzentration der Substanz in den induzierten Zellen und türkis in den Kontrollzellen. Die zahlreichen türkisen Signale für Taurin, Aspartat, Glutamat und GSA deuten somit auf eine erhöhte Konzentration dieser Stoffe in den Kontrollzellen hin. Unter den gewählten Versuchsbedingungen scheint die Expression des Transporters also zu einer Abnahme der Verbindungen zu führen.

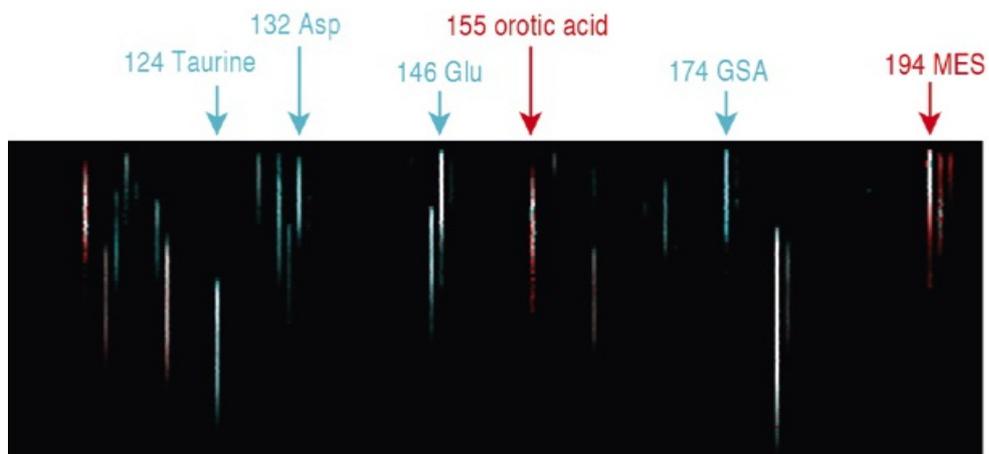


Abb.3.2 Mit pBETetD/SLC22A13h transfizierte 293-Zellen wurden 20h in An- bzw. Abwesenheit von $1 \mu\text{g/ml}$ Doxyzyklin kultiviert. Die Zellen wurden mit Aufnahmepuffer gewaschen, für 1h mit 1mmol/l Orotsäure in MES Aufnahmepuffer (pH 5) inkubiert und nach nochmaligen Waschen in Methanol lysiert. Die Lysate wurden über fullscan LC-MS/MS analysiert (ZICp HILIC Säule, MeOH und neg. Ionisierung). Pfeile zeigen eine erhöhte (rot) oder niedrigere (türkis) Konzentration von Signalen identifizierter Verbindungen. Die Zahlen kennzeichnen m/z .

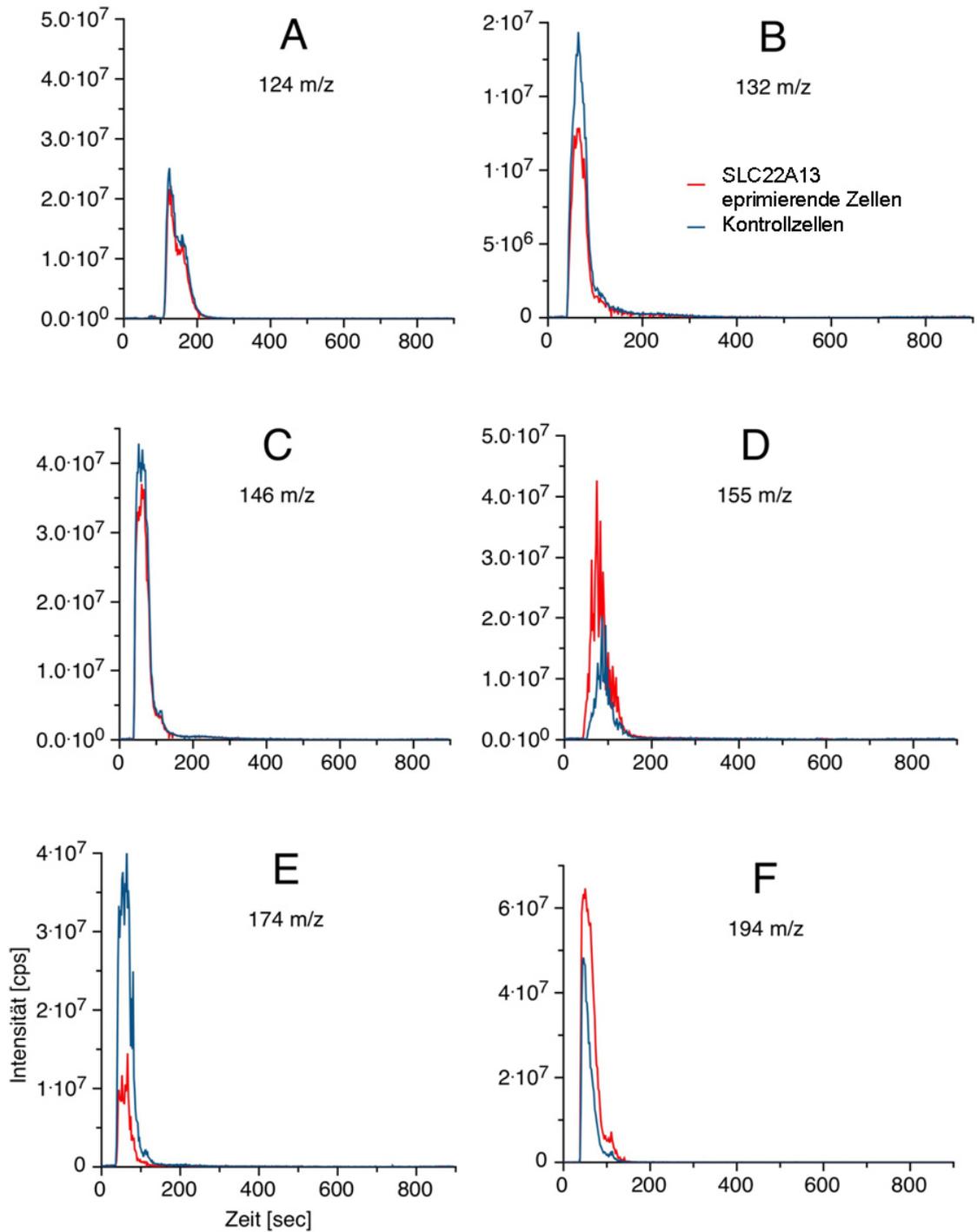


Abb.3.3 Intensität der Massenspektren. Vergleich der Intensität der Massenspektren von m/z 124, 132, 146, 155, 174, 194 gegen die Retentionszeit der induzierten Transporterzellen (rot) und Kontrollzellen (blau).

3.1.1 Die chemische Struktur der potentiellen Substrate

Membranständige Transporter wie SLC22A13 akzeptieren meist mehr als nur ein einziges Substrat. Ihre physikalischen und chemischen Eigenschaften bedingen häufig, dass sie statt des Hauptsubstrats weitere meist strukturverwandte Substanzen transportieren. Ein Beispiel ist der Ergothionein-Transporter ETT (SLC22A4), der neben Ergothionein auch Stachydrin transportiert (Gründemann et al., 2005). OAT2 (SLC22A7) transportiert unter anderem Orotsäure, Glutamat und Trigonellin (Fork et al., 2011). Es ist daher sehr hilfreich, die Struktur der potentiellen Substrate zu vergleichen. Dabei fällt ins Auge, dass bei allen sechs Verbindungen ähnliche charakteristische funktionelle Gruppen vorhanden sind: Entweder mindestens eine Carboxylgruppe (Glu, Asp, Orotat und GSA) oder eine Sulfonsäuregruppe (Tau und MES) (Abb. 3.4) und zu der Säuregruppe naheliegend eine Aminogruppe. Zusätzlich ist hervorzuheben, dass Glutamat, GSA, Taurin und Aspartat unter physiologischen Bedingungen (pH 7,4) mindestens eine negative und eine positive Ladung tragen.

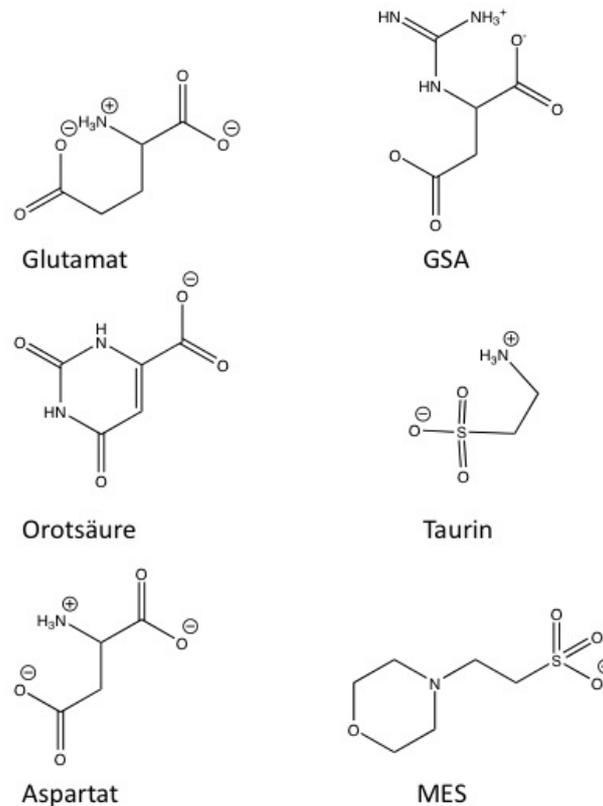


Abb. 3.4 Strukturformeln der identifizierten Substanzen. Dargestellt unter physiologischen Bedingungen.

3.2 Aufnahmeversuche

Die Aufnahme der identifizierten Substanzen in HEK-293-Zellen wurde im Standardaufnahmeexperiment untersucht (siehe 2.11.3). Hierbei werden die Zellen 1 min mit Substrat (0,1 $\mu\text{mol/l}$ bei radioaktiven Substanzen oder 10 $\mu\text{mol/l}$ bei MS Quantifizierung) in physiologischem Puffer inkubiert und anschließend der Substratgehalt im Zelllysate ausgewertet. Der hierfür verwendete physiologische Puffer war der Krebs-Ringer-Henseleit-Puffer (KRH) (siehe 2.11.2). Es konnte kein Unterschied in der Aufnahme von [^3H] Aspartat, [^3H] Glutamat, [^3H] Taurin oder GSA zwischen SLC22A13-exprimierenden Zellen und Kontrollzellen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die Aufnahme von PAH (22A13h; 35 ± 1 pmol/min mg Protein $^{-1}$, Kontrollzellen 9 ± 1 pmol/min mg Protein $^{-1}$) und Orotsäure (22A13h; $0,54 \pm 0,03$ pmol/min mg Protein $^{-1}$, Kontrollzellen $0,16 \pm 0,01$ pmol/min mg Protein $^{-1}$) wurde gesteigert, aber die zugehörige Transporteffizienz (PAH, $2,6 \pm 0,2$ $\mu\text{l/min mg Protein}^{-1}$; Orotsäure, $3,8 \pm 1$ $\mu\text{l/min mg Protein}^{-1}$) war mindestens um das 10-fache niedriger als die von physiologischen Substraten anderer SLC22-Transportern im gleichen Expressionssystem (Schömig et al., 2006). Die Aufnahme von MES wurde nicht gemessen, da es sich bei der Substanz lediglich um eine Puffersubstanz handelt, die keine physiologische Funktion erfüllt.

3.3 Zeitverlauf der Substrataufnahme durch SLC22A13

Die Signale für Glutamat, Aspartat, Taurin, GSA und MES wurden in der Differenzabtönung nach einstündiger Inkubation entdeckt. Aus diesem Grund wurde das Transportverhalten von SLC22A13 über einem bis zu 60-minütigen Zeitraum untersucht. Hierzu konnte in einem Zeitverlauf die Aufnahme der im fullscan gemessenen Substanzen beobachtet werden. GSA und MES blieben unberücksichtigt. Für GSA wurde bereits nachgewiesen, dass eine Langzeitinkubation über 24 h bei einer Konzentration von 1 mmol/l zu einer erhöhten Konzentration im Zellinnern führt, wenn man die Transporter-exprimierenden Zellen mit den Kontrollzellen vergleicht (11.5 ± 0.3 vs. 0.86 ± 0.03 nmol mg Protein $^{-1}$) (Schulz et al., 2014). Die MES-Aufnahme wurde nicht gemessen, da es sich bei der Substanz um keine natürlich vorkommende Verbindung handelt.

3.3.1 Orotsäure

Orotsäure ist ein Substrat von OAT2 (SLC22A7), einem nahe verwandten Transporter von SLC22A13 (Fork et al., 2011). Um den Zeitverlauf der Orotsäureaufnahme zu messen, wurden SLC22A13h induzierte und nicht-induzierte HEK-293-Zellen bis zu 40 min bei 37°C in einer Aufnahmelösung inkubiert. Nach 1, 4, 12 und 40 min wurden die Zellen gewaschen und in Triton lysiert. Es war eine erhöhte Aufnahme von Orotsäure zu beobachten (Abb. 3.5 A). Für SLC22A13r konnte ebenfalls eine erhöhte Aufnahme nachgewiesen werden. (Abb 3.5 B).

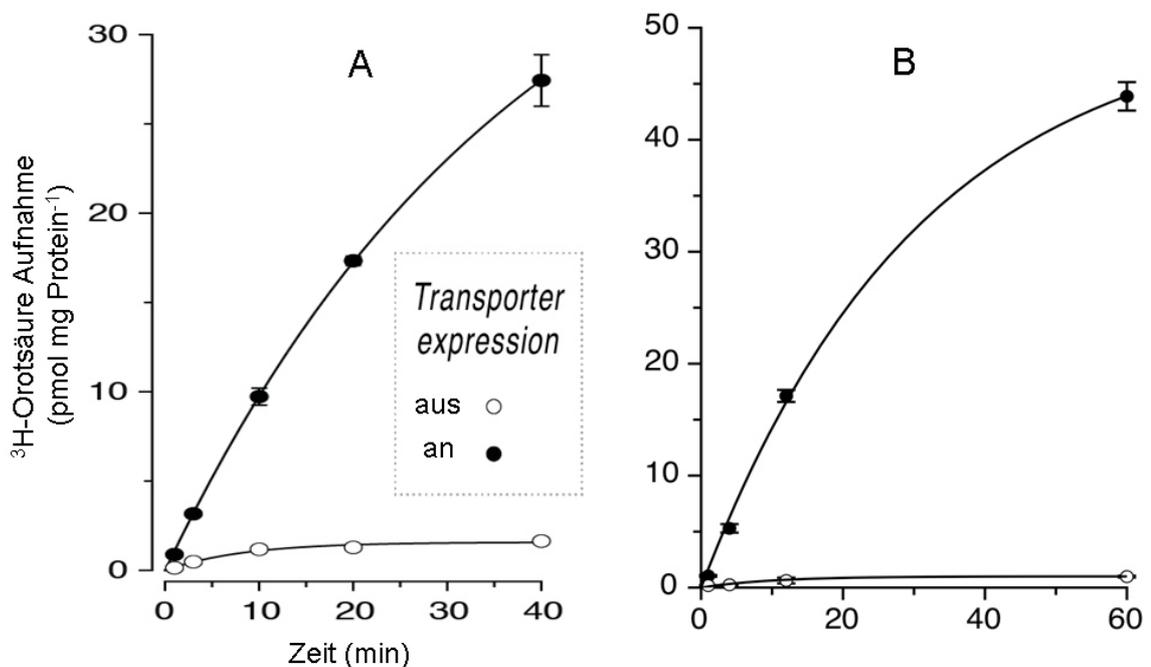


Abb. 3.5 Zeitverlauf der ³H-Orotsäureaufnahme über SLC22A13h (A) und SLC22A13r (B). Induzierte und nicht-induzierte HEK293-Zellen wurden mit 0,1 µmol/l ³H-Orotsäure, bei 37°C, für 1, 4, 12 und 40 min inkubiert. Die Messpunkte für SLC22A13r lagen bei 1, 4, 12 und 60 min. Der Graph basiert auf eine Exponentialfunktion ($y = a * (1 - e^{-bx})$) basierend auf einem Ein-Kompartiment-Modell. Hierbei entspricht a dem Quotienten der Geschwindigkeitskonstante k_{in}/K_{out} und b entspricht k_{out} (Russ et al., 1992). Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n = 3 (Schulz et al., 2014).

3.3.2 Asparaginsäure

Asparaginsäure war eine weitere Substanz, die mit Hilfe der Differenz-Abtönung ermittelt wurde. Das Signal wurde über den Vergleich der Fragmentspektren mit der Originalsubstanz bestätigt. Unter physiologischen Bedingungen (pH 7,4) ist die Aminosäure Deprotoniert und liegt als Säureanion vor. Daher wird sie im weiteren Verlauf als Aspartat bezeichnet.

Der Zeitverlauf der Aspartataufnahme wurde in einem Zeitraum über 40 min und bei einer Aspartat-Konzentrationen von 0,1 $\mu\text{mol/l}$ gemessen. Nach 1, 4, 12 und 40 min wurden die Zellen gewaschen und in Triton lysiert. Die SLC22A13h-Expression hat keinen nennenswerten Effekt auf die Aufnahmegeschwindigkeitskonstante von Aspartat (= initiale Steigung), jedoch zeigte die zelluläre Akkumulation nach längerer Inkubation (= Plateau) eine erkennbare Abnahme (ungepaarter *t*-Test; Vergleich der Werte nach 40 min; $P=0,005$) (Abb. 3.6 A). Mit SLC22A13r wurde ein sehr ähnliches Ergebnis beobachtet (Abb. 3.6 B). Diese Zeitverläufe zeigen, dass die SLC22A13-Expression keine Aufnahme von Aspartat bewirkt, sondern möglicherweise die Substanz, nach Aufnahme über einen anderen Transporter (möglicherweise EAAT1), aus der Zelle schleust.

HEK-293-Zellen exprimieren endogen einen Na^+ -abhängigen Asp/Glu Aufnahme-transporter, wahrscheinlich den exzitatorischen Aminosäuretransporter 1 (EAAT1). Um den Einfluss des EAAT1 auf die Asp-Aufnahme zu kontrollieren, wurde der Zeitverlauf in einem Na^+ -freien Puffer wiederholt. Die Aufnahme von Aspartat war erheblich geringer und wurde nicht durch SLC22A13h ($P=0,2$) beeinflusst (Abb.3.6).

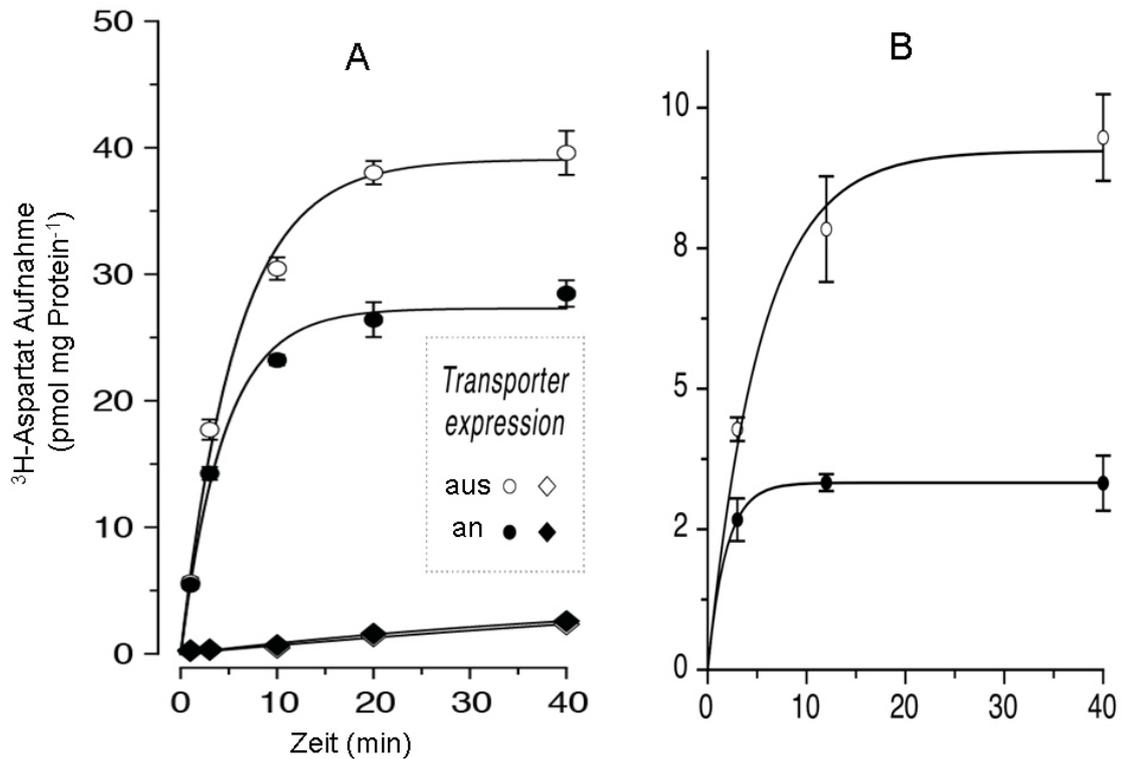


Abb. 3.6. Zeitverlauf der ^3H -Aspartataufnahme über SLC22A13h (A) und SLC22A13r (B). Induzierte und nicht-induzierte HEK-293-Zellen wurden mit $0,1 \mu\text{mol/l}$ ^3H -Aspartat, bei 37°C , für 1, 4, 12, 20 und 40 min inkubiert. Die Messpunkte für den SLC22A13r lagen bei 4, 12 und 40 min. Runde Messpunkte = Messungen in Aufnahmelösung. Rautenförmige Messpunkte = Messungen ohne Na^+ . Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, $n = 3$ (Schulz et al., 2014).

3.3.3 Glutaminsäure

Auch für Glutaminsäure (Glu) wurde eine erhöhte Konzentration, in den Kontrollzellen, bei der Differenz-Abtönung festgestellt. L-Glutaminsäure liegt unter physiologischem pH-Wert auch als deprotoniertes Säureanion vor, weshalb sie im weiteren Text als Glutamat bezeichnet wird.

Die Aufnahme von Glutamat wurde in einem Zeitverlauf von 40 min gemessen. Nach 1, 4, 12 und 40 min wurden die Zellen gewaschen und in Triton lysiert. Die Glutamataufnahmegeschwindigkeitskonstante (=Steigung) zeigte keine erheblichen Unterschiede zwischen Kontroll- und SLC22A13h-exprimierenden Zellen. Die intrazelluläre Konzentration von radioaktivem Glutamat nach 40 min zeigt jedoch eine signifikante Abnahme ($P=0,002$) (Abb. 3.7 A). In einem Experiment mit SLC22A13r wurde ein

ähnliches Ergebnis erzielt. Der Transporter zeigte also keine Aufnahme von Glutamat nach 40 min Inkubation. SLC22A13 scheint eher eine verminderte Akkumulation der Substanz zu bewirken.

Um zu überprüfen, ob die beobachtete Glu-Abnahme im Zeitverlauf über 40 min für SLC22A13h spezifisch ist, wurde der nächste verwandte Transporter OAT2h parallel auf Glu-Transport untersucht. Hierfür wurde OAT2h kloniert und über pEBTetD in HEK-293-Zellen zur Expression gebracht (Klonierung und Versuch wurden durchgeführt von B. Steinrücken). Über OAT2h ist bekannt, dass er in bidirektionaler Richtung funktioniert. Für OAT2h wurde keine Abnahme beobachtet. Im Gegenteil zeigten die induzierten Zellen nach 40 min eine gesteigerte Konzentration der radioaktivmarkierten Aminosäure ($P=0.02$) im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 3.7 B).

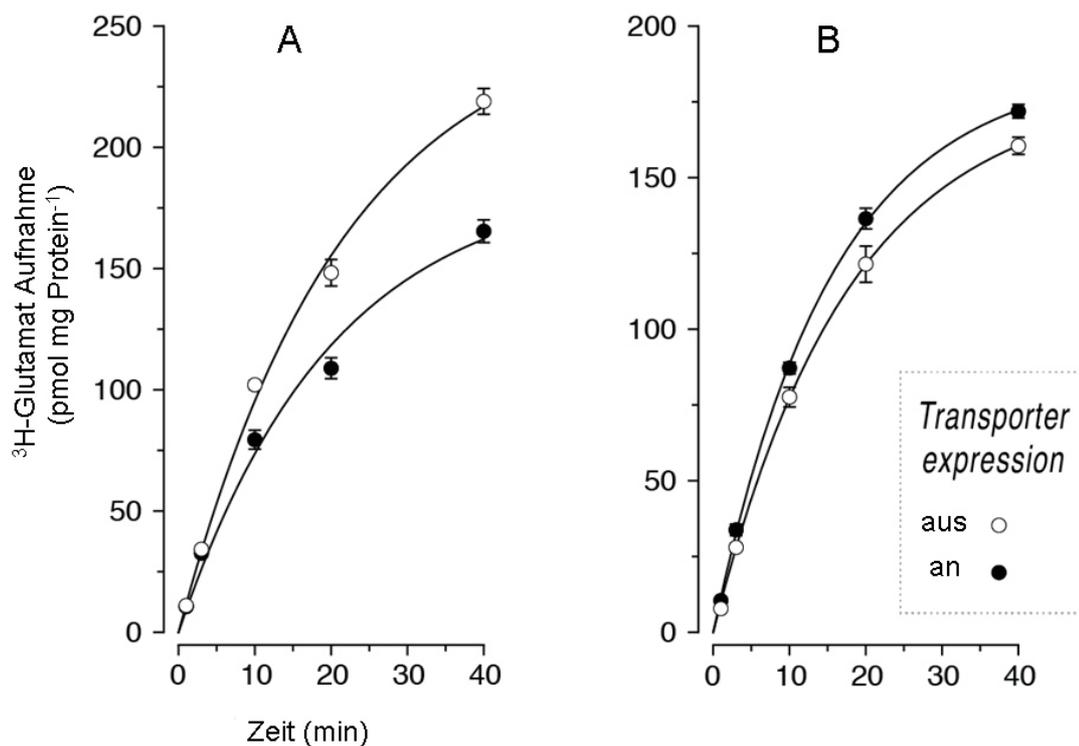


Abb. 3.7. Zeitverlauf der ^3H -Glutamataufnahme über 40 min. A. SLC22A13h-exprimierende und nicht-exprimierende HEK293-Zellen wurden mit $0,1 \mu\text{mol/l}$ ^3H -Glutamat bei 37°C für 1, 4, 12 und 40 min inkubiert. B. OAT2h exprimierende und nicht-exprimierende HEK293-Zellen wurden mit $0,1 \mu\text{mol/l}$ ^3H -Glutamat bei 37°C für 1, 4, 12 und 40 min inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, $n = 3$ (Schulz et al., 2014).

3.3.4 Taurin

Das vermeintlich schwächste Signal bei der Differenz-Abtönung wies Taurin auf. In einem Zeitraum von 40 min wurde die Taurinaufnahme von SLC22A13h-exprimierenden Zellen und Kontrollzellen beobachtet. Die Zellen wurden nach 4, 12 und 40 min gewaschen und anschließend in Triton lysiert. Die Geschwindigkeitskonstante der Aufnahmereaktion zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den verglichenen Zellen. Beim Vergleich der Taurinakkumulation nach 40 min war zu beobachten, dass die Konzentration in den SLC22A13h induzierten Zellen höher ist als in den 293 Kontrollzellen (Abb. 3.8).

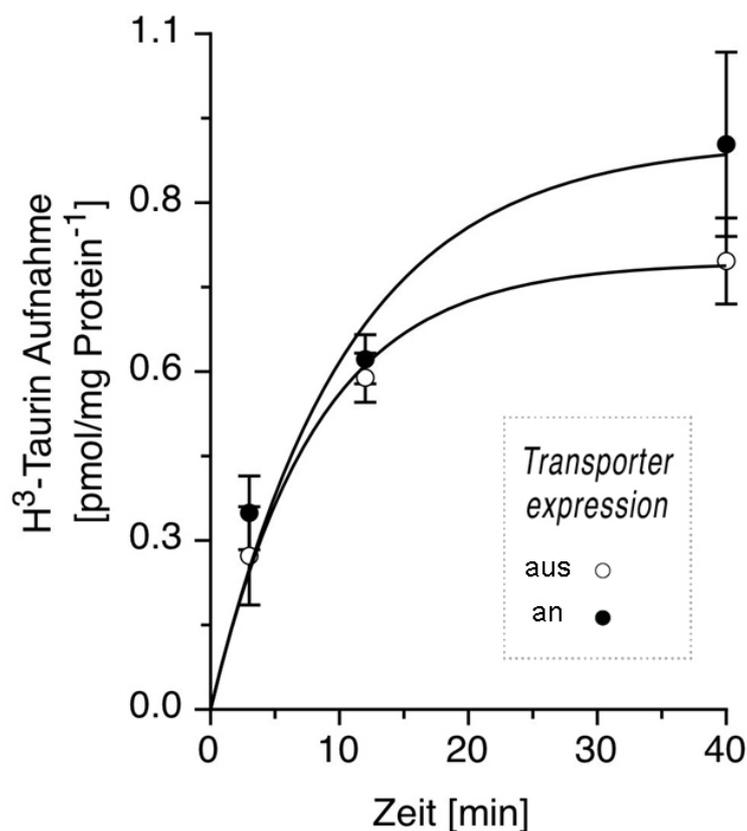


Abb. 3.8 Zeitverlauf der ³H-Taurinaufnahme. Induzierte und nicht-induzierte HEK293-Zellen wurden mit 0,1 $\mu\text{mol/l}$ ³H-Aspartat, bei 37°C, für 1, 4, 12 und 40 min inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n = 3.

3.4 24 h Inkubation von Aspartat

Die vorherigen Aufnahmeversuche und Zeitverläufe wurden mit Konzentrationen von höchstens 10 $\mu\text{mol/l}$ und über einen Zeitraum von bis zu 60 min durchgeführt. Weil unter diesen Bedingungen kein Transport beobachtet werden konnte, wurde die Konzentration auf 1 mmol/l erhöht und die Inkubationszeit auf 24 h gesteigert. Zur Kontrolle wurden die Zellen nur mit KRH-Puffer inkubiert. Als Substrat wurde Aspartat angeboten, da es bisher von den neu entdeckten Substanzen die signifikantesten Unterschiede zwischen induzierten und nicht-induzierten Zellen zeigte.

Die intrazelluläre Aspartatkonzentration zeigte nach 24 h Inkubation im DMEM Medium keinen Unterschied zwischen induzierten und nicht-induzierten Zellen (beide bei 17,6 mmol/l). Bei den induzierten Zellen (1,64 mmol/l), die nur mit KRH-Puffer inkubiert wurden, konnte ein leicht erniedrigter Aspartat-Gehalt in den Zelllysaten gemessen werden. Die Aspartatkonzentration der nicht-exprimierenden Zellen lag bei 2,21 mmol/l (Abb. 3.9).

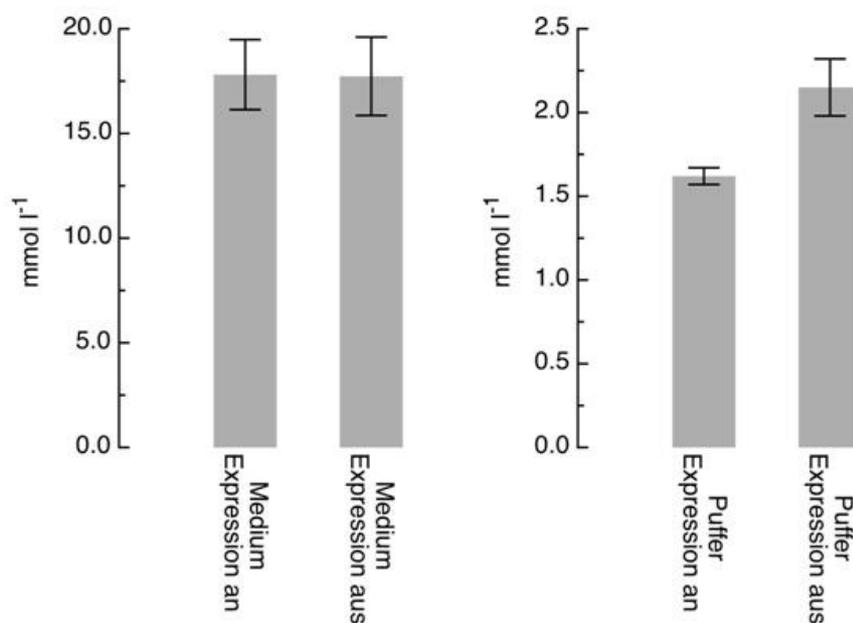


Abb. 3.9 24 h Inkubation von Aspartat in Puffer (KRH) und Medium (DMEM-Medium). Aufgetragen ist der zelluläre Aspartat-Gehalt von SLC22A13h induzierten und nicht-induzierten HEK293-Zellen. Die Zellen wurden 24 h mit 1 mmol/l Aspartat bei 37 °C inkubiert. Die Aspartat-Quantifizierung in den Zellen erfolgte mittels LC-MS. Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwerts (SEM), $n = 3$.

3.5 trans-Stimulationsversuche mit Orotsäure

Besitzt ein Transporter eine Substratbindungsstelle, so kann dieser wechselseitig immer nur auf einer Membranseite Substrate binden. Liegt auf der Zielseite (trans) eine hohe Substratkonzentration vor, so beschleunigt dies die Rückkehr der Substratbindungsstelle zur Quellenseite (cis) ohne den Substrattransport von cis nach trans zu beeinflussen. Eine solche Reaktion wird als trans-Stimulation bezeichnet. Zwar zeigt nicht jeder Transporter eine trans-Stimulation (Tanford et al 1986), jedoch bietet der Beweis eines trans-stimulierten Substratumsatzes, also die Transportbeschleunigung bei Überschuss von Substrat auf der Zielseite, die Möglichkeit Kanäle von Proteinen zu unterscheiden (Tanford et al 1986) und im Falle von SLC22A13 mögliche Substrate zu erkennen. In dem folgenden Experiment wurde versucht die Substratspezifität von SLC22A13h durch trans-Stimulation zu identifizieren.

In induzierten HEK-293-Zellen transportiert SLC22A13h Orotsäure in die Zelle (siehe 3.3.1). Durch Zugabe von möglichen Substraten sollte der Efflux von Orotsäure beschleunigt bzw. trans-stimuliert werden. Hierzu wurden SLC22A13h induzierte Zellen eine Stunde mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Orotsäure beladen. Die einstündige Orotsäureinkubation wurde durch Waschen mit eiskaltem (4°C) KRH und 15 minütige Inkubation mit 1 mmol/l der jeweiligen Substanz bei 37°C abgebrochen. Anschließend wurden 700 μl des Außenmediums abgenommen und die Konzentration von radioaktiver Orotsäure gemessen. Als Kontrolle wurden die Zellen parallel mit Puffer inkubiert. Die untersuchten Verbindungen waren Acetylserin, Acetylaspartat, Taurin, GSA, Nikotinsäure, Ketoglutarat und para-Aminohipursäure. Der stärkste Orotsäure-Gehalt wurde im KRH-Puffer der Kontrollgruppe gemessen (siehe Abb. 3.10).

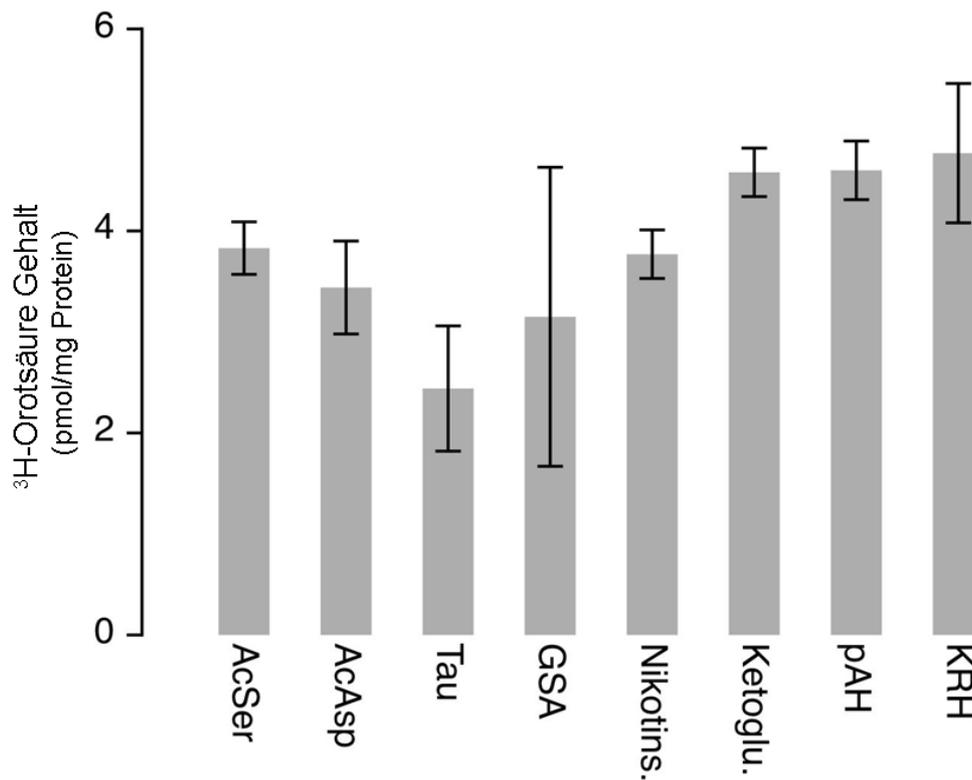


Abb. 3.10 Versuch einer trans-Stimulation mit ³H-Orotsäure. SLC22A13h induzierte Zellen wurden 1 h mit 100 μ M/l ³H-Orotsäure beladen und nach eiskaltem Waschen 15 min, bei 37°C, mit 1 mmol/l der jeweiligen Substanz inkubiert. Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwerts (SEM), n = 3.

3.6 cis-Inhibition der Taurinaufnahme

Von den in der Differenz-Abtönung neu gefundenen Signalen zeigten SLC22A13h-exprimierende 293-Zellen ausschließlich für Taurin eine Aufnahmereaktion. Würde neben Taurin ein anderes mögliches Substrat mit in den Aufnahmepuffer gegeben werden, so sollten beide Substanzen um die SLC22A13h Bindungsstelle konkurrieren und das Resultat wäre eine verminderte Taurin-Aufnahme. Dieser Vorgang wird als cis-Inhibition bezeichnet. Eine verminderte Taurin-Aufnahme in Anwesenheit einer anderen Substanz wäre ein weiteres Indiz dafür, dass es sich hierbei entweder um ein Substrat für SLC22A13h handelt oder um einen Hemmstoff. Daher wurden SLC22A13h induzierte Zellen mit jeweils Aspartat, Glutamat, Glycin, Nikotinsäure, Orotsäure Betain oder Acetyl-Aspartat und ³H-Taurin im Aufnahmepuffer inkubiert und der ³H-Taurin-Gehalt in den Zellen quantifiziert.

Der zelluläre ^3H -Taurin-Gehalt ohne die Testsubstanzen in der Aufnahmelösung war in den induzierten Zellen fast dreimal höher als in nicht-induzierten Zellen. Durch Zugabe der jeweiligen Testsubstanz in die Aufnahmelösung war der ^3H -Taurin-Gehalt in den induzierten Zellen kaum verändert (Abb. 3.10). Unterschiede der intrazellulären ^3H -Taurin Konzentration waren lediglich bei Glutamat und Nikotinsäure zu beobachten. Glutamat führt zu einer leichten Steigerung der ^3H -Taurin-Aufnahme. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Nikotinsäure in der Aufnahmelösung ist die ^3H -Taurin-Konzentration um das vierfache niedriger. Demnach ist die ^3H -Taurin-Aufnahme über SLC22A13h durch Nikotinsäure inhibierbar.

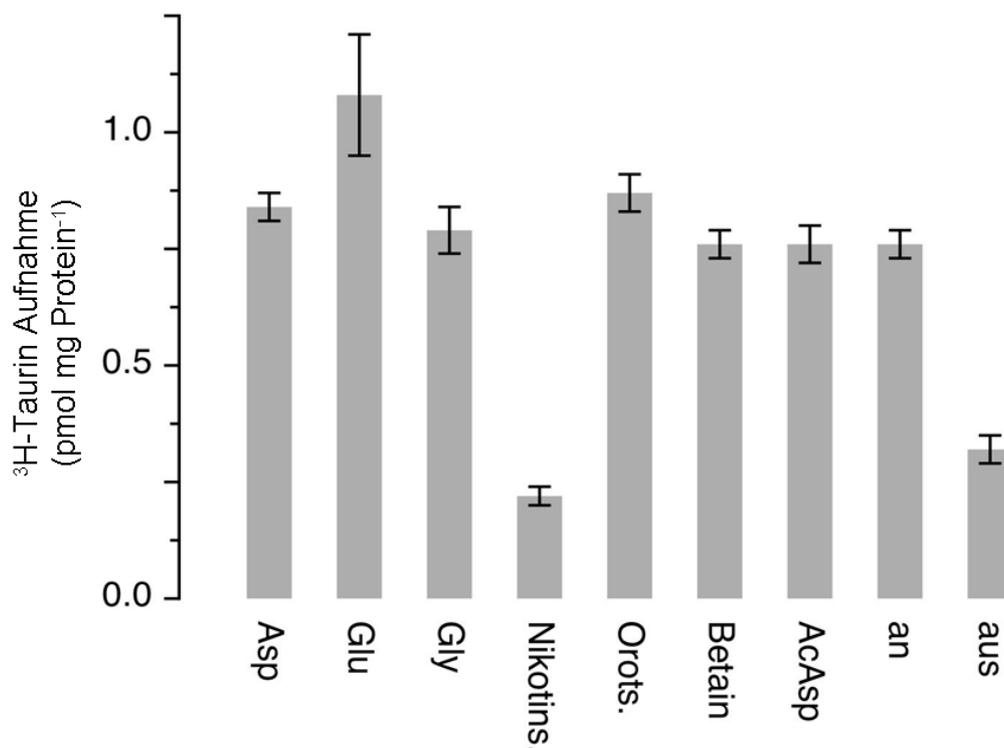


Abb. 3.11. Aufgetragen ist die ^3H -Taurin Aufnahme. SLC22A13h induzierte (+) und nicht-induzierte (-) HEK293-Zellen wurden mit 1 mM ^3H -Taurin für 30 min, bei 37 °C inkubiert (die zwei letzten Balken auf der rechten Seite). Restliche sieben Balken: SLC22A13h induzierte Zellen wurden mit 1 mM ^3H -Taurin und 1 mM der jeweiligen Substanz für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die ^3H -Taurin-Quantifizierung in den Zellen erfolgte mittels Szintillationszähler. Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwerts (SEM), n = 3.

3.7 Zeitverlauf der Efflux-Transportaktivität

SLC22A13h hatte in den bisherigen Experimenten keine hohe Aufnahme rate für die möglichen Substrate gezeigt, sondern vielmehr wie bei Aspartat und Glutamat (siehe 3.3.2 und 3.3.3) die Ausscheidung von Substanzen bewirkt. Die über Differenz-Abtönung entdeckten Signale waren meist Aminosäuren oder deren Derivate. Die genannten Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass SLC22A13 die Ausscheidung der untersuchten Substanzen aktiv befördert. Aufgrund der genannten Vermutung wurde ein Efflux-Experiment entwickelt, das die LC-MS/MS-Messung für aus der Zelle strömende Moleküle ermöglicht (siehe 2.11.5). Es wurde die Konzentration von 16 Aminosäuren und Taurin aus SLC22A13h induzierten Zellen und Kontrollzellen untersucht. Jeweils nach 10, 20 und 30 min wurden 200 μ l des Überstandes (KRH-Puffer ohne Na^+) abgenommen und die Substratkonzentration gemessen. Parallel dazu geführte Zellschalen von induzierten und nicht-induzierten Zellen wurden nach 30 min Inkubation in KRH-Puffer mit Methanol lysiert und daraufhin die intrazelluläre Konzentration bestimmt.

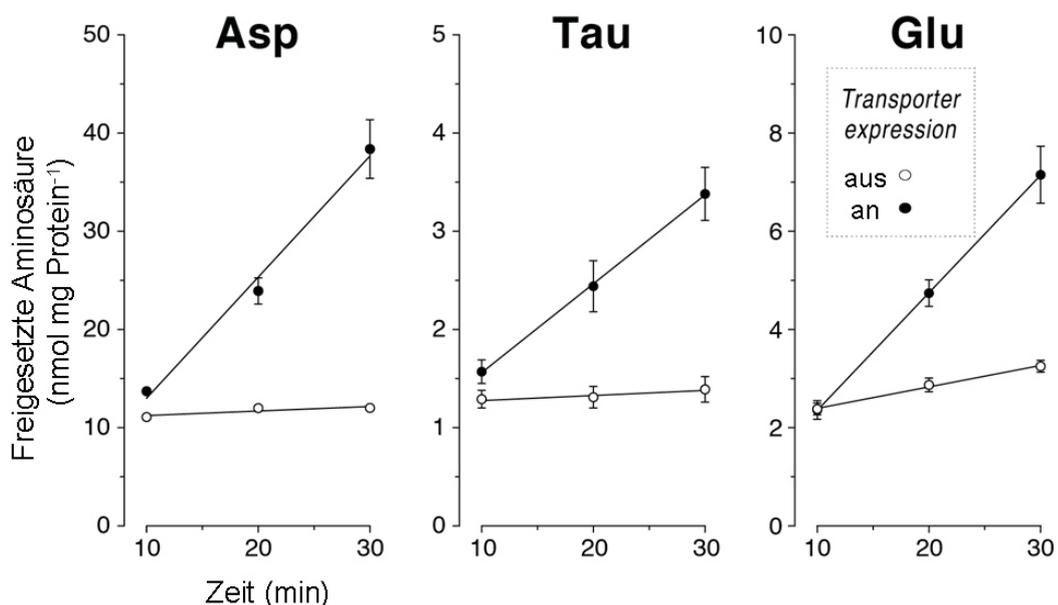


Abb. 3.12. Efflux von Aspartat, Taurin und Glutamat. SLC22A13h-exprimierende und nicht-exprimierende HEK-293-Zellen wurden 20 h nach Induktion mit 37°C warmem KRH Puffer (ohne Na^+ und PO_4) gewaschen und in 2 ml des gleichen KRH Puffers inkubiert. Die Effluxproben (0,2 ml) wurden sukzessive bei 10, 20 und 30 min gesammelt. Abschließend wurden die Zellen gewaschen und in MeOH lysiert. Die Quantifizierung der Effluxproben und Zelllysate erfolgte mittels LC-MS/MS. Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwerts (SEM), $n = 3$.

Um zu vermeiden, dass die Transportaktivität des Na⁺-abhängigen EAAT1 das Ergebnis verfälscht, wurde im KRH-Puffer Na⁺ durch NMDG ersetzt. Die Aminosäurefreisetzung in den KRH-Puffer als Funktion der Zeit konnte immer als gerade Linie beschrieben werden (siehe Abb. 3.11). Alle untersuchten Aminosäuren wiesen bei SLC22A13h-Expression eine erhöhte Effluxgeschwindigkeit auf (siehe Tabelle 3.1 und Abb. 3.12). Dabei sind die Effluxgeschwindigkeiten für Glutamat (5,7 nmol/min x mgProtein), Taurin (13,27 nmol/min * mgProtein) und Aspartat (28,01 nmol/min * mgProtein) besonders aufgefallen. Asparagin, Glutamin und Serin waren knapp über der durchschnittlich berechneten Effluxgeschwindigkeit (siehe Tabelle 3.1 und Abb. 3.12). Eine verringerte intrazelluläre Konzentration der SLC22A13h-induzierten Zellen im Gegensatz zu den Kontrollzellen konnte für Aspartat (8,6 nmol gegen 10 nmol) und Taurin (3,2 nmol gegen 4 nmol) festgestellt werden (siehe Tabelle 3.1). Für SLC22A13r konnten nicht die gleichen Ergebnisse erzielt werden (Tab. 3.2). Lediglich Aspartat zeigte eine vergleichbare Effluxgeschwindigkeit (21,3 nmol/min * mgProtein).

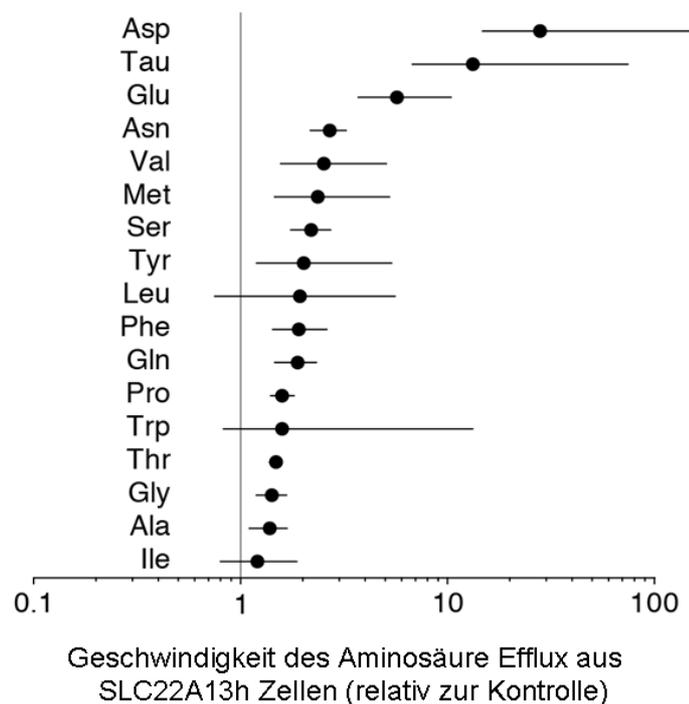


Abb. 3.13. Die Expression von humanem SLC22A13h stimuliert den Efflux von Aminosäuren aus HEK-293-Zellen. Das Verhältnis der Effluxgeschwindigkeiten ist aus Tabelle 3.1 entnommen. Messunsicherheiten (horizontale Linien) wurden über das 95%ige Konfidenzintervall zur Effluxgeschwindigkeit bestimmt. Die Geschwindigkeit wurde über die Steigung der Geraden ($y = y_0 + 10^{\text{pm}} * x$) durch die Datensätze bestimmt (unter der Annahme, dass die Steigungen logarithmisch normalverteilt sind), pm ist \log_{10} (Steigung).

Tabelle 3.1 Efflux von Aminosäuren aus SLC22A13h-exprimierenden und nicht-exprimierenden HEK-Zellen. Die experimentellen Details sind unter Abb. 3.11 beschrieben. Die LC-MS/MS Daten waren für Cys, Arg, Lys, and His nicht auswertbar. Die Effluxgeschwindigkeit (angegeben mit dem 95%igen Konfidenzintervall) entspricht der Steigung der linearen Regression. Die intrazelluläre Konzentration wurde mit einem intrazellulären Volumen von $6,7 \mu\text{l mg Protein}^{-1}$ berechnet und ist als arithmetisches Mittel dargestellt ($n=5$). Das Experiment wurde fünfmal an verschiedenen Tagen ausgeführt. Die Tabelle zeigt repräsentative Daten.

Analyt	Efflux Geschwindigkeit SLC22A13h Zellen ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$)	Efflux Geschwindigkeit Kontrollzellen ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$)	Ratio	intrazelluläre Konzentration SLC22A13h Zellen (mmol/l)	SEM	intrazelluläre Konzentration Kontrollzellen (mmol/l)	SEM
Ile	0.11 (0.074...0.14)	0.089 (0.040...0.14)	1.21	2.5	0.3	2.6	0.3
Ala	1.2 (0.93...1.5)	0.89 (0.80...0.97)	1.38	9.0	0.5	8.5	0.6
Gly	1.4 (1.1...1.6)	0.96 (0.85...1.1)	1.42	15	0.6	15	1.3
Thr	1.0 (0.95...1.1)	0.69 (0.66...0.73)	1.48	3.0	0.2	2.9	0.1
Trp	0.056 (0.046...0.066)	0.035 (-0.0066...0.077)	1.59	0.19	0.01	0.18	0.01
Pro	0.75 (0.67...0.83)	0.47 (0.41...0.53)	1.59	1.4	0.08	1.3	0.04
Gln	3.8 (2.8...4.9)	2.0 (1.9...2.2)	1.89	24	1.1	22	2
Phe	0.62 (0.48...0.76)	0.33 (0.23...0.42)	1.91	0.23	0.01	0.23	0.01
Leu	0.31 (0.10...0.52)	0.16 (0.025...0.30)	1.94	2.3	0.2	2.1	0.1
Tyr	0.35 (0.27...0.43)	0.17 (0.044...0.30)	2.02	1.0	0.07	1.1	0.03
Ser	0.18 (0.14...0.22)	0.082 (0.067...0.096)	2.19	0.47	0.08	0.44	0.03
Met	0.093 (0.071...0.12)	0.040 (0.014...0.065)	2.36	0.31	0.02	0.34	0.01
Val	0.27 (0.19...0.34)	0.11 (0.043...0.17)	2.53	1.2	0.1	1.2	0.02
Asn	0.30 (0.24...0.37)	0.11 (0.10...0.12)	2.70	1.3	0.08	1.2	0.1
Glu	0.25 (0.19...0.31)	0.044 (0.020...0.067)	5.70	22	0.8	21	1.5
Tau	0.10 (0.069...0.13)	0.0075 (-0.00079...0.016)	13.27	3.2	0.3	4.0	0.4
Asp	1.3 (0.96...1.6)	0.046 (0.0010...0.091)	28.01	8.6	0.4	10	0.6

Tabelle 3.2 Efflux von Aminosäuren aus SLC22A13r-exprimierenden und nicht-exprimierenden HEK-Zellen. Die experimentellen Details sind unter Abb. 3.11 beschrieben. Die LC-MS/MS Daten waren für Cys, Arg, Lys, and His nicht auswertbar. Die Effluxgeschwindigkeit entspricht der Steigung der linearen Regression. Die intrazelluläre Konzentration wurde mit einem intrazellulären Volumen von 6,7 μl mg Protein⁻¹ berechnet und ist als arithmetisches Mittel dargestellt (n=5). Die Tabelle zeigt Daten aus der Bachelorarbeit von Inna Miller (Feb. 2013).

Analyt	Efflux Geschwindigkeit SLC22A13r Zellen (nmol min ⁻¹ mg protein ⁻¹)	Efflux Geschwindigkeit Kontrollzellen (nmol min ⁻¹ mg protein ⁻¹)	Ratio	intrazelluläre Konzentration SLC22A13r Zellen (mmol/l)	SEM	intrazelluläre Konzentration Kontrollzellen (mmol/l)	SEM
Ile	-	-	-	0.1	0.0	0.2	0.0
Ala	0,23	0,16	1.5	6.8	0.3	6.2	0.7
Gly	0,27	0.15	1.8	14.4	0.2	12.8	1.0
Thr	0.45	0.45	1.0	5.5	0.2	6.6	1.0
Trp	0.08	0.05	1.6	0.1	0.0	0.1	0.0
Pro	0.29	0.21	1.3	5.4	0.2	6.0	0.9
Gln	0.71	0.33	2.2	0.0	0.0	0.0	0.0
Phe	0.09	0.18	0.5	1.5	0.0	1.9	0.4
Leu	0.04	0.04	0.9	4.4	1.1	4.3	0.6
Tyr	0.02	0.01	1.6	0.6	0.0	0.7	0.1
Ser	0.08	0.05	1.6	2.6	0.1	2.3	0.2
Met	0.004	0.02	0.2	0.1	0.0	0.2	0.0
Val	0.02	0.03	0.9	0.0	0.0	4.9	0.9
Asn	0.05	0.02	2.3	29.0	0.9	30.8	2.4
Glu	-	-	-	3	0.1	2.7	0.3
Tau	0.003	0.01	0.3	3.1	0.4	2.9	0.5
Asp	0.063	0.003	21.3	2	0.0	2.2	0.2

3.8 Konzentrationsabhängigkeit des Effluxtransports

Wird eine Substanz von einem Transporter umgesetzt, ähnelt die Reaktion der Arbeit eines Enzyms mit seinem Substrat. In der Kinetik ist ein grundlegendes Charakteristikum zur Beschreibung von Enzymeigenschaften die Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion der Substratkonzentration.

$$V_0 = V_{\max} [E]_T \times [S] / ([S] + K_M)$$

Der K_M -Wert ist dabei die Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Aufnahmegeschwindigkeit erreicht wird, und dient der Quantifizierung der Substrataffinität eines Enzyms bzw. Transporters. Zur Bestimmung wird durch steigende Substratkonzentration versucht eine Sättigung der spezifischen Substrataufnahme zu erzielen.

Allgemein kann der K_M -Wert auch für Transporter ermittelt werden, wenn sie in Aufnahme-richtung beobachtet wird. Die Substratkonzentration lässt sich im Außenmedium beliebig verändern. Bei SLC22A13h scheint die hauptsächliche Transportrichtung jedoch aus der Zelle zu führen. Eine Berechnung des K_M -Werts setzt somit eine kontinuierliche intrazelluläre Steigerung der Substratkonzentration voraus.

Um eine intrazelluläre Konzentrationssteigerung zu erreichen wurden SLC22A13h-induzierte Zellen und Kontrollzellen unter isoosmotischen Bedingungen mit Aspartat, Taurin und Glutamat vorinkubiert (1h, 10 – 90 mM). Nach der Inkubation wurde die Effluxgeschwindigkeit wie unter 3.7 berechnet und daraufhin als Funktion zur intrazellulären Konzentration des jeweiligen Substrats geplottet (siehe 3.13). Für Glutamat konnte kein Plot angefertigt werden, da die intrazelluläre Konzentration nicht wesentlich gesteigert werden konnte.

Die Effluxgeschwindigkeit stieg linear zur intrazellulären Konzentration. Aspartat wurde effizienter transportiert (Steigung: $2.2 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$) als Taurin ($0.24 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$).

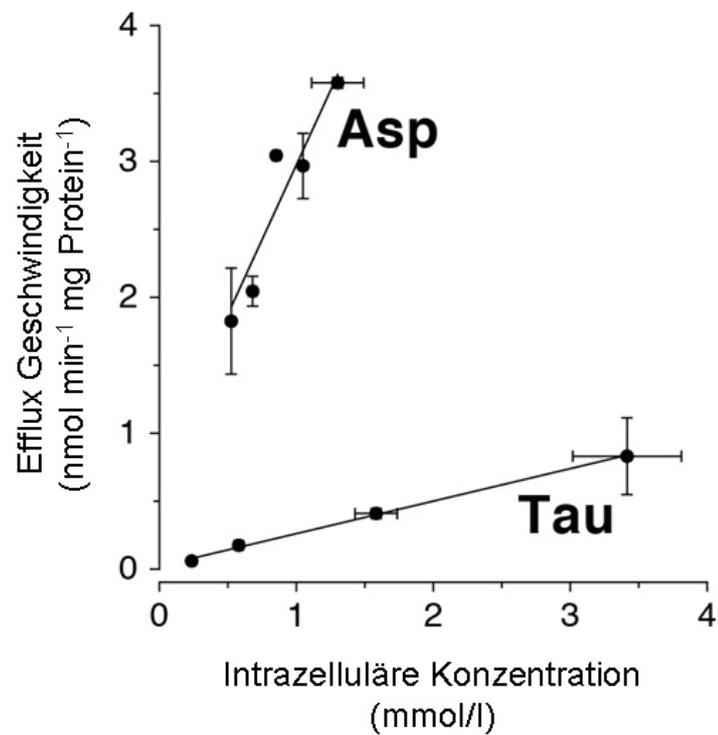


Abb. 3.14. Vorbeladung von SLC22A13h-exprimierenden 293-Zellen führt zu einer Steigerung der Effluxgeschwindigkeit von Aspartat und Taurin. Die Effluxgeschwindigkeit wurde gemessen wie unter Abb. 3.11 erläutert mit der Ausnahme, dass die Zellen eine Stunde mit Aspartat oder Taurin (3-90 mmol/l) vorinkubiert wurden und anschließend mit eiskaltem Natrium- und Phosphat-freiem Aufnahmebuffer gewaschen wurden. Die Effluxleistung der Kontrollzellen war $0.13 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ (Asp) und $0.021 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ (Tau).

3.9 pH-Abhängigkeit

Die Transportaktivität ist von vielen Faktoren abhängig. Einen entscheidenden Einfluss besitzt die Protonenkonzentration des Reaktionsmediums. Der Ladungszustand ionisierbarer Aminosäuren ist pH-abhängig und kann somit Auswirkungen auf die Aktivität haben (Lottspeich, 1998), zudem können Veränderungen des Ionenmilieus zu Störungen der Wasserstoffbrückenbindungen führen.

Um zu untersuchen, ob die Transportleistung in pH-Abhängigkeit steht bzw. ein pH-Optimum zeigt, wurden Efflux-Experimente mit frisch transfizierten HEK-293-Zellen bei extrazellulär verschiedenen, vom physiologischen Wert abweichenden Protonenkonzentrationen, durchgeführt. Die optimalen pH-Bedingungen für den Effluxtransport durch SLC22A13h wurden mit Aspartat und Glutamat als Substrat und einem Puffersystem im Bereich zwischen pH 6 und 8 bestimmt. Die Resultate zeigen deutlich, dass die Transporteffizienz bei pH 7,4 ein Optimum besitzt (Abb. 3.14).

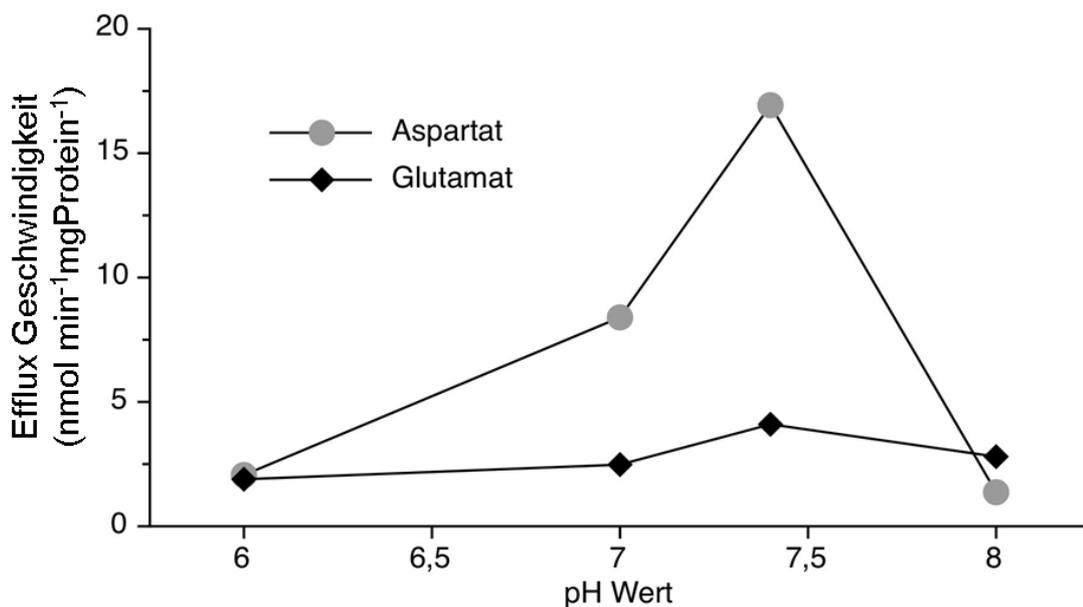


Abb. 3.15. Aufgetragen ist die Effluxgeschwindigkeit für Aspartat und Glutamat gegen den pH-Wert der Pufferlösung. SLC22A13h induzierte Zellen wurden für 30 min bei 37°C inkubiert. Der pH-Wert der Aufnahmelösungen betrug 6,0, 7,0, 7,5 und 8,0. Dargestellt ist der Mittelwert. n=3.

3.10 Ionenabhängigkeit von SLC22A13

Die Transportexperimente hatten bisher in einem Puffersystem stattgefunden, das physiologische Bedingungen erfüllt. Das heißt, der Gehalt an K^+ , Mg^{2+} oder SO_4^{2-} Ionen war an physiologische Konzentrationen angepasst. Anschließend wurde untersucht wie sich die Transportaktivität unter vollständiger Abwesenheit jeweils einer der Ionen verändert. Dabei wurde K^+ durch Na^+ ersetzt, Mg^{2+} durch Ca^{2+} und Sulfat durch Cl^- . Gemessen wurde der Aspartatefflux im Zeitverlauf über 30 min.

Die Effluxgeschwindigkeit war im Vergleich zum Standardpuffer bei jedem der drei Versuchspuffer geringer (Abb. 3.15). Der Aspartatausstoß war im Puffer ohne K^+ etwa 50% niedriger als im Standard-KRH-Puffer. Ohne Mg^{2+} oder Sulfat lag die gemessene Effluxrate 80 % unter den Normalbedingungen.

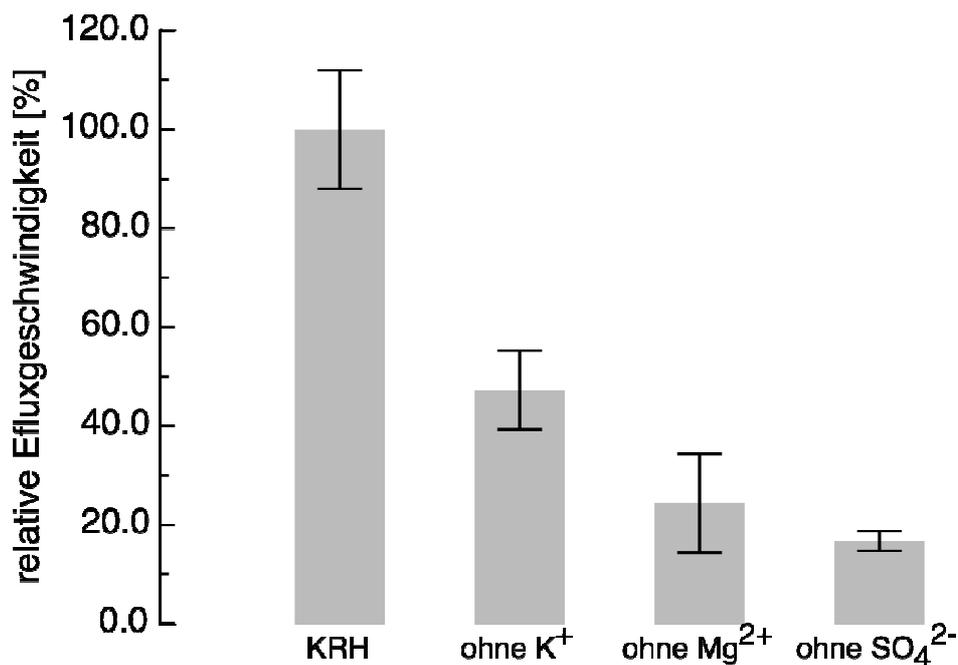


Abb. 3.16. Relativer Efflux für Aspartat in verschieden zusammengesetzten KRH-Pufferlösungen. SLC22A13h-induzierte Zellen wurden für 30 min bei 37°C inkubiert. Dargestellt ist der relative Transport der Aminosäure normiert auf den Transport in KRH-Puffer. Arithmetische Mittelwerte und SEM, n = 3.

4 Diskussion

Die SLC22-Familie besteht aus 15 verschiedenen Proteinen, welche jeweils unterschiedliche Substratspezifitäten besitzen. Über diese werden organische Kationen (OCTs, EMT) (Schömig et al., 2006), Zwitterionen (ETT, CTT) (Bacher et al., 2009) und organische Anionen (OATs) (Rizwan and Burckhardt, 2007) transportiert. Für SLC22A13 konnte die Aufnahme von Substanzen wie z. B. PAH, Orotsäure und Nikotinsäure nachgewiesen werden, auffällig war jedoch die wesentlich langsamere Transportgeschwindigkeit im Vergleich zur Umsatzgeschwindigkeit von physiologischen Substraten anderer SLC-Mitglieder. Sein Substratspektrum und damit auch seine physiologische Bedeutung waren unklar. Im Fokus dieser Arbeit stand, Substrate für SLC22A13 zu ermitteln, die effizient transportiert werden und helfen, die physiologische Bedeutung dieses einzigartigen Transporters zu entschlüsseln.

4.1 Methodische Aspekte

Zu Beginn dieser Arbeit war das Substratspektrum von SLC22A13 noch nicht vollständig aufgeklärt. Die bisher einzige Publikation zum Transportverhalten des Proteins basierte auf Experimenten in Oozyten des Krallenfroschs *Xenopus laevis* (Bahn et al., 2008). Die genetische Information des zu untersuchenden Proteins wird bei Experimenten mit Oozyten durch Injektion von cRNA oder Mikroinjektion heterogener DNA in den Nukleus befördert. Aufgrund einer großen Anzahl freier und an das endoplasmatische Retikulum gebundener Ribosomen haben die *X. laevis* Oozyten eine hohe translationale Kapazität und besitzen eine Zytoplasmamembran (Oolemma), die durch einen dichten Mikrovillibesatz auf das 4-fache der eigentlichen Oberflächengröße gesteigert wird (Dick et al. 1970); (Steinacker et al. 2000). Aus diesem Grund sind Versuche mit Einzellzellen für Transportmessungen relativ leicht möglich.

Dieses Zellsystem besitzt jedoch spezifische Nachteile, die sich unter anderem aus den jahreszeitlichen Schwankungen im Stoffwechsel der Oozyten ergeben. Die jahreszeitlichen Unterschiede zeigen sich in einer verringerten Expressionsrate von heterogenen

Proteinen und einer reduzierten Nährsubstanzaufnahme über Endozytose. Die Lebensfähigkeit der Oozyten kann sich auf ein bis zwei Tage, verbunden mit drastischen morphologischen Veränderungen, reduzieren (Hilken und Glauer 1997). Darüber hinaus werden die Versuche an einzelnen Zellen durchgeführt, weshalb für ein statistisch abgesichertes Experiment ein hoher experimenteller Aufwand betrieben werden muss. Zudem kann es durch die Stimulation der Expression endogener Transporter zu unerwünschten Artefakten während der Messung kommen (Schömig et al. 2006) und beim Vergleich von Experimenten zwischen Oozyten und humanen Zellsystemen sind signifikante Schwankungen beobachtet worden (Hatanaka et al. 2002). Abschließend ist aufgrund der phylogenetischen Differenz die Frage zu stellen, wie sinnvoll die Expression von humanen bzw. Mammalia-Proteinen im amphibischen System ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden HEK-293-Zellen als Zellsystem gewählt. Dies sind humane embryonale Nierenzellen, die adhärent wachsen und relativ einfach kultiviert und transfiziert werden können (Graham et al., 1977; Robinson und Goochee 1991).

4.2 Nikotinsäure als physiologisches Substrat

Neben der Wahl des geeigneten Zellsystems ist auch das Ergebnis der Publikation von Bahn et al. zu hinterfragen. Die Arbeitsgruppe hat mit Nikotinsäure (Niacin), PAH und Harnsäure bekannte Substrate der Transporter OAT1 (SLC22A6) und URAT1 (SLC22A12) geprüft und dann Nikotinsäure als physiologisches Substrat vorgeschlagen (Bahn et al., 2008). Dabei war Nikotinsäure mit Abstand das beste Substrat. Die Transporteffizienz bzw. clearance (= Aufnahmegeschwindigkeit / Substratkonzentration) lag bei $2,5 \mu\text{l Oozyte}^{-1} 30 \text{ min}^{-1}$ gegenüber $0,14$ (PAH) bzw. $0,064$ (Harnsäure) $\mu\text{l Oozyte}^{-1} 30 \text{ min}^{-1}$ (Fig. 3 in der genannten Arbeit). Die Autoren sahen die Aufnahme von Niacin als die primäre physiologische Funktion von SLC22A13 an (vorgeschlagener Funktionsname: OAT10).

Die Nikotinsäure besteht aus einem Pyridinring mit substituierter Carboxylgruppe (Abb. 4.1). Sie ist ein B-Vitamin und wurde früher als Vitamin B₃ bezeichnet. Im menschlichen Körper ist sie ubiquitär vorhanden und wird in der Leber gespeichert. Ihre wichtigste Funktion ist die Bildung von NAD⁺ sowie NADP⁺ (Niehoff et al., 2009; Song und FitzGerald 2013). Eine chronische Nikotinsäure Mangelernährung kann zu Pellagra

führen (Carlson; 2005). Außerdem wird sie zur Senkung erhöhter Blutfettwerte eingesetzt, da Nikotinsäure das Lipoprotein hoher Dichte (HDL)-Cholesterin erhöht und die Konzentration an Lipoprotein niederer Dichte (LDL)-Cholesterin, Lipoprotein a (Lp(a)) und Triglyzeriden senkt (Parsons et al. 1959; Birjmohun et al. 2005).

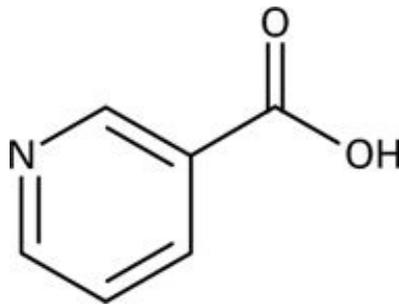


Abb. 4.1 Strukturformel von Nikotinsäure.

Die Substratspezifität für Nikotinsäure passt schwerlich zu der ermittelten Lokalisation des Transporters im basolateralen Kompartiment der Plasmamembran der Typ-A-Schaltzellen (Schulz et al. 2014). Diese Zellen erzeugen über eine Carboanhydrase Protonen für einen luminalen Efflux, um so einer Azidose im Blut gegen zu steuern. Ein besonderer Bedarf für die Aufnahme oder die Abgabe von Nikotinsäure ist hier nicht zu erkennen. Zudem ist Nikotinat kein spezifisches Substrat für SLC22A13, denn OAT1 ist ebenfalls in der Lage, Nikotinat zu transportieren (Rizwan und Burckhardt, 2007). Eine Wiederholung der Aufnahmeversuche mit Radiotracer in HEK-293-Zellen zeigte zudem einen wenig effizienten Transport für Nikotinsäure, PAH und Harnsäure. Es galt also, das physiologisch relevante Substrat von SLC22A13 zu identifizieren.

4.3 Substratsuche über Differenz-Abtönung

Um mögliche Substrate aufzuspüren, wurde in dieser Arbeit die Methode der LC-MS Differenz-Abtönung für SLC22A13h angewendet. Hierbei werden zunächst komplexe Verbindungsgemische durch die Kopplung von Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie zweidimensional (Zeitachse und m/z- Achse) aufgetrennt und detektiert (Siuzdak, 1994). Das Spektrometer analysiert die Lysate von HEK293-Zellen mit und ohne Transporterexpression. Die beiden Datensätze werden dann, um Unterschiede aufzuspüren, durch einen Algorithmus verglichen und visualisiert (Gründemann et al., 2005; siehe Abschn. 1.6 und 2.14.3). Der Vorteil der Substratsuche per Differenz-Abtönung ist die ergebnisoffene Suche nach transportierten Substanzen oder Stoffen deren Konzentration durch die Aktivität von SLC22A13 beeinflusst wird. Die etwas unflexible Fokussierung auf Substrate verwandter Transporter bleibt damit aus. Mit dieser Strategie konnte unter anderem Ergothionein als physiologisches Substrat von SLC22A4 entdeckt werden (Gründemann et al., 2005).

Das Ergebnis für SLC22A13h-exprimierende Zellen zeigte zunächst Signale bei m/z 174 und 146. Durch eine anschließende Fragmentierung konnten die beiden Substanzen als Guanidiniumsuccinat (GSA) und N-Acetylserin erkannt werden. Eine Aufnahme konnte lediglich für GSA nachgewiesen werden und dies erst nach 24 h Inkubation in sehr hoher Konzentration (1 mmol/l). Der Transporter zeigte jedoch keine hohe Transporteffizienz (TE) ($0,1 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$) zu GSA.

Eine Modifikation der Versuchsbedingungen (1h Inkubation mit 1 mmol/l Orotsäure bei pH 5) führte zu weiteren reproduzierbaren Signalen in der Differenz-Abtönung bei 124, 132, 146, 155, 174 und 194 m/z. Die Signale konnten als Taurin (124), Aspartat (132), Glutamat (146), Orotsäure (155), GSA (174) und MES (194) identifiziert werden, wobei Tau, Asp, Glu und GSA in höheren Konzentrationen in den Kontrollzellen gemessen wurden. Aufnahmeversuche mit in Frage kommenden Substanzen zeigten unterschiedliche Ergebnisse. ^3H -Orotsäure, PAH, und Nikotinsäure wurden von SLC22A13 transportiert. Jedoch war die Transporteffizienz ($\mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$) sehr gering: Nikotinsäure, $14,8 \pm 1,7$; PAH, $8,7 \pm 0,7$; Orotsäure, $3,7 \pm 0,3$. Zum Vergleich: die physiologischen bzw. besten Substrate der SLC22-Transporter OCT1, OCT2, EMT, ETT, CTT, OAT1 und OAT2 werden im hier angewandten Expressionssystem (HEK293, pEBTetD) mit einer Effizienz im Bereich von $50\text{-}150 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$ transpor-

tiert. Aufnahme-Experimente mit ^3H -Asp, ^3H -Glu, ^3H -Tau, oder GSA zeigten keine Unterschiede zwischen Transporter-exprimierenden Zellen und nicht-exprimierenden Zellen. Die hier erwähnten Messungen sind nach 1 min Aufnahmezeit entstanden. Verwandte Transporter zeigen nach einminütiger Inkubation von Substanzen aus ihrem Substratspektrum eine deutliche Aufnahme im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die bisher beobachteten Daten lassen vier mögliche Thesen zu:

- 1.) SLC22A13 ist langsamer als die verwandten Transporter.
- 2.) Die Aufnahme der Substrate erfolgt durch einen von intrazellulär nach extrazellulär gerichteten Gradienten organischer Verbindungen die noch unbekannt ist/sind.
- 3.) Die Transportaktivität erfolgt verstärkt in Efflux Richtung.
- 4.) Die beobachteten Signale sind nicht im Substratspektrum von SLC22A13, sondern zeigen eine physiologische Reaktion der Zelle auf den Transport einer noch zu suchenden Substanz.

4.4 Mögliche Substrate im Zeitverlauf

Unter der Annahme, dass SLC22A13 eine langsamere Aufnahmegeschwindigkeit als verwandte Transporter zeigt, wurde eine mögliche Aufnahme von ^3H -Asp, ^3H -Glu und ^3H -Tau über einen Zeitraum von 40 min untersucht. Zudem wurde die Aufnahme von ^3H -Orotsäure unter den gleichen Bedingungen gemessen. Dabei ist keine verstärkte Akkumulation von Aspartat und Glutamat zu beobachten, sondern im Gegenteil ist die Konzentration der radioaktiv markierten Substanzen in den Kontrollzellen höher als in den SLC22A13-exprimierenden Zellen. Selbst durch Erhöhung der Asp-Konzentration in der Aufnahmelösung und längere Inkubationszeit konnte keine Aufnahme von Aspartat über SLC22A13 in HEK-293-Zellen vermittelt werden. Bei der 24 h Inkubation im KRH-Puffer zeigte sich stattdessen, wie schon im Zeitverlauf, eine höhere Asp-Konzentration in den Kontrollzellen (Abb. 3.9).

Eine mögliche Erklärung für die Ergebnisse ist ein SLC22A13 vermittelter Efflux, wobei das exprimierte Transporterprotein einer katalysierten Aufnahme von ^3H -Aspartat und ^3H -Glutamat durch den exzitatorischen Aminosäuretransporter 1 (EAAT1) entgegen zu wirken scheint. Der EAAT1 ist ein Na^+ -abhängiger Asp/Glu Aufnahmetranspor-

ter. Zur Prüfung dieser Hypothese wurde im Reaktionspuffer Na^+ durch NMDG ersetzt. Das Ergebnis zeigt eine erheblich geringere Anreicherung von Aspartat und keinen Unterschied zwischen Kontrollzellen und SLC22A13h produzierenden Zellen (Abb 3.6 A).

Um die Spezifität der beobachteten Abnahme von Glu durch SLC22A13h vermittelten Transport zu verifizieren, wurde der nächste verwandte Transporter OAT2h im Zeitverlauf getestet. Der Carrier zeigte eine erhöhte Aufnahme von Glutamat. Das beobachtete Ergebnis scheint somit eine SLC22A13h spezifische Transportaktivität widerzuspiegeln. Für ^3H -Taurin und insbesondere für ^3H -Orotsäure ist eine Aufnahme zu erkennen. Das Ergebnis im ^3H -Orotsäure Zeitverlauf zeigt eine viel stärkere Akkumulation der Substanz in induzierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen, jedoch besitzen HEK-293-Zellen keinen natürlichen Transporter für Orotsäure. Das Resultat zeigt, dass SLC22A13 in die Aufnahmerichtung funktionieren kann, wobei die TE von Orotsäure zu gering für ein gutes Substrat ist.

Die Aufnahme von Taurin ist durch SLC22A13h gesteigert. Der Unterschied zu den Kontrollzellen ist aber zu gering für einen effizienten Transport. Es bleibt festzuhalten, dass eine Transportaktivität in die Zelle und aus der Zelle heraus zu erkennen ist. Die Aktivität kann in zwei verschiedene Transportmodi unterteilt werden. Glutamat und Aspartat scheinen ausschließlich unidirektional aus der Zelle transportiert zu werden und Taurin und Orotsäure werden bidirektional in Aufnahme- und Effluxrichtung transportiert.

Die dabei untersuchten Verbindungen Taurin, Aspartat, Glutamat und Orotsäure besitzen zum Teil sehr unterschiedliche Funktionen im Körper. Orotsäure ist ein Zwischenprodukt der Pyrimidinbiosynthese und kommt hauptsächlich in Milchprodukten, Hefen, Karotten und Zuckerrüben vor. Entgegen früheren Annahmen wird Orotsäure auch vom Menschen synthetisiert und hauptsächlich über die Niere ausgeschieden (Brosnan & Brosnan, 2007). Außer als Baustein für Proteine haben Aspartat und Glutamat hauptsächlich eine Bedeutung als exzitatorische Neurotransmitter im zentralen Nervensystem (Nistri und Constanti; 1979; Meldrum 2000; Gundersen et al. 1998). Taurin ist eine Aminosulfonsäure, die als Abbauprodukt aus den Aminosäuren Cystein und Methionin entsteht. Physiologische Aufgaben sind eine antioxidative Wirkung und die Konjugation der Gallensäuren (Jacobsen und Smith, 1968; Huxtable 1992; Ripps und Shen, 2012).

4.5 Versuch der trans-Stimulation und cis Inhibition

Eine trans-Stimulation wird erwartet, wenn die Orientierung der Substratbindungsstelle eines mit Substrat beladenen Transporterproteins von intra- nach extrazellulär schneller verläuft als die Rückorientierung des leeren Transporters (Abb. 4.2 A). Um eine trans-Stimulation zu erzeugen wird im Außenmedium ein Substrat angeboten, damit die Substratbindungsstelle bei der intrazellulär gerichteten Bewegung ebenfalls beladen ist und auf diese Weise die allgemeine Transportgeschwindigkeit erhöht ist (Abb. 4.2 B). Für SLC22A13h wurde eine trans-Stimulation des Orotsäuretransports untersucht (Abb. 3.10). Orotsäure eignete sich als Substrat für dieses Experiment, da für die Substanz kein nativer Transporter in HEK-293-Zellen vorhanden ist. Mit keiner der untersuchten Substanzen konnte eine trans-Stimulation der Orotsäure hervorgerufen werden. Der Versuch einer cis-Inhibition (Abb. 4.2 C) der Taurinaufnahme dagegen (Abb. 3.11) wies eine stark verminderte Aufnahme auf, wenn Nikotinsäure gleichzeitig angeboten wurde. Taurin und Nikotinsäure scheinen somit um die Bindungsstelle des Transporters zu konkurrieren. Bemerkenswert ist, dass Orotsäure, Glutamat und Aspartat keinen negativen Effekt auf den Taurintransport zeigten. Für Glutamat und Aspartat stärkt das Ergebnis die Hypothese eines einseitig gerichteten Ausstroms der beiden Aminosäuren.

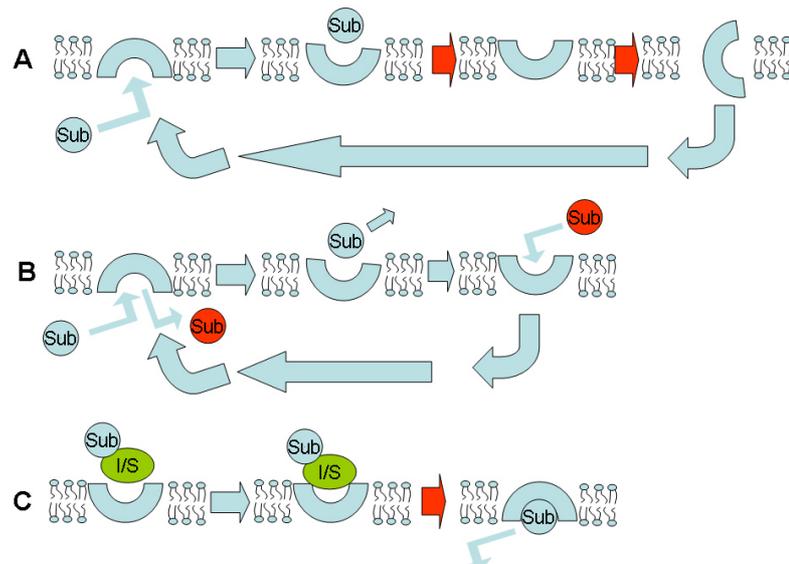


Abb. 4.2 Schematische Darstellung der trans-Stimulation (B) bzw. cis-Inhibitionsreaktion (C). Die langsame Rückorientierung von extra- nach intrazellulär (A) kann durch trans-Stimulation mit einem anderen Substrat beschleunigt werden (B). roter Pfeil = langsame Reaktion; blauer Pfeil = schnelle Reaktion; Sub = Substrat; I/S = Inhibitor bzw. Substrat.

4.6 SLC22A13 funktioniert als Effluxtransporter von Aminosäuren - Substratspektrum

Ein effektiver Transport konnte in den Aufnahme-Experimenten nicht nachgewiesen werden. Insbesondere die Zeitverläufe von Glutamat und Aspartat lassen den Schluss zu, dass SLC22A13h verstärkt in die extrazelluläre Richtung funktioniert. Zur Verifizierung der Substratspezifität wurde deshalb parallel der Efflux von 17 Standard Aminosäuren (AS) gemessen (Tab. 3.1). Die größte Effluxgeschwindigkeit zeigten Aspartat, Taurin und Glutamat. Die drei Substanzen sind somit sehr wahrscheinlich physiologische Substrate von SLC22A13h. Aspartat ist dabei das beste Substrat für SLC22A13h ($28 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$) und die am schwächsten transportierte Aminosäure ist Isoleucin mit einer Geschwindigkeit von $1,21 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$. Es bleibt jedoch unklar, wieso für fast alle Aminosäuren ein Grundstrom an Efflux gemessen werden kann. Die intrazelluläre Konzentration der meisten Aminosäuren war trotz SLC22A13h-Expression nicht niedriger als in den Kontrollzellen, mit der Ausnahme von Aspartat (Induzierte Zellen: $8,6 \pm 0,4 \text{ mmol/l}$; Kontrolle: $10 \pm 0,6 \text{ mmol/l}$) und Taurin ($3,2 \pm 0,3 \text{ mmol/l}$; $4,0 \pm 0,4 \text{ mmol/l}$). Dieses Ergebnis kongruiert mit der vermuteten Substratpräferenz. Dabei ist zu beachten, dass bei der Messung der intrazellulären Konzentrationen nicht ausschließlich die cytosolisch vorliegenden freien Aminosäuren gemessen wurden, sondern wahrscheinlich auch AS aus Kompartimenten oder anders gebundene AS. Die Efflux-Experimente fanden in KRH Puffer ohne Zusatz von möglichen Substraten statt. Eine Stimulation über die cis-Seite des Transporters ist somit höchst unwahrscheinlich und führt zu der Schlussfolgerung, dass SLC22A13h ein unidirektionaler Efflux Transporter für Aspartat und Glutamat ist.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen Kanälen und Transportern ist die Korrelation von Transportgeschwindigkeit und Substratkonzentration, ähnlich wie bei Enzymen (siehe Kapitel 3.8). Nach Steigerung des intrazellulären Aspartatgehalts durch Vorinkubation von SLC22A13h-induzierten Zellen konnte nachgewiesen werden, dass die Effluxgeschwindigkeit linear zur intrazellulären Konzentration zunahm (Abb. 3.14). SLC22A13h ist somit als Transporter zu klassifizieren.

4.7 Welche Triebkraft steht hinter dem unidirektionalen Efflux durch SLC22A13?

Ein unidirektional gerichteter Transport wurde schon häufig für ABC-Transporter gezeigt (Klingenberg, 2007; Locher, 2004; Vanakker et al., 2013). Sie nutzen die Energie aus der Hydrolyse von ATP, um Moleküle auf die andere Seite der Membran zu befördern. Für Mitglieder der MFS-Familie wurde dagegen meist beobachtet, dass sie als sekundäre Transporter die bergauf gerichtete Translokation eines Soluts mit dem bergab gerichteten Strom eines anderen verbinden (1.2). Dabei ist die Reaktion in den meisten Fällen umkehrbar. Also erfolgt sie in bidirektionaler Richtung. Unidirektionaler Transport wurde bisher selten nachgewiesen.

Watts et al. haben gezeigt, dass der exzitatorische Aminosäure Transporter 3 (EAAT3, SLC1A1) Cystein im Cotransport mit 3 Na⁺ und 1 H⁺ ausschließlich in Aufnahmerichtung transportiert (Watts et al. 2014) und für den mitochondrialen Carrier SLC25A15 wurde ein einseitiger Influx von Ornithin im elektroneutralen Antiport mit einem H⁺ beschrieben (Indiveri et al. 1992, Indiveri 1999). Zudem ist die Genfamilie der Neurotransmittertransporter (NTT; SLC6) eine beachtenswerte Gruppe von Transportproteinen, welche die Aufnahme von Neurotransmittern (Dopamin, Serotonin, Noradrenalin, GABA und Glycin) über einen Symport mit Na⁺ und Cl⁻ ermöglichen (Kristensen, 2011).

In der SLC22-Familie wurde unidirektionaler Transport bei 5 Carriern nachgewiesen. Die organischen Kationen Transporter OCT 1-3 (SLC22A1-3), welche auch als extraneuronale Monoamin-Transporter bezeichnet werden (Breidert et al. 1998; Gründemann et al. 1999), fungieren als Uniporter, die das Substrat abhängig vom elektrochemischen Gradienten in beide Richtungen transportieren können (Koepsell und Endou, 2004; Girardin, 2006). OCT1 und 2 sind dabei in der basolateralen Membran von Hepatocyten bzw. in den renalen proximalen Tubuluszellen lokalisiert (Gründemann et al., 1994; Koepsell et al., 2007; Nies et al. 2009; Gorboulev et al. 1997). OCT3 ist in verschiedenen Organen des Körpers verteilt. Insbesondere wird er häufig im menschlichen und im Nagergehirn exprimiert (Wu et al. 1998; Haag et al. 2004; Zhu et al. 2010). Substrate sind diverse organische Kationen, wie z. B. Tetraethylammonium (TEA) und 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺), aber auch kationische Medikamente wie das orale Antidiabetikum Metformin (König et al. 2011; Kimura et al., 2005; Wu et al. 1998). Die beiden Zwitterionen Carrier, ETT (Ergothionein-Transporter; SLC22A4) und CTT (Carni-

tin Transporter, SLC22A5), arbeiten als Symporter, welche Ergothionein bzw. Carnitin im Cotransport mit Na^+ in die Zelle transportieren (Gründemann et al., 2005; Grigat et al. 2009). ETT wird hauptsächlich im Ileum, in der Niere und im Knochenmark (Grigat et al., 2007; Gründemann et al., 2005) und CTT wird überwiegend in Herz, Plazenta, Skelettmuskel, Niere und Pankreas exprimiert (Wu et al., 1998a; Koepsell et al., 1999; Schömig et al., 1998). Die genannten Beispiele machen deutlich, dass unidirektionaler Transport häufig den gerichteten elektrochemischen Gradienten eines oder mehrerer Ionen (z. B. Na^+ , H^+ oder auch Na^+ und Cl^-) als Triebkraft nutzt. Es besteht daher die Möglichkeit, dass der Efflux von Aspartat und Glutamat durch SLC22A13 ebenfalls an den Bergabtransport eines Ions gekoppelt ist. Das Ergebnis aus Kapitel 3.10 kann dabei erste Hinweise auf mögliche Ionen geben, die den Transport fördern. Der stärkste Effekt auf die Effluxgeschwindigkeit ist zu beobachten, wenn Sulfat oder Magnesium im Reaktionspuffer ersetzt wurden (Abb. 3.15). Mg^{2+} liegt unter physiologischen Bedingungen außerhalb der Säugetierzelle in einer etwas höheren Konzentration vor als intrazellulär (2 bzw. 0,5 mM; Alberts et al., 2011). Es wäre somit ein Antiport denkbar, bei dem Aspartat bzw. Glutamat aus der Zelle im Austausch mit Mg^{2+} transportiert werden. Anorganisches Sulfat stellt ein Abbauprodukt der schwefelhaltigen Aminosäuren dar und wird entweder ausgeschieden oder in der Leber zur Biosynthese schwefelhaltiger Verbindungen genutzt (Rehner et al., 2010). Es ist daher intrazellulär meist nicht als freies Ion vorhanden und somit auch ein Antiport möglich. Die oben genannten Transporter koppeln die Reaktion meist an einen Na^+ Symport. Sie funktionieren in Aufnahmerichtung und nutzen dabei den hohen intrazellulär gerichteten elektrochemischen Gradienten von Na^+ aus, welches extrazellulär (145 mM) um den Faktor 10 höher konzentriert ist als im Cytoplasma (10 mM) (Alberts et al., 2011). SLC22A13 transportiert Glutamat und Aspartat jedoch in Effluxrichtung. Eine Beteiligung von Na^+ am Transportprozess wäre also über Antiport denkbar. Betrachtet man jedoch bereits charakterisierte unidirektionale Effluxtransporter, so scheint es für die Reaktion keine einheitliche Triebkraft zu geben.

Mitglieder der MFS-Familie, die einen unidirektionalen Efflux zeigen, sind z. B. MATE1, SLC17A1 und OAT2. Dabei zeigen die Carrier sehr unterschiedliche Transportmechanismen. Das „multidrug and toxin extrusion protein 1“ (MATE1; SLC47A1) wird in Leber und Niere exprimiert und ist ein H^+ /organischer Kationen Antiporter (Otsuka et al., 2005; König et al. 2011). SLC17A1 wird auch als Natrium-abhängiger Phosphat Transporter 1 (NPT1) bezeichnet, weil die SLC17 Transporterfamilie anfänglich als

Na^+/P_i Cotransporter charakterisiert wurde (Aihara, 2000; Reimer und Edwards, 2004). Iharada et al. haben jedoch nachgewiesen, dass es sich bei dem Protein um einen Cl^- abhängigen Harnsäure Effluxtransporter handelt. Dabei ist SLC17A1 kein Cl^- Transporter, es wird jedoch vermutet, dass Cl^- als allosterischer Aktivator fungiert (Iharada, 2010). Die Funktion als Harnsäure Exporter wurde erst kürzlich in einer weiteren Veröffentlichung bestätigt, jedoch wurde hier gezeigt, dass eine Steigerung der Effluxgeschwindigkeit durch Depolarisation mit hohen Mengen Kalium im Extrazellulärraum hervorgerufen wurde (Chiba et al. 2014). Die Triebkraft von NPT1 ist somit abschließend noch nicht geklärt. Der organische Anionen Transporter 2 (OAT2; SLC22A7) zeigte einen gesteigerten Glutamat Ausstoß nach Stimulation mit Benzoesäure (Pfennig et al., 2013). Das Protein transportiert die Benzoesäure dabei nicht, sondern die Autoren erklären die Stimulation mit einer möglichen Benzoesäurebindungstelle auf der extrazellulären Seite von OAT2. OAT2 transportiert Glutamat jedoch auch in die Zelle, weshalb hier nicht wirklich von Unidirektionalität gesprochen werden kann. Die Beispiele zeigen, dass ein unidirektionaler Efflux auf sehr unterschiedliche Weise stimuliert werden kann. Eine H^+ -Abhängigkeit wie bei MATE1 können wir ausschließen, da eine Steigerung der Protonenkonzentration keinen gesteigerten Efflux zufolge hatte (Abb. 3.11). Eine Stimulation durch einen externen Liganden wurde nicht nachgewiesen. Die Triebkraft des Effluxtransports bleibt eine offene Frage.

4.8 Mögliche physiologische Funktion des Transportproteins SLC22A13 in den Typ-A-Schaltzellen

Die Aufklärung der physiologischen Funktion von Transportproteinen hat eine fundamentale Bedeutung. Dabei erschließt sich der Zweck eines Transporters erst aus der Integration von Standort und Substratspezifität. Es stellt sich somit die Frage, ob die unidirektionale Ausscheidung von Aspartat und Glutamat die spezifischen Aufgaben der Typ-A-Schaltzellen (z. B. pH-Homöostase, Ammoniak-Ausscheidung (Wall, 2005)) unterstützt. Dass Schaltzellen eine geringere Konzentration an Aspartat, Glutamat und Taurin aufweisen, wird von zwei Publikationen bestätigt (Ma et al., 1994; Amiry-Moghaddam et al., 1994). In den Veröffentlichungen wurde die native renale Verteilung von Aspartat, Glutamat und Taurin untersucht. Die Substanzen wurden mit Glutaraldehyde

hyd gekoppelt und über Antikörperfärbung ausgewertet. Im Sammelrohr färbten die Antikörper gegen Aspartat und Glutamat die Hauptzellen stark und die Schaltzellen nur schwach an. Taurin war in den Schaltzellen im Vergleich zu den Hauptzellen nur zu 30 % enthalten. Diese Ergebnisse passen trefflich zu der Idee, dass SLC22A13 Aktivität in den Schaltzellen zur intrazellulären Verminderung der Aspartat, Glutamat und Taurin-Konzentrationen führt.

Es stellt sich die Frage, welchen Nutzen Typ-A-Schaltzellen aus dem Efflux von Aspartat, Glutamat und Taurin ziehen und welche physiologische Funktion SLC22A13 besitzt. Eine denkbare Möglichkeit wäre die Beeinflussung des osmotischen Zustandes. Denn Aspartat, Glutamat und Taurin funktionieren auch als Osmoregulatoren, die bei hypotonem Außenmedium aus der Zelle freigesetzt werden (Haskew-Layton, 2008; Huxtable, 1992; Kimelberg et al., 1990). Jedoch spricht dagegen, dass die Expression des Carriers nicht mit der Osmolalität entlang der kortikokapillaren Achse in der Niere korreliert und dass Typ B Zellen die gleichen osmotischen Bedingungen haben wie Typ-A-Zellen.

Eine Hauptaufgabe von Typ-A-Zellen ist die Erzeugung und Sekretion von Protonen (Abb. 4.3). Um das intrazelluläre Ladungsgleichgewicht zu erhalten, muss der luminale elektrogene Ausstoß von Protonen über die H^+ -ATPase durch gleichzeitigen Efflux von Anionen oder die Aufnahme von Kationen ausgeglichen werden. Bisher ist ein solcher kompensatorischer Mechanismus noch nicht bekannt. Der Anionenaustauscher 1 (AE1) katalysiert basolateral den Antiport von Bikarbonat und Chlorid. Es findet somit ein elektroneutraler Austausch statt (Wagner et al. 2009), der zwar Bikarbonat für die Pufferung des Blut pHs bereitstellt, aber nicht die Sekretion der Protonen ausgleicht.

Aspartat und Glutamat besitzen die fundamentale Gemeinsamkeit, dass die Carboxylgruppe ihrer Seitenketten ($pK_a = 3,9$ bzw. $4,1$) innerhalb der Typ-A-Schaltzellen ($pH = 7.3$ (Hayashi M. et al., 1991)) komplett dissoziiert vorliegt. Ein basolateraler Efflux dieser negativ geladenen Aminosäuren über SLC22A13 könnte den luminalen Verlust an Protonen kompensieren. SLC22A13 könnte somit eine Schlüsselfunktion zukommen bei der Erzeugung elektrostatisch ungebundener Protonen. Dabei ist der unidirektionale Efflux essentiell, um die Wiederaufnahme der ausgeschleusten Anionen zu vermeiden. Aspartat und Glutamat können von der Typ-A-Zelle relativ einfach in großen Mengen synthetisiert werden. Beide Aminosäuren werden aus Intermediaten des Citronensäurezyklus gebildet, Oxalacetat und 2-Oxoglutarat, welcher entweder im Cytosol oder in

Mitochondrien abläuft, die in den Typ-A-Schaltzellen reichlich vorhanden sind (Biver S. et al. 2008; Wagner et al., 2009) (Abb. 1.5). Im Gegensatz dazu erzeugen und sekretieren Typ B Schaltzellen Bikarbonat (HCO_3^-). Hier macht die Abwesenheit von SLC22A13 Sinn, da eine Erzeugung von überschüssigen Protonen kontraproduktiv wäre.

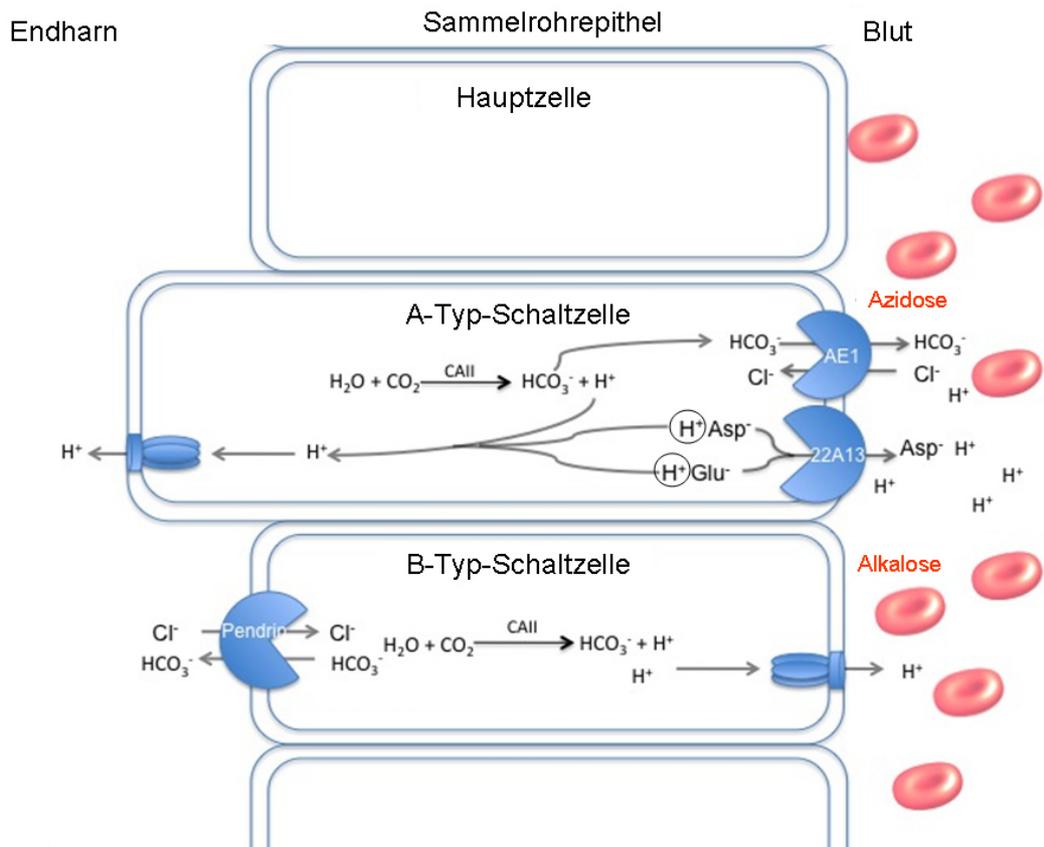


Abb. 4.3 Schematische Darstellung des Sammelrohrepithels und der postulierten, physiologischen Funktion von SLC22A13. AE1 = Anionenaustauscher 1, CAII = Carboanhydrase II.

Taurin liegt bei physiologischem pH als Zwitterion ($\text{pK}_a = 1,5$ und $9,1$) vor und ist insgesamt neutral. Ein Efflux von Taurin erzeugt also keine freien Protonen. Wahrscheinlich ist es ein Begleitsubstrat, das eine ausreichende strukturelle Ähnlichkeit zu den Hauptsubstraten Aspartat und Glutamat besitzt. Ein ähnliches Substratspektrum wurde bereits für andere Transporter beschrieben. Der EAAT2 aus *Drosophila* transportiert Aspartat und Taurin (Besson, M. T. et al. 2005) und ein noch nicht identifiziertes Prote-

in katalysiert den Efflux von Aspartat, Glutamat und Taurin in primären Astrocyten Zellkulturen der Ratte (Kimmelberg H. K. et al. 1990).

4.9 Pharmakologische Anwendbarkeit

Membranständige Transportproteine sind im menschlichen Körper essentiell für die Aufnahme, Verteilung, Elimination und Rückresorption von Verbindungen. So wurde für mehrere SLC22-Transporter postuliert, dass sie aufgrund der starken Expression in Leber oder Niere eine bedeutende Funktion bei der Ausscheidung oder Rückgewinnung endo- und exogener Verbindungen haben (van Montfoort et al., 2003). Pharmakologisch betrachtet besitzen Transporter Bedeutung als relevante therapeutische Angriffspunkte (z. B. Antidepressiva, Diuretika) und die Pharmakokinetik vieler Wirkstoffe beeinflussende Kontrollpunkte. Bekannte Beispiele für Mitglieder der Solute Carrier, die medikamentös manipuliert werden, sind der Noradrenalin Transporter (SLC6A2, Pacholczyk et al. 1991, Gether et al. 2006) und der Na-K-Cl₂-Cotransporter (SLC12A2, Markadieu und Delpire, 2014).

Ähnlich wie bei der Entschlüsselung der physiologischen Funktion ist die Lokalisation des Transporters auch entscheidend für die Entdeckung möglicher pathologischer Mechanismen. SLC22A13 wird in den Typ-A-Schaltzellen im Sammelrohr der Niere exprimiert. Die Bedeutung dieser Zellen wird deutlich bei einer Störung der H⁺-Sekretion z. B. durch genetische Transporterdefekte oder durch eine Autoimmunerkrankung (Sjögren- Syndrom) (Wagner et al., 2009). Hierbei kommt es zu einer distalen RTA (renal tubular acidosis), d.h. zu einem pathologischen Anstieg des pH-Wertes im Blut. Unter der Annahme, dass die Hauptfunktion von SLC22A13 die Ausschleusung von Aspartat und Glutamat zur Erzeugung elektrostatisch ungebundener Protonen ist, könnte eine Fehlfunktion oder der Verlust von SLC22A13 eine distale tubuläre Azidose verursachen.

4.10 Ausblick

In dieser Arbeit wurde die Transportrichtung sowie das physiologische Substrat des Transporters SLC22A13 aufgezeigt. Der Carrier katalysiert den unidirektionalen Efflux von Aspartat und Glutamat aus den Typ-A-Schaltzellen. Da der Transporter ein Mitglied der Solute Carrier ist, ist auszuschließen, dass der Efflux über die Hydrolyse von ATP ermöglicht wird. Dies ist ein Charakteristikum der ABC Transporter. Die Frage nach der Triebkraft von SLC22A13 bleibt somit weiterhin unbeantwortet und wäre zum vollständigen Verständnis noch zu lösen. Außerdem ist die Unidirektionalität des Transporters weiter zu untersuchen. Zwar konnte mit Orotsäure eine Aufnahme beobachtet werden, aber eine trans-Stimulation mit den möglichen physiologischen Substraten zeigte keine gesteigerte Transportaktivität.

Die Generierung einer Knock-out Mutante könnte aufschlussreiche Informationen zu physiologischen und pathophysiologischen Eigenschaften des Transporters geben und gegebenenfalls entsprechende phänotypische Ausprägungsmerkmale zeigen. Mit Blick auf die mögliche Rolle des Carriers bei einer distalen RTA wäre z. B. die Beobachtung der Mutante unter langfristiger Diät mit säurebildenden Lebensmitteln von Interesse.

5 Zusammenfassung

Der Solute Carrier SLC22A13 liegt in mehreren Mammalia-Spezies konserviert vor und wird in Mensch und Ratte hauptsächlich in der Niere exprimiert. Seine physiologische Bedeutung ist bisher unklar.

Ziel dieser Arbeit war es, den Transporter näher zu charakterisieren. Transporter werden im Wesentlichen durch ihre Substrate definiert, weshalb Versuche durchgeführt wurden, um physiologisch relevante Substrate für SLC22A13 zu finden. Dafür wurde der Transporter aus der Niere kloniert und eine SLC22A13h HEK293-Zelllinie generiert. Mögliche Substrate wurden danach mittels LC-MS- (Liquid Chromatography – Mass Spectrometry) Differenz Abtönung aufgespürt.

Über diese Methode konnten Guandiniumsuccinat, Aspartat, Glutamat und Taurin für SLC22A13h als Efflux-Substrate identifiziert werden. Zellen die SLC22A13 exprimierten enthielten weniger der genannten Substanzen als nicht-induzierte Zellen. Zeitverläufe der Aspartat- und Glutamat-Aufnahme zeigten, dass SLC22A13 der endogenen Aufnahme entgegenwirkt. Im Vergleich ist die Glutamat Akkumulation mit OAT2, einem bidirektionalen Glutamattransporter, gesteigert. Demnach katalysiert SLC22A13 einen unidirektionalen Efflux. Die Effluxgeschwindigkeit von 17 proteinogenen Aminosäuren wurde über LC-MS/MS gemessen. So konnte erstmalig gezeigt werden, dass der Transporter den Efflux von Aspartat, Glutamat und Taurin stark stimuliert. Bei Zunahme der intrazellulären Konzentration von Aspartat und Taurin durch Vorinkubation konnte die Effluxgeschwindigkeit linear gesteigert werden.

Die in diesem Zusammenhang gezeigten Ergebnisse liefern erstmalig eine Erklärung für die physiologische Funktion von SLC22A13. Es ist anzunehmen, dass der Carrier in den Typ-A-Schaltzellen den luminalen Austritt von Protonen kompensiert, indem er den basolateralen Ausstoß der Anionen Aspartat und Glutamat vermittelt. Auf diese Weise verhindert der unidirektionale Efflux einen Rückfluss von Anionen. Eine Fehlfunktion oder der Verlust von SLC22A13 könnte somit eine distale tubuläre Azidose verursachen.

6 Abstract

The solute carrier 22A13 is an evolutionary conserved transport protein in several mammalian species, which is basically expressed in the kidney. Its physiological function is so far unknown. Purpose of this thesis was the characterization of the transporter. The physiological role of a transporter is defined by its substrates substantially. Different assays were executed to detect relevant substrates of SLC22A13. Potential substrates were elucidated via LC-MS- (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) difference shading.

The method showed that heterologous expression of SLC22A13 in 293 cells stimulates efflux of guanidinosuccinate, aspartate, glutamate and taurine. Transporter expressing cells contained less amount of the substances compared to non expressing cells. In experiments the time course of uptake of ^3H -aspartate and ^3H -glutamate was measured. SLC22A13 counteracted endogenous uptake of these compounds. This result implicates that SLC22A13 catalyzes unidirectional efflux of aspartate and glutamate. Velocity of efflux of standard amino acids was measured by LC-MS/MS. A strong stimulation of efflux of aspartate, glutamate and taurine via SLC22A13-expression could be observed for the first time. After preincubation the concentrations of aspartate and taurine were increased and lead to a linear raise of velocity of efflux.

For the first time these results give an explanation about the physiological function of SLC22A13. It compensates luminal exit of protons by mediating the basolateral unidirectional expulsion of the anions aspartate and glutamate. An anion reentering is avoided by the one way transport of the anions.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	ATB-Binding-Cassette
ACN	Acetonitril
AE1	Anionenaustauscher 1
Amp	Ampicillin
Amp ^R	Ampicillinresistenz
Ampr	β-Lactamase
As	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
Bidest	zweifach destilliert
bp	Basenpaare
Bq	Becquerel (Kernzerfälle pro Sekunde)
BSA	Bovine Serum Albumine, Rinderserumalbumin
CCD	cortical collecting duct, kortikales Sammelrohr
CD	collecting duct, Sammelrohr
cDNA	complementary DNA
CE	Collision Energy
CNT	connecting tubule, Verbindungs-Tubulus
CTT	Carnitin-Transporter
DCT	Distales Convolut
DL	Denaturierungs-Lösung
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
EBNA	Epstein-Barr nuclear antigen
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMT	Extraneuronaler Monoamin-Transporter
ESI	Elektrospray-Ionisierung
<i>Et al.</i>	et alteri (und andere)
ET	Ergothionein
ETT	Ergothionein-Transporter
g	Erdbeschleunigung, 9,81 m/s
GSA	Guanidiniumsuccinat

h	human
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethylen)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
HEK	Human Embryonic Kidney
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IM	inner medulla, inneres Mark
ISOM	inner stripe outer medulla, innerer Streifen äußeres Mark
K_{cat}	Wechselzahl
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
kDa	Kilodalton
KRH	Krebs-Ringer-Henseleit Puffer
LB	Luria Bertani
LC	Liquid Chromatography
M	Mol
m	Maus
MFS	Major Facilitator Superfamilie
MRM	Multiple Reaction Monitoring
m/z	Quotient aus Masse durch Ladung
MS	Mass Spectrometry
NT	nicht-transfizierte HEK293-Zellen
OAT	Organic Anion-Transporter
OCT	Organic Cation-Transporter
OCTN	Novel Organic Cation-Transporter
OM	outer medulla, äußeres Mark
Ori	Replikationsursprung
OSOM	outer stripe outer medulla, äußerer Streifen des äußeren Marks
PAH	para-Aminohippurat
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PBS	Phosphate buffered saline
PEG	Polyethylenglycol
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
r	Ratte
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SEM	Standard Error of Mean, Standardfehler des arithmetischen Mittels
SLC	Solute-Like-Carrier
SOB	Super Optimal Broth
SOC	SOB + 20 mM Glucose
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Transporteffizienz

Tet	Tetrazyklin
TetR	Tetracyclin Repressor
T-Mix	Terminator-Mix
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
U	Unit, Einheit der Enzymaktivität
UpM	Umdrehungen pro Minute
v	Aufnahmegeschwindigkeit
Vmax	Maximale Aufnahmegeschwindigkeit
V_{\max}/K_m	TE
v/S	Clearance (TE)
v/v	volume per Volume, Volumen pro Volumen
w/v	wieght per Volume, Gewicht pro Volumen
z. B.	zum Beispiel

Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartat	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutamat	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

Literaturverzeichnis

Aihara Y., Mashima H., Onda H., Hisano S., Kasuya H., Hori T., Yamada S., Tomura H., Yamada Y., Inoue I., Kojima I., Takeda J. Molecular cloning of a novel brain-type Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter. *J Neurochem.* Jun;74(6):2622-5.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (Übersetzung herausgegeben von U. Schäfer). 2011. *Molekularbiologie der Zelle*. Gebundene Ausgabe Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; Auflage: 5.

Amiry-Moghaddam M., Nagelhus E. and Ottersen O. P. .1994. Light- and electronmicroscopic distribution of taurine, an organic osmolyte, in rat renal tubule cells. *Kidney Int.* 45, 10-22.

Bach M., Grigat S., Pawlik B., Fork C., Utermöhlen O., Pal S., Banczyk D., Lazar A., Schömig E., Gründemann D. 2007. 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* 274:783-790.

Bahn, A., Hagos, Y., Reuter, S., Balen, D., Brzica, H., Krick, W., Burckhardt, B. C., Sabolic, I. and Burckhardt, G. 2008. Identification of a new urate and high affinity nicotinate transporter, hOAT10 (SLC22A13). *J Biol Chem.* 283, 16332-16341.

Ballatori N. 2005. Biology of a novel organic solute and steroid transporter, OSTalpha-OSTbeta. *Exp Biol Med (Maywood).* 230(10):689-98.

Besson M.T. , Ré D.B. , Moulin M. , Birman S. 2005. High affinity transport of taurine by the *Drosophila* aspartate transporter dEAAT2. *J Biol Chem.* Feb 25;280 (8): 6621-6.

Birjmohun R. S., B. A. Hutten , J. J. Kastelein , and E. S. Stroes . 2005. Efficacy and safety of high-density lipoprotein cholesterol increasing compounds: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Am. Coll. Cardiol.* 45: 185 – 197.

Biver S., Belge H., Bourgeois S., Van Vooren P., Nowik M., Scohy S., Houillier P., Szpirer J., Szpirer C., Wagner C. A., Devuyst O. and Marini A. M. 2008. A role for Rhesus factor Rhcg in renal ammonium excretion and male fertility. *Nature.* 456, 339-343.

- Breidert T.**, Spitzenberger F., Gründemann D., Schömig E. 1998. Catecholamine transport by the organic cation transporter type 1 (OCT1). *Br J Pharmacol.* 1998 Sep;125(1):218-24.
- Bruins A. P.** 1998. Mechanistic aspects of electrospray ionization. Review, *Journal of Chromatography A*, Volume 794, Issues 1–2, Pages 345–357.
- Budzikiewicz H.** 1998. *Massenspektrometrie. Eine Einführung.* Wiley-VCH, Weinheim.
- Burckhardt G.**, Bahn A., Wolff N. A. 2001. Molecular physiology of renal p-aminohippurate secretion. *News Physiol Sci.* Jun; 16:114-8.
- Burckhardt G. and Koepsell H.** 2007. Organic Anion and Cation Transporters in Renal Elimination of Drugs. *Seldin and Giebisch's The Kidney* Vol. 4.
- Carlson , L. A.** 2005 . Nicotinic acid: the broad-spectrum lipid drug. A 50th anniversary review. *J. Intern. Med.* 258 : 94 – 114 .
- Carraro-Lacroix L. R.**, Malnic G.J 2010. Acid-base transport by the renal distal nephron. *Nephrol.* Nov-Dec;23 Suppl 16:S19-27. Review.
- Chen D.**, Lupu F., Shaper N., Schmitt J.F., Lemoine N.R. and Keogh M.C. 1998. TfxTM-50 reagent and high efficiency transfection of vascular tissue in vitro and in vivo. *Promega Notes* 65: p.19.
- Chiba T.**, Matsuo H., Kawamura Y., Nagamori S., Nishiyama T., Wei L., Nakayama A., Nakamura T., Sakiyama M., Takada T., Taketani Y., Suma S., Naito M., Oda T., Kumagai H., Moriyama Y., Ichida K., Shimizu T., Kanai Y., Shinomiya N. 2014. NPT1/SLC17A1 is a renal urate exporter in humans and its common gain-of-function variant decreases the risk of renal underexcretion gout. *Arthritis Rheumatol.* 2014 Sep 23. doi: 10.1002/art.38884. [Epub ahead of print]
- Christensen H. N.** 1990. Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol Rev.* Jan; 70(1):43-77.
- Eckert R.**, 2000. *Tierphysiologie.* Thieme Verlag. 3. Auflage.
- Fenn J.B.**, Mann M., Meng C.K., Wong S.F., Whitehouse C.M. 1998. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, Oct 6;246(4926):64-71. Review.

- Fork C.**, Bauer T., Golz S., Geerts A., Weiland J., Del Turco D., Schömig E. and Gründemann D. 2011. OAT2 catalyses efflux of glutamate and uptake of orotic acid. *Biochemical Journal*. 436, 305-312.
- Gaillard C.**, Strauss F. 1990. Ethanol precipitation of DNA with linear polyacrylamide as carrier. *Nucleic Acids Res*, 18 (2):378.
- Gether U.**, Andersen P.H., Larsson O.M., Schousboe A. 2006. "Neurotransmitter transporters: molecular function of important drug targets". *Trends Pharmacol. Sci.* 27 (7): 375–83.
- Gorboulev V.**, Ulzheimer J.C., Akhoundova A., Ulzheimer-Teuber I., Karbach U., Quester S., Baumann C., Lang F., Busch A.E., Koepsell H. 1997. Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters. *DNA Cell Biol.* Jul;16(7):871-81.
- Graham F.L.**, Smiley J., Russell W.C., Nairn R.; 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *Jul*; 36(1): 59-74.
- Grigat S.**, Fork C., Bach M., Golz S., Geerts A., Schömig E., Gründemann D. 2009. The carnitine transporter SLC22A5 is not a general drug transporter, but it efficiently translocates mildronate. *Drug Metab Dispos.* Feb; 37(2):330-7.
- Grigat S.**, Harlfinger S., Pal S., Striebinger R., Golz S., Geerts A., Lazar A., Schömig E., Gründemann D. 2007. Probing the substrate specificity of the ergothioneine transporter with methimazole, hercynine, and organic cations. *Biochem Pharmacol.* Jul 15;74(2):309-16.
- Gründemann D.**, Gorboulev V., Gambaryan S., Veyhl M., Koepsell H. 1994. Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. *Nature.* 1994 Dec 8; 372(6506):549-52.
- Gründemann D.**, Harlfinger S., Golz S., Geerts A., Lazar A., Berkels R., Jung N., Rubbert A., Schömig E. 2005. Discovery of the ergothioneine transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:5256-5261.
- Gründemann D.**, Liebich G., Kiefer N., Köster S., Schömig E. 1999. Selective substrates for non-neuronal monoamine transporters. *Mol Pharmacol.* Jul; 56(1):1-10.

- Gründemann D.**, Schömig E. 1996. Protection of DNA during preparative agarose gel electrophoresis against damage induced by ultraviolet light. *Biotechniques*, 21 (5):898-903.
- Gundersen V.**, Chaudhry F. A., Bjaalie J. G., Fonnum F., Ottersen O. P., Storm-Mathisen J. 1998. Synaptic vesicular localization and exocytosis of L-aspartate in excitatory nerve terminals: a quantitative immunogold analysis in rat hippocampus. *J Neurosci*. Aug 15; 18 (16): 6059-70.
- Haag C**, Berkels R, Gründemann D, Lazar A, Taubert D, Schömig E. 2004. The localisation of the extraneuronal monoamine transporter (EMT) in rat brain. *J Neurochem*. Jan; 88(2):291-7.
- Haskew-Layton R.E.**, Rudkouskaya A, Jin Y, Feustel PJ, Kimelberg HK, Mongin AA. 2008. Two Distinct Modes of Hypoosmotic Medium-Induced Release of Excitatory Amino Acids and Taurine in the Rat Brain *In Vivo*. *PLoS One*. 2008;3(10): e3543.
- Hayashi M.**, Yamaji Y., Iyori M., Kitajima W. and Saruta T. 1991. Effect of isoproterenol on intracellular pH of the intercalated cells in the rabbit cortical collecting ducts. *J Clin Invest*. 87, 1153-1157.
- Hediger M.A.**, Romero M.F., Peng J.B., Rolfs A., Takanaga H., Bruford E.A. 2004. The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 447:465–468.
- Horn F.**, Moc I., Schneider N., Grillhösl C., Berghold S., Lindenmeier G. 2005. *Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium*. Thieme Verlag. 3.Auflage.
- Hughson M.**, Farris A.B. 3rd, Douglas-Denton R., Hoy W.E., Bertram J.F. 2003. Glomerular number and size in autopsy kidneys: the relationship to birth weight. *Kidney Int*. Jun; 63(6):2113-22.
- Huxtable R.J.**, 1992. Physiological actions of taurine. *Physiol Rev* 72: 101–163.
- Iharada M.**, Miyaji T, Fujimoto T, Hiasa M, Anzai N, Omote H, Moriyama Y. 2010. Type 1 sodium-dependent phosphate transporter (SLC17A1 Protein) is a Cl(-)-dependent urate exporter. *J Biol Chem*. Aug 20;285(34):26107-13.

- Indiveri C.**, Tonazzi A., Palmieri F. 1992. Identification and purification of the ornithine/citrulline carrier from rat liver mitochondria. *Eur J Biochem.* Jul 15; 207(2):449-54.
- Indiveri C.**, Tonazzi A., Stipani I., Palmieri F. 1999. The purified and reconstituted ornithine/citrulline carrier from rat liver mitochondria catalyses a second transport mode: ornithine+/H⁺ exchange. *Biochem J.* Aug 1; 341 (Pt 3):705-11.
- Ito K.**, Suzuki H., Horie T., Sugiyama Y. 2005. Apical/basolateral surface expression of drug transporters and its role in vectorial drug transport. *Pharm Res.* Oct;22(10):1559-77.
- Jacobsen J.G.**, Smith L.H.; 1968. 260. Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives. *Physiol Rev.* Apr; 48(2):424-511.
- Kahvejian, A.**, Svitkin, Y. V., Sukarieh, R., M'Boutchou, M. N., and Sonenberg, N. 2005. Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes Dev.*, 19, 104-13.
- Karlson P.**, Doenecke D., Koolman J., Fuchs G., Gerok W. 2005. *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie.* Thieme Verlag, 15. Auflage.
- Kimelberg H.K.**, Goderie S.K., Higman S., Pang S., Waniewski R.A.; 1990. Swelling-induced release of glutamate, aspartate, and taurine from astrocyte cultures. *J Neurosci.* May;10(5): 1583-91.
- Kimura N.**, Masuda S., Tanihara Y., Ueo H., Okuda M., Katsura T., Inui K. 2005. Metformin is a superior substrate for renal organic cation transporter OCT2 rather than hepatic OCT1. *Drug Metab Pharmacokinet.* Oct; 20(5):379-86.
- Klingenberg M.** 2007. Transport viewed as a catalytic process. *Biochimie.* Sep;89(9):1042-8.
- Koepsell H.**, Endou H. 2004. The SLC22 drug transporter family. *Pflugers Arch.* Feb;447(5):666-76.
- Koepsell H.**, Gorboulev V., Arndt P. 1999. Molecular pharmacology of organic cation transporters in kidney. *J Membr Biol.* Jan 15; 167(2):103-17.
- Koepsell H.**, Lips K., Volk C. 2007. Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm Res.* Jul; 24(7):1227-51.

- Kohfeldt, E.**, Maurer, P., Vannahme, C., and Timpl, R. 1997. Properties of the extracellular calcium binding module of the proteoglycan testican. *FEBS Lett.*, 414, 557-61.
- König J.**, Zolk O., Singer K., Hoffmann C., Fromm M.F. 2011. Double-transfected MDCK cells expressing human OCT1/MATE1 or OCT2/MATE1: determinants of uptake and transcellular translocation of organic cations. *Br J Pharmacol.* Jun;163(3):546-55.
- Kozak, M.** 2004. How strong is the case for regulation of the initiation step of translation by elements at the 3' end of eukaryotic mRNAs? *Gene*, 343, 41-54.
- Kristensen A.S.**, Andersen J., Jørgensen T.N., Sørensen L., Eriksen J., Loland C.J., Strømgaard K, Gether U. 2011. SLC6 neurotransmitter transporters: structure, function, and regulation. *Pharmacol Rev.* Sep; 63(3):585-640.
- Kriz W.** and Bankir L. 1988. A standard nomenclature for structures of the kidney *Kidney International*, Vol. 33, pp. 1-7
- Kriz, W.** and Kaissling, B. 2008. Structural Organization of the Mammalian Kidney. In Seldin and Giebisch's *The Kidney. Physiology and pathophysiology* (Alpern, R. J. and Hebert, S. C., eds.). pp. 479-563, Elsevier, Amsterdam
- Landowski C.P.**, Suzuki Y., Hediger M.A. 2007. The Mammalian Transporter Families. Seldin and Giebisch's *The Kidney* Vol. 4.
- Langen K.J.**, Bröer S. 2004. Molecular Transport Mechanisms of Radiolabeled Amino Acids for PET and SPECT. *J Nucl Med.* Sep; 45(9):1435-6.
- Law C.J.**, Maloney P.C., Wang D.N. 2008. Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters. *Annu Rev Microbiol.*; 62:289-305.
- Lemieux M.J.** 2007. Eukaryotic major facilitator superfamily transporter modeling based on the prokaryotic GlpT crystal structure. *Mol Membr Biol.* Sep-Dec; 24(5-6):333-41.
- Locher K.P.** 2004. Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr Opin Struct Biol.* Aug; 14(4):426-31. Review.
- Ma N.**, Aoki E. and Semba, R. (1994) An immunohistochemical study of aspartate, glutamate, and taurine in rat kidney. *J Histochem Cytochem.* 42, 621-626.

- Macias R. I.**, Marin J. J., Serrano M. A. 2009. Excretion of biliary compounds during intrauterine life. *World J Gastroenterol.* Feb 21; 15(7):817-28.
- Madsen K.**, Nielsen S., Tisher., 2008. *Anatomy of the Kidney.* Barry M. Brenner *The Kidney* Vol. 8.
- Markadieu N.**, Delpire E. 2014. Physiology and pathophysiology of SLC12A1/2 transporters. *Pflugers Arch.* Jan; 466(1):91-105.
- Meldrum B. S.** 2000. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr.* Apr; 130 (4S Suppl): 1007S-15S.
- Mullis K. B.**, Faloona F. A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*; 155:335-50.
- Neumann E.**, Schaefer-Riddler M., Wang Y. and Hofschneider P.H. 1982. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation high electric fields. *EMBO J.*, 1:841-845 Nielsen.
- Niehoff I. D.**, L. Huther , and P. Lebzien . 2009. Niacin for dairy cattle: a review. *Br. J. Nutr.* 101 : 5 – 19.
- Nies A. T.**, Koepsell H., Winter S., Burk O., Klein K., Kerb R., Zanger U. M., Keppler D., Schwab M., Schaeffeler E. 2009. Expression of organic cation transporters OCT1 (SLC22A1) and OCT3 (SLC22A3) is affected by genetic factors and cholestasis in human liver. *Hepatology.* Oct; 50(4):1227-40.
- Nistri A.**, Constanti A. 1979. Pharmacological characterization of different types of GABA and glutamate receptors in vertebrates and invertebrates. *Prog Neurobiol.* ; 13(2): 117-235. Review.
- Nishiwaki, T.**, Daigo, Y., Tamari, M., Fujii, Y. and Nakamura, Y. 1998. Molecular cloning, mapping, and characterization of two novel human genes, ORCTL3 and ORCTL4, bearing homology to organic-cation transporters. *Cytogenetics and cell genetics.* 83, 251-255.
- Otsuka M.**, Matsumoto T., Morimoto R., Omote H., and Moriyama Y. 2005. A human transporter protein that mediates the final excretion step for toxic organic cations. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 17923–17928.

- Pacholczyk T.**, Blakely R. D., Amara S. G. 1991. "Expression cloning of a cocaine- and antidepressant-sensitive human noradrenaline transporter". *Nature* 350 (6316): 350–4.
- Palacín M.**, Estévez R., Bertran J., Zorzano A. 1998. Molecular Biology of Mammalian Plasma Membrane Amino Acid Transporters. *Physiol Rev.* 1998 Oct; 78(4):969-1054. Review.
- Pao S. S.**, Paulsen I. T., Saier M. H. Jr. 1998. Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev.* Mar; 62(1):1-34. Review.
- Parsons W. B.**, Jr., and J. H. Flinn. 1959. Reduction of serum cholesterol levels and beta-lipoprotein cholesterol levels by nicotinic acid. *AMA Arch. Intern. Med.* 103 : 783 – 790.
- Pfennig T.**, Herrmann B., Bauer T., Schömig E., Gründemann D. 2013. Benzoic acid and specific 2-oxo acids activate hepatic efflux of glutamate at OAT2. *Biochim Biophys Acta.* Feb;1828(2):491-8.
- Rehner E.** und Daniel H. 2010. *Biochemie der Ernährung*. 3. Auflage; Elsevier Heidelberg.
- Reimer R. J.**, Edwards R. H. 2004. Organic anion transport is the primary function of the SLC17/type I phosphate transporter family. *Pflugers Arch.* Feb; 447(5):629-35.
- Ripps H., Shen W.**; 2012. Review: taurine: a "very essential" amino acid. *Mol Vis.* ; 18: 2673-86. Epub.
- Rizwan A. N.**, Burckhardt G. 2007. Organic anion transporters of the SLC22 family: biopharmaceutical, physiological, and pathological roles. *Pharm Res.* Mar;24(3):450-70.
- Robinson P. S.**, Goochee C. F. 1991. Kidney-specific enzyme expression by human kidney cell lines generated through oncogene transfection. *J Cell Physiol.* Jul; 148(1): 54 – 9.
- Sambrook J.** and Russel D.W. 2001. Chapter 16: Introducing cloned genes into cultured mammalian cells. *Molecular Cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanger F.**, Nicklen S, Coulson A. R. 1977. DNA sequencing with chainterminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74 (12):5463-5467.

- Schmidt R.** 2006. LC-MS/MS-Analyse von Eicosanoiden, Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main.
- Schömig E.,** Spitzenberger F., Engelhardt M., Martel F., Ording N., Gründemann D. 1998. Molecular cloning and characterization of two novel transport proteins from rat kidney. *FEBS Lett.* Mar 20;425(1):79-86.
- Schulz C.,** Fork C., Bauer T., Golz S., Geerts A., Schömig E., Gründemann D. 2014. SLC22A13 catalyzes unidirectional efflux of aspartate and glutamate at the basolateral membrane of type A intercalated cells in renal collecting duct. *Biochem J.* Jan 15; 457(2):243-51.
- Schuster V. L.** 1993. Function and regulation of collecting duct intercalated cells. *Annu Rev Physiol.* 1993;55:267-88. Review.
- Siuzdak G.** 1994. The emergence of mass spectrometry in biochemical research. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:11290-11297.
- Song W. L.,** FitzGerald GA.; 2013. Niacin, an old drug with a new twist. *J Lipid Res.* Oct; 54(10): 2586-94.
- van Montfoort J. E.,** Hagenbuch B., Groothuis G. M., Koepsell H., Meier P. J., Meijer D. K. 2003. Drug uptake systems in liver and kidney. *Curr Drug Metab* 4:185-211.
- Vanakker O. M.,** Hosen M. J., Paepe A. D. 2013. The ABCC6 transporter: what lessons can be learnt from other ATP-binding cassette transporters? *Front Genet.* Oct 16; 4:203.
- Vogel M. ;** Kibat P.-G. 1998. Kopplung von HPLC mit Massenspektrometrie: Instrumentierung und Einsatz in der pharmazeutischen Forschung und Entwicklung. *PZ PRISMA; VOL 5, NUMBER 1; 57-67*
- Wagner, C. A.,** Devuyst, O., Bourgeois, S. and Mohebbi, N. 2009. Regulated acid-base transport in the collecting duct. *Pflugers Arch.* 458, 137-156.
- Wall, S. M.** 2005. Recent advances in our understanding of intercalated cells. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 14, 480-484.
- Watts S. D.,** Torres-Salazar D., Divito C. B., Amara S. G. 2014. Cysteine Transport through Excitatory Amino Acid Transporter 3 (EAAT3). *PLoS One.* Oct 2;9 (10):e109245.

- Wu X.**, Kekuda R., Huang W., Fei Y. J., Leibach F. H., Chen J., Conway S. J., Ganapathy V. 1998. Identity of the organic cation transporter OCT3 as the extraneuronal monoamine transporter (uptake2) and evidence for the expression of the transporter in the brain. *J Biol Chem.* Dec 4;273(49):32776-86.
- Yates, J. L.**, Warren, N., and Sugden, B. 1985. Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature*, 313, 812-5.
- Zhu H. J.**, Appel D. I., Gründemann D, Markowitz JS. 2010. Interaction of organic cation transporter 3 (SLC22A3) and amphetamine. *J Neurochem.* Jul; 114(1):142-9.
- Zimmermann U.** 1982. Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena *Biochim Biophys Acta.*, 694:227-277

Danksagung

Nach mehrjähriger wissenschaftlicher Arbeit am vorgestellten Thema, bin ich froh die Dissertation nun zu beenden. In dieser spannenden Phase meiner akademischen Laufbahn haben mich viele Personen begleitet, denen ich an dieser Stelle meinen herzlichsten Dank aussprechen möchte.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dirk Gründemann für die Bereitstellung des Themas, sowie die exzellente Betreuung und Förderung meiner Arbeit. Sein offenes und ruhiges Wesen erleichterten Diskussionen und Fehlerbetrachtungen in jeglicher Phase der Arbeit.

Prof. Dr. Proksch möchte ich für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens und sein lebendiges Interesse an der Arbeit danken.

Ein besonderer Dank geht an die vielen Arbeitskollegen die zu Freunden wurden, mich fachlich und persönlich unterstützten und auf diese Weise ein außerordentlich angenehmes Arbeitsklima erzeugten. Dr. Tim Bauer, Bea Steinrücken und Simone Kalis danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft, technische Unterstützung und immer wieder gute Unterhaltung in Kaffe- und Mittagspause oder auch mal zum Feierabend. Johanna Krüger danke ich für motivierende, vertrauliche und intensive Gespräche und die gründliche und kritische Korrektur meiner Arbeit. Thorsten Tuschy möchte ich dafür danken, dass er trotz schlechten Fußballgeschmacks so ein angenehmer Arbeitskollege ist und sich im Lindenburg Cup 2013 für das Team geopfert hat.

Abschließend danke ich Sarah, Björn und Melina für das Korrekturlesen der Arbeit.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Gedankengut oder Daten die aus fremden Quellen entliehen wurden sind kenntlich gemacht. Diese Dissertation ist von mir noch an keiner anderen Stelle vorgelegt worden.

Ich habe vormals noch keinen Promotionsversuch unternommen.

Köln den 11.12.2014