

Aus dem ehemaligen Institut für Vegetative Physiologie und Pathophysiologie  
(Prof. Dr. med. em. G. Burckhardt)  
im Zentrum Physiologie und Pathophysiologie  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Untersuchung der Transportvorgänge des Prolyl-Hydroxylase-  
Hemmers ICA an den Transportern OAT1, OAT2, OAT3 und  
OAT4 von proximalen Nierentubuluszellen**

INAUGURAL–DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

**Kei Schulz**

aus

Moers

Göttingen 2017

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
Referent/in:	Prof. Dr. phil. nat. B. C. Burckhardt
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. med. O. Groß
Drittreferent/in:	.....
Tag der mündlichen Prüfung:	05.12.2017

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Untersuchung der Transportvorgänge des Prolyl-Hydroxylase-Hemmers ICA an den Transportern OAT1, OAT2, OAT3 und OAT4 von proximalen Nierentubuluszellen" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 10.07.2017

.....

(Unterschrift)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	III
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	V
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	VI
<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1 <i>Hypoxia Inducible Factor</i> (HIF) .....	1
1.2 <i>Prolyl Hydroxylase Domain</i> (PHD) und <i>2-(1-chloro-4-hydroxyiso-quinoline-3-carboxamido) acetic acid</i> (ICA).....	3
1.3 Organische Anionen-Transporter (OATs) .....	4
1.3.1 Organischer Anionen-Transporter 1 (OAT1).....	6
1.3.2 Organischer Anionen-Transporter 2 (OAT2).....	6
1.3.3 Organischer Anionen-Transporter 3 (OAT3).....	7
1.3.4 Organischer Anionen-Transporter 4 (OAT4).....	8
1.4 Zielsetzung und Fragestellung .....	9
<b>2. Material und Methoden</b> .....	10
2.1 Material .....	10
2.1.1 Zellen .....	10
2.1.2 Geräte .....	10
2.1.3 Verbrauchsmaterial .....	12
2.1.4 Chemikalien .....	12
2.1.5 Zusammensetzung der Lösungen und Medien.....	14
2.1.6 Software, Auswertung der Ergebnisse und Berechnung der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration (IC <sub>50</sub> ).....	16
2.2 Methoden .....	17
2.2.1 Zellkultur.....	17
2.2.2 Experimente zur Aufnahme der radioaktiv-markierten Substrate.....	20
2.2.3 Proteinbestimmung .....	24
<b>3. Ergebnisse</b> .....	26
3.1 OAT1 .....	26
3.1.1 <i>cis</i> -Hemmung .....	26
3.1.2 Halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC <sub>50</sub> ) .....	28
3.1.3 <i>trans</i> -Stimulation.....	30
3.1.4 Bestimmung des Hemmtyps zwischen PAH und ICA.....	32
3.2 OAT2 .....	33
3.2.1 <i>cis</i> -Hemmung .....	33

3.2.2 Halbmaximale inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) .....	35
3.2.3 <i>trans</i> -Stimulation.....	37
3.3 OAT3 .....	39
3.3.1 <i>cis</i> -Hemmung .....	39
3.3.2 Halbmaximale inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) .....	41
3.3.3 <i>trans</i> -Stimulation.....	43
3.4 Zusammenfassung der $IC_{50}$ vom OAT1, OAT2 und OAT3.....	45
3.5 OAT4 .....	46
3.5.1 <i>cis</i> -Hemmung .....	46
3.5.2 <i>trans</i> -Stimulation.....	48
<b>4. Diskussion</b> .....	50
4.1 Limitationen der Methodik .....	50
4.2 Interaktionen zwischen ICA und den OATs .....	51
4.2.1 Qualitative und quantitative Hemmbarkeit .....	51
4.2.2 Stimulation .....	53
4.3 Klinische Überlegungen.....	54
4.4 Ausblick .....	57
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	59
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	61

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Genregulation bei Normoxie und Hypoxie .....	2
Abbildung 1.2 Strukturformel von ICA.....	3
Abbildung 1.3 Transportvorgänge durch OAT1, 2, 3 und 4 in einer proximalen Tubuluszelle (PCT).....	5
Abbildung 2.1 Brutschrank.....	17
Abbildung 2.2 Zellkulturwerkbank.....	18
Abbildung 2.3 Strukturformel von [ <sup>3</sup> H]-PAH .....	21
Abbildung 2.4 Strukturformel von [ <sup>3</sup> H]-cGMP .....	21
Abbildung 2.5 Strukturformel von [ <sup>3</sup> H]-ES.....	22
Abbildung 2.6 Arbeitsplatz im Radioaktivlabor .....	23
Abbildung 2.7 Szintillationszähler Tri-Carb 2810 TR .....	24
Abbildung 3.1 Einfluss von ICA auf die Aufnahme von [ <sup>3</sup> H]-PAH in OAT1- und Vektor-transfizierten HEK293-Zellen.....	27
Abbildung 3.2 Halbmaximale inhibitorische Konzentration von ICA bei der Aufnahme von [ <sup>3</sup> H]-PAH in OAT1- und Vektor-transfizierten HEK293-Zellen.....	29
Abbildung 3.3 Einfluss durch die Vorinkubation mit ICA auf die Aufnahme von [ <sup>3</sup> H]-PAH in OAT1- und Vektor-transfizierten HEK293-Zellen.....	31
Abbildung 3.4 Dixon Plot des Einflusses von ICA auf die Aufnahme von [ <sup>3</sup> H]-PAH in OAT1-transfizierte HEK293-Zellen .....	32
Abbildung 3.5 Einfluss von ICA auf die Aufnahme von [ <sup>3</sup> H]-cGMP in OAT2- und Vektor-transfizierten HEK293-Zellen.....	34
Abbildung 3.6 Halbmaximale inhibitorische Konzentration von ICA bei der Aufnahme von [ <sup>3</sup> H]-cGMP in OAT2- und Vektor-transfizierten HEK293-Zellen .....	36
Abbildung 3.7 Einfluss durch die Vorinkubation mit ICA auf die Aufnahme von [ <sup>3</sup> H]-cGMP in OAT2- und Vektor-transfizierten HEK293-Zellen.....	38
Abbildung 3.8 Einfluss von ICA auf die Aufnahme von [ <sup>3</sup> H]-ES in OAT3- und Vektor-transfizierten HEK293-Zellen.....	40
Abbildung 3.9 Bestimmung der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration von ICA bei der Aufnahme von [ <sup>3</sup> H]-ES in OAT3- und Vektor-transfizierten HEK293-Zellen .....	42
Abbildung 3.10 Einfluss durch die Vorinkubation mit ICA auf die Aufnahme von [ <sup>3</sup> H]-ES in OAT3- und Vektor-transfizierten HEK293-Zellen.....	44
Abbildung 3.11 Halbmaximale inhibitorische Konzentration von ICA bei der Aufnahme des jeweiligen Substrats bei OAT1-, 2- und 3-transfizierten HEK293-Zellen.....	45

<b>Abbildung 3.12 Einfluss von ICA auf die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-ES in OAT4- und Vektor-transfizierten HEK293-Zellen.....</b>	<b>47</b>
<b>Abbildung 3.13 Einfluss durch die Vorinkubation mit ICA auf die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-ES in OAT4- und Vektor-transfizierten HEK293-Zellen.....</b>	<b>49</b>
<b>Abbildung 4.1 Renale Ausscheidung von ICA .....</b>	<b>57</b>

# Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1.1 Fragestellungen</b> .....	9
<b>Tabelle 2.1 Geräte im Zellkulturlabor</b> .....	10
<b>Tabelle 2.2 Geräte im Isotopenlabor</b> .....	11
<b>Tabelle 2.3 Verbrauchsmaterialien</b> .....	12
<b>Tabelle 2.4 Chemikalien</b> .....	12
<b>Tabelle 2.5 Software</b> .....	16
<b>Tabelle 2.6 verwendete Standardsubstrate</b> .....	21
<b>Tabelle 2.7 BSA-Standardreihe</b> .....	25
<b>Tabelle 3.1 ICA Konzentrationen zur Bestimmung der IC<sub>50</sub></b> .....	28
<b>Tabelle 3.2 OAT1: Hemmung der Aufnahme von PAH durch aufsteigende Konzentrationen von ICA – Bestimmung der IC<sub>50</sub></b> .....	29
<b>Tabelle 3.3 OAT2: Hemmung der Aufnahme von cGMP durch aufsteigende Konzentrationen von ICA – Bestimmung der IC<sub>50</sub></b> .....	35
<b>Tabelle 3.4 OAT3: Hemmung der Aufnahme von ES durch aufsteigende Konzentrationen von ICA – Bestimmung der IC<sub>50</sub></b> .....	41
<b>Tabelle 4.1 Medikamenteninteraktionen beim OAT1 und OAT3</b> .....	56



## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AKF	<i>acute kidney failure</i> ; akutes Nierenversagen
BSA	bovines Serumalbumin
CBP	<i>CREP-binding protein</i>
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
DC	Dicarboxylat
DDIs	<i>Drug-Drug-Interactions</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGLN	<i>egg laying nine</i>
ES	Estronsulfat
FCS	<i>fetal calf serum</i> ; fetales Kälberserum
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPH	<i>HIF-prolyl hydroxylase</i>
EPO	Erythropoetin
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HIF	<i>hypoxia inducible factor</i>
hOAT	<i>human organic anion transporter</i> ; humaner Organischer Anionen-Transporter
HRE	<i>hypoxia response element</i>
ICA	<i>2-(1-chloro-4-hydroxyiso-quinoline-3-carboxamido) acetic acid</i>
IC <sub>50</sub>	halbmaximale inhibitorische Konzentration
KHK	koronare Herzkrankheit
K <sub>i</sub>	Inhibitorkonstante
MRi	<i>mammalian Ringer solution</i> ; Säugetier-Ringer-Lösung
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NaDC1	<i>sodium-coupled dicarboxylate transporter 1</i>
NaDC3	<i>sodium-coupled dicarboxylate transporter 3</i>
NHE3	<i>sodium hydrogen exchanger 3</i>
NOG	<i>N-oxalylglycine</i>
n.s.	nicht signifikant
OA	organisches Anion

OAT	<i>organic anion transporter</i> ; organischer Anionen-Transporter
OCT	<i>organic cation transporter</i> ; organischer Kationen-Transporter
OCTN	<i>organic zwitterion/ cation transporter</i> ; organischer Zwitterionen-/ Kationen-Transporter
p300	<i>300-kilodalton coactivator protein</i>
PAH	<i>p</i> -Aminohippursäure
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCT	<i>proximal tubule cell</i> ; proximale Tubuluszelle
PDCA	<i>pyridine-2,4-dicarboxylic acid</i>
PHD	<i>prolyl hydroxylase domain</i> ; Prolyl-Hydroxylase-Domäne
PHDI	<i>prolyl hydroxylase domain inhibitor</i> ; Prolyl-Hydroxylase-Domäne-Inhibitor
SD	<i>standard deviation</i> ; Standardabweichung
SLC22	<i>Solute Carrier 22</i>
Ub	Ubiquitin
V	Versuch
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VHL	von Hippel Lindau

# 1. Einleitung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Interaktionen des Prolyl-Hydroxylase-Domäne (PHD)-Inhibitors (PHDI) *2-(1-chloro-4-hydroxyiso-quinoline-3-carboxamido) acetic acid* (ICA) mit den Organischen Anionen-Transportern (OAT) 1, 2, 3 und 4 und einen möglichen Transport von ICA über einen oder mehrere OATs nachzuweisen. Bei Hemmung der PHD wird der *Hypoxia Inducible Factor* (HIF) hochreguliert, sodass in den Sauerstoffhaushalt des Körpers eingegriffen werden kann. Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten veröffentlicht werden (Schulz et al. 2015).

Zunächst werden die grundlegenden Funktionsweisen der PHD und des HIF unter physiologischen Bedingungen im Körper im ersten Unterkapitel erläutert, um dann im zweiten Unterkapitel der Einleitung auf die Möglichkeiten einer Einflussnahme auf dieses System mit Hemmstoffen und im Speziellen mit ICA einzugehen, um zuletzt die OATs im Allgemeinen und die vier in dieser Arbeit untersuchten auf ihre möglichen Wechselwirkungen mit ICA zu diskutieren. Anschließend wird die Fragestellung dieser Arbeit formuliert.

## 1.1 *Hypoxia Inducible Factor* (HIF)

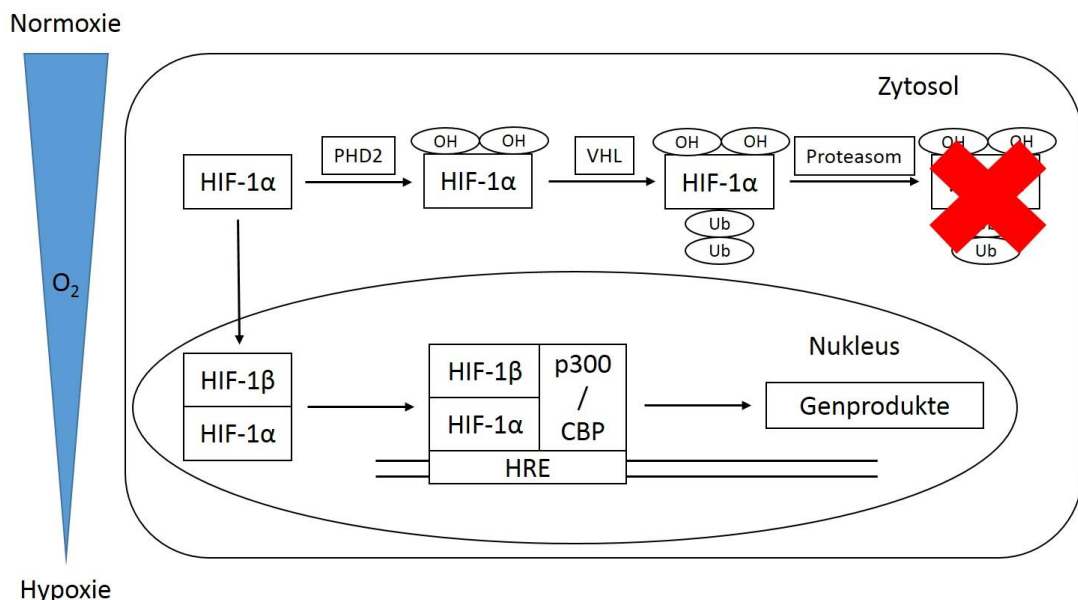
Eine ausreichende Sauerstoffversorgung des Körpers gehört zu den essentiellen Lebensgrundlagen auf dieser Erde. Viele Krankheitsbilder des Menschen gründen auf einer nicht mehr gewährleisteten Versorgung des Gewebes mit O<sub>2</sub> wie z.B. Anämie, koronare Herzkrankheit (KHK), periphere arterielle Verschlusskrankheit, Apoplex oder ein durch eine Ischämie bedingtes akutes Nierenversagen (AKF).

Um Ischämie-bedingte Erkrankungen effektiv behandeln zu können, ist ein besseres Verständnis der Sauerstoffregulierung im Körper vonnöten. Mit der Entdeckung von Erythropoetin (EPO) und dem *Hypoxia Inducible Factor* (HIF) waren wichtige Meilensteine erreicht (Semenza und Wang 1992; Wang et al. 1995).

Beim HIF bzw. HIF-1 handelt es sich um ein Heterodimer, welches aus einer Alpha- und einer Beta-Untereinheit besteht, wobei HIF- $\alpha$  dauerhaft im Zytosol exprimiert wird und HIF- $\beta$  im Nukleus zu finden ist. Unter Normoxie wird HIF- $\alpha$  sofort wieder abgebaut. Nur unter

hypoxischen Bedingungen kann die  $\alpha$ -Untereinheit in den Nukleus gelangen und dimerisiert dort mit HIF- $\beta$ . Dieses Heterodimer bindet dann mit Hilfe der beiden Kofaktoren *300-kilodalton coactivator protein* (p300) und *CREP-binding protein* (CBP) an ein *Hypoxia Response Element* (HRE) in der DNA und initiiert so die Expression von unterschiedlichen Genprodukten (Mole et al. 2009; Schödel et al. 2011), welche der Hypoxie entgegenwirken sollen, wie z.B. EPO, Glukosetransporter oder *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (Franke et al. 2013; Rabinowitz 2013). Normoxie führt dazu, dass HIF- $\alpha$  abgebaut wird. Der erste Schritt erfolgt hierbei durch die *prolyl hydroxylase domain* (PHD), welche HIF- $\alpha$  hydroxyliert, damit das von Hippel-Lindau (VHL)-Protein im nächsten Schritt die Ubiquitinierung vornehmen kann. Somit wird die  $\alpha$ -Einheit vom Proteasom abgebaut. Hierbei benötigt die PHD Ascorbinsäure,  $O_2$ ,  $Fe^{2+}$  und  $\alpha$ -Ketoglutarat/ 2-Oxoglutarat (Franke et al. 2013; Ratcliffe und Bishop 2014; Ratcliffe et al. 2017; Semenza 2007).

Insgesamt existieren von HIF- $\alpha$  drei Isoformen: HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  (Tian et al. 1997) und HIF-3 $\alpha$  (Maynard et al. 2003). Die  $\beta$ -Untereinheit liegt nur als HIF-1 $\beta$  vor. Bei der PHD unterscheidet man drei Unterformen: PHD1, PHD2 und PHD3 (Myllyharju 2013). Die größte Relevanz hat die Interaktion von HIF-1  $\alpha$  mit PHD2 (Berra et al. 2003). Ein vereinfachtes Schema der oben besprochenen Vorgänge zeigt Abbildung (Abb.) 1.1.



**Abbildung 1.1 Genregulation bei Normoxie und Hypoxie** Regulation der Genprodukte durch HIF und die PHD am Beispiel von HIF-1 $\alpha$  und PHD2. Weitere Erklärungen erfolgen im Text. CBP, CREP-binding protein; HIF, hypoxia inducible factor; HRE, hypoxia response element; p300, 300-kilodalton coactivator protein; OH, Hydroxylierung des HIF-1 $\alpha$ ; PHD, prolyl hydroxylase domain; Ub, Ubiquitinierung des HIF-1 $\alpha$ ; VHL, von Hippel-Lindau-Protein (eigene Abbildung)

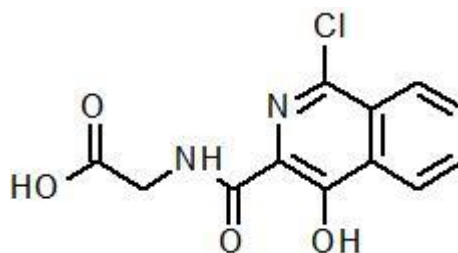
## 1.2 Prolyl Hydroxylase Domain (PHD) und 2-(1-chloro-4-hydroxyisoquinoline-3-carboxamido) acetic acid (ICA)

PHD1 bzw. *egg laying nine* (EGLN) 2 oder *HIF-prolyl hydroxylase* (HPH) 3 besteht aus 407 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 43,9 kDa. PHD1 ist vor allem im Kern von Zellen aus dem Hoden und der Leber zu finden. PHD2 bzw. EGLN 1 oder HPH 2 konnte ubiquitär und besonders hochexprimiert im Zytoplasma von Kardiomyozyten nachgewiesen werden. PHD2 besteht aus 426 Aminosäuren und weist ein Molekulargewicht von 46 kDa auf. PHD3 bzw. HPH 1 oder EGLN 3 ist deutlich kürzer (239 Aminosäuren) mit einem Molekulargewicht von 27 kDa. Am höchsten ist diese Isoform in Herz und Leber exprimiert. Seit kurzem wird die Existenz einer vierten Isoform, PHD4, diskutiert, wobei Bedeutung und Lokalisation noch unklar sind (Rabinowitz 2013; Selvaraju et al. 2014).

PHD2-Knockout-Mäuse versterben bereits im Embryonalstadium zwischen Tag 12,5 und 14,5, was die Bedeutung der PHD2 bei der Embryonalentwicklung hervorhebt (Takeda et al. 2007). PHD1- und PHD3-Knockouts hingegen entwickeln sich normal. Bis heute wurden keine Pathologien beobachtet (Takeda et al. 2006).

PHD-Inhibitoren werden von unterschiedlichen pharmazeutischen Unternehmen angeboten. Einige davon befinden sich zurzeit in klinischen Studien zur Behandlung verschiedener Ischämie-bedingter Erkrankungen (Rabinowitz 2013; Selvaraju et al. 2014).

Einer dieser PHD-Inhibitoren ist das in dieser Arbeit untersuchte 2-(1-chloro-4-hydroxyisoquinoline-3-carboxamido) acetic acid (ICA). ICA liegt unter dem Produktkürzel FG-2216 der Firma FibroGen (Rabinowitz 2013; Selvaraju et al. 2014) vor. Die Strukturformel des ICA ist in Abb 1.2 zu sehen.



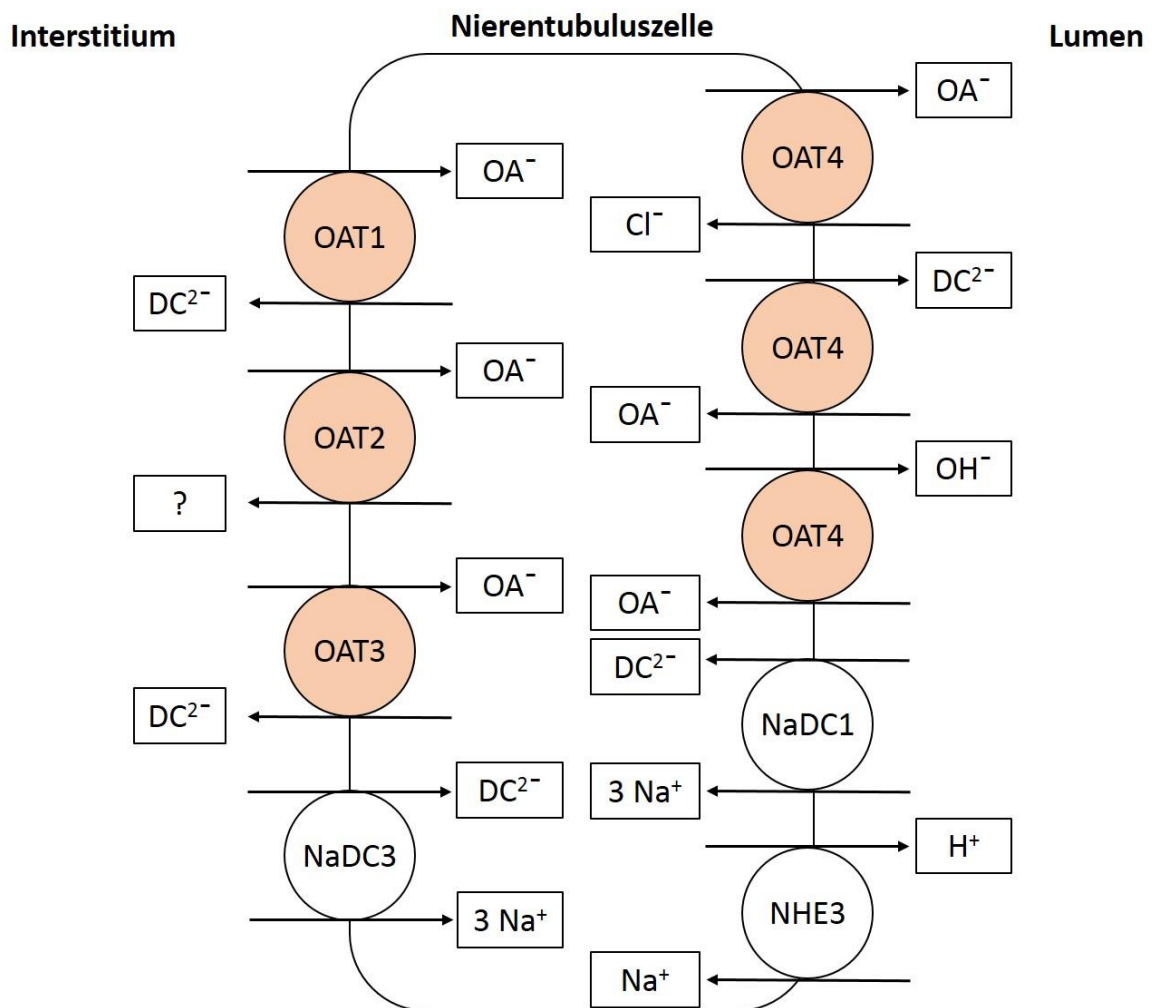
**Abbildung 1.2 Strukturformel von ICA**  
(erstellt mit der freien Version von ChemSketch)

### 1.3 Organische Anionen-Transporter (OATs)

Prinzipiell kann zwischen passivem und aktivem Transport von Stoffen unterschieden werden. Beim passiven Transport können Stoffe nur aufgrund eines Gradienten vom Ort der hohen Konzentration zum Ort der niedrigen Konzentration wandern. Dies geschieht durch Diffusion. Bei dem aktiven Transport von Stoffen können diese auch gegen einen Gradienten unter Verwendung von Energie, beispielsweise ATP, über Zellmembranen hinweg transportiert werden. Es wird zwischen Uniportern, Symportern bzw. Kotransportern und Antiportern bzw. Austauschern unterschieden. Bei Uniportern wird nur ein Substrat entweder in die Zelle oder aus ihr heraus transportiert, wohingegen Symporter mindestens zwei Substrate in die gleiche Richtung transportieren. Bei Antiportern hingegen werden unterschiedliche Substanzen in entgegengesetzte Richtung transportiert. Weiterhin kann zwischen primär, sekundär und tertiär aktivem Transport unterschieden werden. Primäre Transporter bauen einen Konzentrations- oder elektrischen Gradienten über die Zellmembran auf. Diesen Gradienten nutzt der sekundär aktive Transporter, um sein Substrat in die Zelle zu transportieren, sodass wiederum ein Gradient für das über den sekundär aktiven Transporter in die Zelle aufgenommene Substrat zwischen Extrazellulärraum und Zellinnerem besteht. Diesen vom sekundär aktiven Transporter aufgebauten Gradienten nutzt der tertiäre Transporter zur Aufnahme seines Substrats in die Zelle. Die in dieser Arbeit untersuchten OAT1, OAT2, OAT3 und OAT4 arbeiten als tertiär aktive Transporter, wobei sie ihr Substrat, das organische Anion, im Antiport gegen ein intrazelluläres Dicarboxylat in die Zelle schleusen. Im Fall der OATs ist der sekundär aktive Transporter der Natrium-abhängige Dicarboxylat-Transporter 3 (NaDC3), als der primäre Transporter dient die Na/K-ATPase (Abb. 1.3).

Die OATs gehören zur *Solute Carrier 22* (SLC22)-Genfamilie. Neben den Organischen Anionen-Transportern (OATs) zählen hierzu auch die Organischen Kationen-Transporter (OCT) und solche, die sowohl Zwitterionen als auch Kationen transportieren (OCTN). Die Transporter dieser Familie und damit auch die OATs bestehen aus 12 *trans*-Membran-Domänen, wobei sich eine große Schleife extrazellulär zwischen den Domänen 1 und 2 befindet. Eine zweite große Schleife ist intrazellulär zwischen der sechsten und siebten Domäne zu finden. Die hier besprochenen Organischen Anionen-Transporter 1 bis 3 kommen in der basolateralen Membran proximaler Tubuluszellen vor, wo sie für die Fremdstoffaufnahme in die proximalen Tubuluszellen zuständig sind. In einem nächsten Schritt werden diese Substanzen durch die Zellen transloziert und über teilweise noch nicht identifizierte Transporter

oder den OAT4 über die luminalen Membran in den Urin zur Ausscheidung abgegeben. Neben verschiedenen endogenen Substraten oder in der Umwelt vorkommenden Substanzen interagieren die OATs mit einer breiten Palette von Pharmaka, wie Antihypertensiva (z.B. Sartane, Angiotensin II Rezeptor I Blocker), Diuretika, Antibiotika (z.B. Penicilline, Cephalosporine), Zytostatika (z.B. Methotrexat), orale Antidiabetika, Immunsuppressiva und nichtsteroidale Antirheumatika (Übersichten in Burckhardt 2012; Koepsell 2013; Pelis und Wright 2011; Riedmaier et al. 2012; VanWert et al. 2010).



**Abbildung 1.3 Transportvorgänge durch OAT1, 2, 3 und 4 in einer proximalen Tubuluszelle (PCT)** Während OAT1 und OAT3 ein  $OA^-$  im Austausch gegen ein über NaDC3 oder NaDC1 aufgenommenes  $DC^{2-}$  transportieren, ist der Transportmodus von OAT2 noch weitgehend ungeklärt. OAT4 kann ein intrazelluläres  $OA^-$  im Austausch gegen im Lumen vorliegendes  $Cl^-$  in den Primärharn abgeben oder intrazelluläres  $DC^{2-}$  oder  $OH^-$  im Austausch gegen im Lumen vorliegendes  $OA^-$  in den Primärharn abgeben. Weitere Erklärungen folgen im Text.  $Cl^-$ , Chloridion;  $DC^{2-}$ , Dicarboxylat;  $H^+$ , Wasserstoffion;  $Na^+$ , Natriumion;  $OA^-$ , organisches Anion;  $OH^-$ , Hydroxylion; OAT, Organischer Anionen Transporter (eigene Abbildung)

### 1.3.1 Organischer Anionen-Transporter 1 (OAT1)

Der Organische Anionen-Transporter 1 bzw. OAT1, dessen Genname *SLC22A6* ist, wurde 1997 zeitgleich aus den Nieren der Ratte und der Winterflunder kloniert (Sekine et al. 1997; Sweet et al. 1997; Wolff et al. 1997). 1999 erfolgte ebenfalls zeitgleich die Klonierung des OAT1 aus der humanen Niere (Bahn et al. 2000; Hosoyamada et al. 1999). Der OAT1 liegt in vier unterschiedlichen Splicevarianten vor, wobei nur die erste 563 Aminosäuren zählende Variante und die 550 Aminosäuren umfassende zweite Variante funktionell sind. Das Gen selbst befindet sich auf Chromosom 11q13.2.

Am häufigsten wird der Transporter bzw. seine *messenger RNA* (mRNA) und das entsprechende Protein in der Niere exprimiert, gefolgt von seiner Expression im Gehirn, dem Plexus choroideus und den Skelettmuskeln (Lopez-Nieto et al. 1997; Lu et al. 1999; Nishimura und Naito 2005). In den proximalen Tubuluszellen der Nieren befindet sich der OAT1 in der basolateralen Membran, wo er Stoffe aus dem Blut bzw. dem Interstitium aufnehmen kann (Breljak et al. 2016; Hosoyamada et al. 1999; Motohashi et al. 2002).

Der OAT1 arbeitet hierbei als tertiärer Antiporter, welcher ein organisches Anion wie z.B. die oben genannten Medikamente im Austausch gegen Dicarboxylat, hauptsächlich  $\alpha$ -Ketoglutarat, in die Zelle hinein transportiert. Der sekundäre Transportvorgang wird hierbei vom *sodium-coupled dicarboxylate transporter 3* (NaDC3) übernommen, welcher das intrazelluläre Dicarboxylat zusammen mit drei Natriumionen bereitstellt und sich ebenfalls in der basolateralen Zellmembran befindet. Als Standardsubstrat zur weiteren Eigenschaftsbestimmung hat sich radioaktiv-markierte *para*-Aminohippursäure (PAH) etabliert (Übersichtsartikel: Burckhardt 2012; Koepsell 2013; Riedmaier et al. 2012). Abb. 1.3 fasst die funktionelle Kopplung zwischen OAT1 und NaDC3 zusammen.

### 1.3.2 Organischer Anionen-Transporter 2 (OAT2)

Das Protein selbst wurde 1994 in der Rattenleber entdeckt; allerdings ohne seine Funktion erklären zu können (Simonson et al. 1994). So folgte die genaue Charakterisierung als Organischer Anionen-Transporter 2 erst 1998 aus der Rattenleber (Sekine et al. 1998). Der Genname des humanen OAT2 ist *SLC22A7*, wobei sich das Gen auf dem Chromosom 6p21.1



befindet. Beim OAT2 ist eine Splicevariante mit 546 Aminosäuren und eine mit 548 Aminosäuren bekannt, wobei nur die kürzere Form funktionell ist (Cropp et al. 2008; Henjakovic et al. 2015).

OAT2-mRNA kommt vor allem in der Leber und der Niere vor. Ein geringerer mRNA-Gehalt wurde in den Hoden, dem Ileum, dem Plexus choroideus, dem Gehirn, dem Herzen und den Lungen nachgewiesen (Augustine et al. 2005; Cropp et al. 2008; Hilgendorf et al. 2007). Immunhistochemische Untersuchungen lokalisierten den OAT2 in der basolateralen Membran der proximalen Nierentubuluszellen, wo er aus dem Blut Substrate in die Zelle aufnehmen kann (Breljak et al. 2016; Cheng et al. 2012). Als Referenzsubstrat für den OAT2 wird cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) eingesetzt, ob er als Antiporter oder Austauscher, ähnlich dem OAT1 arbeitet, ist ungeklärt (Übersichten in Burckhardt 2012; Koepsell 2013; Riedmaier et al. 2012; Rizwan und Burckhardt 2007). In Abb. 1.3 ist der OAT2 schematisch dargestellt.

### 1.3.3 Organischer Anionen-Transporter 3 (OAT3)

Der Organische Anionen-Transporter 3 (OAT3) wurde 1999 aus der Rattenniere (Kusuhara et al. 1999) und 2001 aus der humanen Niere (Cha et al. 2001) kloniert. *SLC22A8* ist der Gencode für den OAT3, dessen Gen sich auf dem Chromosom 11q12.3 befindet. Die Nähe zum Gen des OAT1 auf demselben Chromosom und ähnliche Substratspezifitäten sowie ihr gemeinsames Arbeiten als Antiporter, die ein organisches Anion im Austausch gegen ein Dicarboxylat in die Zelle aufnehmen, lassen auf eine engere Verwandtschaft schließen. Der Transporter selbst besteht aus 536 bis 542 Aminosäuren.

Der OAT3 kommt vor allem in der Niere und außerdem in der Leber, dem Gehirn, der Skelettmuskulatur und den Nebennieren vor (Breljak et al. 2016; Cha et al. 2001; Nishimura und Naito 2005). Immunhistochemisch ist der OAT3 in Bezug auf die Niere wie seine beiden Vorgänger in der basolateralen Membran der proximalen Nierentubuluszelle lokalisiert, um Substanzen aus dem Blut aufzunehmen (Bahn et al. 2005; Breljak et al. 2016; Hasegawa et al. 2002; Kojima et al. 2002). Der OAT3 verfügt prinzipiell über ähnliche Transporteigenschaften wie der OAT1 und nutzt die durch den NaDC3 bereitgestellten Dicarboxylate, um organische Anionen nach intrazellulär zu transportieren. Als Standardsubstrat hat sich Estronsulfat (ES) etabliert (Übersichtsartikel: Burckhardt 2012; Koepsell 2013; Riedmaier et

al. 2012). Die Transportvorgänge zwischen OAT3 und NaDC3 lassen sich in Abb. 1.3 noch einmal nachvollziehen.

#### 1.3.4 Organischer Anionen-Transporter 4 (OAT4)

Der Vierte der Organischen Anionen-Transporter wurde im Jahre 2000 in der menschlichen Niere entdeckt, sein Gen *SLC22A11* befindet sich auf dem Chromosom 11q13.1 (Cha et al. 2000). Das Genprodukt besteht aus 550 Aminosäuren.

Der OAT4 kommt vorrangig in der Niere vor, wobei er in einem geringeren Ausmaße auch in der Plazenta und den Nebennieren zu finden ist (Cha et al. 2000; Nishimura und Naito 2005).

Im Gegensatz zu den drei zuerst genannten Transportern befindet sich der OAT4 in der luminalen Membran der proximalen Nierentubuluszellen, um Stoffe entweder aus dem Urin aufzunehmen oder in diesen zu sezernieren (Babu et al. 2002; Ekaratanawong et al. 2004).

Für den OAT4 werden unterschiedliche Transportmodi diskutiert. Generell wird unterschieden, ob das organische Anion nach intrazellulär (*influx mode*) oder extrazellulär (*efflux mode*) transportiert wird. Der erste *influx mode* funktioniert ähnlich dem von OAT1 oder OAT3. Hier wird ein organisches Anion im Austausch gegen Dicarboxylat in die Zelle eintransportiert, wobei hier der sekundäre Transport durch den *sodium-coupled dicarboxylate transporter 1* (NaDC1), welcher sich zusammen mit dem OAT4 in der apikalen Zellmembran befindet, stattfindet. Der zweite *influx mode* basiert auf dem Transport von organischen Anionen im Austausch gegen Hydroxylionen, wobei hier der sekundär aktive Transport durch den apikalen *sodium hydrogen exchanger 3* (NHE3) vermittelt wird, welcher ein Wasserstoffion in das Lumen transportiert, um im Gegenzug ein Natriumion in die Zelle aufzunehmen. Beim *efflux mode* hingegen wird ein organisches Anion im Austausch gegen ein Chloridion in das Lumen sezerniert (Hagos et al. 2007). Als Standardsubstrat hat sich zur Testung des Transporters Estronsulfat (ES) etabliert (Übersichtsartikel: Burckhardt 2012; Koepsell 2013; Riedmaier et al. 2012). Abb. 1.3 zeigt das Zusammenspiel der Transporter OAT4, NaDC1 und NHE3.

## 1.4 Zielsetzung und Fragestellung

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Interaktionen des ICA mit OAT1, OAT2, OAT3 und OAT4 zu zeigen, um anschließend zu diskutieren, wie ICA aus der Blutbahn in die proximale Tubuluszelle aufgenommen wird und durch diese weiter in den Urin abgegeben werden kann. Hierzu wurden sowohl *cis*-Inhibitions- als auch *trans*-Stimulationsversuche mit radioaktiv-markierten Referenzsubstraten der jeweiligen Transporter in Ab- und Anwesenheit von ICA durchgeführt. Folgende Fragestellungen werden untersucht (Tabelle 1.1):

**Tabelle 1.1 Fragestellungen**

Fragestellung	Untersuchte Transporter
Kann der Substrattransport über den jeweiligen Transporter durch ICA gehemmt werden?	OAT1, OAT2, OAT3, OAT4
Wie hoch ist die quantitative Hemmbarkeit bzw. die halbmaximale inhibitorische Konzentration zur Hemmung der Substrataufnahme durch ICA?	OAT1, OAT2, OAT3
Wird ICA über den jeweiligen Transporter transportiert?	OAT1, OAT2, OAT3, OAT4

## 2. Material und Methoden

Dieses Kapitel befasst sich im ersten Teil mit den verwendeten Geräten und Chemikalien, um im zweiten Teil auf die Methoden der Zellkultur und der *cis*-Inhibitions- und *trans*-Stimulationsexperimente mit radioaktiv-markierten Substraten einzugehen.

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zellen

Für alle Versuche wurden *human embryonic kidney* (HEK) 293-Zellen verwendet, welche mit dem jeweiligen Transporter, OAT1, OAT2, OAT3 und OAT4, stabil transfiziert waren. Als Kontrollen dienten HEK293-Zellen, die nur mit dem leeren Vektor transfiziert waren. Für die Kontrollzellen wurde bei den Transportern OAT1, OAT3 und OAT4 der Vektor pcDNA5, beim OAT2 der Vektor pEF5 verwendet. Alle Zellen befinden sich seit längerem im Institut in Kultur und wurden für die Experimente zur Verfügung gestellt.

#### 2.1.2 Geräte

Die Auflistung der verwendeten Geräte geschieht in zwei getrennten Listen (Tabelle 2.1 und 2.2), da der Arbeitsplatz im Isotopenlabor streng von den anderen Arbeitsbereichen getrennt war. Im Isotopenlabor gelten besondere Sicherheitsmaßnahmen: Sämtliche im Isotopenlabor benötigten Chemikalien und Verbrauchsmittel müssen getrennt entsorgt werden, um eine Kontamination anderer Labore zu vermeiden.

**Tabelle 2.1 Geräte im Zellkulturlabor**

Gerät	Artikelbezeichnung	Hersteller
Absaugpumpen	N 035.3 AN.18	KNF Neuberger GmbH (Freiburg, BRD)
Brutschrank	Heraeus Function Line BB 16	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA)
<i>Dispenser</i>	Repeater 4780	Eppendorf AG (Hamburg, BRD)
mechanische Pipetten 1	Eppendorf Research 2,5, 10, 20, 200, 1000	Eppendorf AG (Hamburg, BRD)
mechanische Pipetten 2	PIPETMAN Classic P20, P100, P200, P1000	Gilson Inc. (Middletown, WI)

Mikroplattenleser	Mithras LB 940	Berthold Technologies GmbH & Co.KG (Bad Wildbad, BRD)
Mikroskop	Telaval 31	Carl Zeiss AG (Oberkochen, BRD)
Mini-Zentrifuge	C-1200	Labnet International Inc. (Edison, NJ)
Neubauer-Zählkammer	hell-linig	Saaringia (Saarlouis, BRD)
Pipettierhilfe	pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG (Eberstadt, BRD)
Schüttelwasserbad	1083	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel, BRD)
Thermoblock	Thermostat 3401	Eppendorf AG (Hamburg, BRD)
<i>Vortexer 1</i>	Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc. (Bohemia, NY)
<i>Vortexer 2</i>	Reax top	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach, BRD)
Wipptisch	RT-3D	Fröbel Labortechnik GmbH (Lindau, BRD)
Zellkulturwerkbank 1	BIOWIZARD Silver Line	Kojair (Vilppula, Finnland)
Zellkulturwerkbank 2	Safe 2020	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA)
Zentrifugen	Heraeus Labofuge 400R/ Megafuge 40R	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA)

**Tabelle 2.2 Geräte im Isotopenlabor**

Gerät	Artikelbezeichnung	Hersteller
Absaugpumpe	N 035.3 AN.18	KNF Neuberger GmbH (Freiburg, BRD)
<i>Dispenser</i>	Repeater 4780	Eppendorf AG (Hamburg, BRD)
mechanische Pipetten 1	Eppendorf Research 10, 20, 100, 200, 1000	Eppendorf AG (Hamburg, BRD)
mechanische Pipette 2	PIPETMAN Classic P200	Gilson Inc. (Middletown, WI)
Szintillationszähler	Tri-Carb 2810 TR	PerkinElmer Inc. (Waltham, MA)
<i>Vortexer</i>	Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc. (Bohemia, NY)
Wipptisch	4020	Köttermann GmbH & Co. KG (Uetze/Hänigsen, BRD)

### 2.1.3 Verbrauchsmaterial

Im Zellkultur- und im Isotopenlabor wurden dieselben Verbrauchsmaterialien (Tabelle 2.3) benutzt, wobei streng auf eine getrennte Entsorgung geachtet wurde.

**Tabelle 2.3 Verbrauchsmaterialien**

Material	Artikelbezeichnung	Hersteller
Deckgläschen	Deckgläschen	R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik (Emmendingen, BRD)
<i>Dispenserspritze</i>	Combitip 12,5 ml	Eppendorf AG (Hamburg, BRD)
Glaspipetten	EM Techcolor 5 ml, 10 ml, 20 ml	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG (Eberstadt, BRD)
Mikro-Plastikreagenzglas	Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, BRD)
Pipettenspitzen	Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, BRD)
Plastikreagenzgläser	Schraubröhre 15 ml, 50 ml	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, BRD)
Szintillationsröhrchen	Mini-Vial 6 ml	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, BRD)
Zellkulturpetrischale	TC-Schale 100, Standard	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, BRD)
24-Well-Zellkulturplatte	CELLSTAR Zellkultur Multiwellplatte für Suspensionskultur 24-Well	Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster, Österreich)
96-Well-Testplatte	Mikrotestplatte 96 Well	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, BRD)

### 2.1.4 Chemikalien

Neben den Chemikalien sind in Tabelle 2.4 auch die Zellkulturmedien aufgeführt.

**Tabelle 2.4 Chemikalien**

Chemikalien/ Zellkulturmedien	CAS-Nummer	Hersteller
<i>p</i> -[Glycyl-2- <sup>3</sup> H]-Aminohipursäure	NET053	PerkinElmer Inc. (Waltham, MA)
bovines Serumalbumin (BSA)	P5369	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, BRD)
CaCl <sub>2</sub>	C3306	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, BRD)

cGMP	G6129	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, BRD)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	4720.1	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, BRD)
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM)	D5796	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, BRD)
<i>Dulbecco's PBS-Puffer</i>	A0964	AppliChem GmbH (Darmstadt, BRD)
[6,7- <sup>3</sup> H(N)]-Estronsulfat, Ammoniumsalz	NET203	PerkinElmer Inc. (Waltham, MA)
Ethanol (99,6%)	A1613	AppliChem GmbH (Darmstadt, BRD)
<i>Fetal Calf Serum</i> (FCS)	10270-106	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, BRD)
Glucose	A3666	AppliChem GmbH (Darmstadt, BRD)
[8- <sup>3</sup> H]-3',5'-cylclisches Guanosinphosphat, Ammoniumsalz	NET337	PerkinElmer Inc. (Waltham, MA)
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	A3268	AppliChem GmbH (Darmstadt, BRD)
Hygromycin B	P02015	PAA (Pasching, Österreich)
ICA		Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
Indometacin	I7378	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, BRD)
KCl	1.04877	Merck KGaA (Darmstadt, BRD)
MgSO <sub>4</sub>	A6287	AppliChem GmbH (Darmstadt, BRD)
NaCl	1.06404	Merck KGaA (Darmstadt, BRD)
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	A4229	AppliChem GmbH (Darmstadt, BRD)
NaOH	A1551	AppliChem GmbH (Darmstadt, BRD)
Penicillin, Streptomycin	P0781	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, BRD)
Phosphorsäure 85%	90791	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, BRD)
Poly-D-Lysin	P1149	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, BRD)
Probenecid	P8761	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, BRD)
Rotiszint® eco plus	0016.3	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, BRD)
Serva Blue G	35050	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, BRD)
Trypsin	L2103	Biochrom GmbH (Berlin, BRD)
5 x Lysispuffer	E1941	Promega Corporation (Fitchburg, WI)

## 2.1.5 Zusammensetzung der Lösungen und Medien

### 2.1.5.1 Zellkulturnährmedium

Substanz	Konzentration
DMEM	500 ml
FCS 10 %	100 ml / l
Penicillin	100 U / ml
Streptomycin	100 µg / ml

Das Medium wurde steril hergestellt und bei 4 °C gelagert.

### 2.1.5.2 Mammalian Ringer (MRi)

Substanz	Konzentration
NaCl	130 mM
HEPES	20 mM
Glucose	18 mM
KCl	4 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM
MgSO <sub>4</sub>	1 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 mM

Die Lösung wurde mit demineralisiertem Wasser steril hergestellt und auf den pH-Wert von 7,4 mit NaOH eingestellt. Sie wurde bei Raumtemperatur gelagert.

### 2.1.5.3 Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

<i>Dulbecco's</i> PBS-Puffer	9,55 g / l
------------------------------	------------

Die Lösung wurde mit destilliertem Wasser steril hergestellt und bei Raumtemperatur gelagert.

### 2.1.5.4 Trypsin-Lösung

Trypsin	0,1 %
---------	-------

Das Trypsin wurde steril in PBS gelöst und bei 4 °C gelagert.



#### 2.1.5.5 Poly-D-Lysin-Lösung

Poly-D-Lysin	0,1 mg / ml
--------------	-------------

Das Poly-D-Lysin wurde in destilliertem Wasser steril gelöst und bei 4 °C gelagert.

#### 2.1.5.6 Bradford-Reagenz

Serva Blue G	70 mg
Ethanol (99,6 %)	50 ml
Phosphorsäure (85 %)	100 ml

Anschließend wurde mit H<sub>2</sub>O auf 250 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde bei 4 °C dunkel gelagert.

#### 2.1.5.7 ICA, Probenecid und Indometacin

ICA/ Probenecid/ Indometacin	100 mM
------------------------------	--------

Es wurden Stammlösungen der drei Substanzen gelöst in DMSO hergestellt und bei -20 °C gelagert.

#### 2.1.5.8 cGMP

cGMP	100 mM
------	--------

Es wurde in demineralisiertem Wasser steril gelöst und bei -20 °C gelagert.

#### 2.1.5.9 Hygromycin B

Hygromycin B	50 mg / ml
--------------	------------

Das Hygromycin B war in demineralisiertem Wasser steril gelöst und wurde bei 4 °C gelagert.

### 2.1.5.10 NaOH

Die NaOH-Plätzchen wurden in demineralisiertem Wasser steril gelöst, sodass eine 1N NaOH entstand, die bei Raumtemperatur gelagert wurde.

### 2.1.6 Software, Auswertung der Ergebnisse und Berechnung der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration ( $IC_{50}$ )

Folgende Software (Tabelle 2.5) wurde verwendet, um die Rohdaten aus den Experimenten weiterzuverarbeiten, diese graphisch darzustellen, die Strukturformeln zu zeichnen und den Text abzufassen.

**Tabelle 2.5 Software**

Software	Bezeichnung	Hersteller
Abbildungsbearbeitung	Microsoft Powerpoint	Microsoft Corporation (Redmond, WA)
Grafische Datenanalyse	SigmaPlot	Systat Software Inc. (San Jose, CA)
Literaturverwaltung	Citavi	Swiss Academic Software GmbH (Wädenswil, CH)
Strukturformelbearbeitung	ChemSketch	Advanced Chemistry Development Inc. (Toronto, Ontario)
Tabellenkalkulation	Microsoft Excel	Microsoft Corporation (Redmond, WA)
Textverarbeitung	Microsoft Word	Microsoft Corporation (Redmond, WA)

Die im Ergebnisstil angegebenen Ergebnisse sind immer mit der jeweiligen Standardabweichung (SD) angegeben.

Die Berechnung der  $IC_{50}$  erfolgte nach folgender Formel:

$$f = \frac{v \cdot c}{c + x}$$

Wobei x für die verschiedenen ICA Konzentrationen, f für die Substrataufnahme und v für die maximale Aufnahme steht. Das errechnete c ergibt die  $IC_{50}$ .

## 2.2 Methoden

Der erste Schritt der Experimente erfolgte jeweils im Zellkulturlabor. Hier wurden die Zellen mit den vier Transportern und zwei Vektoren kultiviert. Waren die Zellen bis zur Subkonfluenz gewachsen, folgten entweder die Versuche zur Aufnahme des für den Transporter charakteristischen Referenzsubstrats inklusive der Proteinbestimmung oder eine erneute Aussaat für die nächste Passage. Hierfür wurde eine weitere Platte ausgesät. Am Ende wurden diese Daten dann am Computer zusammengeführt und weiterverarbeitet. Prinzipiell wurden die einzelnen Arbeitsschritte nach den im Institut etablierten Standardprotokollen durchgeführt.

### 2.2.1 Zellkultur

#### 2.2.1.1 Zellkultivierung

Bis zur Subkonfluenz (>80%) wurden die mit den Transportern OAT1, OAT2, OAT3 und OAT4 und den Vektoren pcDNA5 und pEF5 stabil transfizierten HEK293-Zellen in Petrischalen mit dem Durchmesser von 10 cm mit 10 ml Nährmedium im Brutschrank (Abb. 2.1) bei 37 °C und einer Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luft gehalten.



**Abbildung 2.1 Brutschrank** Heraeus Function Line BB 16 mit Zellkulturschalen (*eigene Photographie*)

### 2.2.1.2 Zellernte und Rekultivierung

Nach einer Kultivierung von drei Tagen im Brutschrank und einer Konfluenz von 80% - 100% konnten die Zellen für die Versuche herangezogen werden. Zur Beurteilung der Subkonfluenz wurden die einzelnen Petrischalen im Mikroskop auf den jeweiligen Wachstumsgrad überprüft. Die einzelnen Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen in der Zellkulturwerkbank (Abb. 2.2) durchgeführt. Alle benutzten Lösungen und Medien sowie die Pipettenspitzen, Mikro-Plastikreagenzgläser und Glaspipetten waren steril-filtriert oder sterilisiert und auf 37 °C erwärmt.



**Abbildung 2.2 Zellkulturwerkbank BIOWIZARD Silver Line (eigene Photographie)**

Zuerst wurde mit Hilfe einer Pipettenspitze und einer Pumpe das Medium aus den Petrischalen abgesaugt. Danach erfolgte das Waschen der Zellen mit PBS, um das restliche Medium und Zelltrümmer zu beseitigen. Hierfür wurden mit einer Glaspipette 5 ml PBS vorsichtig am Rande der Petrischale aufgebracht, um die Zellen nicht versehentlich abzulösen. Nach mehrmaligem Schwenken wurde das PBS mit der Saugpumpe entfernt. Anschließend wurden 2 ml 0,1 % Trypsin auf die Zellen geträufelt und 5 min abgewartet, bis sich alle Zellen vom Boden gelöst hatten. Durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren wurden alle Zellen aufgenommen und in ein 15-ml-Plastikreagenzglas überführt, welches zum Neutralisieren des Trypsins mit 2 ml Nährmedium befüllt war. Das Reagenzglas wurde dann für 5 min bei

1000 U / min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das Zell-pellet wieder in 2 ml Nährmedium resuspendiert.

Ein Teil dieser Zellen wurde für die einzelnen Experimente verwendet, nicht benötigte Zellen wurden zur Rekultivierung eingesetzt. Zur Passagierung wurde ein Teil der Zellsuspension in eine mit 10 ml Nährmedium gefüllte Petrischale überführt. Durch mehrmaliges Schwenken konnten sich die Zellen in der Petrischale verteilen. Bei HEK293-Zellen, welche mit dem OAT3 transfiziert waren, wurde zusätzlich 35 µl Hygromycin B in der Ausgangskonzentration von 50 mg / ml hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen in den Petrischalen in den Brutschrank gestellt.

### 2.2.1.3 Zellzahlbestimmung

Um die Versuche mit annähernd gleichen Zellzahlen bzw. annähernd gleichen Mengen an Protein durchführen zu können, wurden die in der Zellsuspension vor der Aussaat vorhandenen Zellen in einer Neubauer-Zählkammer unter mikroskopischer Kontrolle gezählt. Unter Hinzuziehen des entsprechenden Verdünnungsfaktors (20), nach Auszählen der in  $4 \cdot 16$  Quadraten der Neubauer-Zählkammer vorliegenden Zellen und dem Bilden des Mittelwertes (M) und Berücksichtigung eines für die Neubauerzählkammer spezifischen Korrekturfaktors ( $10^4$ ) ergab sich für die Anzahl (K) der Zellen folgender Wert:

$$K \text{ [Zellen/ ml]} = M \cdot 20 \cdot 10^4 \text{ [Zellen/ ml]}$$

### 2.2.1.4 Beschichtung der 24-Well-Platten

Bevor die Zellen in die 24-Well-Zellkulturplatten für die Experimente ausgesät werden konnten, mussten diese erst mit Poly-D-Lysin beschichtet werden, da sonst die Zellen nicht auf dem Boden hätten anwachsen können. 500 µl erwärmtes Poly-D-Lysin in einer Konzentration von 0,1 mg / ml wurde unter sterilen Bedingungen mit einer Glaspipette in jedes der 24 Wells gefüllt und eine halbe Stunde einwirken gelassen. Anschließend wurde das Poly-D-Lysin entfernt und die Platten für eine weitere halbe Stunde zum Trocknen unter der Werkbank belassen. Danach konnten die Platten für den Versuch eingesetzt oder für den späteren Gebrauch zwischengelagert werden.

### 2.2.1.5 Aussäen der Zellen für die Experimente

Je nach Experiment wurden zwei oder drei Platten benötigt, wobei eine oder zwei für das jeweilige Experiment und die andere für die Proteinbestimmung verwendet wurde. In jedes *Well* wurden jeweils  $2 \cdot 10^5$  Zellen pipettiert. Hierfür wurde die vorher berechnete und insgesamt benötigte Menge an Ausgangszellsuspension in ein vorher mit der bestimmten Menge Nährmedium befülltes 50-ml-Reagenzglas überführt. Bevor man nun die einzelnen *Wells* mit jeweils 500  $\mu$ l der Zellsuspension bestückte, war auch hier eine gute Durchmischung durch Auf- und Abpipettieren wichtig, um eine gleichmäßige Zellverteilung zu gewährleisten.

## 2.2.2 Experimente zur Aufnahme der radioaktiv-markierten Substrate

### 2.2.2.1 Vorbereitungen und Vorinkubation

Alle für die Versuche verwendeten Lösungen wurden in einem Wasserbad auf Raumtemperatur aufgewärmt und durchmischt, um etwaigen Konzentrationsgradienten durch das Einfrieren und Auftauen vorzubeugen. Konzentrationen an markierten Substraten, prototypischen Hemmstoffen und ICA werden in den entsprechenden Abschnitten im Resultateteil aufgelistet.

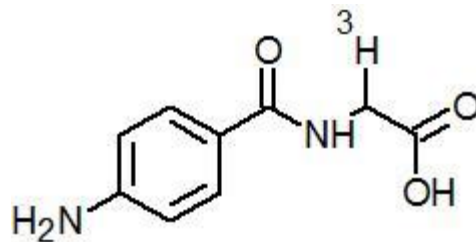
Während bei den *cis*-Inhibitionsversuchen und den Versuchen zur Bestimmung einer  $IC_{50}$  für die Hemmung der Aufnahme das für den jeweiligen Transporter charakteristische Referenzsubstrat und der Inhibitor gemeinsam in einem *Well* angeboten wurden, musste für die *trans*-Stimulationsexperimente eine Vorinkubation der Zellen in Ab- und Anwesenheit von ICA durchgeführt werden. Hierfür wurden die 24-*Well*-Platten aus dem Brutschrank genommen und der Überstand der *Wells* mit der Saugpumpe abgesaugt. Anschließend wurden jeweils 220  $\mu$ l des Nährmediums, welches vorher mit der gewünschten Menge ICA versetzt worden war, in die *Wells* pipettiert. Die *Wells* wurden für 2 Stunden zur Inkubation in den Brutschrank zurückgestellt. Direkt anschließend konnte mit den Versuchen zur Aufnahme des radioaktiv-markierten Referenzsubstrats begonnen werden. Die Platten zur Proteinbestimmung wurden adäquat behandelt.

### 2.2.2.2 Transportversuche und Lysieren

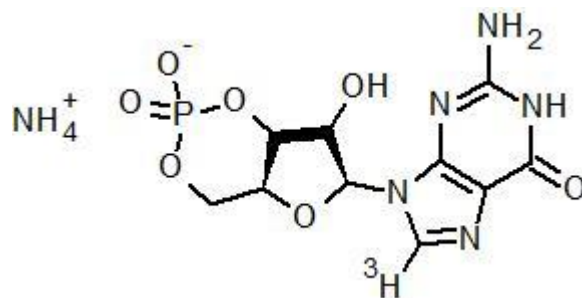
Zuerst wurde in das mit Ringer-Lösung befüllte Kontrollreagenzglas die jeweilige  $^3\text{H}$ -markierte Substanz pipettiert. Die entsprechenden Konzentrationen sind Tabelle 2.6 und die Strukturformeln den Abbildungen 2.3 bis 2.5 zu entnehmen.

**Tabelle 2.6 verwendete Standardsubstrate**

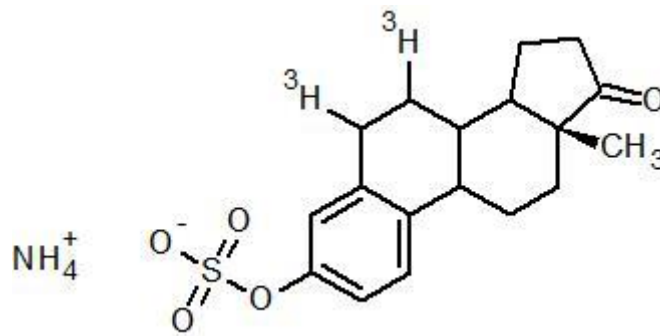
Transporter	Substrat
OAT1	0,5 $\mu\text{M}$ [ $^3\text{H}$ ]-PAH
OAT2	9,9 $\mu\text{M}$ unmarkiertes cGMP und 0,1 $\mu\text{M}$ [ $^3\text{H}$ ]-cGMP
OAT3, OAT4	10 nM [ $^3\text{H}$ ]-ES



**Abbildung 2.3 Strukturformel von [ $^3\text{H}$ ]-PAH** (erstellt mit der freien Version von ChemSketch)



**Abbildung 2.4 Strukturformel von [ $^3\text{H}$ ]-cGMP** (erstellt mit der freien Version von ChemSketch)



**Abbildung 2.5** Strukturformel von [ $^3\text{H}$ ]-ES (erstellt mit der freien Version von ChemSketch)

Das Reagenzglas wurde sicher verschlossen und durchmischt. Anschließend wurde aus dem Reagenzglas jeweils ein Teil der nun radioaktiv-markierten Ringer-Lösung in die für die anderen Bedingungen bereitstehenden Reagenzgläser überführt und durchmischt. Zuerst wurde mit der Saugpumpe jeweils die Bedingung auf der 24-Well-Platte von der Ringer-Lösung, welche als erstes inkubiert werden sollte, abgesaugt. Nun wurde in jedes der Wells 190  $\mu\text{l}$  der Testsubstanz gegeben und gleichzeitig eine Stoppuhr gestartet, um die Transportzeit einzuhalten. Dies geschah am Arbeitsplatz der in Abbildung 2.6 zu sehen ist.

Bei den *cis*-Inhibitionsversuchen wurden den Zellen das Referenzsubstrat und die zu untersuchende Substanz (ICA) von der gleichen Seite aus angeboten. Bei den *trans*-Stimulationen geht man davon aus, dass das ICA, falls es durch die OATs transportiert wird, während der Vorinkubation in die Zelle gelangt und so das Referenzsubstrat und das ICA auf entgegengesetzten Seiten der Zellmembran vorliegen.

Nach Ablauf einer Inkubationszeit von 5 min wurden die Wells abgesaugt und dreimal mit 500  $\mu\text{l}$  eiskaltem PBS gewaschen, um den Transportprozess zu unterbrechen.





**Abbildung 2.6 Arbeitsplatz im Radioaktivlabor** (eigene Photographie)

Zum Lösen der Zellen vom Boden der Platte und zum Lysieren der Zellen wurde in jedes der verwendeten *Wells* 500  $\mu\text{l}$  1 N NaOH pipettiert. Anschließend wurden die Platten für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf einen Wipptisch gestellt, damit alle Zellen in Suspension vorliegen.

#### 2.2.2.3 Standards

Um die Messungen der einzelnen Experimente im Szintillationszähler in Bezug auf die jeweilige spezifische Aktivität der radioaktiven Substanz zu setzen, wurden bei jedem Versuch vier Standards mitgeführt. Hierfür wurden jeweils 5  $\mu\text{l}$  aus der mit einer der radioaktiven Substanzen versetzten Ringer-Lösung in ein Szintillationsröhrchen pipettiert und ebenfalls mit 500  $\mu\text{l}$  1 N NaOH versetzt. Unter dem Abzug wurden anschließend 2,5 ml Szintillationsflüssigkeit hinzugefügt. Die Röhrchen wurden verschlossen und mit dem *Vortexer* gut durchmischt.

#### 2.2.2.4 Messung der in die Zellen aufgenommenen Radioaktivität

Nach zweistündigem Lysieren der Zellen konnten diese in die Szintillationsröhrchen überführt werden. Hierfür wurde der Inhalt eines *Wells* jeweils in ein eigenes Röhrchen pipettiert, nachdem durch vorheriges Auf- und Abpipettieren sichergestellt wurde, dass sich alle Zellreste vom Boden gelöst hatten. Anschließend wurde unter dem Abzug jedem Röhrchen 2,5

ml Szintillationsflüssigkeit hinzugefügt. Nach Verschließen und Durchmischen mit dem *Vortexer* konnten diese Röhrchen zusammen mit den vier Standards für die Messungen in den Szintillationszähler gestellt werden (Abb. 2.7).



**Abbildung 2.7 Szintillationszähler Tri-Carb 2810 TR** (*eigene Photographie*)

### 2.2.3 Proteinbestimmung

Um die aufgenommene Radioaktivität in Relation zur vorhandenen Zellmenge setzen zu können, wurde bei jedem Versuch eine zusätzliche Platte für die Proteinbestimmung ausgesät. Hierbei wurde die Methode nach Bradford (Bradford 1976) verwendet, um die Proteinmenge zu quantifizieren.

#### 2.2.3.1 Lysieren der Zellen

Die bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefrorenen 24-Well-Platten mit den Zellen wurden für die Bestimmung des Proteingehalts langsam bei Raumtemperatur aufgetaut. In jedes *Well* wurden  $100\text{ }\mu\text{l}$  1 x Lysispuffer hinzugefügt, welcher zuvor aus einem in  $\text{H}_2\text{O}$  1:5 verdünnten 5 x Lysispuffer erstellt wurde. Anschließend wurden die Platten für 30 min auf den Wipptisch gestellt. Danach wurden in jedes *Well* zusätzlich  $1900\text{ }\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  hinzupipettiert. Durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren wurde eine gleichmäßige Verteilung der gelösten Proteine erreicht.

### 2.2.3.2 Standardreihe

Um die gemessene Absorption der Proben vergleichbar zu machen, wurden die Ergebnisse anhand einer Eichgeraden eingeordnet, welche durch eine Standardreihe an vordefinierten Proteinkonzentrationen (Tabelle 2.7) erstellt wurde. Hierfür wurde bovines Serumalbumin in den folgenden Konzentrationen eingesetzt:

**Tabelle 2.7 BSA-Standardreihe**

Konzentration BSA [ $\mu\text{g} / \text{ml}$ ]	0	50	75	100	150	200	250	300
---	---	----	----	-----	-----	-----	-----	-----

BSA wurde ebenfalls bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert und zur Verwendung aufgetaut, durchmischt und anschließend kurz zentrifugiert.

### 2.2.3.3 Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurden die BSA Konzentrationen und die jeweiligen Proben aus den 24-*Well*-Platten verwendet, welche zur Doppelbestimmung in eine 96-*Well*-Platte pipettiert wurden. Hierfür wurden in jedes der *Wells*  $20\ \mu\text{l}$  BSA-Standard oder Proteinprobe pipettiert. Anschließend wurde die benötigte Menge Bradford-Reagenz im Verhältnis 1:4 mit  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt. In jedes der belegten *Wells* wurde  $200\ \mu\text{l}$  der verdünnten Bradford-Lösung pipettiert. Nach 10-minütiger Inkubation wurde die 96-*Well*-Platte in den Mikroplattenleser eingelegt und die Absorption bei  $590\ \text{nm}$  gemessen.

### 3. Ergebnisse

Die Ergebnisse wurden an HEK293-Zellen, die stabil mit OAT1, OAT2, OAT3, OAT4 oder den entsprechenden Leervektoren transfiziert waren, erzielt. Als Zeit für die Aufnahme des radioaktiv-markierten Referenzsubstrats wurde für alle Transporter fünf Minuten gewählt. Als Referenzsubstrate dienten mit den folgenden Konzentrationen: 0,5  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]-*p*-Aminohippurat (PAH) für OAT1, 0,1  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]-cGMP und 9,9  $\mu\text{M}$  cGMP für OAT2 und jeweils 10 nM [ $^3\text{H}$ ]-Estron-3-Sulfat (ES) für OAT3 und OAT4. Alle Versuche wurden dreimal mit möglichst aufeinanderfolgenden Zellpassagen durchgeführt. Für jede Messung wurde eine Proteinbestimmung zur Normierung vorgenommen.

#### 3.1 OAT1

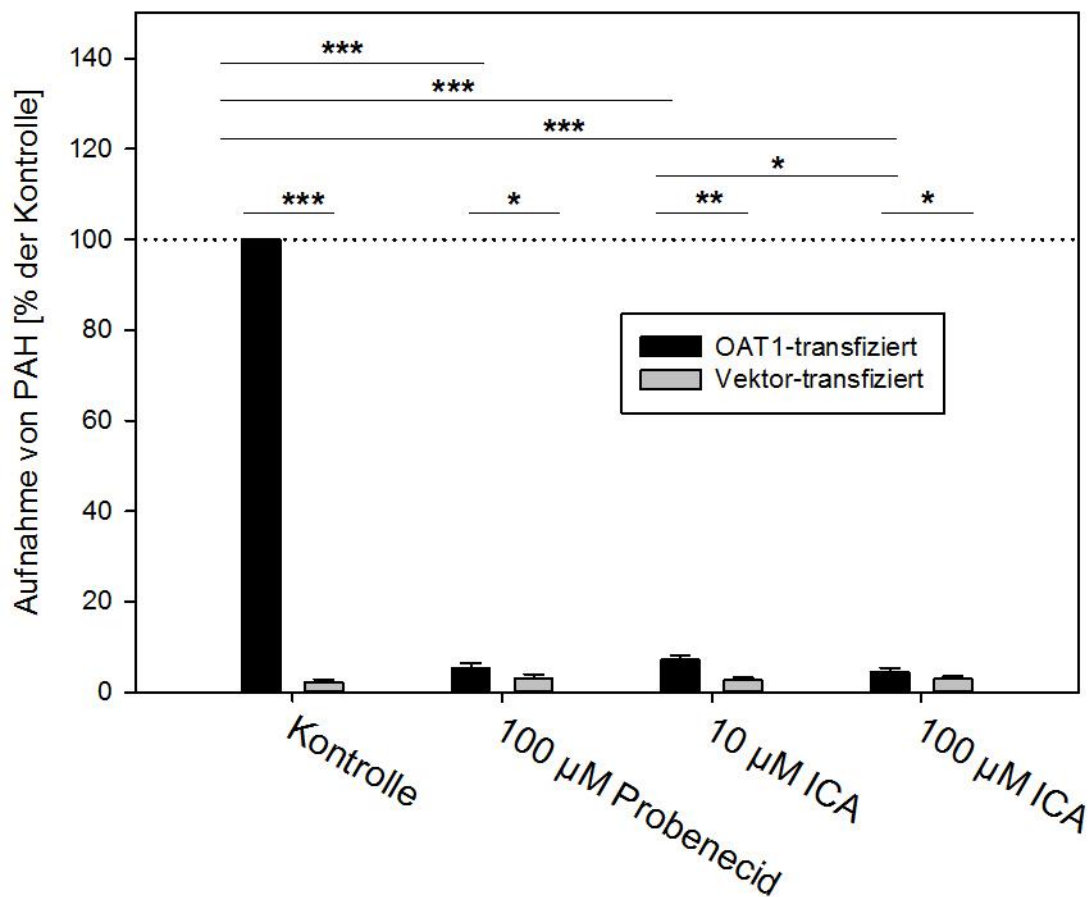
##### 3.1.1 *cis*-Hemmung

Nach fünfminütiger Inkubation OAT1- bzw. pcDNA5-transfizierter HEK293-Zellen in 0,5  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]-PAH gelöst in MRi betrug die Aufnahme von [ $^3\text{H}$ ]-PAH  $11,56 \pm 2,33$  bzw.  $0,26 \pm 0,12$  pmol/mg; was einem signifikanten Unterschied entspricht. Dies entspricht einer PAH-Akkumulation der OAT1- gegenüber den Vektor-transfizierten Zellen von  $49,04 \pm 13,69$ .

Die simultane Applikation von 100  $\mu\text{M}$  Probenecid, einem OAT1 Inhibitor, und 0,5  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]-PAH (*cis*-Hemmung) reduzierte die [ $^3\text{H}$ ]-PAH-Aufnahme signifikant auf  $0,62 \pm 0,23$  pmol/mg in OAT1-transfizierten HEK293-Zellen gegenüber der Kontrolle, während die [ $^3\text{H}$ ]-PAH-Aufnahme in die Vektor-transfizierten Zellen mit  $0,37 \pm 0,17$  pmol/mg nicht signifikant gegenüber den Vektor-transfizierten Kontrollen verschieden war.

Eine mit ICA-Konzentrationen von 10 und 100  $\mu\text{M}$  jeweils gelöst in MRi durchgeführte *cis*-Hemmung erzielte [ $^3\text{H}$ ]-PAH-Aufnahmen von  $0,83 \pm 0,24$  bzw.  $0,52 \pm 0,19$  pmol/mg. Somit unterscheiden sich die Werte signifikant voneinander als auch gegenüber der Kontrolle. Die [ $^3\text{H}$ ]-PAH-Aufnahmen in die pcDNA5-transfizierten HEK293-Zellen waren mit  $0,31 \pm 0,13$  und  $0,34 \pm 0,12$  pmol/mg weder signifikant voneinander noch signifikant von der Kontrollbedingung verschieden, wohl aber signifikant von den OAT1-Werten.

Zur besseren Vergleichbarkeit sind die eben beschriebenen Resultate in Abbildung 3.1 normiert auf die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-PAH in Abwesenheit (Kontrolle) von Probenecid oder ICA dargestellt.



**Abbildung 3.1 Einfluss von ICA auf die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-PAH in OAT1- und Vektor-transfizierten HEK293-Zellen** 0,5 µM [<sup>3</sup>H]-PAH und die Inhibitoren in den entsprechenden Konzentrationen (gelöst in MRi plus 0,1 % DMSO) wurden in vier Parallelansätzen OAT1- und Vektor-transfizierten HEK293-Zellen für fünf Minuten angeboten. Die einzelnen Werte stellen das arithmetische Mittel aus 3 unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung (SD) unterschiedlicher Zellpassagen dar. Die Werte wurden jeweils auf die Kontrollbedingung des jeweiligen Experimentes mit MRi normiert. Bei allen Experimenten wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt. Die statistische Signifikanz liegt bei \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  und \* $p < 0,05$  beim einseitigen t-Test.

### 3.1.2 Halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC<sub>50</sub>)

Die Bestimmung der Konzentration, bei der die Aufnahme eines Substrats zu 50 % gehemmt ist, wird als IC<sub>50</sub> bezeichnet. An OAT1-transfizierten HEK293-Zellen erfolgte die Bestimmung der IC<sub>50</sub> für die Hemmung der [<sup>3</sup>H]-PAH-Aufnahme durch ICA an drei verschiedenen Zellpassagen, wobei in den einzelnen Versuchen unterschiedliche Konzentrationen an ICA eingesetzt wurden (Tabelle 3.1). Dies war nötig, da bereits in der ersten Versuchsreihe die Aufnahme von 0,5 µM [<sup>3</sup>H]-PAH durch 1 µM ICA von 9,21 ± 1,99 pmol/mg in Abwesenheit des Hemmstoffs auf 2,58 ± 1,39 pmol/mg in Anwesenheit von 1 µM ICA reduziert war. In den Versuchsreihen 2 und 3 wurden deshalb die Konzentrationen 0,1 und 0,5 µM ICA aufgenommen.

**Tabelle 3.1 ICA Konzentrationen zur Bestimmung der IC<sub>50</sub>**

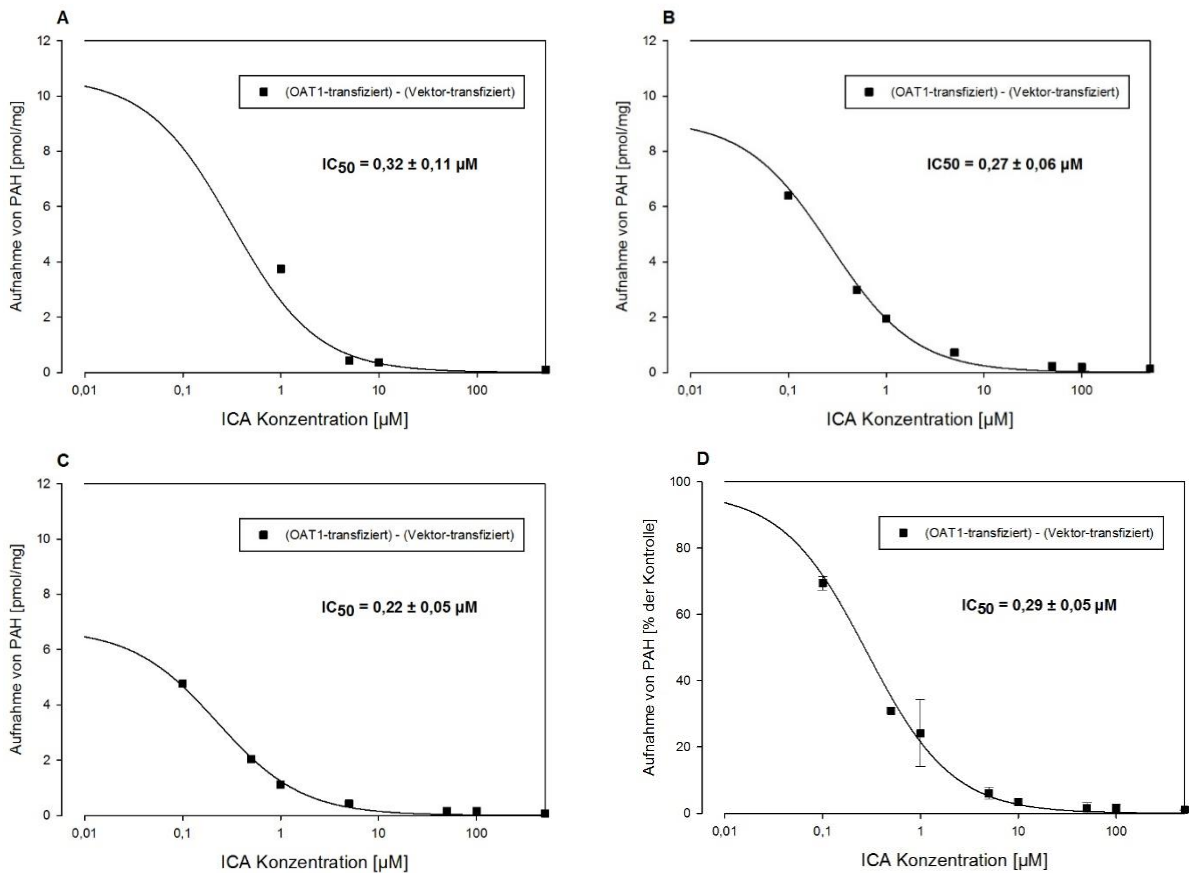
Versuch 1 [ICA, µM]	0	/	/	1	5	10	50	100	500
Versuch 2 [ICA, µM]	0	0,1	0,5	1	5	/	50	100	500
Versuch 3 [ICA, µM]	0	0,1	0,5	1	5	/	50	100	500

In halblogarithmischer Darstellung ergibt sich eine Schulterkurve. Die Schulter ist allerdings nur sehr flach ausgeprägt, da aus technischen Gründen ICA-Konzentrationen < 0,1 µM nicht eingesetzt werden konnten. Ab ICA-Konzentrationen > 0,1 µM (geschätzt) erfolgte ein sehr rascher Abfall der [<sup>3</sup>H]-PAH-Aufnahme. In Anwesenheit von ICA-Konzentrationen von ungefähr 5 µM war die Aufnahme von 0,5 µM [<sup>3</sup>H]-PAH in OAT1- nicht mehr von der, in Vektor-transfizierten HEK293-Zellen ermittelten Aufnahme, zu unterscheiden. Die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-PAH in Vektor-transfizierte HEK293-Zellen zeigte unbeeinflusst von allen eingesetzten ICA-Konzentrationen Werte von 0,31 ± 0,02 pmol/mg. Diese Ergebnisse sind zusammengefasst in Abbildung 3.2 abgebildet.

Die IC<sub>50</sub>-Werte wurden zuerst getrennt für die drei Versuchsreihen errechnet (Tabelle 3.2). Anschließend wurde aus den Einzelmessungen der Mittelwert der IC<sub>50</sub> zu 0,29 ± 0,05 µM berechnet.

**Tabelle 3.2 OAT1: Hemmung der Aufnahme von PAH durch aufsteigende Konzentrationen von ICA – Bestimmung der IC<sub>50</sub>**

Versuch 1	0,32 ± 0,11 µM
Versuch 2	0,27 ± 0,06 µM
Versuch 3	0,22 ± 0,05 µM
Mittelwert ± SD aus allen Einzelmessungen	0,29 ± 0,05 µM



**Abbildung 3.2** Halbmaximale inhibitorische Konzentration von ICA bei der Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-PAH in OAT1- und Vektor-transfizierten HEK293-Zellen 0,5 µM [<sup>3</sup>H]-PAH und das ICA in den entsprechenden Konzentrationen (gelöst in MRI plus 0,05 bis 0,5 % DMSO) wurden in sieben bzw. acht Parallelansätzen OAT1- und Vektor-transfizierten HEK293-Zellen für fünf Minuten angeboten. Bei allen Experimenten wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt. A-C: Einzeldarstellung der 3 unabhängigen Versuche mit Regressionsanalyse D: Die einzelnen Werte stellen das arithmetische Mittel aus 3 unabhängigen Experimenten ±SD unterschiedlicher Zellpassagen dar. Die Werte wurden jeweils auf die Kontrollbedingung des jeweiligen Experimentes mit MRI normiert.

### 3.1.3 *trans*-Stimulation

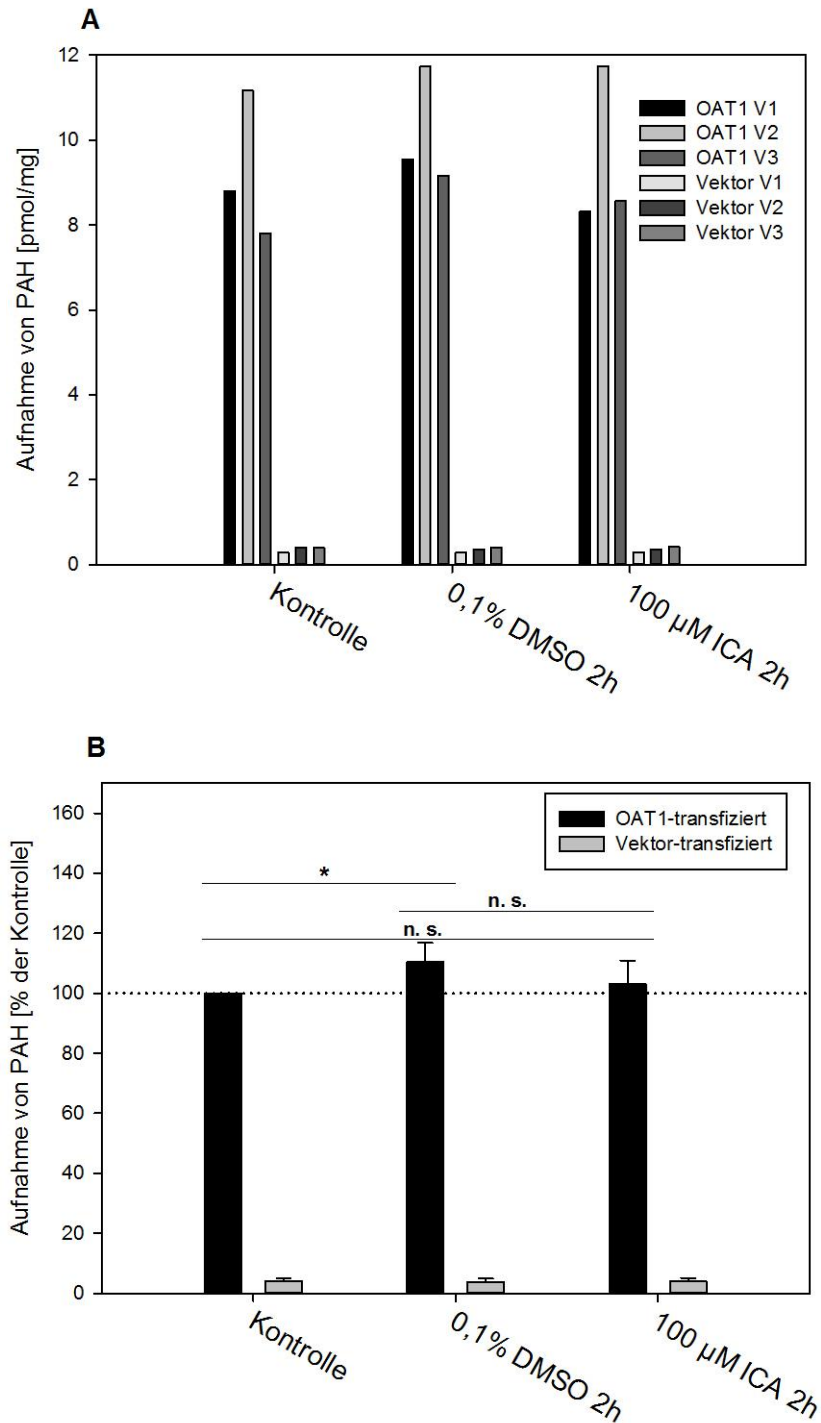
Bei den *trans*-Stimulationsversuchen wurden die Zellen für zwei Stunden in MRi plus 0,1 % DMSO oder in MRi, dem sowohl 100  $\mu$ M ICA als auch 0,1 % DMSO zugesetzt waren, vorinkubiert. Außerdem wurde eine Kontrolle mitgeführt, die kein DMSO enthielt, um den Einfluss einer zweistündigen Inkubation von DMSO auf die Zellen zu testen.

Wie aus Abbildung 3.3 A ersichtlich ist, erhöht DMSO die Aufnahme von PAH in allen Versuchen in OAT1- nicht jedoch in Vektor-transfizierten Zellen. Die zusätzliche Gabe von 100  $\mu$ M ICA während der Vorinkubation führte entweder zu keiner Änderung der PAH-Aufnahme wie in Versuch 2 oder zu einer geringfügigen Abnahme der PAH-Aufnahme, wie in Versuch 1 und 3 beobachtet.

Abbildung 3.3 B fasst die Resultate zusammen. DMSO stimuliert die Aufnahme von PAH geringfügig auf einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$ . Eine zweistündige Vorinkubation der Zellen mit 100  $\mu$ M ICA verändert die Aufnahme von PAH nicht.

Die Werte für die fünfminütige Aufnahme von PAH liegen bei  $9,25 \pm 1,73$  (Kontrolle),  $10,15 \pm 1,39$  (0,1 % DMSO) und  $9,54 \pm 1,90$  pmol/mg (0,1 % DMSO, 100  $\mu$ M ICA). Die PAH-Aufnahmen Vektor-transfizierter Zellen wurden zu  $0,37 \pm 0,06$  (Kontrolle),  $0,35 \pm 0,06$  (0,1 % DMSO) und  $0,36 \pm 0,06$  pmo/mg (0,1 % DMSO, 100  $\mu$ M ICA) bestimmt.

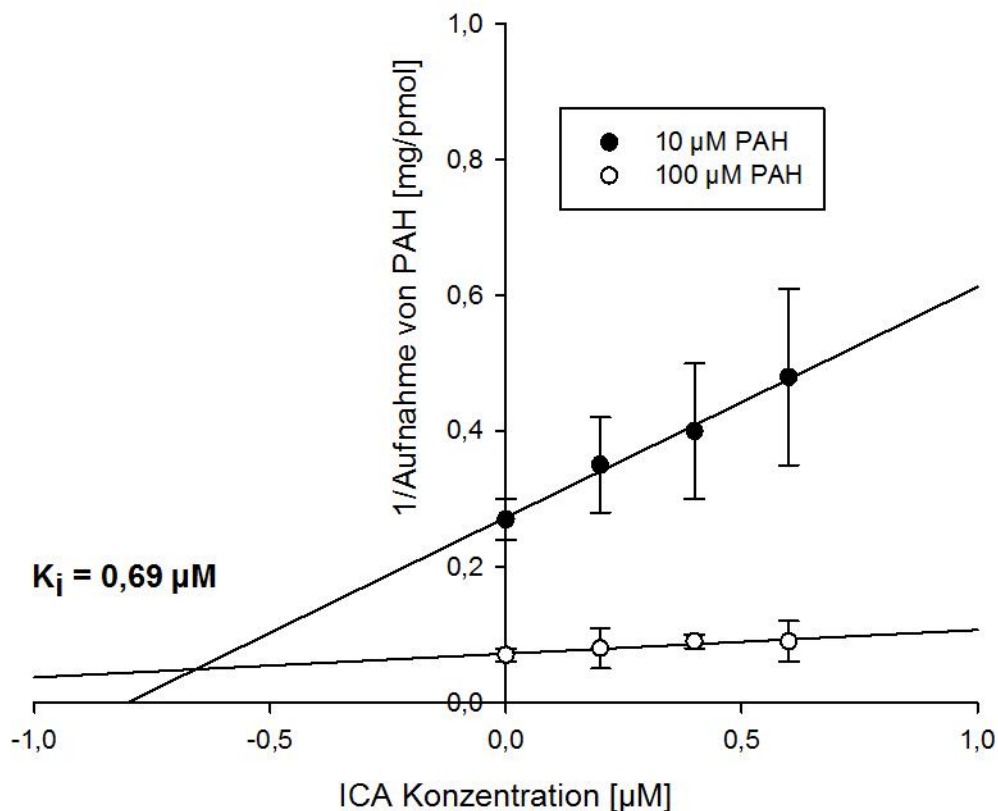




**Abbildung 3.3 Einfluss durch die Vorinkubation mit ICA auf die Aufnahme von  $[^3\text{H}]$ -PAH in OAT1- und Vektor-transfizierten HEK293-Zellen**  $0,5 \mu\text{M}$   $[^3\text{H}]$ -PAH und das ICA (gelöst in MRI plus 0,1 % DMSO) wurden in drei Parallelansätzen OAT1- und Vektor-transfizierten HEK293-Zellen für fünf Minuten nach zweistündiger Vorinkubation mit ICA und DMSO angeboten. Bei allen Experimenten wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt. **A:** Einzeldarstellung der 3 unabhängigen Versuche (V) **B:** Die einzelnen Werte stellen das arithmetische Mittel aus 3 unabhängigen Experimenten  $\pm$  SD unterschiedlicher Zellpassagen dar. Die Werte wurden jeweils auf die Kontrollbedingung des jeweiligen Experimentes mit MRI normiert. Die statistische Signifikanz liegt bei  $*p < 0,05$  beim einseitigen t-Test. n.s.: nicht signifikant.

### 3.1.4 Bestimmung des Hemmtyps zwischen PAH und ICA

Zur Bestimmung des Hemmtyps zwischen PAH und ICA wurden den Zellen zwei unterschiedliche Konzentrationen an PAH ( $0,5 \mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]-PAH plus  $9,5 \mu\text{M}$  unmarkiertes PAH und  $0,5 \mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]-PAH plus  $99,5 \mu\text{M}$  unmarkiertes PAH) angeboten und der Einfluss von  $0, 0,2, 0,4$  und  $0,6 \mu\text{M}$  ICA auf die jeweiligen [ $^3\text{H}$ ]-PAH-Aufnahmen untersucht. Die Auftragungen nach Dixon für die reziproken [ $^3\text{H}$ ]-PAH-Aufnahmen ergeben zwei Geraden unterschiedlicher Steigungen, deren Schnittpunkt oberhalb der Konzentrationsachse liegt. Dies spricht für eine kompetitive Hemmung. Aus der Lage des Schnittpunkts ergibt sich eine Inhibitorkonstante ( $K_i$ ) von  $0,69 \mu\text{M}$  (Abb. 3.4).



**Abbildung 3.4** Dixon Plot des Einflusses von ICA auf die Aufnahme von [ $^3\text{H}$ ]-PAH in OAT1- transfizierte HEK293-Zellen  $0,5 \mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]-PAH und  $9,5$  bzw.  $99,5 \mu\text{M}$  unmarkiertes PAH und das ICA in den entsprechenden Konzentrationen wurden den OAT1-transfizierten HEK293-Zellen für fünf Minuten angeboten.

## 3.2 OAT2

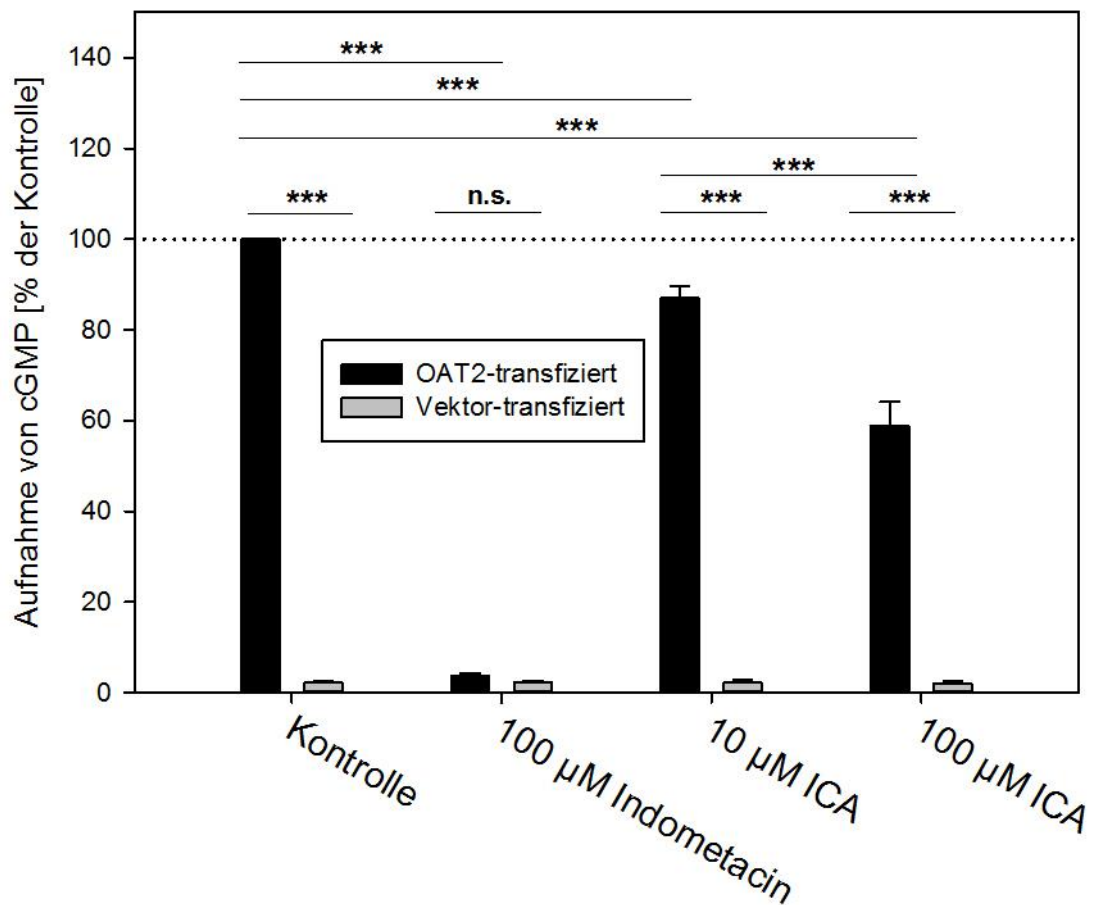
### 3.2.1 *cis*-Hemmung

Nach fünfminütiger Inkubation OAT2- bzw. pEF5-transfizierter HEK293-Zellen in 0,1  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]-cGMP und 9,9  $\mu\text{M}$  unmarkiertem cGMP gelöst in MRi betrug die Aufnahme von [ $^3\text{H}$ ]-cGMP  $1,16 \pm 0,27$  bzw.  $0,03 \pm 0,01$  pmol/mg; was einem signifikanten Unterschied entspricht. Dies entspricht einer cGMP-Akkumulation der OAT2- gegenüber den Vektor-transfizierten Zellen von  $44,21 \pm 3,88$ .

Die *cis*-Hemmung mit 100  $\mu\text{M}$  Indometacin, einem etablierten Hemmstoff des OAT2, und [ $^3\text{H}$ ]-cGMP reduzierte die [ $^3\text{H}$ ]-cGMP-Aufnahme signifikant auf  $0,04 \pm 0,003$  pmol/mg in OAT2-transfizierten HEK293-Zellen gegenüber der Kontrolle, während die [ $^3\text{H}$ ]-cGMP-Aufnahme in die pEF5-transfizierten Zellen mit  $0,02 \pm 0,003$  pmol/mg weder signifikant gegenüber den Vektor-transfizierten Kontrollen noch gegenüber den OAT2-transfizierten Zellen verändert war.

Die *cis*-Hemmung mit 10 und 100  $\mu\text{M}$  ICA jeweils in MRi gelöst erzielte [ $^3\text{H}$ ]-cGMP-Aufnahmen von  $1,02 \pm 0,26$  bzw.  $0,68 \pm 0,15$  pmol/mg. Die Werte unterschieden sich signifikant voneinander und gegenüber der Kontrolle. Die [ $^3\text{H}$ ]-cGMP-Aufnahmen in die pEF5-transfizierten HEK293-Zellen waren mit  $0,02 \pm 0,01$  und  $0,02 \pm 0,0004$  pmol/mg weder signifikant voneinander noch signifikant von der Kontrollbedingung verschieden, wohl aber signifikant von den OAT2-Werten.

Zur besseren Vergleichbarkeit sind diese Resultate normiert auf die Aufnahme von [ $^3\text{H}$ ]-cGMP der Kontrollbedingung dargestellt (Abb. 3.5).



**Abbildung 3.5 Einfluss von ICA auf die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-cGMP in OAT2- und Vektor-transfizierten HEK293-Zellen** 0,1 µM [<sup>3</sup>H]-cGMP und 9,9 µM unmarkiertes cGMP sowie die Inhibitoren in den entsprechenden Konzentrationen (gelöst in MRi plus 0,1 % DMSO) wurden in vier Parallelansätzen OAT2- und Vektor-transfizierten HEK293-Zellen für fünf Minuten angeboten. Die einzelnen Werte stellen das arithmetische Mittel aus 3 unabhängigen Experimenten ± SD unterschiedlicher Zellpassagen dar. Die Werte wurden jeweils auf die Kontrollbedingung des jeweiligen Experimentes mit MRi normiert. Bei allen Experimenten wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt. Die statistische Signifikanz liegt bei \*\*\*p<0,001 beim einseitigen t-Test. n.s.: nicht signifikant.

### 3.2.2 Halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC<sub>50</sub>)

An OAT2-transfizierten HEK293-Zellen erfolgte die Bestimmung der IC<sub>50</sub> für die Hemmung der [<sup>3</sup>H]-cGMP-Aufnahme durch ICA an drei verschiedenen Zellpassagen, wobei in den Versuchen die Konzentrationen 0, 10, 20, 50, 100, 200 und 500 µM ICA eingesetzt wurden.

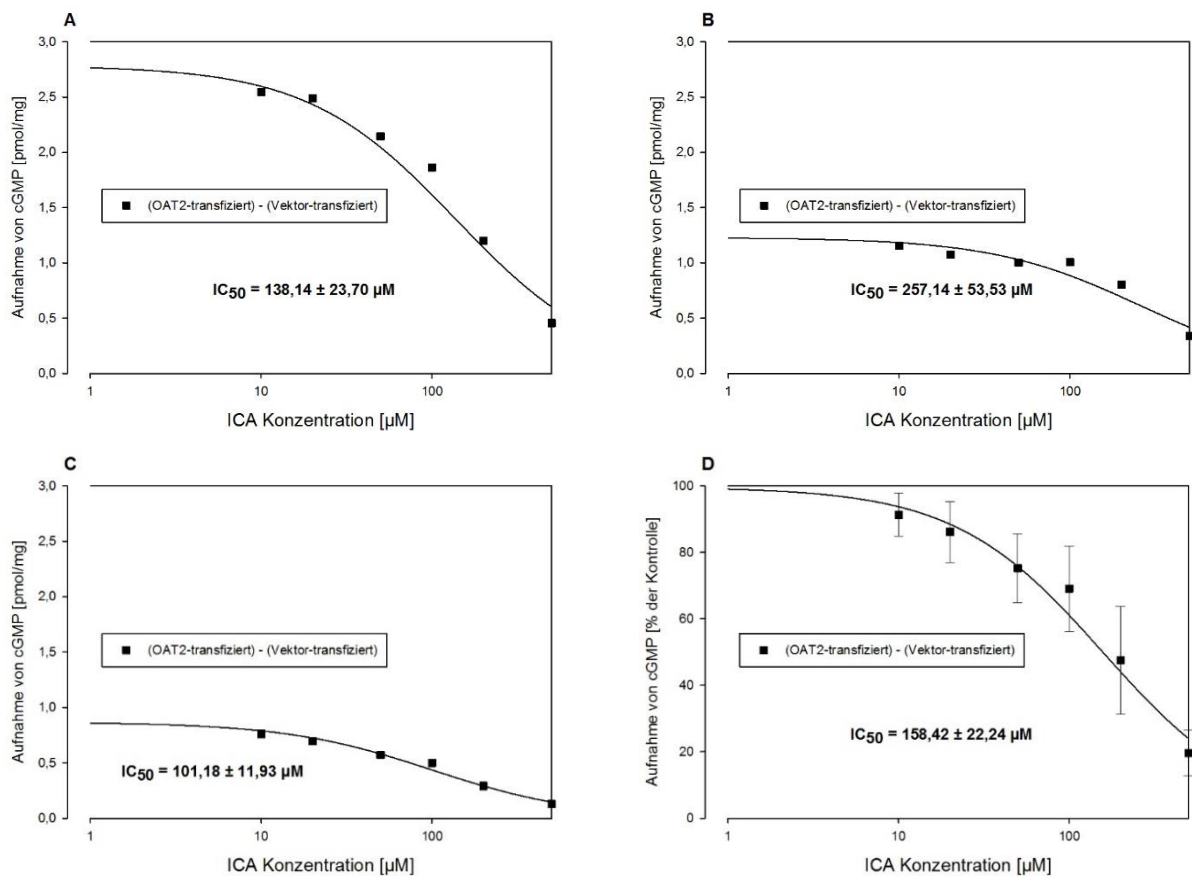
Mit steigender ICA-Konzentration fällt die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-cGMP in die Zellen relativ langsam ab, wobei bei der Konzentration von 500 µM ICA noch ein signifikant nicht hemmbarer Teil der Aufnahme von cGMP zu registrieren war. Allerdings kann man erkennen, dass sich die Werte immer weiter denen der Vektor-transfizierten Zellen annähern (Abb. 3.6). Die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-cGMP in Vektor-transfizierte HEK293-Zellen zeigte, unbeeinflusst von allen eingesetzten ICA-Konzentrationen, Werte von  $0,03 \pm 0,01$  pmol/mg.

Die IC<sub>50</sub>-Werte wurden zur besseren Veranschaulichung getrennt für die drei Versuchsdurchgänge und mit Hilfe der Gesamtheit aller Werte errechnet (Tabelle 3.3).

**Tabelle 3.3 OAT2: Hemmung der Aufnahme von cGMP durch aufsteigende Konzentrationen von ICA – Bestimmung der IC<sub>50</sub>**

Versuch 1	$138,14 \pm 23,70 \mu\text{M}$
Versuch 2	$257,14 \pm 53,53 \mu\text{M}$
Versuch 3	$101,18 \pm 11,93 \mu\text{M}$
Mittelwert $\pm$ SD aus allen Einzelmessungen	$158,42 \pm 22,24 \mu\text{M}$

Die halbmaximale inhibitorische Konzentration von ICA bei der Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-cGMP in OAT2-transfizierte Zellen nach Abzug der Werte der Vektor-transfizierten Zellen entspricht somit  $158,42 \pm 22,24 \mu\text{M}$ .



**Abbildung 3.6 Halbmaximale inhibitorische Konzentration von ICA bei der Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-cGMP in OAT2- und Vektor-transfizierten HEK293-Zellen** 0,1 µM [<sup>3</sup>H]-cGMP und 9,9 µM unmarkiertes cGMP und das ICA in den entsprechenden Konzentrationen (gelöst in MRI plus 0,05 bis 0,5 % DMSO) wurden in sieben Parallelansätzen OAT2- und Vektor-transfizierten HEK293-Zellen für fünf Minuten angeboten. Bei allen Experimenten wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt. **A-C:** Einzeldarstellung der 3 unabhängigen Versuche mit Regressionsanalyse **D:** Die einzelnen Werte stellen das arithmetische Mittel aus 3 unabhängigen Experimenten ± SD unterschiedlicher Zellpassagen dar. Die Werte wurden jeweils auf die Kontrollbedingung des jeweiligen Experimentes mit MRI normiert.

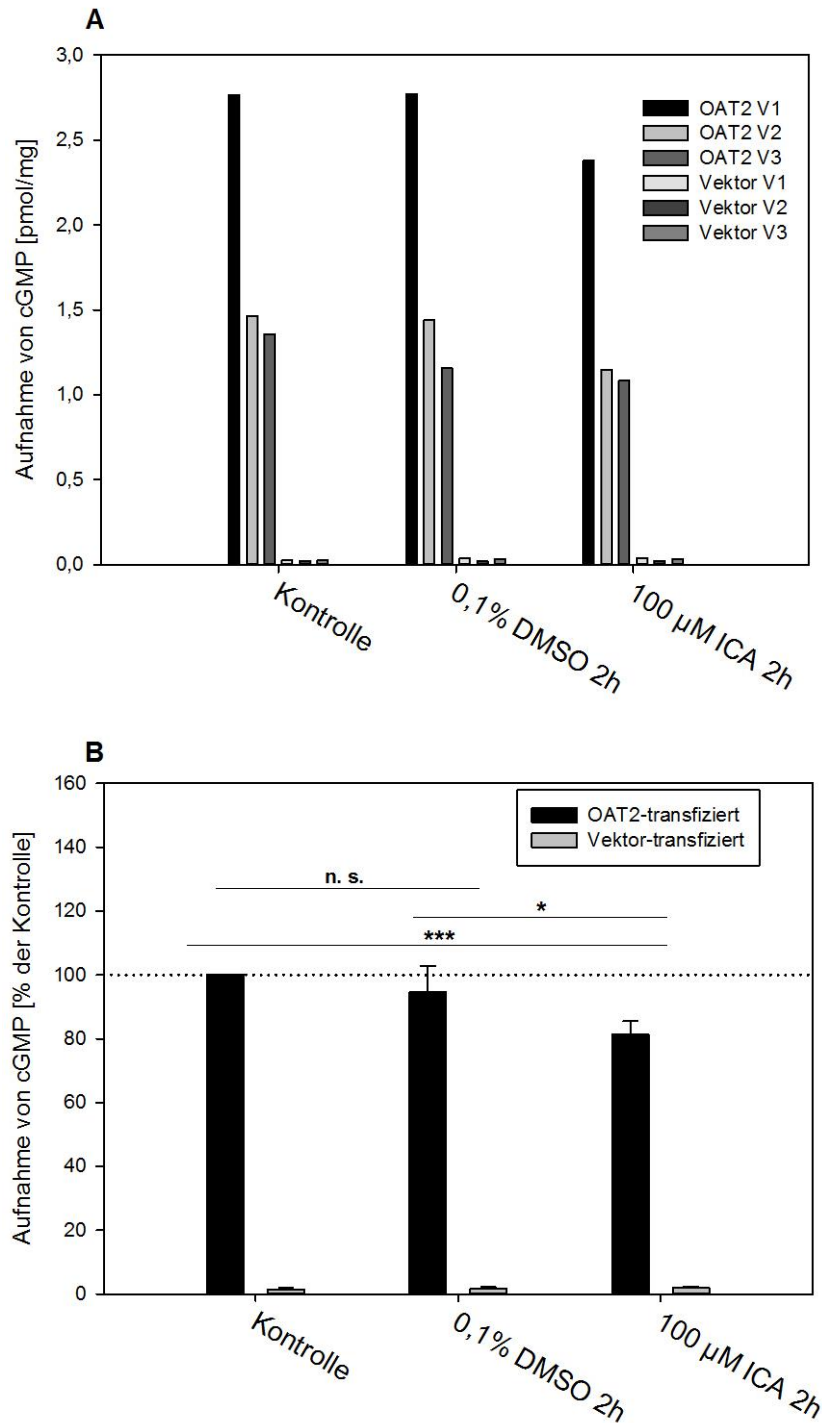
### 3.2.3 *trans*-Stimulation

Zuerst wurde getestet, ob eine zweistündige Inkubation der Zellen in 0,1 % DMSO, gelöst in MRI, einen Einfluss auf die [<sup>3</sup>H]-cGMP-Aufnahme gegenüber Bedingungen ohne DMSO hat. Während die Aufnahme von cGMP in Versuch 1 und Versuch 2 unbeeinflusst von der DMSO-Behandlung blieb, nahm im 3. Versuch die [<sup>3</sup>H]-cGMP-Aufnahme ab.

Die Applikation bzw. Vorinkubation in 100 µM ICA reduzierte die Aufnahme von cGMP signifikant gegenüber den Kontrollen ( $1,86 \pm 0,78$  vs.  $1,54 \pm 0,73$  pmol/mg) und ebenfalls signifikant gegenüber den DMSO-behandelten OAT2-transfizierten HEK293-Zellen ( $1,54 \pm 0,73$  vs.  $1,79 \pm 0,86$  pmol/mg).

In Vektor-transfizierten Zellen wurden keine Unterschiede der cGMP-Aufnahme in Bezug auf die unterschiedlichen Behandlungen verzeichnet. Die Aufnahme von cGMP lag bei allen 3 Bedingungen bei 0,03 pmol/mg.

Die Ergebnisse werden in Abbildung 3.7 noch einmal zusammengefasst dargestellt.



**Abbildung 3.7 Einfluss durch die Vorinkubation mit ICA auf die Aufnahme von  $[^3\text{H}]$ -cGMP in OAT2- und Vektor-transfizierten HEK293-Zellen** 0,1  $\mu\text{M}$   $[^3\text{H}]$ -cGMP und 9,9  $\mu\text{M}$  unmarkiertes cGMP und das ICA (gelöst in MRi plus 0,1 % DMSO) wurden in drei Parallelansätzen OAT2- und Vektor-transfizierten HEK293-Zellen für fünf Minuten nach zweistündiger Vorinkubation mit ICA und DMSO angeboten. Bei allen Experimenten wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt. **A:** Einzeldarstellung der 3 unabhängigen Versuche (V) **B:** Die einzelnen Werte stellen das arithmetische Mittel aus 3 unabhängigen Experimenten  $\pm$  SD unterschiedlicher Zellpassagen dar. Die Werte wurden jeweils auf die Kontrollbedingung des jeweiligen Experimentes mit MRi normiert. Die statistische Signifikanz liegt bei  $***p < 0,001$  und  $*p < 0,05$  beim einseitigen t-Test. n.s.: nicht signifikant.



## 3.3 OAT3

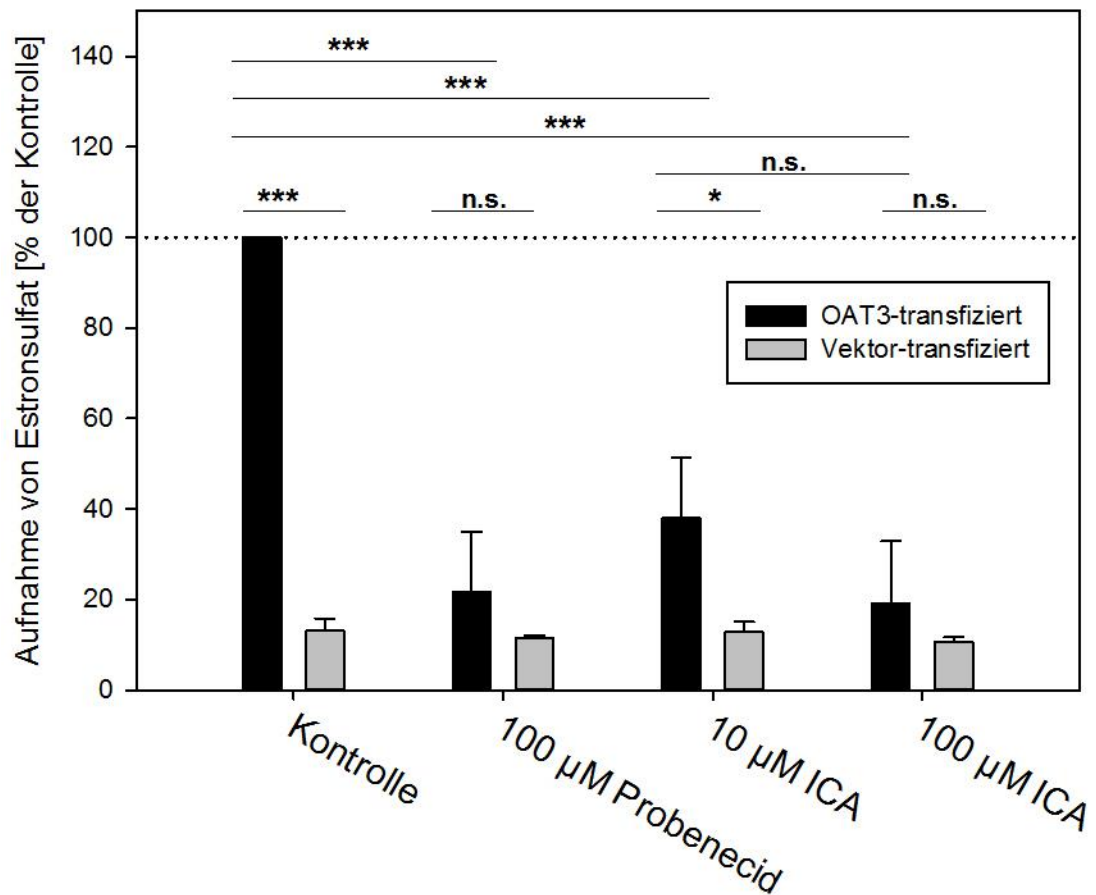
### 3.3.1 *cis*-Hemmung

Unter Kontrollbedingungen betrug die Aufnahme nach fünfminütiger Inkubation der OAT3- bzw. pcDNA5-transfizierten HEK293-Zellen mit 10 nM [<sup>3</sup>H]-ES gelöst in MRi  $0,17 \pm 0,02$  bzw.  $0,02 \pm 0,003$  pmol/mg ( $p < 0,001$ ). Dies entspricht einer ES-Akkumulation der OAT3- gegenüber den Vektor-transfizierten Zellen von  $7,85 \pm 1,53$ .

Die *cis*-Hemmung mit 100  $\mu$ M Probenecid, einem etablierten Inhibitor des OAT3, reduzierte die [<sup>3</sup>H]-ES-Aufnahme signifikant auf  $0,04 \pm 0,02$  pmol/mg in OAT3-transfizierten HEK293-Zellen gegenüber der Kontrolle, während die [<sup>3</sup>H]-ES-Aufnahme in die pcDNA5-transfizierten Zellen mit  $0,02 \pm 0,001$  pmol/mg weder signifikant gegenüber den Vektor-transfizierten Kontrollen noch gegenüber den OAT2-transfizierten Zellen verringert war.

Die *cis*-Hemmung mit 10 und 100  $\mu$ M ICA erzielte [<sup>3</sup>H]-ES-Aufnahmen von  $0,07 \pm 0,02$  bzw.  $0,03 \pm 0,02$  pmol/mg. Die Werte sind zwar signifikant gegenüber der Kontrolle verringert, allerdings unterscheiden sie sich nicht signifikant voneinander. Die [<sup>3</sup>H]-ES-Aufnahmen in die Vektor-transfizierten HEK293-Zellen waren mit  $0,02 \pm 0,002$  und  $0,02 \pm 0,0004$  pmol/mg weder signifikant voneinander noch signifikant von der Kontrollbedingung verschieden. Bei 10  $\mu$ M ICA ließ sich noch ein signifikanter Unterschied zwischen OAT3- und Vektor-transfizierten Zellen feststellen, wohingegen die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-ES bei 100  $\mu$ M ICA bei OAT3- und pcDNA5-transfizierten Zellen nicht signifikant verschieden war.

Zur besseren Vergleichbarkeit sind die eben beschriebenen Resultate normiert auf die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-ES der Kontrollbedingung dargestellt (Abb. 3.8).



**Abbildung 3.8 Einfluss von ICA auf die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-ES in OAT3- und Vektor-transfizierten HEK293-Zellen** 10 nM [<sup>3</sup>H]-ES und die Inhibitoren in den entsprechenden Konzentrationen (gelöst in MRi plus 0,1 % DMSO) wurden in vier Parallelansätzen OAT3- und Vektor-transfizierten HEK293-Zellen für fünf Minuten angeboten. Die einzelnen Werte stellen das arithmetische Mittel aus 3 unabhängigen Experimenten ± SD unterschiedlicher Zellpassagen dar. Die Werte wurden jeweils auf die Kontrollbedingung des jeweiligen Experimentes mit MRi normiert. Bei allen Experimenten wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt. Die statistische Signifikanz liegt bei \*\*\* $p < 0,001$  und \* $p < 0,05$  beim einseitigen t-Test. n.s.: nicht signifikant.

### 3.3.2 Halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC<sub>50</sub>)

An OAT3-transfizierten HEK293-Zellen erfolgte die Bestimmung der IC<sub>50</sub> für die Hemmung der [<sup>3</sup>H]-ES-Aufnahme durch ICA an drei verschiedenen Zellpassagen, wobei in den Versuchen 0, 0,5, 1, 5, 10, 50 und 100 µM ICA eingesetzt wurden.

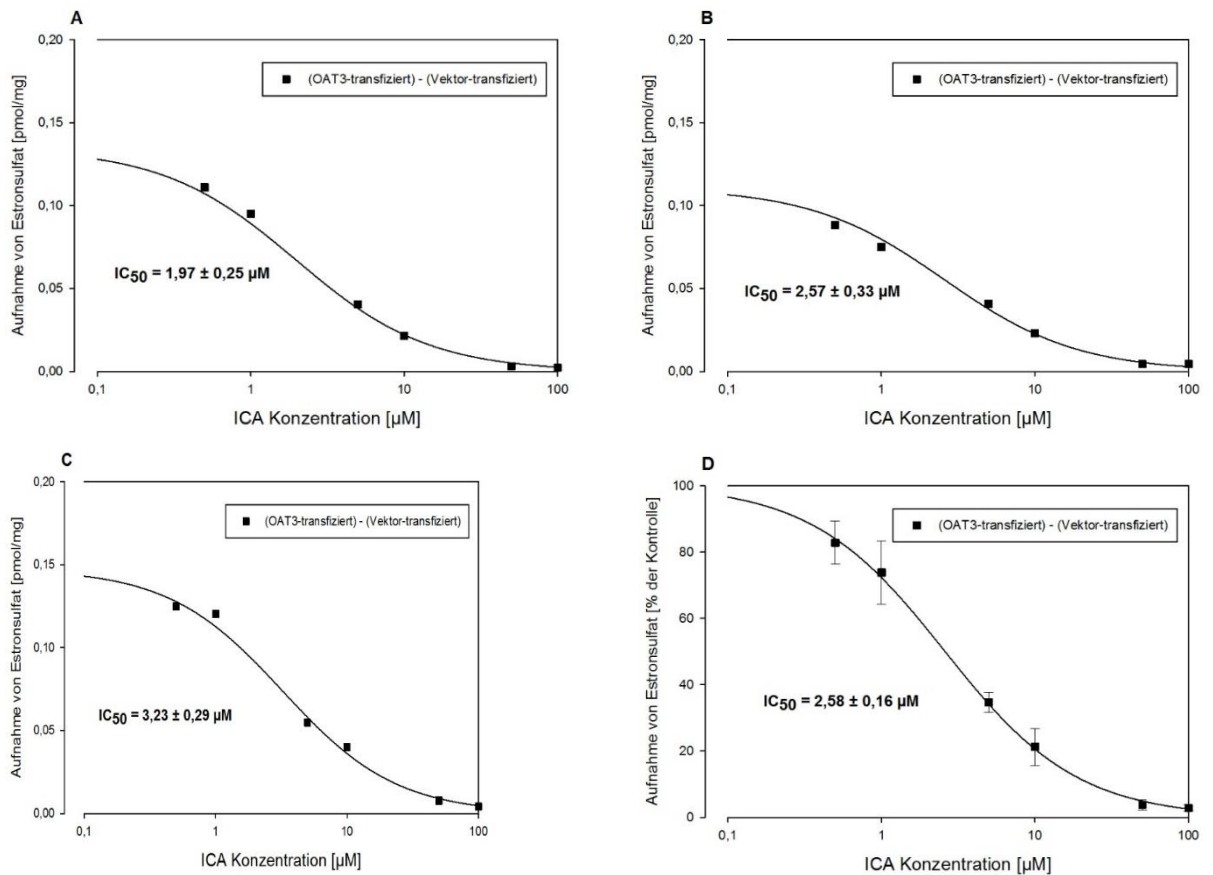
Die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-ES in die Zellen wird durch aufsteigende Konzentrationen an ICA reduziert. Ab ICA-Konzentrationen >50 µM entspricht die an OAT3-transfizierten HEK293-Zellen gemessene Aufnahme von ES der in Vektor-transfizierten Aufnahme von 0,03 pmol/mg.

Die IC<sub>50</sub>-Werte wurden zur besseren Veranschaulichung getrennt für die drei Versuchsdurchgänge und mit Hilfe der Gesamtheit aller Werte errechnet (Tabelle 3.4).

**Tabelle 3.4 OAT3: Hemmung der Aufnahme von ES durch aufsteigende Konzentrationen von ICA – Bestimmung der IC<sub>50</sub>**

Versuch 1	1,97 ± 0,25 µM
Versuch 2	2,57 ± 0,33 µM
Versuch 3	3,23 ± 0,29 µM
Mittelwert ± SD aus allen Einzelmessungen	2,58 ± 0,16 µM

Somit liegt die IC<sub>50</sub>-Konzentration von ICA bei der Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-Estronsulfat in OAT2-transfizierte Zellen nach Abzug der Werte der Vektor-transfizierten Zellen bei 2,58 ± 0,16 µM (Abb. 3.9).



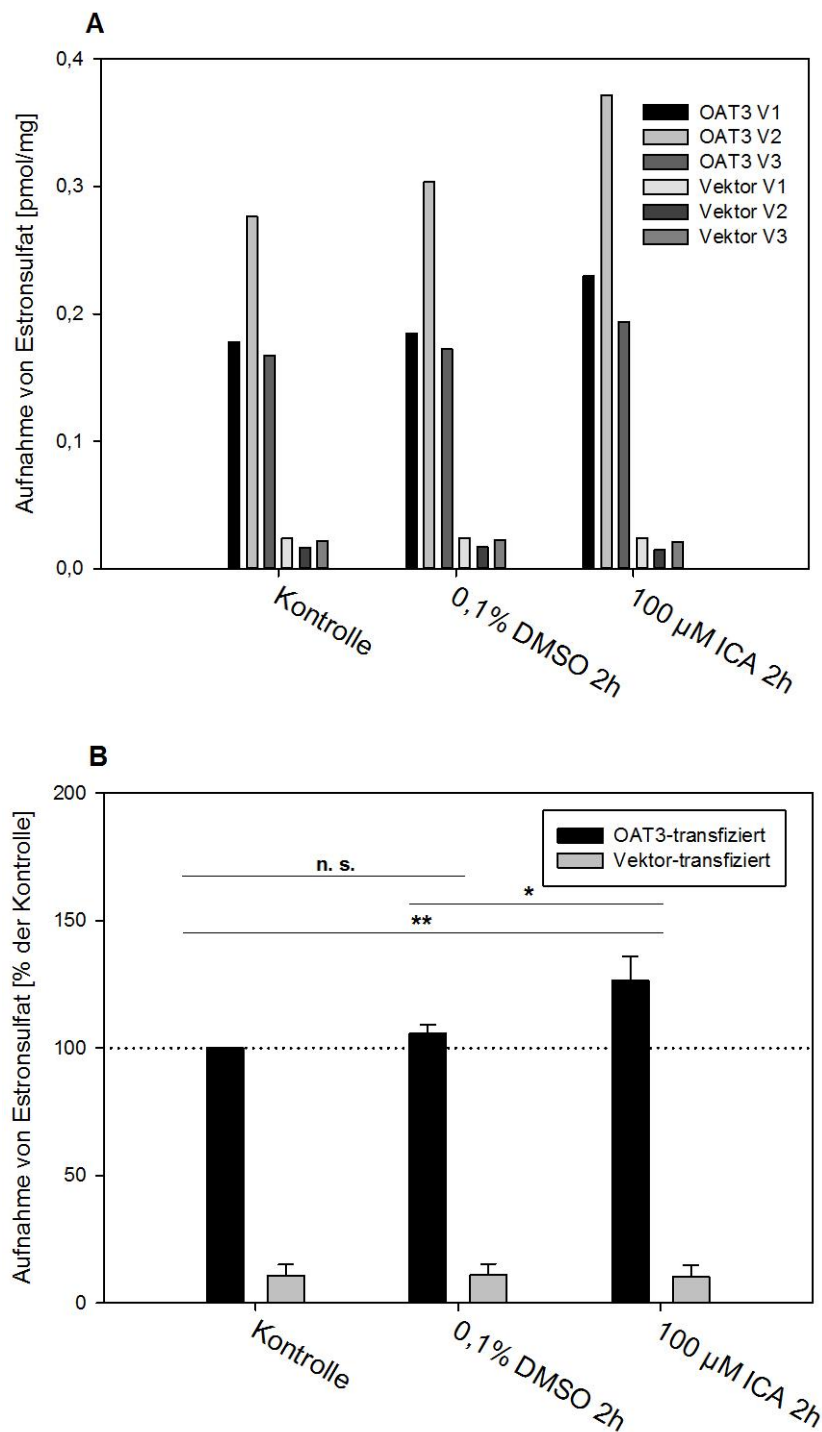
**Abbildung 3.9 Bestimmung der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration von ICA bei der Aufnahme von [ $^3\text{H}$ ]-ES in OAT3- und Vektor-transfizierten HEK293-Zellen** 10 nM [ $^3\text{H}$ ]-ES und das ICA in den entsprechenden Konzentrationen (gelöst in MRi plus 0,05 bis 0,1 % DMSO) wurden in sieben Parallelansätzen OAT3- und Vektor-transfizierten HEK293-Zellen für fünf Minuten angeboten. Bei allen Experimenten wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt. **A-C:** Einzeldarstellung der 3 unabhängigen Versuche mit Regressionsanalyse **D:** Die einzelnen Werte stellen das arithmetische Mittel aus 3 unabhängigen Experimenten  $\pm$  SD unterschiedlicher Zellpassagen dar. Die Werte wurden jeweils auf die Kontrollbedingung des jeweiligen Experimentes mit MRi normiert.

### 3.3.3 *trans*-Stimulation

Diejenigen OAT3-transfizierten HEK293-Zellen, die für zwei Stunden in 0,1 % DMSO, gelöst in MRI, inkubiert wurden, zeigten eine Aufnahme von ES von  $0,22 \pm 0,07$  pmol/mg. Diese ES-Aufnahme unterschied sich nicht signifikant von der ES-Aufnahme, die in Abwesenheit von DMSO gemessen wurde:  $0,21 \pm 0,06$  pmol/mg.

Die *trans*-Stimulation mit der Vorinkubation von 100  $\mu$ M ICA zeigte bei den OAT3-transfizierten Zellen eine signifikant erhöhte [<sup>3</sup>H]-ES-Aufnahme von  $0,26 \pm 0,09$  pmol/mg gegenüber der Kontrolle. Die Aufnahme der pcDNA5-transfizierten Zellen war mit  $0,02 \pm 0,005$  pmol/mg signifikant gegenüber den Werten der OAT3-transfizierten Zellen verringert, nicht aber gegenüber der Kontrolle.

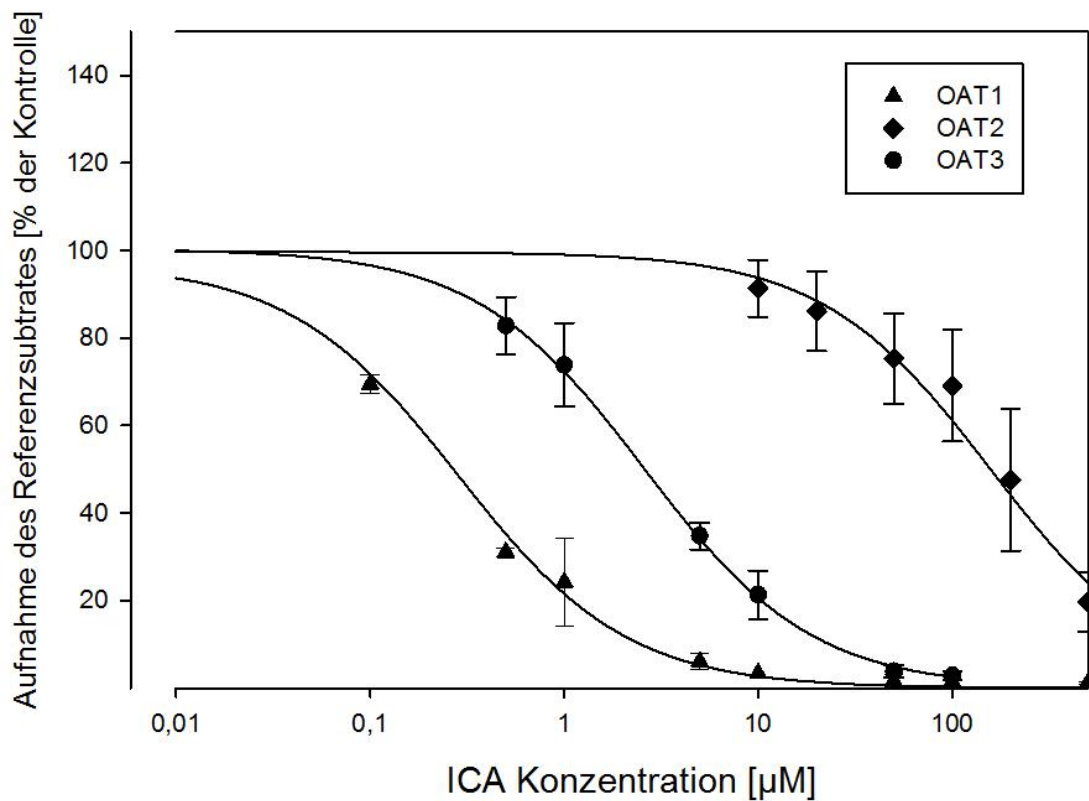
Alle Werte sind in Abbildung 3.10 B noch einmal zusammengefasst und in Abbildung 3.10 A einzeln dargestellt.



**Abbildung 3.10 Einfluss durch die Vorinkubation mit ICA auf die Aufnahme von  $[^3\text{H}]$ -ES in OAT3- und Vektor-transfizierten HEK293-Zellen**  $10 \text{ nM } [^3\text{H}]$ -ES und  $100 \mu\text{M}$  ICA (gelöst in MRI plus 0,1 % DMSO) wurden in drei Parallelansätzen OAT3- und Vektor-transfizierten HEK293-Zellen für fünf Minuten nach zweistündiger Vorinkubation mit ICA und DMSO angeboten. Bei allen Experimenten wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt. **A:** Einzeldarstellung der 3 unabhängigen Versuche (V) **B:** Die einzelnen Werte stellen das arithmetische Mittel aus 3 unabhängigen Experimenten  $\pm$  SD unterschiedlicher Zellpassagen dar. Die Werte wurden jeweils auf die Kontrollbedingung des jeweiligen Experimentes mit MRI normiert. Die statistische Signifikanz liegt bei  $**p < 0,01$  und  $*p < 0,05$  beim einseitigen t-Test. n.s.: nicht signifikant.

### 3.4 Zusammenfassung der IC<sub>50</sub> vom OAT1, OAT2 und OAT3

Um die unterschiedlichen Sensitivitäten der Organischen Anionen-Transporter 1, 2 und 3 in Bezug auf ICA hervorzuheben, werden die Daten aus Abb. 3.2 D, 3.6 D und 3.9 D noch einmal in der Abbildung 3.11 zusammengefasst.



**Abbildung 3.11 Halbmaximale inhibitorische Konzentration von ICA bei der Aufnahme des jeweiligen Substrats bei OAT1-, 2- und 3-transfizierten HEK293-Zellen**  
Die Abbildung stellt eine Zusammenfassung der Abbildungen 3.2 D, 3.6 D und 3.9 D dar. Deutlich ersichtlich sind die unterschiedlichen Sensitivitäten der einzelnen OATs gegenüber ICA. Als Referenzsubstrate wurden eingesetzt: PAH (OAT1), cGMP (OAT2) und ES (OAT3).

## 3.5 OAT4

### 3.5.1 *cis*-Hemmung

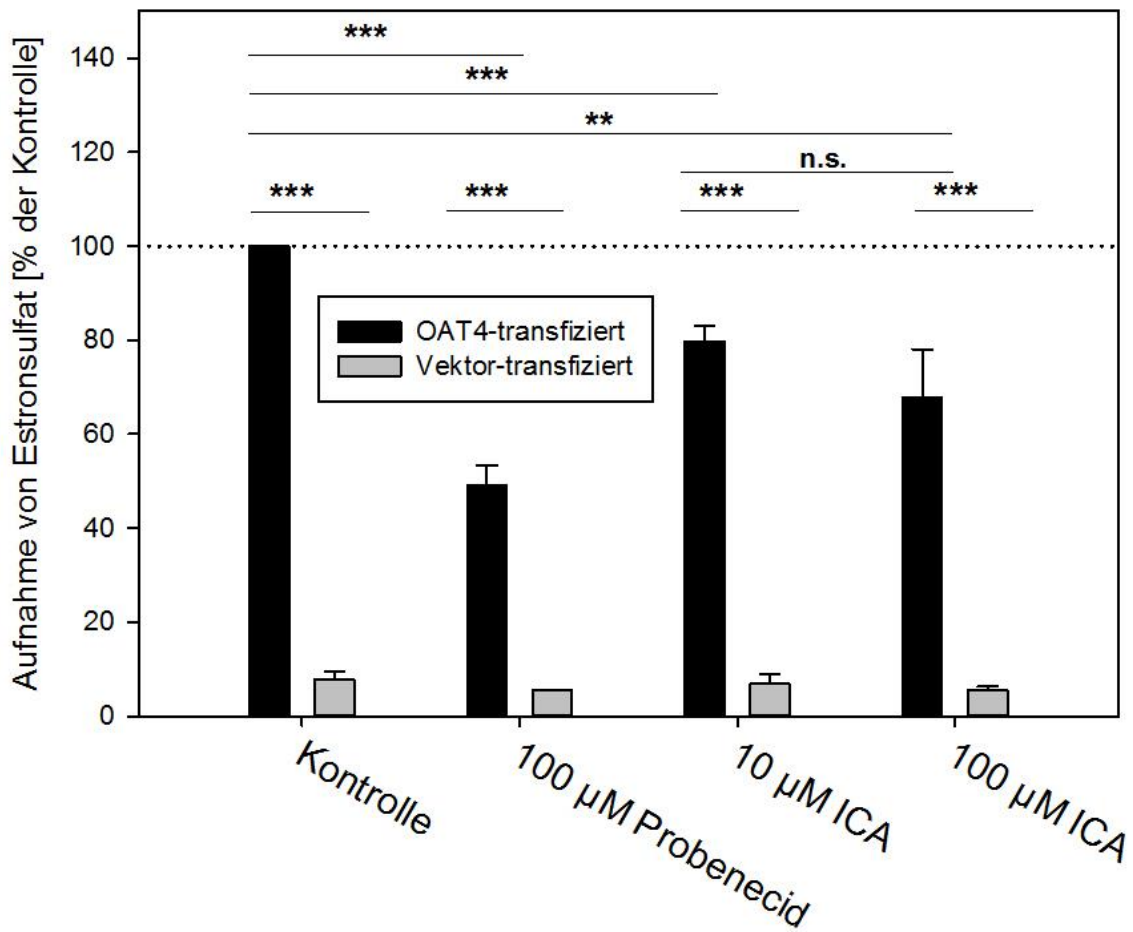
Bei der Kontrollbedingung betrug die Aufnahme nach fünfminütiger Inkubation der OAT4- bzw. pcDNA5-transfizierten HEK293-Zellen mit 10 nM [<sup>3</sup>H]-ES gelöst in MRi  $0,26 \pm 0,01$  bzw.  $0,02 \pm 0,01$  pmol/mg; was einem signifikanten Unterschied entspricht. Dies entspricht einer ES-Akkumulation der OAT4- gegenüber den Vektor-transfizierten Zellen von  $13,06 \pm 2,87$ .

Die simultane Applikation von 100  $\mu$ M Probenecid, einem Hemmstoff des OAT4, und [<sup>3</sup>H]-ES reduzierte die [<sup>3</sup>H]-ES-Aufnahme signifikant auf  $0,13 \pm 0,01$  pmol/mg in OAT4-transfizierten Zellen gegenüber den Kontrollen, während die [<sup>3</sup>H]-ES-Aufnahme in die pcDNA5-transfizierten Zellen mit  $0,01 \pm 0,001$  pmol/mg sich zwar nicht signifikant gegenüber den Vektor-transfizierten Kontrollen unterschied, wohl aber gegenüber den OAT4-transfizierten Zellen.

Die Applikation von 10 oder 100  $\mu$ M ICA bedingte [<sup>3</sup>H]-ES-Aufnahmen von  $0,21 \pm 0,002$  bzw.  $0,18 \pm 0,03$  pmol/mg. Die Werte sind zwar signifikant gegenüber der Kontrolle ( $0,26 \pm 0,01$  pmol/mg) verringert, allerdings unterscheiden sie sich nicht signifikant voneinander. Die [<sup>3</sup>H]-ES-Aufnahmen in die Vektor-transfizierten HEK293-Zellen waren mit  $0,02 \pm 0,01$  und  $0,01 \pm 0,002$  pmol/mg weder signifikant voneinander noch signifikant von der Kontrollbedingung verschieden. Die Aufnahmen von [<sup>3</sup>H]-ES unterschieden sich signifikant bei 10 sowie 100  $\mu$ M ICA von denen bei den OAT4-transfizierten Zellen.

Zur besseren Vergleichbarkeit sind die eben beschriebenen Resultate normiert auf die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-ES der Kontrollbedingung in Abwesenheit eines Hemmstoffes dargestellt (Abb. 3.12).





**Abbildung 3.12 Einfluss von ICA auf die Aufnahme von  $[^3\text{H}]$ -ES in OAT4- und Vektor-transfizierten HEK293-Zellen** 10 nM  $[^3\text{H}]$ -ES und die Inhibitoren in den entsprechenden Konzentrationen (gelöst in MRi plus 0,1 % DMSO) wurden in vier Parallelansätzen OAT4- und Vektor-transfizierten HEK293-Zellen für fünf Minuten angeboten. Die einzelnen Werte stellen das arithmetische Mittel aus 3 unabhängigen Experimenten  $\pm$  SD unterschiedlicher Zellpassagen dar. Die Werte wurden jeweils auf die Kontrollbedingung des jeweiligen Experimentes mit MRi normiert. Bei allen Experimenten wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt. Die statistische Signifikanz liegt bei  $***p < 0,001$  und  $**p < 0,01$  beim einseitigen t-Test. n.s.: nicht signifikant.

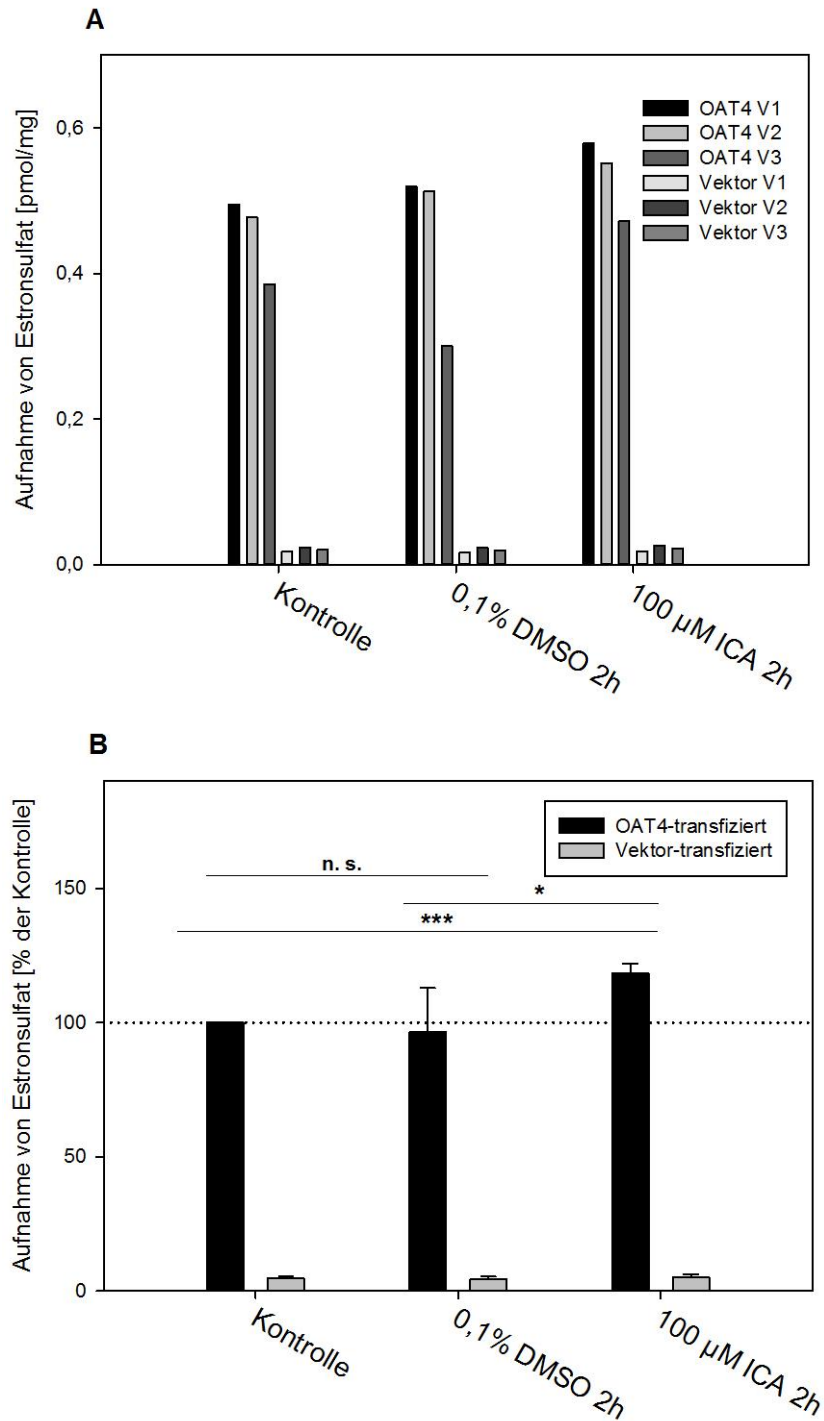
### 3.5.2 *trans*-Stimulation

Nach der fünfminütigen Inkubation ohne zweistündige Vorinkubation der OAT4- und Vektor-transfizierten HEK293-Zellen mit 10 nM [<sup>3</sup>H]-ES gelöst in MRi kam es jeweils zur [<sup>3</sup>H]-ES-Aufnahme von  $0,45 \pm 0,06$  pmol/mg bzw.  $0,02 \pm 0,003$  pmol/mg, was einem signifikanten Unterschied entspricht.

Mit dem 0,1 % DMSO gelöst im Nährmedium wurden die Zellen zuerst für zwei Stunden vorinkubiert, um danach die signifikant unterschiedlichen [<sup>3</sup>H]-ES Aufnahmen in die OAT4- und Vektor-transfizierten Zellen von  $0,44 \pm 0,12$  und  $0,02 \pm 0,004$  pmol/mg zu messen. Weder die Werte der OAT4- noch der Vektor-transfizierten HEK293-Zellen unterschieden sich von denen der Kontrollbedingung.

Die Vorinkubation mit 100 µM ICA für zwei Stunden der HEK293-Zellen zeigte eine signifikant erhöhte [<sup>3</sup>H]-ES-Aufnahme von  $0,53 \pm 0,06$  pmol/mg gegenüber der Kontrolle. Die Aufnahme der pcDNA5-transfizierten Zellen war mit  $0,02 \pm 0,004$  pmol/mg signifikant gegenüber den Werten der OAT4-transfizierten Zellen verringert, nicht aber gegenüber der Kontrolle.

Zur Veranschaulichung wurden die Ergebnisse in Abb. 3.13 einmal als Einzelexperimente dargestellt und zur besseren Vergleichbarkeit nochmals normiert auf die jeweilige [<sup>3</sup>H]-ES-Aufnahme der Kontrolle abgebildet.



**Abbildung 3.13 Einfluss durch die Vorinkubation mit ICA auf die Aufnahme von  $[^3\text{H}]$ -ES in OAT4- und Vektor-transfizierten HEK293-Zellen** 10 nM  $[^3\text{H}]$ -ES und das ICA (gelöst in MRI plus 0,1 % DMSO) wurden in drei Parallelansätzen OAT4- und Vektor-transfizierten HEK293-Zellen für fünf Minuten nach zweistündiger Vorinkubation mit ICA und DMSO angeboten. Bei allen Experimenten wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt. **A:** Einzeldarstellung der 3 unabhängigen Versuche (V) **B:** Die einzelnen Werte stellen das arithmetische Mittel aus 3 unabhängigen Experimenten  $\pm$  SD unterschiedlicher Zellpassagen dar. Die Werte wurden jeweils auf die Kontrollbedingung des jeweiligen Experimentes mit MRI normiert. Die statistische Signifikanz liegt bei  $***p < 0,001$  und  $*p < 0,05$  beim einseitigen t-Test. n.s.: nicht signifikant.

## 4. Diskussion

In den folgenden Abschnitten sollen die erzielten Ergebnisse und die eingesetzten Techniken kritisch beleuchtet werden. Am Anfang stehen Bemerkungen zu den Limitierungen der Versuchsdurchführung, anschließend werden die Ergebnisse im Hinblick auf die der zur Verfügung stehende Literatur diskutiert. Im dritten Abschnitt wird auf eine mögliche klinische Bedeutung Bezug genommen.

### 4.1 Limitationen der Methodik

Um die einzelnen Ergebnisse besser miteinander vergleichen zu können, wurden viele Ergebnisse normiert und nicht als Absolutwerte dargestellt. Die Normierung erfolgt durch Mitführen eines Ansatzes, der ausschließlich der Proteinbestimmung diene. Dadurch können mögliche Unterschiede im Auszählen der Zellen bei der Aussaat und dem Wachsen bis zur Subkonfluenz, wenn nicht ganz ausgeschlossen, so doch minimiert werden. Die Zellen wurden für 72 h in Kultur gehalten, um dann das Experiment durchzuführen. In dieser Zeit sollten die Zellen zur Subkonfluenz heranwachsen. Die Subkonfluenz wurde optisch kontrolliert, welches großen interindividuellen Schwankungen unterliegt.

Versuche, bei denen Substrat und möglicher Hemmstoff gemeinsam in einem *Well* angeboten werden, werden als *cis*-Inhibitionsversuche bezeichnet. Da die Inkubationszeit für die Aufnahme des radioaktiv markierten Substrats in Ab- und Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von ICA immer fünf Minuten betrug, blieben die Zellen auf dem Boden des *Wells* während dieser Zeit haften, sodass bei vorsichtiger Behandlung keine Zellen mit abgesaugt wurden. Erfahrungen des Labors haben gezeigt, dass zumindest bei kurzzeitigen Inkubationen DMSO-Konzentrationen <1% keinen Einfluss auf die Aufnahme des Referenzsubstrats haben. In der Literatur werden diese DMSO-Konzentrationen ebenfalls als unbedenklich gesehen (Brouwer et al. 2013). In *trans*-Stimulationsexperimenten, in denen die Zellen für zwei Stunden teilweise in DMSO-haltigem MRi in Ab- und Anwesenheit von ICA inkubiert wurden, erscheint ein Ablösen der Zellen vom Boden des *Wells* durchaus gegeben. Diese Zellen werden möglicherweise nach Beendigung der Aufnahme des radioaktiv markierten Substrats mit abgesaugt, sodass Abweichungen in den Proteingehalten der einzelnen Ansätze die Folge sind.

Um die Ergebnisse mehrerer Versuche miteinander vergleichen zu können, wurde die Aufnahme des für die OATs jeweiligen Referenzsubstrats in Abwesenheit des PHD-Hemmstoffes ICA zu 100% gesetzt. Dies ermöglicht den Vergleich der unterschiedlichen Zellpassagen eines OATs nicht nur untereinander, sondern auch den Vergleich der Ergebnisse unterschiedlicher OATs untereinander (siehe Abb. 3.11). Dies ist von Bedeutung, da die Aufnahmen der Referenzsubstrate gegenüber dem jeweiligen Vektor für OAT1, OAT2, OAT3 und OAT4 sehr unterschiedlich sind (Akkumulation des Referenzsubstrats der OAT- gegenüber den Vektor-transfizierten Zellen: OAT1 ( $49,04 \pm 13,69$ ), OAT2 ( $44,21 \pm 3,88$ ), OAT3 ( $7,85 \pm 1,53$ ) und OAT4 ( $13,06 \pm 2,87$ )).

Der Einfluss endogener Transporter der Zellen konnte durch das Mitführen ausschließlich mit dem leeren Vektor transfizierter Zellen minimiert werden. Es erscheint sehr unwahrscheinlich, dass durch die Gabe des ICA oder die sonstige Behandlung der Zellen ein für den jeweiligen stabil-transfizierten OAT spezieller Ko-Faktor aktiviert oder supprimiert wird, der die Aufnahme des Referenzsubstrats beeinflussen könnte.

## 4.2 Interaktionen zwischen ICA und den OATs

Es existieren nur wenige Publikationen, die sich mit dem Transport von PHD-Inhibitoren in ihre Zielzellen oder der renalen Ausscheidung befassen (Hagos et al. 2012; Schley et al. 2012). Hagos und Mitarbeiter (Hagos et al. 2012) identifizierten die PHD-Inhibitoren *N-oxalylglycine* (NOG) und *pyridine-2,4-dicarboxylic acid* (PDCA) als mögliche Substrate von OAT1 und OAT4, wobei OAT1 für die Aufnahme in die proximale Tubuluszelle und OAT4 für die Abgabe in den Urin verantwortlich ist.

### 4.2.1 Qualitative und quantitative Hemmbarkeit

Bei allen untersuchten OATs wurde die Aufnahme der radioaktiv markierten Standardsubstrate PAH, cGMP und ES gemessen. Als Kontrollen dienten Ansätze, bei denen die Zellen lediglich mit MRi inklusive der radioaktiv markierten Substanz beschickt wurden. Die unter diesen Bedingungen gemessene Aufnahme von PAH, cGMP und ES wurde jeweils zu 100% gesetzt. In einem zweiten Ansatz wurde den Zellen zusätzlich ein für den jeweiligen Transporter etablierter Inhibitor hinzugefügt. Dies war Probenecid für OAT1, OAT3 und OAT4 und Indometacin für OAT2. Dies erlaubte, bei gleicher Konzentration der Inhibitoren, die

Potenz des ICA gegenüber dem Standardinhibitor zu bestimmen. Die entsprechenden Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.1, 3.5, 3.8 und 3.12 dargestellt. Bei einer Interaktion des Hemmstoffs mit dem Transporter geht man von einer Abnahme der Aufnahme des Referenzsubstrats aus, d.h. insgesamt wird deutlich weniger Radioaktivität in die Zelle aufgenommen. Bei allen vier Transportern wurde sowohl durch die Gabe der klassischen Inhibitoren Probenecid und Indometacin als auch durch ICA die Aufnahme des Referenzsubstrats signifikant reduziert (\*\*\* $p < 0.001$ ).

An OAT1-transfizierten HEK293-Zellen reduzierte die Gabe von 10 und 100  $\mu\text{M}$  ICA die Aufnahme von PAH auf  $5,20 \pm 1,12$  % bzw.  $4,40 \pm 0,94$  % des Ausgangswertes. Dies lässt darauf schließen, dass ICA ein hoch potenter Inhibitor der Aufnahme von PAH am OAT1 ist. Diese Annahme wurde durch sich anschließende Messungen der  $\text{IC}_{50}$  bestätigt. Diese betrug  $0,29 \pm 0,05$   $\mu\text{M}$ . Die  $\text{IC}_{50}$  stuft einen Hemmstoff nur hinsichtlich seiner Potenz ein, macht aber keine Aussage über die Art der Hemmung. Da der OAT1 sehr sensitiv auf ICA reagiert, wurde eine Dixon-Plot-Analyse herangezogen. Hierüber ließ sich eine  $K_i$  zu  $0,69$   $\mu\text{M}$  bestimmen. Die Lage des Schnittpunkts der beiden reziproken Aufnahmen identifizierte ICA als kompetitiven Hemmstoff.

Im Gegensatz zu OAT1 war an OAT3-transfizierten HEK293-Zellen die Aufnahme von ES durch 10  $\mu\text{M}$  ICA auf  $38,01 \pm 13,36$  % und bei 100  $\mu\text{M}$  ICA auf  $19,12 \pm 13,86$  % des Ausgangswerts reduziert. Die gemessene  $\text{IC}_{50}$  betrug  $2,58 \pm 0,16$   $\mu\text{M}$ .

Der OAT2 bzw. die Aufnahme von cGMP über den OAT2 zeigt eine deutlich geringere Sensitivität gegenüber ICA, als bei OAT1 und OAT3 beobachtet. So beträgt die Hemmung der cGMP-Aufnahme bei 10  $\mu\text{M}$  ICA nur  $12,89 \pm 2,48$  % und bei 100  $\mu\text{M}$  ICA  $41,21 \pm 5,41$  %. Zwar ist der Unterschied zwischen den beiden Konzentrationen mit \*\*\* $p < 0.001$  signifikant, allerdings spielt dies bei der geringen Hemmbarkeit keine relevante Rolle. Entsprechend hoch ist auch die  $\text{IC}_{50}$ , die zu  $158,42 \pm 22,24$   $\mu\text{M}$  bestimmt wurde.

Beim OAT4 wurde eine Hemmung der ES-Aufnahme beobachtet, die allerdings geringer als beim OAT1 und OAT3 und höher als beim OAT2 ausfiel. Die Reduktion der ES-Aufnahme betrug bei 10  $\mu\text{M}$   $20,21 \pm 3,23$  % (\*\*\* $p < 0.001$ ) und bei 100  $\mu\text{M}$   $32,28 \pm 10,37$  % (\*\* $p < 0.01$ ) gegenüber dem Ausgangswert. Diese Werte besitzen eine limitierte Aussagekraft, da der

OAT4 (siehe Abb. 1.3) in unterschiedlichen *In*- und *Efflux*-Modi arbeiten kann und hauptsächlich organische Anionen aus der Zelle in das Tubuluslumen transportiert. Die hier beschriebenen *cis*-Inhibitionsexperimente setzen das Vorliegen von ICA im Primärharn voraus, das aufgrund der Proteinbindung von ICA unwahrscheinlich erscheint. Aus diesem Grund wurde auch auf eine Bestimmung der  $IC_{50}$  verzichtet.

Somit kann man festhalten, dass sowohl OAT1 als auch OAT3 eine starke Interaktion mit ICA aufweisen, da ihre  $IC_{50}$ -Werte sehr niedrig sind. Gegenüber den bisher getesteten PHD-Inhibitoren NOG und PDCA besitzt der OAT1 mit einer  $IC_{50}$  von  $0,29 \pm 0,05 \mu\text{M}$  eine deutlich höhere Sensitivität gegenüber der Aufnahme von PAH als NOG mit einer  $IC_{50}$  von  $79,6 \pm 10,2 \mu\text{M}$  und PDCA mit einer  $IC_{50}$  von  $19,1 \pm 6,1 \mu\text{M}$  (Hagos et al. 2012).

#### 4.2.2 Stimulation

Kompetitive Hemmung und niedrige  $IC_{50}$ -Werte einer Substanz legen den Transport dieser Substanz über den entsprechenden Transporter nahe, beweisen aber keinen Transport. Da ICA nicht radioaktiv markiert zur Verfügung stand, wurden *trans*-Stimulationsexperimente gewählt, um einen Transport von ICA über einen oder mehrere OATs nachzuweisen. Die entsprechenden Experimente sind in den Abbildungen 3.3, 3.7, 3.10 und 3.13 dargestellt. In *trans*-Stimulationsexperimenten wird die interessierende Substanz den Zellen über eine sinnvoll gewählte Inkubationszeit im Medium angeboten. Man geht davon aus, dass in dieser Zeit genügend Substanz – in den hier durchgeführten Experimenten ICA – in die Zellen aufgenommen wird. Nach Beendigung der Inkubationszeit wird die Substanz aus dem Medium entfernt und das radioaktiv markierte Referenzsubstrat angeboten. Dies wird unter der Annahme, dass es sich bei dem Transporter um einen Austauscher handelt, verstärkt in die Zelle aufgenommen. Für OAT1 und OAT3 heißt das beispielsweise: Nach der Vorinkubation mit ICA wird nun mehr PAH bzw. ES aufgenommen, da das vorbeladene ICA die Zelle im Austausch gegen PAH bzw. ES verlässt. Zellen, die nur einer Inkubation mit MRi ausgesetzt waren, werden weniger PAH bzw. ES aufnehmen, da das Austauschion fehlt.

Eine signifikant gesteigerte ES-Aufnahme nach Vorinkubation mit ICA konnte nur beim OAT3 beobachtet werden. Erfolgt eine Normierung auf die Kontrollbedingungen (100%), so stieg die Aufnahme von ES nach zweistündiger Inkubation der Zellen in 100  $\mu$ M ICA auf  $126,66 \pm 9,28$  % an (\*\* $p < 0.01$ ). ICA konnte demnach als Substrat des OAT3 identifiziert werden. In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen konnte für OAT1-transfizierte HEK293-Zellen nach zweistündiger Inkubation mit ICA nur eine Stimulation der Aufnahme von PAH von 100% unter Kontrollbedingungen auf  $103,18 \pm 7,78$  % nach Behandlung mit ICA detektiert werden. Zusätzliche Versuche der Arbeitsgruppe mit einer modifizierten Technik konnten einen Transport von ICA über OAT1 nachweisen (Schulz et al. 2015). In diesen Versuchen wurden die Zellen mit radioaktiv-markiertem PAH inkubiert und der *Efflux* von PAH, d.h. der Gehalt der Zellen an radioaktiv-markiertem PAH als Funktion der Zeit in Ab- und Anwesenheit von ICA registriert. Der intrazelluläre PAH-Gehalt nahm in Anwesenheit von ICA deutlich schneller als in Abwesenheit von ICA ab, was für einen PAH-ICA Austausch spricht. Das von mir gewählte Zeitfenster für die Aufnahme von PAH scheint nicht optimal gewählt worden zu sein.

Für OAT2 fielen die *trans*-Stimulationsexperimente negativ aus, d.h. die Inkubation mit ICA reduzierte die Aufnahme von cGMP statt sie zu stimulieren. Sie fiel von 100% unter Kontrollbedingungen auf  $81,37 \pm 4,17$  % nach ICA Inkubation ab. Im Gegensatz dazu stieg nach Inkubation der OAT4-transfizierten HEK293-Zellen in ICA die Aufnahme von ES signifikant (\*\* $p < 0.001$ ) auf  $118,30 \pm 3,79$  % an. Diese Versuche bedürfen weitere Klärung, da die Transportmodi des OAT4 noch nicht hinreichend bekannt sind.

Aus diesen Versuchen kann geschlossen werden, dass OAT1, OAT3 und OAT4 ICA als Substrat akzeptieren. Für weitere PHD-Inhibitoren, NOG und PDCA (Hagos et al. 2012), konnte von der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass sie Substrate des OAT1 und OAT4 sind und nach Transport über diese Transporter in der Lage sind, HIF-1 $\alpha$  zu aktivieren.

### 4.3 Klinische Überlegungen

Im Tiermodell konnte mit dem PHD-Inhibitor ICA gezeigt werden, dass es bei Ischämie-Reperfusionversuchen an Rattennieren bei vorheriger Gabe von ICA zur Hochregulierung von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  kam und so ein nephro- bzw. ischämieprotektiver Effekt erzielt werden konnte (Wang et al. 2012). Klinische Studien bestätigten diesen Effekt (Philipp et



al. 2006; Rabinowitz 2013; Selvaraju et al. 2014). In einer anderen Studie (Bernhardt et al. 2010) wurden insgesamt 18 Probanden untersucht, denen ICA per os verabreicht wurde. Ein Drittel hiervon waren gesunde Testpersonen. Die übrigen zwei Drittel teilten sich jeweils auf Hämodialysepatienten mit und ohne Nieren auf. In allen drei Probandenpopulationen konnte eine EPO Erhöhung nachgewiesen werden, welches den möglichen therapeutischen Nutzen von ICA belegt (Bernhardt et al. 2010). In der klinischen Anwendung könnte das bedeuten, dass man bei Patienten, bei denen ein Nierenversagen möglich erscheint, durch vorausschauende Gaben von ICA oder einem anderen PHD-Inhibitor einen nephroprotektiven Effekt erzielt.

In der Studie von Bernhardt et al. (2010) wurden Plasmakonzentrationen ( $C_{max}$ ) von ICA von  $179,0 \pm 31,0$   $\mu\text{g/ml}$  gemessen. Hieraus errechnet sich eine ICA-Plasmakonzentration von 3-5  $\mu\text{M}$  (Schulz et al. 2015). Die in dieser Dissertation ermittelten  $IC_{50}$ -Werte für die Hemmung der OAT1-vermittelten PAH- und der OAT3-vermittelten ES-Aufnahme von  $0,29 \pm 0,05$   $\mu\text{M}$  respektive  $2,58 \pm 0,16$   $\mu\text{M}$ , liegen im Bereich dieser Plasmakonzentrationen und lassen eine Interaktion in vivo sowohl mit OAT1 als auch mit OAT3 möglich erscheinen. Zusätzlich konnte in dieser Dissertationsschrift gezeigt werden, dass ICA über OAT3 transloziert werden kann und damit auf intrazelluläre PHDs wirken kann (Chowdhury et al. 2013; Hong et al. 2014).

Viele Patienten erhalten mehrere Medikamente gleichzeitig, die sich in ihren Wirkungen addieren oder antagonisieren können. Da OAT1 und OAT3 mit sehr vielen Medikamenten höchst affin interagieren (Burckhardt und Burckhardt 2011; VanWert et al. 2010), sind Medikamenteninteraktionen (*Drug-Drug-Interactions* (DDIs)) zu erwarten (Yin und Wang 2016). In Tabelle 4.1 werden einige ausgewählte Medikamente beschrieben (Burckhardt und Burckhardt 2011), die mit den OATs interagieren. Besonders relevant sind Substanzen, die eine ähnliche  $IC_{50}$ , unter der Annahme ungefähr gleicher Plasmakonzentrationen, am OAT1 und OAT3 aufweisen, da es so zu DDIs kommen kann. Der Transport des ICA über den OAT3 könnte eingeschränkt sein, wenn bereits ein anderes Medikament den OAT3 hemmt. Oder ICA selbst hemmt den OAT1, über den dann kein anderes Medikament mehr transportiert werden kann. Es gibt Überlegungen von Hillgren et al. (2013), die besagen, dass, wenn die nicht an Protein-gebundene sogenannte freie Konzentration eines Medikaments mindestens ein Zehntel der  $IC_{50}$  beträgt, DDIs sehr wahrscheinlich sind (Hillgren et al. 2013).

**Tabelle 4.1 Medikamenteninteraktionen beim OAT1 und OAT3**

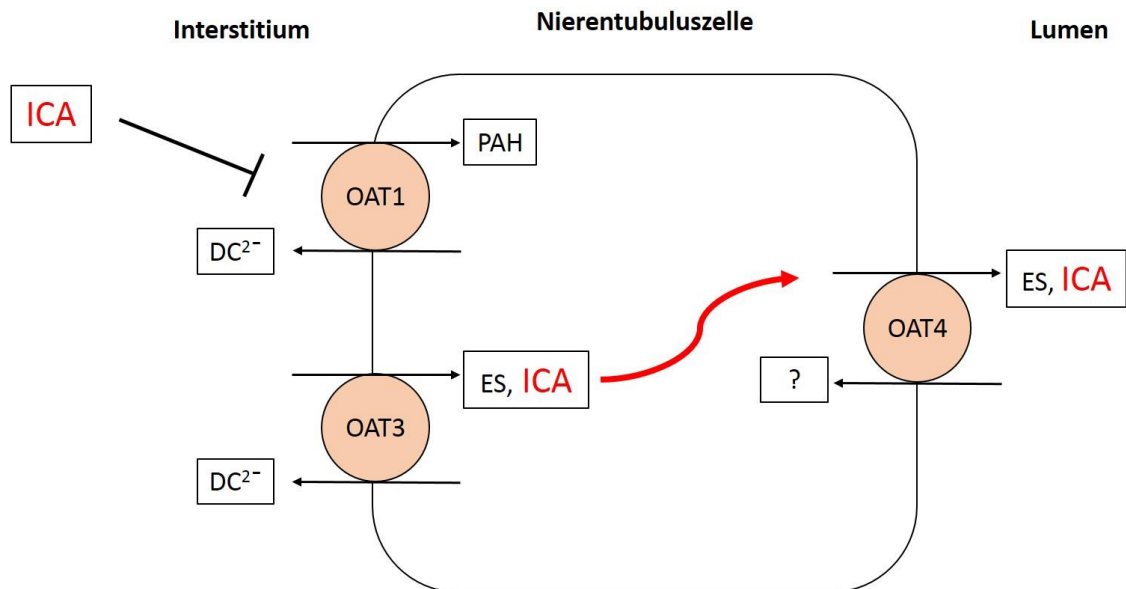
(Burckhardt und Burckhardt 2011)

Transporter	Medikament	IC <sub>50</sub>
OAT1	Adefovir	17,2 – 30,0 µM
OAT1	Acetylsalicylsäure	769 µM
OAT1	Indometacin	3,0 – 6,72 µM
OAT1	Furosemid	14 – 20 µM
OAT1	Probenecid	3,9 – 12,5 µM
OAT1	Valsartan	16 µM
OAT3	Acetylsalicylsäure	717 µM
OAT3	Indometacin	0,61 – 0,979 µM
OAT3	Furosemid	1,7 – 7,31 µM
OAT3	Valsartan	0,2 µM

Ein Ergebnis dieser Arbeit war der Nachweis eines Transports von ICA über OAT4. In der proximalen Tubuluszelle würde das bedeuten, dass das über OAT3 in die Zelle aufgenommene ICA über OAT4 in den Primärharn zur Ausscheidung abgegeben werden könnte. Zur Verstärkung der nephroprotektiven Wirkung von ICA, d.h. einer Verlängerung der Verweildauer in der Zelle, müsste der ICA-Efflux über OAT4 gehemmt werden. Ein Hemmstoff für OAT4 ist Probenecid, welches allerdings auch den Transport von Pharmaka über OAT1 und OAT3 hemmt (Cihlar et al. 1999; Ho et al. 2000; Mulato et al. 2000; Uwai et al. 2000). Hier sind weitere Untersuchungen nötig, die auch mögliche weitere Transportwege von ICA in den proximalen Tubuluszellen inkludieren.

Die erhöhte Gefahr von DDIs könnte bedeuten, dass nicht alle verabreichten Pharmaka ihren Wirkort erreichen oder dass ihre Ausscheidung reduziert ist und sich höhere Plasmakonzentrationen als erwünscht einstellen. Hier müsste eine Anpassung der einzunehmenden Dosis geschehen. Da ICA nicht nur i.v., sondern auch per os verabreicht werden kann, könnten auch Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes zu veränderten Plasmakonzentrationen führen, zumal nicht geklärt ist, wie ICA über den Darm aufgenommen wird.

Abschließend sollen die Erkenntnisse dieser Arbeit in Abb. 4.1 zusammengefasst werden, in der die renale Ausscheidung von ICA skizziert wird. Dabei wird ICA über den OAT3 in die proximale Tubuluszelle aufgenommen und dann über den OAT4 in das Lumen sezerniert, wobei nicht klar ist, welcher der verschiedenen Transportmodi des OAT4 genutzt wird. Der Austausch von extrazellulärem PAH und intrazellulärem Dicarboxylat mittels des OAT1 wird durch ICA gehemmt.



**Abbildung 4.1 Renale Ausscheidung von ICA** ICA wird über den OAT3 in die proximale Tubuluszelle aufgenommen und über den OAT4 wieder in das Lumen abgegeben. Der OAT1 wird durch ICA gehemmt. Weitere Erklärungen folgen im Text. DC<sup>2-</sup>, Dicarboxylat (eigene Abbildung)

#### 4.4 Ausblick

Die OATs wechselwirken mit vielen Medikamenten und transportieren eine breite Palette an strukturell unterschiedlichen Pharmaka (VanWert et al. 2010; Morrissey et al. 2013). In neuerer Zeit finden sich Arbeiten, die eine Interaktion der OATs mit in Nahrungsmitteln vorhandenen Stoffen wie Bestandteilen des grünen Tees, der Kaffeesäure, Flavonoiden und anderen (Albassam und Markowitz 2017; Hong et al. 2015; Peng et al. 2015; Uwai et al. 2011; Wang und Sweet 2013) beschreiben. Diese möglichen *Drug-Food-Interactions* werden in Zukunft eine immer größere Rolle bei der Verabreichung von Medikamenten spielen.

Vor diesem Hintergrund erscheint es wichtig, die Substratspezifität aller Transporter umfassend zu untersuchen. Hierzu erschienen Publikationen (Giacomini et al. 2010; Giacomini und Huang 2013). Unter den in diesen Publikationen zur Testung neuer Pharmaka vorgeschlagenen Transportern befinden sich auch OAT1 und 3 (Hillgren et al. 2013).

Wie im vorherigen Kapitel schon angeklungen, wäre es wünschenswert, die Verweildauer des ICA in der proximalen Tubuluszelle durch Blockade des OAT4 zu verlängern. Hierzu wäre es wichtig, alle Transporter, über die ICA aus der Zelle geschleust werden kann, zu identifizieren und für die Transporter gut verträgliche und effiziente Hemmstoffe zu entwickeln.

## 5. Zusammenfassung

In dieser Dissertationsarbeit wurden Interaktionen zwischen den stabil in HEK293-Zellen transfizierten OATs 1 bis 4 mit einem Hemmstoff der PHD, dem ICA, untersucht. Relevant ist diese Substanz, weil über eine Hemmung der PHD HIF hochreguliert werden kann und so ein nephroprotektiver Effekt bei Hypoxie erzielt werden kann.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

- In OAT1-transfizierten HEK293-Zellen wurde die Aufnahme des Referenzsubstrats PAH durch ICA signifikant gehemmt. In *trans*-Stimulationsversuchen konnte jedoch nach Vorinkubation der Zellen mit ICA keine erhöhte Aufnahme von PAH nachgewiesen werden; ICA ist nur ein Hemmstoff, aber kein Substrat des OAT1.
- Die Aufnahme von ES über den OAT3 wird signifikant durch ICA gehemmt. In *trans*-Stimulationsversuchen kann nach Vorinkubation der Zellen mit ICA eine erhöhte Aufnahme von ES detektiert werden. ICA ist sowohl ein Hemmstoff als auch ein Substrat des OAT3.
- Interaktionen von ICA mit OAT2 sind marginal und müssen aufgrund der geringen Affinität von ICA zum OAT2 sehr wahrscheinlich nicht weiter berücksichtigt werden.
- Die Aufnahme von ES über den OAT4 wird nur geringfügig, aber signifikant durch ICA gehemmt. *trans*-Stimulationsversuche zeigen nach Vorinkubation der Zellen mit ICA eine erhöhte Aufnahme von ES, sodass anzunehmen ist, dass ICA ein Substrat des OAT4 ist.
- Für die renale Ausscheidung von ICA ergibt sich folgendes Schema: ICA wird über OAT3 in die proximale Tubuluszelle aufgenommen und über OAT4 in das Lumen zur Ausscheidung abgegeben. Die Aufnahme von OAT1-Substraten kann durch ICA aufgrund möglicher *Drug-Drug*- oder *Drug-Food*-Wechselwirkungen beeinflusst werden.

**Teile dieser Dissertationsarbeit wurden bereits im Rahmen einer Erstautorenschaft veröffentlicht:**

Schulz K, Hagos Y, Burckhardt G, Schley G, Burzlaff N, Willam C, Burckhardt BC (2015): The Isoquinolone Derived Prolyl Hydroxylase Inhibitor ICA Is a Potent Substrate of the Organic Anion Transporters 1 and 3. *Nephron* 131, 285–289

## 6. Literaturverzeichnis

- Albassam AA, Markowitz JS (2017): An Appraisal of Drug-Drug Interactions with Green Tea (*Camellia sinensis*). *Planta Med* 83, 496–508
- Augustine LM, Markelewicz RJ, JR, Boekelheide K, Cherrington NJ (2005): Xenobiotic and endobiotic transporter mRNA expression in the blood-testis barrier. *Drug Metab Dispos* 33, 182–189
- Babu E, Takeda M, Narikawa S, Kobayashi Y, Enomoto A, Tojo A, Cha SH, Sekine T, Sakthisekaran D, Endou H (2002): Role of human organic anion transporter 4 in the transport of ochratoxin A. *Biochim Biophys Acta* 1590, 64–75
- Bahn A, Prawitt D, Buttler D, Reid G, Enklaar T, Wolff NA, Ebbinghaus C, Hillemann A, Schulten HJ, Gunawan B (2000): Genomic structure and in vivo expression of the human organic anion transporter 1 (hOAT1) gene. *Biochem Biophys Res Commun* 275, 623–630
- Bahn A, Ljubojevic M, Lorenz H, Schultz C, Ghebremedhin E, Ugele B, Sabolic I, Burckhardt G, Hagos Y (2005): Murine renal organic anion transporters mOAT1 and mOAT3 facilitate the transport of neuroactive tryptophan metabolites. *Am J Physiol Cell Physiol* 289, C1075-84
- Bernhardt WM, Wiesener MS, Scigalla P, Chou J, Schmieder RE, Gunzler V, Eckardt K (2010): Inhibition of prolyl hydroxylases increases erythropoietin production in ESRD. *J Am Soc Nephrol* 21, 2151–2156
- Berra E, Benizri E, Ginouves A, Volmat V, Roux D, Pouyssegur J (2003): HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. *EMBO J* 22, 4082–4090
- Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248–254
- Breljak D, Ljubojevic M, Hagos Y, Micek V, Balen Eror D, Vrhovac Madunic I, Brzica H, Karaica D, Radovic N, Kraus O (2016): Distribution of organic anion transporters NaDC3 and OAT1-3 along the human nephron. *Am J Physiol Renal Physiol* 311, F227-38
- Brouwer KLR, Keppler D, Hoffmaster KA, Bow DAJ, Cheng Y, Lai Y, Palm JE, Stieger B, Evers R (2013): In vitro methods to support transporter evaluation in drug discovery and development. *Clin Pharmacol Ther* 94, 95–112
- Burckhardt G (2012): Drug transport by Organic Anion Transporters (OATs). *Pharmacol Ther* 136, 106–130
- Burckhardt G, Burckhardt BC (2011): In vitro and in vivo evidence of the importance of organic anion transporters (OATs) in drug therapy. *Handb Exp Pharmacol* 201, 29–104

- Cha SH, Sekine T, Kusuhara H, Yu E, Kim JY, Kim DK, Sugiyama Y, Kanai Y, Endou H (2000): Molecular cloning and characterization of multispecific organic anion transporter 4 expressed in the placenta. *J Biol Chem* 275, 4507–4512
- Cha SH, Sekine T, Fukushima JI, Kanai Y, Kobayashi Y, Goya T, Endou H (2001): Identification and characterization of human organic anion transporter 3 expressing predominantly in the kidney. *Mol Pharmacol* 59, 1277–1286
- Cheng Y, Vapurcuyan A, Shahidullah M, Aleksunes LM, Pelis RM (2012): Expression of organic anion transporter 2 in the human kidney and its potential role in the tubular secretion of guanine-containing antiviral drugs. *Drug Metab Dispos* 40, 617–624
- Chowdhury R, Candela-Lena JI, Chan MC, Greenald DJ, Yeoh KK, Tian Y, McDonough MA, Tumber A, Rose NR, Conejo-Garcia A (2013): Selective small molecule probes for the hypoxia-inducible factor (HIF) prolyl hydroxylases. *ACS Chem Biol* 8, 1488–1496
- Cihlar T, Lin DC, Pritchard JB, Fuller MD, Mendel DB, Sweet DH (1999): The antiviral nucleotide analogs cidofovir and adefovir are novel substrates for human and rat renal organic anion transporter 1. *Mol Pharmacol* 56, 570–580
- Cropp CD, Komori T, Shima JE, Urban TJ, Yee SW, More SS, Giacomini KM (2008): Organic anion transporter 2 (SLC22A7) is a facilitative transporter of cGMP. *Mol Pharmacol* 73, 1151–1158
- Ekaratanawong S, Anzai N, Jutabha P, Miyazaki H, Noshiro R, Takeda M, Kanai Y, Sophasan S, Endou H (2004): Human organic anion transporter 4 is a renal apical organic anion/dicarboxylate exchanger in the proximal tubules. *J Pharmacol Sci* 94, 297–304
- Franke K, Gassmann M, Wielockx B (2013): Erythrocytosis: the HIF pathway in control. *Blood* 122, 1122–1128
- Giacomini KM, Huang S (2013): Transporters in drug development and clinical pharmacology. *Clin Pharmacol Ther* 94, 3–9
- Giacomini KM, Huang S, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KLR, Chu X, Dahlin A, Evers R, Fischer V, Hillgren KM (2010): Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov* 9, 215–236
- Hagos Y, Stein D, Ugele B, Burckhardt G, Bahn A (2007): Human renal organic anion transporter 4 operates as an asymmetric urate transporter. *J Am Soc Nephrol* 18, 430–439
- Hagos Y, Schley G, Schodel J, Krick W, Burckhardt G, Willam C, Burckhardt BC (2012): alpha-Ketoglutarate-related inhibitors of HIF prolyl hydroxylases are substrates of renal organic anion transporters 1 (OAT1) and 4 (OAT4). *Pflugers Arch* 464, 367–374



- Hasegawa M, Kusuhara H, Sugiyama D, Ito K, Ueda S, Endou H, Sugiyama Y (2002): Functional involvement of rat organic anion transporter 3 (rOat3; Slc22a8) in the renal uptake of organic anions. *J Pharmacol Exp Ther* 300, 746–753
- Henjakovic M, Hagos Y, Krick W, Burckhardt G, Burckhardt BC (2015): Human organic anion transporter 2 is distinct from organic anion transporters 1 and 3 with respect to transport function. *Am J Physiol Renal Physiol* 309, F843-F851
- Hilgendorf C, Ahlin G, Seithel A, Artursson P, Ungell A, Karlsson J (2007): Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines. *Drug Metab Dispos* 35, 1333–1340
- Hillgren KM, Keppler D, Zur AA, Giacomini KM, Stieger B, Cass CE, Zhang L (2013): Emerging transporters of clinical importance: an update from the International Transporter Consortium. *Clin Pharmacol Ther* 94, 52–63
- Ho ES, Lin DC, Mendel DB, Cihlar T (2000): Cytotoxicity of antiviral nucleotides adefovir and cidofovir is induced by the expression of human renal organic anion transporter 1. *J Am Soc Nephrol* 11, 383–393
- Hong Y, Yang S, Nam M, Koo Y, Lee K (2015): Caffeic acid inhibits the uptake of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) by inducing the efflux transporters expression in Caco-2 cells. *Biol Pharm Bull* 38, 201–207
- Hong YR, Kim HT, Ro S, Cho JM, Lee SH, Kim IS, Jung YH (2014): Discovery of novel 2-(3-hydroxy-pyridin-2-yl)-thiazol-4-yl-acetamide derivatives as HIF prolyl 4-hydroxylase inhibitors; SAR, synthesis and modeling evaluation. *Bioorg Med Chem Lett* 24, 3142–3145
- Hosoyamada M, Sekine T, Kanai Y, Endou H (1999): Molecular cloning and functional expression of a multispecific organic anion transporter from human kidney. *Am J Physiol* 276, F122-F128
- Koepsell H (2013): The SLC22 family with transporters of organic cations, anions and zwitterions. *Mol Aspects Med* 34, 413–435
- Kojima R, Sekine T, Kawachi M, Cha SH, Suzuki Y, Endou H (2002): Immunolocalization of multispecific organic anion transporters, OAT1, OAT2, and OAT3, in rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 13, 848–857
- Kusuhara H, Sekine T, Utsunomiya-Tate N, Tsuda M, Kojima R, Cha SH, Sugiyama Y, Kanai Y, Endou H (1999): Molecular cloning and characterization of a new multispecific organic anion transporter from rat brain. *J Biol Chem* 274, 13675–13680
- Lopez-Nieto CE, You G, Bush KT, Barros EJ, Beier DR, Nigam SK (1997): Molecular cloning and characterization of NKT, a gene product related to the organic cation transporter family that is almost exclusively expressed in the kidney. *J Biol Chem* 272, 6471–6478

- Lu R, Chan BS, Schuster VL (1999): Cloning of the human kidney PAH transporter: narrow substrate specificity and regulation by protein kinase C. *Am J Physiol* 276, F295-F303
- Maynard MA, Qi H, Chung J, Lee EHL, Kondo Y, Hara S, Conaway RC, Conaway JW, Ohh M (2003): Multiple splice variants of the human HIF-3 alpha locus are targets of the von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase complex. *J Biol Chem* 278, 11032–11040
- Mole DR, Blancher C, Copley RR, Pollard PJ, Gleadle JM, Ragoussis J, Ratcliffe PJ (2009): Genome-wide association of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha DNA binding with expression profiling of hypoxia-inducible transcripts. *J Biol Chem* 284, 16767–16775
- Morrissey KM, Stocker SL, Wittwer MB, Xu L, Giacomini KM (2013): Renal transporters in drug development. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 53, 503–529
- Motohashi H, Sakurai Y, Saito H, Masuda S, Urakami Y, Goto M, Fukatsu A, Ogawa O, Inui K (2002): Gene expression levels and immunolocalization of organic ion transporters in the human kidney. *J Am Soc Nephrol* 13, 866–874
- Mulato AS, Ho ES, Cihlar T (2000): Nonsteroidal anti-inflammatory drugs efficiently reduce the transport and cytotoxicity of adefovir mediated by the human renal organic anion transporter 1. *J Pharmacol Exp Ther* 295, 10–15
- Mylyharju J (2013): Prolyl 4-hydroxylases, master regulators of the hypoxia response. *Acta Physiol (Oxf)* 208, 148–165
- Nishimura M, Naito S (2005): Tissue-specific mRNA expression profiles of human ATP-binding cassette and solute carrier transporter superfamilies. *Drug Metab Pharmacokinet* 20, 452–477
- Pelis RM, Wright SH (2011): Renal transport of organic anions and cations. *Compr Physiol* 1, 1795–1835
- Peng Y, Sweet DH, Lin S, Yu C, Lee Chao P, Hou Y (2015): Green tea inhibited the elimination of nephro-cardiovascular toxins and deteriorated the renal function in rats with renal failure. *Sci Rep* 5, 16226
- Philipp S, Jurgensen JS, Fielitz J, Bernhardt WM, Weidemann A, Schiche A, Pilz B, Dietz R, Reigitz-Zagrosek V, Eckardt K (2006): Stabilization of hypoxia inducible factor rather than modulation of collagen metabolism improves cardiac function after acute myocardial infarction in rats. *Eur J Heart Fail* 8, 347–354
- Rabinowitz MH (2013): Inhibition of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase domain oxygen sensors: tricking the body into mounting orchestrated survival and repair responses. *J Med Chem* 56, 9369–9402

- Ratcliffe P, Koivunen P, Myllyharju J, Ragoussis J, Bovee JV, Batinic-Haberle I, Vinatier C, Trichet V, Robriquet F, Oliver L (2017): Update on hypoxia-inducible factors and hydroxylases in oxygen regulatory pathways: from physiology to therapeutics. *Hypoxia (Auckl)* 5, 11–20
- Ratcliffe PJ, Bishop T (2014): Signaling hypoxia by hypoxia-inducible factor protein hydroxylases: A historical overview and future perspectives. *HP* 2, 197–213
- Riedmaier AE, Nies AT, Schaeffeler E, Schwab M (2012): Organic anion transporters and their implications in pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* 64, 421–449
- Rizwan AN, Burckhardt G (2007): Organic anion transporters of the SLC22 family: biopharmaceutical, physiological, and pathological roles. *Pharm Res* 24, 450–470
- Schley G, Klanke B, Schodel J, Kroning S, Turkoglu G, Beyer A, Hagos Y, Amann K, Burckhardt BC, Burzlaff N (2012): Selective stabilization of HIF-1 $\alpha$  in renal tubular cells by 2-oxoglutarate analogues. *Am J Pathol* 181, 1595–1606
- Schödel J, Oikonomopoulos S, Ragoussis J, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Mole DR (2011): High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq. *Blood* 117, e207–e217
- Schulz K, Hagos Y, Burckhardt G, Schley G, Burzlaff N, Willam C, Burckhardt BC (2015): The Isoquinolone Derived Prolyl Hydroxylase Inhibitor ICA Is a Potent Substrate of the Organic Anion Transporters 1 and 3. *Nephron* 131, 285–289
- Sekine T, Watanabe N, Hosoyamada M, Kanai Y, Endou H (1997): Expression cloning and characterization of a novel multispecific organic anion transporter. *J Biol Chem* 272, 18526–18529
- Sekine T, Cha SH, Tsuda M, Apiwattanakul N, Nakajima N, Kanai Y, Endou H (1998): Identification of multispecific organic anion transporter 2 expressed predominantly in the liver. *FEBS Lett* 429, 179–182
- Selvaraju V, Parinandi NL, Adluri RS, Goldman JW, Hussain N, Sanchez JA, Maulik N (2014): Molecular mechanisms of action and therapeutic uses of pharmacological inhibitors of HIF-prolyl 4-hydroxylases for treatment of ischemic diseases. *Antioxid Redox Signal* 20, 2631–2665
- Semenza GL (2007): Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) Pathway. *Science's STKE* 2007, cm8
- Semenza GL, Wang GL (1992): A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 12, 5447–5454
- Simonson GD, Vincent AC, Roberg KJ, Huang Y, Iwanij V (1994): Molecular cloning and characterization of a novel liver-specific transport protein. *J Cell Sci* 107, 1065–1072
- Sweet DH, Wolff NA, Pritchard JB (1997): Expression cloning and characterization of ROAT1. The basolateral organic anion transporter in rat kidney. *J Biol Chem* 272, 30088–30095

- Takeda K, Ho VC, Takeda H, Duan L, Nagy A, Fong G (2006): Placental but not heart defects are associated with elevated hypoxia-inducible factor alpha levels in mice lacking prolyl hydroxylase domain protein 2. *Mol Cell Biol* 26, 8336–8346
- Takeda K, Cowan A, Fong G (2007): Essential role for prolyl hydroxylase domain protein 2 in oxygen homeostasis of the adult vascular system. *Circulation* 116, 774–781
- Tian H, McKnight SL, Russell DW (1997): Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* 11, 72–82
- Uwai Y, Saito H, Hashimoto Y, Inui KI (2000): Interaction and transport of thiazide diuretics, loop diuretics, and acetazolamide via rat renal organic anion transporter rOAT1. *J Pharmacol Exp Ther* 295, 261–265
- Uwai Y, Ozeki Y, Isaka T, Honjo H, Iwamoto K (2011): Inhibitory effect of caffeic acid on human organic anion transporters hOAT1 and hOAT3: a novel candidate for food-drug interaction. *Drug Metab Pharmacokinet* 26, 486–493
- VanWert AL, Gionfriddo MR, Sweet DH (2010): Organic anion transporters: discovery, pharmacology, regulation and roles in pathophysiology. *Biopharm Drug Dispos* 31, 1–71
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL (1995): Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5510–5514
- Wang L, Sweet DH (2013): Interaction of Natural Dietary and Herbal Anionic Compounds and Flavonoids with Human Organic Anion Transporters 1 (SLC22A6), 3 (SLC22A8), and 4 (SLC22A11). *Evid Based Complement Alternat Med* 2013, 612527
- Wang Z, Schley G, Turkoglu G, Burzlaff N, Amann KU, Willam C, Eckardt K, Bernhardt WM (2012): The protective effect of prolyl-hydroxylase inhibition against renal ischaemia requires application prior to ischaemia but is superior to EPO treatment. *Nephrol Dial Transplant* 27, 929–936
- Wolff NA, Werner A, Burkhardt S, Burckhardt G (1997): Expression cloning and characterization of a renal organic anion transporter from winter flounder. *FEBS Lett* 417, 287–291
- Yin J, Wang J (2016): Renal drug transporters and their significance in drug-drug interactions. *Acta Pharm Sin B* 6, 363–373

## **Danksagung**

An erster Stelle möchte ich vor allem meiner Doktormutter und Betreuerin Frau Prof. Dr. phil. nat. Burckhardt danken, welche mir erst einmal das Thema überhaupt zur Verfügung stellte und in der Folgezeit gerade bei Problemen immer weiterhelfen konnte.

Prof. Dr. Yohannes Hagos möchte ich an dieser Stelle auch noch einmal danken für die Hilfe bei der Verarbeitung der gesammelten Daten.

Ein großer Dank geht auch an Prof. Dr. Carsten Willam am Universitätsklinikum Erlangen in der Medizinischen Klinik für Nephrologie und Hypertensiologie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg für das Bereitstellen des ICA.

Ein ganz besonderer Dank geht vor allem an Sören Petzke, welcher mir über die unzähligen Unwegsamkeiten einer experimentellen Doktorarbeit hinweghalf und mir bei der Umsetzung der Experimente mit den Zellkulturen und im Isotopenlabor mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ein weiterer Dank gilt dem gesamten Team und allen Mitarbeitern des Instituts, welche mich freundlich aufnahmen und mich unterstützten.