

Der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität
eingereicht von Prof. Dr. rer. nat. Y. Hagos

Funktionelle Charakterisierung des humanen Organische-Anionen- Transporters 4 (hOAT4)

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Daniel Stein

aus

Kassel

Göttingen 2017

Die vorliegende Dissertation wurde in Göttingen im Zeitraum von 2003 bis 2017 im nicht mehr bestehenden Institut für Vegetative Physiologie und Pathophysiologie unter der Betreuung von Prof. Dr. rer. nat. Y. Hagos und Prof. Dr. med. G. Burckhardt angefertigt.

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
Referent:	Prof. Dr. rer. nat. Y. Hagos
Ko-Referent:	Prof. Dr. rer. nat. A. R. Asif

Datum der mündlichen Prüfung: 06.03.2018

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Funktionelle Charakterisierung des humanen Organische-Anionen-Transporters 4 (hOAT4)" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 10.05.2017

.....

(Unterschrift)

Teile dieser Dissertation wurden bereits veröffentlicht:

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 JASN* **18**, 430–439

Hagos Y, Stein D, Ugele B, Burckhardt G, Bahn A: Poster Presentation - Human Renal Organic Anion Transporter 4 (hOAT4) Operates as an Asymmetrical Organic Anion/OH or Anion/Cl Exchanger. Congress of Nephrology 2004, Joint Scientific Meeting: 35. Kongress der Gesellschaft für Nephrologie, 36. Jahresversammlung der Schweizerischen Gesellschaft für Nephrologie, 37. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für Klinische Nephrologie. Basel, 18.-21. September 2004

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung	1
1.1 Humaner Organische-Anionen-Transporter 4.....	4
1.1.1 Molekulare Charakteristika von hOAT4	4
1.1.2 Funktionelle Charakteristika von hOAT4.....	5
1.1.3 Vergleich von hURAT1 und hOAT4	7
1.1.4 Transportmechanismus und Triebkraft von hOAT4.....	7
1.2 Ziel dieser Arbeit.....	8
2 Material und Methoden	9
2.1 Material.....	9
2.2 Der hOAT4-cDNS-Klon.....	9
2.3 Expressionssysteme	10
2.4 Expression von hOAT4 in einer Zellkulturlinie	10
2.4.1 Stabile Transfektion von hOAT4 in HEK-Zellen.....	11
2.4.2 Kultivierung der HEK-Zellen	11
2.4.3 Zellernte der HEK-Zellen durch Trypsinieren	12
2.4.4 Einfrieren und Auftauen der Zellen.....	13
2.4.5 Zellzahlbestimmung der HEK-Zellen	13
2.4.6 Aussäen der HEK-Zellen in 24-Well-Platten	13
2.5 hOAT4-vermittelte Substrat-Aufnahme in HEK-Zellen	14
2.5.1 Versuchsdurchführung.....	14
2.5.2 Messung mit Fluoreszenzfarbstoffen als Tracersubstanzen.....	15
2.5.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels Photometer.....	16
2.5.4 Messung mit radioaktiven Tracersubstanzen.....	16
2.5.5 Statistische Auswertung.....	16
2.6 Xenopus laevis-Oozyten	17
2.7 Expression von hOAT4 in Xenopus laevis-Oozyten.....	17
2.7.1 Gewinnung von hOAT4-cRNS zur Injektion in Oozyten.....	18
2.7.2 Operative Entnahme der Oozyten	18
2.7.3 Vereinzelung und Defollikulierung der Oozyten	18
2.7.4 Selektion der Oozyten	19
2.7.5 Injektion der Oozyten	19
2.8 Transport-Experimente mit Xenopus laevis-Oozyten.....	21
2.8.1 Influx-Experimente.....	21
2.8.2 Elektrophysiologie.....	21
2.9 Berechnung der Michaelis-Menten-Konstante.....	22

2.10	Besonderheiten einiger Substrate.....	23
2.10.1	Das Fluorescein-Derivat 6-Carboxyfluorescein	23
2.10.2	Esteronsulfat	24
3	Ergebnisse.....	28
3.1	Verifizierung funktioneller Eigenschaften des hOAT4-Klons	28
3.2	Elektrophysiologie des hOAT4-vermittelten Transports	28
3.3	Eignung von 6-CF als Tracersubstanz für hOAT4-vermittelten Transport in HEK-Zellen.....	28
3.3.1	Fluoreszenzmessung nach Inkubation von HEK-Zellen in Transportmedium mit 6-Carboxyfluorescein.....	29
3.3.2	Fluoreszenzmikroskopie von HEK-Zellen nach 6-CF-Aufnahme.....	29
3.4	Charakterisierung der hOAT4-vermittelten 6-CF-Aufnahme in HEK-Zellen	30
3.4.1	Zeitreihen der hOAT4-vermittelten 6-CF-Aufnahme in HEK-Zellen	30
3.4.2	Konzentrationsreihen der hOAT4-vermittelten 6-CF-Aufnahme in HEK-Zellen.....	31
3.5	Cis-Inhibitions-Studien der hOAT4-vermittelten 6-CF-Aufnahme	33
3.6	Aufnahme von radioaktiv markiertem ES, PAH, Glutarat und Urat durch hOAT4.....	35
3.6.1	hOAT4-vermittelte Aufnahme von ES, PAH und Glutarat in HEK-Zellen.....	35
3.6.2	hOAT4-vermittelte Aufnahme von Urat in HEK-Zellen und <i>X. laevis</i> -Oozyten	36
3.7	Trans-Stimulation der Transportaktivität von hOAT4 in HEK-Zellen.....	37
3.7.1	Trans-Stimulation der hOAT4-vermittelten 6-CF-Aufnahme in HEK-Zellen	38
3.7.2	Trans-Stimulation der hOAT4-vermittelten ES-Aufnahme in HEK-Zellen	39
3.8	pH-Wert-Abhängigkeit des hOAT4-vermittelten Transports	39
3.8.1	hOAT4-vermittelte 6-CF-Aufnahme mit unterschiedlichen pH-Werten extrazellulär.....	40
3.8.2	hOAT4-vermittelte ES-Aufnahme mit unterschiedlichen pH-Werten extrazellulär.....	41
3.9	Natrium- und Chloridabhängigkeit der hOAT4-vermittelten ES-Aufnahme in HEK-Zellen.....	43
3.9.1	Natriumabhängigkeit der hOAT4-vermittelten ES-Aufnahme in HEK-Zellen.....	43
3.9.2	Chloridabhängigkeit der hOAT4-vermittelten ES-Aufnahme in HEK-Zellen	44
4	Diskussion.....	46
4.1	Verifizierung funktioneller Eigenschaften des hOAT4-Klons	46
4.2	Elektrophysiologie.....	46
4.3	Tracersubstanz 6-CF bei hOAT4-vermitteltem Transport in HEK-Zellen	47
4.4	Interaktionen bei der hOAT4-vermittelten Substrat-Aufnahme in HEK-Zellen.....	48
4.4.1	Stabil transfizierte HEK-hOAT4-Zellen liefern valide Daten.....	48
4.4.2	Cis-Inhibition der hOAT4-vermittelten 6-CF-Aufnahme in HEK-Zellen.....	49
4.4.3	Vergleich von hOAT4 und hURAT1 – cis- und trans- Effekte.....	49
4.5	Transport von PAH und Glutarat durch hOAT4 - Asymmetrie	50
4.6	Urat-Aufnahme durch hOAT4 und die mögliche physiologische Rolle.....	51
4.6.1	Urat: Vier-Komponenten-Modell und Hypourikämie	52
4.6.2	Hyperurikämie, assoziiert mit hOAT4.....	53
4.6.3	Möglicher Einfluss auf kardiovaskuläre Ereignisse und fetale Entwicklung	54
4.7	Triebkräfte des hOAT4-vermittelten Transports.....	55

4.7.1	Chlorid als Triebkraft von hOAT4.....	55
4.7.2	Auswärts gerichteter OH-Gradient als Triebkraft für hOAT4.....	56
4.7.3	Funktionelle Koppelung von hOAT4 mit NHE3.....	56
5	Zusammenfassung.....	58
6	Literaturverzeichnis	59

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Mechanismus des Transports organischer Anionen an der proximalen Nierentubuluszelle	3
Abbildung 2.1: Strukturformel von 6-Carboxyfluorescein und zugehörige pK _s -Werte.....	26
Abbildung 2.2: Mikrospeziesverteilung von 6-Carboxyfluorescein.....	26
Abbildung 2.3: Strukturformel von Esteronsulfat und zugehörige pK _s -Werte.....	27
Abbildung 2.4: Mikrospeziesverteilung von Esteronsulfat.....	27
Abbildung 3.1: Fluoreszenzmessung nach Inkubation von HEK -Zellen im Transportmedium mit 6-CF	29
Abbildung 3.2: Fluoreszenzmikroskopie von HEK-hOAT4-Zellen nach 6-CF-Aufnahme	30
Abbildung 3.3: Zeitreihe der hOAT4-vermittelten 6-CF-Aufnahme in HEK-Zellen	31
Abbildung 3.4: Konzentrationsabhängige 6-CF-Aufnahme in HEK-Zellen durch hOAT4.....	32
Abbildung 3.5: cis-Inhibition der hOAT4-vermittelten 6-CF-Aufnahme in HEK-Zellen: Bekannte Substanzen	33
Abbildung 3.6: cis-Inhibition der hOAT4-vermittelten 6-CF-Aufnahme in HEK-Zellen: Ausgewählte Carboxylate.....	34
Abbildung 3.7: cis-Inhibition der hOAT4-vermittelten 6-CF-Aufnahme in HEK-Zellen: Weitere Substanzen	35
Abbildung 3.8: Aufnahme radioaktiv markierter Substanzen durch hOAT4 in HEK-Zellen.....	36
Abbildung 3.9: Aufnahme von radioaktiv markiertem Urat durch hOAT4.....	37
Abbildung 3.10: trans-Stimulation der hOAT4-vermittelten 6-CF-Aufnahme in HEK-Zellen.....	38
Abbildung 3.11: trans-Stimulation der hOAT4-vermittelten [³ H]ES-Aufnahme in HEK-Zellen.....	39
Abbildung 3.12: pH-Wert-abhängige hOAT4-vermittelte 6-CF-Aufnahme in HEK-Zellen.....	40
Abbildung 3.13: pH-Wert-abhängige hOAT4-vermittelte [³ H]ES-Aufnahme in HEK-Zellen	42
Abbildung 3.14: Nigericin-abhängige hOAT4-vermittelte [³ H]ES-Aufnahme in HEK-Zellen bei pH 5,5.....	43
Abbildung 3.15: Natriumabhängige Aufnahme von [³ H]ES durch hOAT4 in HEK-Zellen	44
Abbildung 3.16: Chloridabhängige Aufnahme von [³ H]ES durch hOAT4 in HEK-Zellen.....	45

Abkürzungsverzeichnis

[³ H]-	Tritium-markiertes Substrat
[³ H]ES	Tritium-markiertes Esteronsulfat
[¹⁴ C]-	Kohlenstoff-14 -markiertes Substrat
[¹⁴ C]Glutarat	Kohlenstoff-14 -markiertes Glutarat
6-CF	6-Carboxyfluorescein
α-Ketoglutarat	alpha-Ketoglutarat
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BBMV	Bürstensaum-Membranvesikel (<i>brushborder membrane vesicle</i>)
BSA	bovines Serum-Albumin
CBBG	Coomassie-Brillant-Blau G-250
Ca(NO ₃) ₂	Calciumnitrat
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNS	komplementäre DNS
cRNS	komplementäre RNS
DHEAS	Dehydroepiandrosteronsulfat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dpm	<i>disintegrations per minute</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMA	<i>European Medicines Agency</i> (Europäische Arzneimittel-Agentur)
ES	Esteronsulfat
et al.	<i>et alii</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (US-amerikanische Behörde für Lebens- und Arzneimittel)
FE _{Urat}	fraktionelle Exkretion von Urat

FKS	Fetales Kälberserum
FRT	<i>Flp Recombination Target site</i>
GWAS	genomweite Assoziationsstudien (<i>genome-wide association studies</i>)
h	Stunde (<i>hour</i>)
hBBMV	humanes Bürstensaum-Membranvesikel (<i>human brushborder membrane vesicle</i>)
H ₂ O	Wasser
HCl	Wasserstoffchlorid (in wässriger Lösung: Salzsäure)
HCT	Hydrochlorothiazid
HEK-Zellen	Humane embryonale Nierenzellen (<i>human embryonal kidney cells</i> , hier: HEK-Zellen der „T-REx™-293“ Zell-Linie)
HEK-hOAT4	mit hOAT4 transfizierte HEK-Zellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hOAT4	humaner Organische-Anionen-Transporter 4, humaner OAT4, SLC22A11
hURAT1	humaner URAT1, der Urat-Transporter SLC22A12
hUST3	hUST3 bzw. OAT7, SLC22A9
KCl	Kaliumchlorid
K _m -Wert	Michaelis-Menten-Konstante
M	Mol (Stoffmenge), molar
MATE- Transporter	<i>multidrug and toxin extrusion transporter</i>
MDR	<i>multi drug resistance protein</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
mM	Millimol, millimolar
μM	Mikromol, mikromolar
mRNS	Boten-Ribonukleinsäure, <i>messenger RNS</i>

MRP	<i>multi drug resistance associated protein</i>
mURAT1	URAT1-Ortholog der Spezies Maus
Na ₂ SO ₄	Natriumsulfat
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid (in wässriger Lösung: Natronlauge)
NHE3	Natrium-Protonen-Austauscher 3, <i>Na⁺/H⁺ Exchanger 3</i>
nM	Nanomol, nanomolar
OAT	Organische-Anionen-Transporter
OATP	<i>organic anion transporting polypeptides</i>
OATP-B	<i>organic anion transporting polypeptide B</i> , OATP-B
OCT	Organische-Kationen-Transporter
OCTN	Organische-Zwitterionen-Transporter
ORI; ORI-2	Oozyten-Ringer; Oozyten-Ringer-2
PAH	Para-Aminohippurat
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pen-Strep	Penicillin-Streptomycin
pH	pH-Wert, negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität, ein Maß für den sauren oder basischen Charakter einer wässrigen Lösung
pK _s -Wert	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante K _s , ein Maß für die Stärke einer Säure
pmol	Picomol, picomolar
RNS	Ribonukleinsäure
rOAT bzw. rOCT	OAT- bzw. OCT- Ortholog der Spezies Ratte
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
sec	Sekunde

SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> , Standardfehler des Mittelwerts, Quotient aus Standardabweichung und Wurzel des Stichprobenumfangs
SLC	<i>Solute Carrier</i>
SLC47A	<i>Solute Carrier</i> -Familie 47A
SLCO-Familie	Organo-Anionen-Transporter-Familie
SLC22A11 / 12	hOAT4 / hURAT1
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<i>X. laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i> , ein südafrikanischer Krallenfrosch
Ω	Ohm

1 Einleitung

Der menschliche Organismus ist während seines gesamten Lebens einer Vielzahl von potentiell toxischen Substanzen ausgesetzt. Viele dieser Substanzen liegen im Blut als organische Anionen oder Kationen vor. Auch Nahrungsmittel, deren Metabolite sowie endogene Substrate wie Hormone oder biogene Amine und auch viele Pharmaka werden im Blutkreislauf überwiegend in ionisierter Form transportiert. Eine effektive Aufnahme, Biotransformation sowie Ausscheidung dieser Stoffe ist für die Aufrechterhaltung einer gesunden Homöostase im Körper essentiell. Hierbei erfolgt die Ausscheidung über die Gallenflüssigkeit, den Stuhl oder Urin.

In der Niere spielen dabei neben der glomerulären Filtration auch die aktive Sekretion und Rückresorption eine entscheidende Rolle. Diese Transportprozesse finden an und in den Zellen statt, die das Tubulussystem begrenzen. Dabei verhindert die lipophile Plasmamembran der Zellen die passive Diffusion geladener Teilchen. Der Transport über die Membran aus der Zelle heraus oder in die Zellen hinein findet deswegen über Transportproteine statt.

Mit diesen Transportvorgängen in der Niere beschäftigt sich die vorgelegte Arbeit.

Einen der ersten nachvollziehbaren Nachweise der tubulären Sekretion von Anionen erbrachten Marshall und Vickers (1923) in den Studien über die renale Elimination von Phenolrot bei der Hundeniere. In den folgenden Jahren und Jahrzehnten wurden mittels Experimenten an isolierten Tubuli sowie Membranvesikeln von Tubuluszellen zunächst zwei Gruppen von Transportproteinen postuliert und erforscht: Organische-Kationen-Transporter (OCT) und Organische-Anionen-Transporter (OAT). Mit Zunahme der Forschungsaktivität auf diesem Gebiet und daraus resultierend dem Wachstum der Informationen über entsprechende Transportwege durch die Tubuluszelle hindurch stellten sich diese Transportvorgänge mehr und mehr als konzertierte Aktion einer großen Anzahl von Genprodukten dar (Lotspeich 1958; Pritchard und Miller 1993). Durch die weitere Verbreitung und Anwendung molekularbiologischer Techniken wurden der erste OCT und der erste OAT kloniert und charakterisiert (Gründemann et al. 1994; Sweet et al. 1997), weitere Mitglieder dieser Gruppen von Transportproteinen folgten in den Jahren danach.

Auch ist in dieser Zeit ein großer Wissenszuwachs für Transportproteine allgemein entstanden. Nach dem Transport-Klassifizierungs-System für Membran-Transportproteine (Saier et al. 2006), das auf phylogenetischer Analyse und funktionellen Eigenschaften der entsprechenden Transportproteine beruht, werden mehrere Hauptklassen von Transportproteinen in lebenden Organismen eingeteilt, zu denen u. a. „Kanäle“, „elektrochemisch getriebene Transporter“ und „primär aktive Transporter“ zählen. Während „Kanäle“ als selektive Poren fungieren, die sich als Antwort auf einen

chemischen oder elektrophysiologischen Stimulus öffnen und die Beförderung einer gelösten Substanz entlang einem elektrochemischen Gradienten („*downhill*“) vermitteln, können „primär aktive Transporter“ Substrate entgegen eines solchen Gradienten („*uphill*“) über Membranen hinweg transportieren. Die dafür nötige Energie muss aus einem anderen (bspw. chemischen oder elektrischen) Prozess gewonnen werden, relevant beim Menschen ist hierfür v.a. die ATP-Hydrolyse (Adenosintriphosphat-Hydrolyse).

Die „elektrochemisch getriebenen Transporter“ können den „*uphill*“-Transport eines Substrats an den „*downhill*“-Transport eines anderen koppeln oder eine erleichterte Diffusion („*downhill*“) vermitteln. Sie werden aufgrund ihres Arbeitsmodus u. a. in Symporter (Co-Transporter), Antiporter (Austauscher) und Uniporter eingeteilt. Wenn der zuvor durch „primär aktiven Transport“ aufgebaute elektrochemische Gradient von einem Transporter als Triebkraft für den („*uphill*“-)Transport eines weiteren Substrates verwendet wird, bezeichnet man dies als „sekundär aktiven Transport“; „tertiär aktiver Transport“ nutzt die durch „sekundär aktiven Transport“ aufgebaute Triebkraft und so fort. Der tatsächliche Transport hängt dabei wohl nicht immer nur von den messbaren elektrochemischen Triebkräften ab.

Durch funktionelle Koppelung verschiedener Transportproteine miteinander können unter Umständen lokale Konzentrationsänderungen an der Plasmamembran entstehen, wie „Ionenwolken“, die tiefgreifenden Einfluss auf solche sekundär oder tertiär aktiven Transportprozesse haben. Dies wird bspw. für den Natrium-Calcium-Austauscher in der Herzmuskelzelle vermutet (Blaustein und Lederer 1999).

Heutzutage geht man davon aus, dass am Nierentubulus für die Aufnahme und Abgabe geladener Stoffe vor allem zwei große Familien von multispezifischen Transportern zuständig sind: „*Solute Carrier*“ (SLC) sowie „*ATP-binding cassette*“ (ABC). Dabei sind Mitglieder der ABC-Familie eher für die Abgabe aus den Zellen (Efflux) verantwortlich und SLC-Transporter eher für die Aufnahme in die Zellen (Influx). In beiden Familien gibt es jedoch Transporter, die sowohl Influx wie auch Efflux vermitteln können (Burckhardt 2015).

Innerhalb der ABC-Familie sind bspw. MDR (*multi drug resistance protein*) am Transport von organischen Kationen und MRP (*multi drug resistance associated protein*) am Transport von organischen Anionen beteiligt. Innerhalb der SLC-Familie existieren mehrere beteiligte Unterfamilien. Neben den OATP (*organic anion transporting polypeptides*), die der SLCO-Familie zugerechnet werden, sind in der SLC47A-Familie die MATE-Transporter (*multidrug and toxin extrusion transporter*) zusammengefasst, die überwiegend organische Kationen transportieren.

Die oben genannten OAT sowie OCT werden zusammen mit anderen Transportproteinen wie den OCTN (Organische-Zwitterionen-Transporter) aufgrund struktureller Ähnlichkeiten zur SLC22A-Familie zusammengefasst.

Vom „*International Transporter Consortium*“, einer Gruppe von anerkannten Vertretern aus der Wissenschaft, der Pharmaindustrie und der „*Food and Drug Administration*“ (FDA, US-amerikanische Behörde für Lebens- und Arzneimittel), wurden wichtige Transportproteine, bezogen auf den renalen Transport, identifiziert (Huang et al. 2008; International Transporter Consortium et al. 2010). Mehrere Mitglieder der genannten Transporterfamilien wurden ausgewählt und dafür vorgeschlagen, an ihnen zukünftig beispielhaft Wechselwirkungen von (neuen) Pharmaka und Stoffwechselprodukten systematisch zu untersuchen und zu beschreiben, wobei zuerst *In-vitro*-Studien erfolgen sollen, bevor *In-vivo*-Untersuchungen durchgeführt werden. Darunter sind der Kationen-Transporter OCT2 sowie die beiden Organische-Anionen-Transporter OAT1 und OAT3, welche am Nierentubulus basolateral lokalisiert sind. Die Liste der betreffenden Transportproteine hat nicht nur Einzug gehalten in die entsprechenden Ratschläge für die Industrie seitens der FDA, sondern wurde auch von der EMA (*European Medicines Agency*, Europäische Arzneimittel-Agentur) übernommen. Dies zeigt auch die wachsende klinische Bedeutung dieser Transportprozesse (Pruexsaritanont et al. 2013).

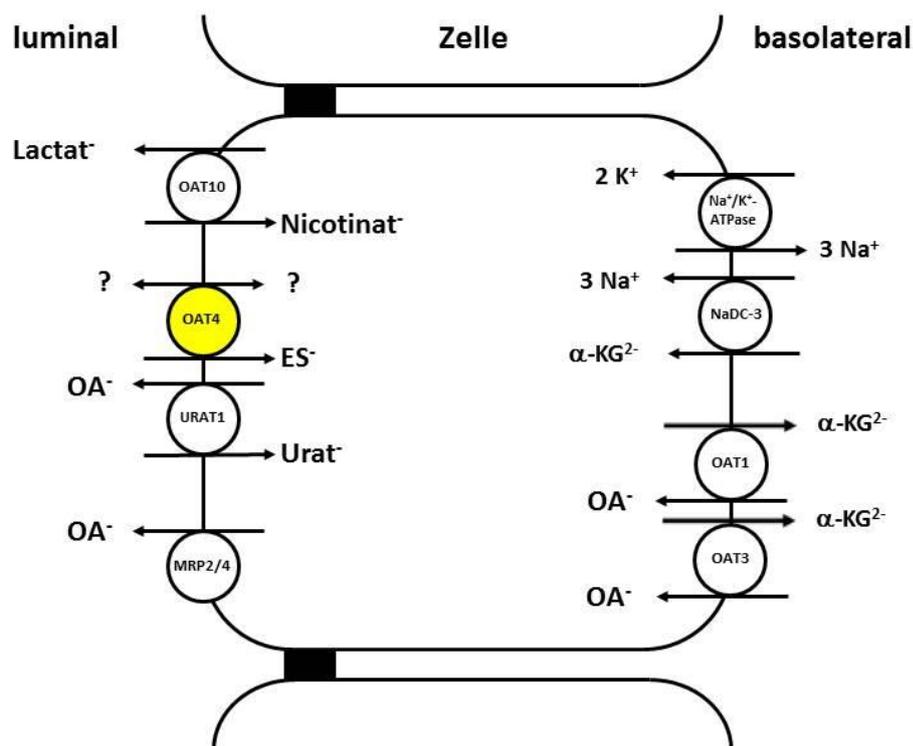


Abbildung 1.1: Mechanismus des Transports organischer Anionen an der proximalen Nierentubuluszelle

Diese Arbeit beschäftigt sich im Besonderen mit dem Transport organischer Anionen bzw. mit den Organische-Anionen-Transportern (Abbildung 1.1). Mit OAT1 und OAT3 sind auf der basolateralen Seite der proximalen Nierentubuluszellen bereits zwei Vertreter der

OAT gut charakterisiert. Über entsprechende Transporter an der luminalen Membran ist jedoch vergleichsweise wenig bekannt (Rizwan und Burckhardt 2007; Nigam et al. 2015). Die an diesem Abschnitt des Tubulus stattfindende Netto-Sekretion von organischen Anionen – mit den zugehörigen Transportprozessen an basolateraler und luminaler Plasmamembran – ist damit noch nicht lückenlos nachvollziehbar. Jedoch ist in den letzten Jahren durch die Identifizierung und Klonierung von luminal lokalisierten OAT der Fokus mehr und mehr auch auf diese Seite der Tubuluszelle gerückt, was zu einem besseren Verständnis auch der luminalen Transportprozesse führen wird. Hier ist auch der Organische-Anionen-Transporter 4 lokalisiert, um den es im Folgenden geht.

1.1 Humaner Organische-Anionen-Transporter 4

Im Jahr 2000 wurde der humane Organische-Anionen-Transporter 4 (hOAT4) aus einer cDNS - Datenbank der menschlichen Niere isoliert und kloniert (Cha et al. 2000). Seitdem sind sowohl Daten über molekulare wie auch funktionelle Charakteristika des Gens bzw. Proteins veröffentlicht worden. So wurden bislang auch Struktur-Funktions-Analysen und Untersuchungen über den Transportmechanismus und mögliche Triebkräfte von hOAT4 durchgeführt:

1.1.1 Molekulare Charakteristika von hOAT4

Die hOAT4-DNS besteht aus 2210 Basenpaaren, die für ein aus 550 Aminosäuren bestehendes Protein kodieren, das 12 Transmembrandomänen besitzt (Cha et al. 2000). Im DNS-Vergleich mit anderen Mitgliedern der OAT-Familie zeigte hOAT4 eine Homologie mit hOAT1 (44%), rOAT1 (43%, OAT1- Ortholog der Spezies Ratte), rOAT2 (38%) und rOAT3 (43%). Im Vergleich mit Organische-Kationen-Transportern (OCT) lag die Homologie für rOCT1 (OCT1- Ortholog der Spezies Ratte), rOCT2 und rOCT3 zwischen 33% und 36%. Wie bei anderen Mitgliedern der OCT und OAT wurden auch bei hOAT4 N-Glykosylierungs-Stellen sowie Protein-Kinase-C - abhängige Phosphorylierungs-Stellen nachgewiesen.

Um Missverständnisse zu vermeiden, sollte an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass Sun et al. (2001) ein anderes Genprodukt mit zunächst unbekannter Funktion kloniert haben und es ebenfalls OAT4 nannten. In aktuellen Publikationen wird dieses Protein als hUST3 bzw. OAT7 (SLC22A9) bezeichnet (Shin et al. 2007), während das von Cha et al. (2000) eingeführte Genprodukt weiterhin als hOAT4 (SLC22A11) bezeichnet wird (Eraly et al. 2003; Koepsell und Endou 2004).

Die Expression der hOAT4-mRNS in unterschiedlichen humanen Gewebetypen wurde untersucht (Cha et al. 2000), jedoch konnte hOAT4 nur in der Niere und der Plazenta nachgewiesen werden, nicht jedoch in den untersuchten Proben von Gehirn, Herz, Skelettmuskel, Thymus, Milz, Leber, Dünndarm, Lunge oder peripheren Leukozyten.

Während Nishimura und Naito (2005) das Vorkommen von hOAT4-RNS mittels RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion) in untersuchten Gewebeproben von Niere und Plazenta bestätigen konnten, wiesen Eraly et al. (2003) hOAT4-RNS jedoch zusätzlich auch in untersuchten Gewebeproben der Milz nach. Außerdem konnten in der eigenen Arbeitsgruppe Asif et al. (2005) hOAT4-mRNS auch in adrenocorticalen Zellen der Tumorzell-Linie NCI-H295R nachweisen. Über genaue Lokalisation oder Funktion in diesen beiden Gewebetypen liegen jedoch derzeit keine weiteren Daten vor.

Die Expression des hOAT4-Proteins konnte durch immunhistochemische Untersuchungen von Plazenta-Präparaten des ersten und letzten Trimenons an Zytotrophoblasten-Membranen und an der basalen Oberfläche von Syncytiotrophoblasten nachgewiesen werden (Ugele et al. 2003).

Es wurde gezeigt, dass hOAT4 in der Niere auf der apikalen Seite des proximalen Tubulus lokalisiert ist und im Nierenkortex von Zellen des Tubulus proximalis convolutus sowie im äußeren Nierenmark auch von Zellen des Tubulus proximalis rectus exprimiert wird (Babu et al. 2002b). Die luminalen Lokalisation wird von Ekaratanawong et al. (2004) bestätigt, welche außerdem zeigen, dass hOAT4 in humanen proximalen Tubuluszellen auf der luminalen Seite co-exprimiert ist mit hOAT1 und hOAT3 auf der basolateralen Seite.

OAT4-Orthologa in anderen Spezies außer beim höheren Primaten sind bislang nicht gefunden worden (Zhu et al. 2015). Jedoch ist bei der systematischen Suche nach OAT-Paraloga des humanen Genoms ein Gen mit hoher Ähnlichkeit zum *hOAT4*- (*SLC22A11*-) Gen identifiziert und mit der Bezeichnung *SLC22A12* versehen worden (Enomoto et al. 2002). Dessen Genprodukt wurde aufgrund seiner funktionellen Eigenschaften hURAT1 benannt.

Die hohe Homologie der hOAT4- und hURAT1- cDNS miteinander wurde von Eraly et al. (2003) bestätigt. Außerdem wurde eine physikalische Nachbarschaft der beiden Gene auf ihrem Genlokus 11q13.1 festgestellt. Dieses Auftreten von eng verbundenen Gen-Paaren ist auch bei zehn anderen Mitgliedern der SLC22-Transporterfamilie zu beobachten und wird als Ausdruck einer engen phylogenetischen Beziehung gewertet.

1.1.2 Funktionelle Charakteristika von hOAT4

Cha et al. (2000) berichten über das Transportverhalten von hOAT4-exprimierenden *Xenopus laevis*-Oozyten. Bei Aufnahme-Experimenten transportierte hOAT4 [³H]Esteronsulfat ([³H]ES) sowie [³H]Dehydroepiandrosteronsulfat ([³H]DHEAS) mit hoher Affinität, die Km-Werte betragen $1,01 \pm 0,15 \mu\text{M}$ (ES) und $0,63 \pm 0,04 \mu\text{M}$ (DHEAS). Dabei wurde die Aufnahmerate des ES nicht durch das Ersetzen des extrazellulären Natriums mit Lithium oder Cholin beeinflusst. An 90 min mit [³H]ES vorbeladenen Zellen wurden Effluxexperimente durchgeführt, wobei die festgestellte Effluxrate nicht durch extrazelluläres ES trans-stimuliert werden konnte. Mehrere Substrate wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen auf ihren cis-inhibitorischen

Einfluss auf die [³H]ES-Aufnahme untersucht. Die organischen Anionen Esteronsulfat sowie Sulfobromophthalein zeigten ausgeprägte inhibitorische Effekte bereits in niedrigen Konzentrationen, während bspw. Probenecid, Diclofenac und Furosemid eine etwas geringere hemmende Wirkung hatten. Vergleichbar damit war auch die Hemmung durch Corticosteron, einem neutralen Steroidhormon. Sowohl Na₂SO₄ (Natriumsulfat, ein anorganisches Sulfat) als auch Tetraethylammonium (ein organisches Kation) zeigten bei den verwendeten Konzentrationen keine Hemmung. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass auch die organischen Anionen Glutarat, Salicylat und Azidothymidin bei 500 µM keine signifikante Hemmung zeigten. Die meisten außerdem getesteten Substrate mit sulfatierten Gruppen zeigten einen hemmenden Einfluss auf die [³H]ES-Aufnahme, während keines der Substrate mit glukuronidierten Gruppen einen Einfluss zeigte. Das prototypische organische Anion Para-Aminohippurat (PAH) zeigte zwar bei Aufnahme-Experimenten eine sehr niedrige, wohl nicht signifikante Aufnahme, jedoch wurde die hOAT4-vermittelte [³H]ES-Aufnahme erst bei sehr hohen Konzentrationen von „mehr als mehreren mM“ gehemmt.

Basierend auf der renalen Lokalisation von hOAT4 und der Tatsache, dass die Niere das dominante Organ für die Expression auch der anderen OAT ist, sind Untersuchungen der Interaktionen von hOAT4 mit unterschiedlichen Substanzgruppen mit renaler Relevanz durchgeführt worden. Interaktionen von hOAT4 mit Antibiotika wie Tetracyclin (Babu et al. 2002a), nichtsteroidalen antiinflammatorischen Medikamenten (NSAR) wie Ketoprofen und Salicylat, nicht jedoch Acetylsalicylsäure (Khamdang et al. 2002), Prostaglandinen (Kimura et al. 2002), Zytostatika wie Methotrexat (Takeda et al. 2002a), antiviralen Medikamenten wie Ziduvudin (Takeda et al. 2002b), HMG-CoA-Reduktase Hemmern und H₂-Rezeptor-Antagonisten (Khamdang et al. 2004), Schleifendiuretika wie Bumetanid (Hasannejad et al. 2004) und Mykotoxinen wie Ochratoxin A (Babu et al. 2002b) wurden nachgewiesen.

Der Efflux verschiedener Substanzen an den entsprechenden mit hOAT4 transfizierten Kulturzellen ist dabei u. a. für Ochratoxin A, Tetracyclin und Bumetanid gezeigt worden.

Experimente an isolierten mononuklearen Trophoblasten haben gezeigt, dass für die Aufnahme von sulfatierten Steroiden aufgrund ihrer bis dato bekannten Transportcharakteristika sowohl OATP-B als auch OAT4 in Frage kommen. Dies lässt eine physiologische Rolle von beiden Transportern für die plazentare Aufnahme von sulfatierten Steroiden, die vom Fetus, nicht jedoch von der Mutter stammen, vermuten (Ugele et al. 2003). Dabei war der gezeigte Transport in den Mononuklearen Trophoblasten natriumabhängig. Über OAT 4 wurde zuvor berichtet, er transportiere in *Xenopus laevis*-Oozyten natriumunabhängig (Cha et al. 2000), aber von OATP-B ist bekannt, dass er in HEK293-Zellen natriumabhängigen Transport vermittelt (Nozawa et al. 2004).

1.1.3 Vergleich von hURAT1 und hOAT4

Beide Transporter hOAT4 und hURAT1 gehören zu derselben Transporterfamilie, nämlich SLC22A. Sie befinden sich als Tandem-Gen-Paar auf dem Chromosom 11q13 und könnten Spekulationen nach aus einem gemeinsamen Gen in der späten Phase der höheren Primatenevolution entstanden sein (Eraly et al. 2003). Ein direkter Vergleich der publizierten funktionellen Charakteristika für hOAT4 und hURAT1 zeigt, dass sie einige ähnliche Transporteigenschaften, insbesondere für Stoffe wie Probenecid, Indomethacin, Bumetanid oder Furosemid besitzen, mit denen beide Transporter ausgeprägte Interaktionen eingehen. Dagegen definieren die derzeit bekannten endogenen Substrate wie ES und DHEAS für hOAT4 sowie Urat, L-Laktat und Nicotinat für hURAT1 klare Unterschiede zwischen diesen beiden Transportern, was darauf schließen lässt, dass sie unterschiedliche physiologische Rollen erfüllen (Cha et al. 2000; Enomoto et al. 2002).

Der Transporter hURAT1 wurde als apikaler Urataustauscher entdeckt, welcher intrazelluläres Nicotinat, Pyrazinoat, Laktat und einen auswärts gerichteten Chloridgradienten nutzt, um die Urat-Aufnahme aus dem Primärharn zu vermitteln, was in Übereinstimmung mit vorherigen Erkenntnissen für humane Bürstensaum-Membranvesikel (hBBMV) steht (Roch-Ramel et al. 1994; Enomoto et al. 2002). Aufgrund dieser Erkenntnisse postulierten Roch-Ramel et al. (1994) die Existenz zweier unterschiedlicher Urataustauscher; davon einer mit hoher Affinität für Urat und aromatische Moleküle, wie Nicotinat, Pyrazinoat und Orotat. Dies sind Transporteigenschaften, die von hURAT1 repräsentiert werden.

Ein zweiter Urat-Transporter mit niedriger Affinität für Urat soll aliphatische organische Anionen und Chlorid gegen Urat austauschen (Roch-Ramel et al. 1996). Es wurde weiterhin gezeigt, dass ein OH-Gradient von innen nach außen zur Urat-Aufnahme in hBBMV führt. Dieser Transportmodus wird nicht von hURAT1 erfüllt (Enomoto et al. 2002). Die molekulare Identität dieses zweiten Transporters ist bislang noch unbekannt.

1.1.4 Transportmechanismus und Triebkraft von hOAT4

Über den genauen Transportmechanismus sowie die Triebkraft für den hOAT4-vermittelten Substrattransport liegen bislang vergleichsweise wenig gesicherte bzw. wenig unumstrittene Daten vor. Ekaratanawong et al. (2004) haben an hOAT4-exprimierenden Mäuse-S2-Zellen trans-Stimulationsexperimente durchgeführt und kommen zu der Schlussfolgerung, hOAT4 sei ein Organische-Anionen/Dicarboxylat-Austauscher, der hauptsächlich die Reabsorption bestimmter organischer Anionen vermittele. Dabei stehen einige der dargestellten Ergebnisse im Widerspruch mit zuvor publizierten Daten und bedürfen daher einer ausgiebigen Diskussion.

1.2 Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, den Transport organischer Anionen am proximalen Nierentubulus besser zu verstehen und das Modell des komplexen Zusammenspiels der einzelnen beteiligten Transportproteine zu verfeinern. Dies wird helfen, zukünftig Wechselwirkungen von Pharmaka und Stoffwechselmetaboliten besser zu untersuchen und vorherzusagen. Während Organische-Anionen-Transporter an der basolateralen Membran bereits gut untersucht sind, ist über den Transport von organischen Anionen an der luminalen Membran vergleichsweise wenig bekannt. Hier ist der humane Organische-Anionen-Transporter 4 lokalisiert, der in dieser Arbeit funktionell charakterisiert werden soll, insbesondere hinsichtlich seines zuvor unbekanntem Transportmodus und seiner Triebkräfte.

2 Material und Methoden

Als Expressionssysteme wurden eine Zellkultur von Humanen Embryonalen Nierenzellen sowie Oozyten des Südafrikanischen Krallenfroschs *Xenopus laevis* (*X. laevis*) verwendet. Für die stabile Transfektion von hOAT4 in die verwendete Kulturzell-Linie wurde hOAT4-cDNS benötigt, für die Transfektion in Oozyten hOAT4-cRNS. Um hOAT4-vermittelte Transportvorgänge messbar zu machen, kamen elektrophysiologische Methoden sowie Substrate mit fluoreszierenden Eigenschaften als auch radioaktiv markierte Substrate zum Einsatz. Einflüsse von nicht als derart markierte Substanzen vorliegenden Substraten wurden indirekt z. B. mittels cis-Inhibition oder trans-Stimulation untersucht.

2.1 Material

Materialien wie „*Dulbecco's Modified Eagle Medium*“ (DMEM), Fetales Kälberserum (FKS), Trypsin und „*Phosphate-Buffered-Saline*“ (PBS) wurden von Invitrogen (Groningen, Niederlande) bezogen. Chemikalien, Salze und Lösungsmittel sowie nicht radioaktiv- oder Fluoreszenz-markierte Substrate wie Para-Aminohippurat (PAH), Esteronsulfat (ES), Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS), Pyruvat, Oxaloacetat, Citrat, alpha-Ketoglutarat (a-Ketoglutarat), Succinat, Fumarat, Malat, L-Laktat, Orotat, Pyrazinoat, Urat, Nicotinat, Glutarat, Cholin, Amilorid, Natriumglukonat, Probenecid wurden von Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland) in der Qualität „reinst“ oder „*analytic grade*“ bezogen. Ebenso von Sigma-Aldrich stammten Materialien für die Zellkultur wie L-Glutamin (2mM), Penicillin-Streptomycin (Pen-Strep, 1%) und Blastocidin (5µg/ml) sowie Coomassie-Brillant-Blau G-250 (CBBG, 5%ig), Bovines Serum Albumin, (BSA, 1mg/ml Protein).

Von Molecular Probes (Leiden, Niederlande) wurde 6-Carboxyfluorescein (6-CF) geliefert. Es kamen [³H]Esteronsulfat ([³H]ES; *estrone sulfate, ammonium salt*, [6,7-³H(N)], 43,5 Ci/mmol) von New England Nuclear (Boston, MA, USA) und [¹⁴C]Glutarat (*glutaric acid*, [1,5-¹⁴C], 30,8mCi/mmol) von ICN (Costa Mesa, CA, USA) zur Anwendung. [¹⁴C]Urat ([¹⁴C]*uric acid*, ARC-513, [8-¹⁴C], 50-60 Ci/mmol) wurde von Biotrend (Köln, Deutschland) und [³H]Para-Aminohippurat ([³H]PAH, 3,25 Ci/mmol) von Perkin Elmer Life Sciences (Boston, MA, USA) bezogen. Das verwendete Wasser entstammte einer Reinstwasseranlage der Firma Millipore („Milli-Q“; Billerica, MA, USA).

2.2 Der hOAT4-cDNS-Klon

Von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande) wurde hOAT4-DNS (*Gene Bank accession number AL514126*), welche in den „pSPORT6 Expressions-Vektor“ kloniert war, bezogen. Die Sequenz wurde durch eine Sequenzierungs-PCR (Polymerase-Kettenreaktion) und anschließend einen Automatischen Sequenzer (ABI Weiterstadt, Deutschland)

überprüft, Sequenzanalysen wurden durch Online-Dienste (MAP, <http://genome.cs.mtu.edu/map.html>) durchgeführt. Das pSPORT6-hOAT4-Konstrukt wurde sowohl für die stabile Transfektion als auch für die cRNS-Synthese verwendet.

2.3 Expressionssysteme

Während man bei Transportmessungen an ausdifferenzierten, natürlichen Zellpopulationen aufgrund der oft großen Anzahl verschiedener Transportproteine das Resultat des Transports meist nicht einem einzigen Protein zuordnen kann, sondern vielmehr dem Zusammenspiel der gesamten (Transport-) Proteinausstattung der Zellen, gibt es Expressionssysteme, die sich zur Expression von außen eingebrachter Gene bzw. ihrer Genprodukte eignen, deren Zellen wenig oder undifferenziert sind, über wenig eigene Transportproteine verfügen und daher die Deutung der Messung eines Transports durch niedrige „Hintergrundaktivität“ vereinfachen.

In einen Teil der Zellen des gewählten Expressionssystems wird die vorher gewonnene DNS bzw. RNS des zu untersuchenden Proteins transfiziert bzw. injiziert und daraufhin von den Zellen exprimiert, im Fall von hOAT4 geschieht dies in ihrer Plasmamembran. Eine möglicherweise dabei auftretende „Überexpression“, d.h. ein Auftreten des gebildeten Proteins in verhältnismäßig großer Anzahl, ist dabei durchaus erwünscht.

Die Kontrollzellen werden nicht mit der hOAT4 DNS/RNS transfiziert bzw. injiziert, aber ansonsten gleich behandelt. Somit erhält man zwei Zellpopulationen, die sich voneinander nur dadurch unterscheiden, dass die eine, im Vergleich mit der anderen, ein bestimmtes Protein zusätzlich exprimiert. Unterschiede im Transportverhalten zwischen transfizierten Zellen und nicht-transfizierten Zellen können somit auf die Aktivität des zu untersuchenden Proteins zurückgeführt werden.

2.4 Expression von hOAT4 in einer Zellkulturlinie

Humane embryonale Nierenzellen (HEK-Zellen) mit dem dazugehörigen Kit zur stabilen Transfektion wurden von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande) bezogen und freundlicherweise von Herrn Dr. Ugele (Klinikum der Universität München I, Frauenklinik-Innenstadt, München) stabil mit dem ebenfalls von Invitrogen bezogenen *hOAT4*-Gen transfiziert, die Kontrollzellen (Mockzellen) blieben ohne Transfektion. Beide Zellpopulationen wurden separat voneinander kultiviert, Zellen früher Passage wurden als Vorrat eingefroren und bei Bedarf aufgetaut.

Der überwiegende Teil der Experimente wurde mit diesen stabil transfizierten HEK-Zellen durchgeführt.

2.4.1 Stabile Transfektion von hOAT4 in HEK-Zellen

Es wurden HEK-Zellen der „T-RExTM-293“ Zell-Linie (hier als „HEK-Zellen“ bezeichnet) verwendet und mittels des „Flp-InTM – Systems“ stabil transfiziert. Die Zellen dieser Zell-Linie entstammen humanen embryonalen Epithelzellen der Niere, weisen epithelartiges Wachstum auf und sind mit dem sogenannten „*lacZ-Zeo-Fusions-Gen*“ stabil transfiziert, das die Bindungsstelle für den Vektor des „Flp-InTM – Systems“, „*Flp Recombination Target site*“ (FRT Stelle), enthält. (Herstellerseitig sind solche Zellen vorselektiert, die genau eine dieser Bindungsstellen enthalten.) Über diesen Vektor mit seiner Bindungsstelle wurde das *hOAT4*-Gen nach Angaben des Herstellers eingefügt. Hierfür wurde die *hOAT4*-Sequenz in den „Flp-InTM“ Expressionsvektor „pcDNA5/FRT“ subkloniert, der neben einer FRT Stelle auch ein Hygromycin-Resistenz-Gen enthält. Das so entstandene pcDNA5/FRT-*hOAT4*-Konstrukt wurde anschließend zusammen mit dem „pOG44-Plasmid“, das „Flp Rekombinase“ exprimiert, in die HEK-Zellen cotransfiziert. Die von „pOG44“ exprimierte „Flp Rekombinase“ konnte so die Rekombination der FRT Stellen der HEK-Zellen mit der des Expressionsvektors katalysieren. Dabei erfolgte die Integration des Vektors in die DNS der Ziel-Zelle. Die stabile Transfektion von *hOAT4* wurde von Herrn Dr. Ugele (Klinikum der Universität München I, Fraunklinik-Innenstadt, München) durchgeführt.

Erfolgreich auf diesem Weg stabil transfizierte Zellen zeichnen sich u. a. durch Hygromycin Resistenz und die Expression des zu transfizierenden Proteins aus. So wurden die Zellen, die *hOAT4* stabil exprimierten, durch Zugabe von Hygromycin (200 µg/ml) nach Angaben des Herstellers selektiert und im Anschluss kultiviert.

2.4.2 Kultivierung der HEK-Zellen

Die HEK-Zellen wurden bei einer Temperatur von 37°C, einer Luftfeuchtigkeit von 95% und einem CO₂-Gehalt von 5% kultiviert (Begasungsbrutschrank BB-16, Heraeus, Deutschland). Alle Arbeiten unter sterilen Bedingungen wurden an einer Sterilbank (Sicherheitswerkbank Microflow 51424/1, Nunc, Wiesbaden, Deutschland) durchgeführt, Pipettenspitzen und alle verwendeten Mehrweg-Gefäße (Schott Duran, Mainz, Deutschland) wurden im Autoklaven sterilisiert und anschließend 4 h bei 120°C getrocknet. Es kamen auch steril verpackte Einmal-Materialien wie Zellkulturflaschen, Petrischalen, Zentrifugenröhrchen, 24-Well-Platten von Sarstedt, (Nümbrecht, Deutschland) sowie Mikroreaktionsgefäße von Eppendorf (Hamburg, Deutschland) zur Anwendung. Die Arbeitsfläche wurde mit 70%igem Ethanol dekontaminiert, alle Flüssigkeiten bzw. Lösungen wurden vor der Verwendung steril filtriert. Als Kulturmedium wurde „*Dulbecco's Modified Eagle Medium*“ (DMEM) verwendet, welches mit Glukose (5mM), Fetalem Kälberserum (FKS, 10%), L-Glutamin (2mM), Pen-Strep (1%) und Blasticidin (5µg/ml) supplementiert war. Das Medium wurde dreimal pro Woche erneuert, wobei die Kulturflaschen am Mikroskop auf Kontamination überprüft wurden. Kontaminierte

Kulturen wurden verworfen. Zum Waschen der Zellen wurde „*Phosphate-Buffered-Saline*“ (PBS; 137 mM NaCl (Natriumchlorid), 10 mM Phosphat, 2,7 mM KCl (Kaliumchlorid); pH 7,4) und zum Ablösen bzw. Ernten der Zellen wurde Trypsin verwendet. Alle Lösungen wurden, bevor sie in Kontakt mit den Zellen kamen, im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Die Zellen wuchsen als am Boden der Kulturflaschen adhärenter Zellrasen in einer Schicht („*Monolayer*“). Bei Erreichen von 80-90 %iger Konfluenz (ca. einmal wöchentlich) wurden die Zellen der Stammkultur in ein anderes Kulturgefäß überführt, „passagiert“, und dabei 1:10 verdünnt. Die für die Fortführung der Stammkultur nicht benötigten Zellen konnten für die Subkultivierung verwendet werden. Je nach Versuchsplanung wurden sie für drei Tage Wachstum bis zur erneuten Ernte 1:4 verdünnt (vier Tage: 1:6, fünf Tage: 1:8) und in Petrischalen ausgesät. Die aus der Subkultivierung gewonnenen Zellen wurden zwei Tage vor dem geplanten Versuch geerntet und in einer definierten Dichte in dem für das entsprechende Experiment vorgesehenen Gefäß ausgesät. Dies waren vor allem 24-Well-Platten, aber auch Objektträger.

2.4.3 Zellernte der HEK-Zellen durch Trypsinieren

Um die Zellen von einem Kulturgefäß in ein anderes überführen zu können, sei es zum Passagieren, Subkultivieren oder Aussäen in 24-Well-Platten, mussten sie vorher abgelöst und geerntet werden. Die hierfür verwendete Methode war das Trypsinieren.

Nach dem Absaugen des Kulturmediums mittels einer Pumpe wurde der am Boden des Gefäßes adhärenthe Zellrasen („*Monolayer*“) sanft mit PBS gewaschen. Dadurch sollten totes Zellmaterial, zurückgebliebenes Medium und das darin befindliche FKS, welches Trypsin-Inhibitoren enthält, möglichst komplett entfernt werden. Nach dem Absaugen des PBS wurden die Zellen mit 5 ml 0,1 % Trypsin/0,5 mM EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) für 3-5 Minuten inkubiert, wodurch sie sich vom Gefäßboden ablösten. Da die Adhärenz der HEK-Zellen nicht sehr hoch war, konnte dabei auf eine Inkubation bei 37°C verzichtet werden. Nachdem sich der Großteil der Zellen gelöst hatte, wurde dieser enzymatische Vorgang durch Zugabe einer äquivalenten Menge des Kulturmediums gestoppt, noch nicht abgelöste Zellen durch leichtes Klopfen an den Gefäßrand gelöst und die entstandene Suspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach 5-minütigem Zentrifugieren bei Raumtemperatur mit 1000 Umdrehungen pro Minute und anschließendem Absaugen des Überstandes wurden die im Zellsediment vorliegenden Zellen resuspendiert.

Für das Einfrieren (zur längeren Lagerung) wurde zur Resuspension Einfriermedium benutzt und wie unter Abschnitt 2.4.4 beschrieben fortgefahren. Für die weitere Kultivierung wurde dagegen in 1000 µl Kulturmedium resuspendiert und vor der dann folgenden Aussaat wurde die Zellzahl der Suspension bestimmt, wie unter Abschnitt 2.4.5 beschrieben.

2.4.4 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Zellen früher Passage wurden zur längeren Lagerung eingefroren und bei Bedarf wieder aufgetaut.

Für das Einfrieren der Zellen wurde wie unter Abschnitt 2.4.3 beschrieben verfahren und dann das Zellsediment in 4ml Einfriermedium (Kulturmedium mit 10%DMSO, Dimethylsulfoxid) resuspendiert und in vier Kryoröhrchen mit je 1ml aufgeteilt. Anschließend erfolgte eine schrittweise Kühlung. Zunächst wurde für 30 Minuten in Eiswasser gekühlt, danach wurden die Röhrchen bei -80°C über Nacht eingefroren, am nächsten Tag wurden sie in flüssigen Stickstoff bei -196°C umgelagert.

Für das Auftauen der Zellen wurde ein Kryoröhrchen dem flüssigen Stickstoff entnommen und schnell in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut und erwärmt. Die aufgetauten Zellen wurden resuspendiert, mit 10ml Kulturmedium in einer Petrischale ausgesät und anschließend für 4-6 Stunden im Zellkultur-Inkubator gelagert. Das Medium sowie nicht adhärenente Zellen wurden dann abgesaugt und 5ml neues Kulturmedium hinzugefügt. Bei Erreichen von 80-90%iger Konfluenz wurden die Zellen in ein anderes Kulturgefäß überführt, wie oben beschrieben.

2.4.5 Zellzahlbestimmung der HEK-Zellen

Die Kenntnis der Zellzahl in einer Suspension war vor allem notwendig, um Zellen standardisiert in immer wieder gleichen, definierten Konzentrationen aussäen zu können.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer. Auf die gereinigte und angefeuchtete Zählkammer wurde ein Deckplättchen gelegt und leicht angepresst, bis Newtonsche Interferenzringe sichtbar wurden. In einer Verdünnung von 1:10 wurde die Zellsuspension anschließend unter das Deckgläschen pipettiert und die Zellzahl in den vier Großquadraten wurde unter dem Mikroskop ausgezählt. Aus dem Mittelwert der vier Großquadrate ergibt sich die Zellzahl der Stammsuspension wie folgt:

$$\text{Mittelwert} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^4 = \text{Zellzahl pro ml.}$$

Mit der Kenntnis der Zellkonzentration der Stammsuspension wurde durch entsprechende Verdünnung die für die Aussaat der Zellen bestimmte Suspension mit der gewünschten, definierten Zellkonzentration hergestellt.

2.4.6 Aussäen der HEK-Zellen in 24-Well-Platten

Der Großteil der Versuche mit HEK-Zellen wurde mit Hilfe von „24-Well-Platten für Gewebekulturen“ (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) durchgeführt. Eine solche Platte mit den Abmessungen 13 cm*8,5 cm*2 cm besteht aus der eigentlichen Platte, in die 24 zylindrische Vertiefungen („Wells“) eingelassen sind, und einem passenden Deckel. Um die bei der Subkultivierung produzierten HEK-Zellen in 24-Well-Platten aussäen zu können, mussten die Zellen zuvor geerntet und die Zellzahl bestimmt werden.

Das benutzte Kulturvolumen betrug 0,5 ml pro Well, was 12 ml pro Platte entspricht. Die Aussaat erfolgte in einer definierten Dichte von $4 \cdot 10^5$ Zellen pro ml bzw. $2 \cdot 10^5$ Zellen pro Well.

Anschließend folgte eine zweitägige Inkubation im Brutschrank, während derer die in der Suspension befindlichen Zellen einen auf der Bodenfläche anhaftenden Monolayer bildeten. Nach dieser Inkubationszeit waren die Konfluenz und Adhärenz der HEK-Zellen so hoch, dass die Transportexperimente durchgeführt werden konnten.

2.5 hOAT4-vermittelte Substrat-Aufnahme in HEK-Zellen

Im Folgenden werden die einzelnen Arbeitsschritte für Influx-Transportexperimente mit in 24-Well-Platten ausgesäten HEK-Zellen beschrieben. Für jede 24-Well-Platte mit hOAT4-transfizierten Zellen wurde standardmäßig eine 24-Well-Platte mit nicht-transfizierten Zellen (sog. „Mockzellen“) mit parallelem Versuchsaufbau und -ablauf bestückt. Verwendet wurden Zellen, die zwei Tage zuvor in definierter Dichte ausgesät worden sind und so während ihrer Zeit in Inkubation einen auf dem Boden der Wells anhaftenden einschichtigen Zellrasen gebildet hatten.

2.5.1 Versuchsdurchführung

Nach dem vorsichtigen Absaugen des Kulturmediums aus jedem Well einzeln mittels einer Pumpe wurden die Zellen initial mit Ringer-Lösung („*Mammalian Ringer*“, 130 mM NaCl (Natriumchlorid), 4 mM KCl (Kaliumchlorid), 1 mM CaCl_2 (Calciumchlorid), 1 mM MgSO_4 (Magnesiumsulfat), 1 mM NaH_2PO_4 (Natriumdihydrogenphosphat), 20 mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure), 18 mM Glukose; pH 7,4) gewaschen, um Reste des Mediums und Zelltrümmer zu entfernen. (Für alle Versuche mit HEK-Zellen wurde diese Ringer-Lösung auch als Transportmedium verwendet, falls nicht anders ausgewiesen.) Die auf 37 °C erwärmte Ringer-Lösung wurde dabei vorsichtig in alle Wells einer Platte mit einem Volumen von 0,5 ml pro Well hinein pipettiert und anschließend wieder abgesaugt. Dieser Vorgang erfolgte insgesamt dreimal.

Bei Influx-Versuchen und Influx-Versuchen mit Cis-Inhibition wurde nach dem letzten Absaugen mit dem eigentlichen Versuch begonnen. Für Influx-Versuche mit Trans-Stimulation wurden die Zellen nach dem oben beschriebenen initialen dreimaligen Waschen für 2 Std. in Ringer-Lösung inkubiert, die die zu testenden Substrate in einer Konzentration von 10 mM enthielt. Unmittelbar nach Ablauf der zwei Stunden erfolgte zweimaliges Waschen mit auf 37°C erwärmter Ringer-Lösung und anschließend dann ebenfalls die Inkubation mit dem Transportmedium.

Hierfür wurde das vorbereitete Transportmedium vorsichtig in jedes Well einzeln pipettiert und nach der vorher festgelegten Inkubationszeit wieder abgesaugt. Die Zeitmessung erfolgte für jedes Well einzeln.

Verwendet wurden für Influx-Versuche, soweit nicht anders angegeben, Transportmedien bestehend aus Ringerlösung mit entweder 50 μ M 6-CF bzw. 10 nM [3 H]ES als Tracer, mit einem Volumen von 0,5 ml bzw. 200 μ l pro Well und einer Inkubationszeit von 30 sec bzw. 2 min. Für einige Versuche wurde die Ringerlösung modifiziert, Näheres ist den entsprechenden Abschnitten im Ergebnisteil zu entnehmen.

Für Influx-Versuche mit Cis-Inhibition enthielten die Transportmedien zusätzlich zu den Tracersubstanzen Substrate in einer Konzentration von 0,5 mM.

Nach der Absaugung des Transportmediums wurden die Wells erneut gewaschen, um extrazellulär befindliche Rückstände des Transportmediums zu eliminieren. Hierfür wurde 4 °C kalte Ringer-Lösung verwendet, um Transportvorgänge während des Waschvorganges auf Null zu reduzieren. Wie bereits zuvor wurde ein Volumen von 0,5 ml/Well verwendet und der Vorgang insgesamt dreimal durchgeführt.

Bei allen diesen Arbeitsschritten wurde sorgfältig darauf geachtet, auf den Zellrasen wirkende Strömungen und Scherkräfte so gering wie möglich zu halten, um ein Ablösen der Zellen zu verhindern. Hierfür wurde z. B. beim Füllen der Wells unter Benutzung der Wellwand pipettiert und beim Absaugen der in den Wells befindlichen Lösungen immer an derselben Stelle des Wells abgesaugt.

Im Anschluss hieran wurden die Zellen mit Hilfe von [1M] Natronlauge aufgelöst.

2.5.2 Messung mit Fluoreszenzfarbstoffen als Tracersubstanzen

Bei der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen als Tracersubstanz wurde für die Herstellung des Zell-Lysats 1 M NaOH (Natriumhydroxid; 1 ml/Well) benutzt, so dass alle Messungen der Fluoreszenz dann im Spektralfluorimeter (F 2500; Hitachi, Tokyo, Japan) bei pH14 durchgeführt wurden, falls nicht anders angegeben. Die Messung erfolgte bei Excitations- / Emissionswellenlängen von 492 / 512 nm.

Für die Kalibrierung der gemessenen Daten wurde jeweils aus dem Grundstock des Transportmediums mit Tracersubstanz eine Verdünnungsreihe mit [1N] Natronlauge erstellt (mit den Konzentrationen der Tracersubstanz $C = 10^0, 10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 2 \cdot 10^5$ pmol/l, dreifacher Ansatz), die Fluoreszenz F gemessen und daraus eine lineare Kalibrierungskurve $F = m \cdot C$ berechnet, wobei m der Steigung der Kalibrierungsgeraden entspricht. Nach Formelumstellung ($C = F / m$) wurden die beim eigentlichen Experiment gemessenen Fluoreszenzeinheiten für jedes Well bzw. für jede Probe einzeln in die Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffes (pmol/l) umgerechnet.

Mittels einer Proteinbestimmung nach Bradford (s. u.) wurde für entsprechende Proben die Proteinkonzentration (in μ g/ml) ermittelt. Über den Quotienten aus der Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffes und der Proteinkonzentration wurde für jede Probe die Stoffmenge des Fluoreszenzfarbstoffes pro mg Protein des Zell-Lysats (in pmol/mg) berechnet.

2.5.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels Photometer

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Methode nach Bradford angewendet (Bradford 1976). Durch Bindung des Triphenylmethanfarbstoffs Coomassie-Brillant-Blau G-250 (CBBG) an Proteine verschiebt sich dessen Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist dabei ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Zusammensetzung des Proteingemischs im Zell-Lysat gleichbleibend ist und daher die bestimmte Proteinkonzentration ein Maß für die Zellmenge ist.

Zu je 50 µl des Zell-Lysats von entsprechenden Proben wurden 150 µl einer CBBG-Lösung (0,007% CBBG, 5% Ethanol, 8,5% Phosphorsäure) hinzupipettiert. Verwendung fanden dabei 96-Well-Mikroplatten. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm photometrisch (BioTek Elx808 mit Software MikroWin V.3.13; BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) bestimmt.

Für die Kalibrierung der gemessenen Daten wurde aus dem Grundstock einer Standardalbuminlösung (BSA, 1 mg/ml Protein) eine Verdünnungsreihe erstellt und anschließend eine Kalibrierungskurve errechnet.

Analog der oben für Fluoreszenzfarbstoffe angegebenen Formel wurde so für jede Probe die Proteinkonzentration berechnet.

2.5.4 Messung mit radioaktiven Tracersubstanzen

Bei der Verwendung von radioaktiv markierten Substraten als Tracersubstanz wurde für die Herstellung des Zell-Lysats 1 N NaOH (0,5 ml/Well) benutzt. In diesem Fall wurde die Lösung nach einer Inkubationszeit von 15 bis 20 Minuten durch Zugabe von 0,5 ml/Well 1 N HCl neutralisiert und anschließend wurde nach Zugabe von 2,6 ml Szintillationsflüssigkeit die von den Proben ausgehende Strahlung im „*Liquid Scintillation Counter*“ (Liquid Tri Carb 2100 TR, Canberra-Packard, Dreieich, Deutschland) bestimmt.

Für die Kalibrierung der gemessenen Daten wurden von jedem benutzten Lösungsansatz viermal 5 µl in 2,6 ml Szintillationsflüssigkeit gelöst, der Quotient aus dem Mittelwert der Strahlungsmessungen und der jeweiligen Stoffmenge gebildet, und so die spezifische Aktivität (in dpm/pmol) bestimmt. Aus Aktivität der jeweiligen Probe (in dpm, *disintegrations per minute*), dem Probenvolumen (in ml) und spezifischer Aktivität (in dpm/pmol) wurde jeweils die Konzentration des radioaktivmarkierten Substrats (in pmol/ml) für jede Probe bestimmt.

2.5.5 Statistische Auswertung

Auf jeder 24-Well-Platte wurden für ein Transportexperiment sechs bis acht Gruppen zu je drei oder vier Wells gebildet, wovon eine Gruppe im Vorfeld als Kontrollgruppe definiert wurde. Jedes Experiment wurde, soweit nicht anders angegeben, dreimal unabhängig

voneinander durchgeführt. Für jede Gruppe wurden (arithmetischer) Mittelwert und SEM („*Standard Error of the Mean*“, Standardfehler des Mittelwerts, Quotient aus Standardabweichung und Wurzel des Stichprobenumfangs) aller Proben berechnet und, wo Prozentzahlen angegeben sind, in Relation zueinander gesetzt, wobei die Kontrollgruppe der transfizierten Zellen als „100%“ definiert wurde. Die Werte werden jeweils als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

Statistische Unterschiede zwischen Gruppen wurden mit Hilfe des „zweiseitigen Student’s T-Test“ berechnet, die jeweiligen Signifikanzniveaus betragen dabei 5%, 1% und 0,1% (*P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001).

Ausgeschlossen von der Auswertung wurden Proben, die offensichtlich verunreinigt waren oder deren Proteingehalt signifikant erniedrigt war, z. B. durch Ablösung des Zellrasens während der Versuchsdurchführung.

Die statistische Auswertung und grafische Darstellung erfolgte mit Microsoft Excel (Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland) und Sigma Plot 2001 (SPSS Science, Chicago, IL, USA).

2.6 *Xenopus laevis*-Oozyten

Oozyten des Südafrikanischen Krallenfroschs *Xenopus laevis* sind ein weit verbreitetes Expressionssystem für Proteine unterschiedlicher Spezies. Erstmals zeigten (Gurdon et al. 1971), dass *X. laevis*-Oozyten nach der Injektion zugehöriger mRNA Hämoglobin produzieren konnten. Da Froscheier normalerweise in unwirtlicher Umgebung gelegt werden, sind sie sehr resistent gegen äußere Einflüsse und voll ausgestattet mit allen Substraten, die sie für Wachstum und Entwicklung benötigen. Daher sind sie kaum davon abhängig, Substrate über die Zellmembran aufzunehmen oder abzugeben und exprimieren aus diesem Grund eine vergleichsweise geringe Zahl endogener Transportsysteme (Wagner et al. 2000). Dies und vor allem ihre Größe von 1 - 1,3 mm Durchmesser prädestinieren sie für Transportversuche unterschiedlichster Techniken (Weber 1999).

2.7 Expression von hOAT4 in *Xenopus laevis*-Oozyten

Xenopus laevis-Eizellen wurden als Expressionssystem für Transportexperimente mit radioaktiv markierten Substraten sowie für die Elektrophysiologie verwendet. Dafür wurden sie vorher freundlicherweise von Frau I. Markmann (Zentrum Physiologie und Pathophysiologie, Abteilung Vegetative Physiologie und Pathophysiologie, Georg-August Universität, Göttingen) nach den geltenden Tierschutzvorschriften in Form eines Ovar-Teilstücks operativ entfernt und mit Kollagenase vereinzelt. Anschließend wurden sie unter dem Mikroskop selektiert und einzeln mit hOAT4-cRNA bzw. Wasser (Kontrollzellen) injiziert.

2.7.1 Gewinnung von hOAT4-cRNS zur Injektion in Oozyten

Für die cRNS-Synthese wurde das pSPORT6-hOAT4-Konstrukt benutzt. Nach einer Linearisierung des Plasmids mittels „NotI Verdauung“ wurde die in vitro Transkription durchgeführt. Hierfür wurde das „*mMessage mMachine kit*“ (Ambion, Austin, TX, USA) mit SP6 Promotor verwendet. Die entstandene hOAT4-cRNS wurde mit Hilfe der Lithium Präzipitation, nach Angaben des Herstellers, gereinigt. Bei der Resuspendierung der cRNS in Wasser wurde eine Endkonzentration von 1 µg/µl hergestellt.

2.7.2 Operative Entnahme der Oozyten

Für die Gewinnung der Oozyten wurden *Xenopus laevis*-Weibchen von der Firma Nasco, (Fort Atkinson, Wisconsin, USA) bezogen und in einem Tag/Nacht-Rhythmus von jeweils 12 Stunden in temperierten (20 °C) und mit gefiltertem Wasser versorgten Aquarien des Instituts gehalten. Ca. vier Tage vor dem geplanten Versuch erfolgte die operative Entfernung eines Ovar-Teilstücks. Hierfür wurden die ausgewählten Froschweibchen in eine hypothermale Anästhesie versetzt, die durch Eintauchen in Eiswasser mit einem Zusatz von 0,2%igem Tricain hervorgerufen wurde. Die Lagerung auf Eis und in Rückenlage gab das Operationsgebiet frei und sorgte für die Aufrechterhaltung der Anästhesie. Den so betäubten Fröschen wurde durch einen jeweils ca. 1cm langen, lateralen Haut- und Muskelschnitt das Abdomen eröffnet. Nach vorsichtigem Aufsuchen und Freilegen des Ovars wurde dieses mittels eines kleinen Hakens mobilisiert. So konnte ein Teil des Ovars mit einer Schere entfernt werden.

Nach Repositionierung und Adaptation der Wundränder erfolgte die Versorgung des Operationsschnittes durch eine Muskel- sowie Hautschichtnaht mit resorbierbarem Nahtmaterial. In den Tagen nach dieser Prozedur wurden die betroffenen Froschweibchen zur Verbesserung der Wundheilung und Rekonvaleszenz in speziellen Aquarien separat von den anderen Fröschen gehalten. Einzelne Individuen können einem solchen Eingriff erfahrungsgemäß ca. alle sechs bis acht Wochen wechselseitig unterzogen werden.

Aus dem entfernten Ovar-Teilstück wurden anschließend die Oozyten durch enzymatische Auflösung des sie umgebenden Bindegewebes herausgelöst, bei zwischenzeitlicher Inkubation in 18°C-temperiertem Oozyten-Ringer (ORI; 90 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ (Magnesiumchlorid), 5 mM HEPES/TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan); pH 7,6).

2.7.3 Vereinzlung und Defollikulierung der Oozyten

So gewonnene *Xenopus laevis*-Oozyten sind von mehreren Hüllen umgeben. Dies sind von innen nach außen Plasmamembran, Vitellinmembran, Follikelzellschicht, Theka und einschichtiges Plattenepithel (Dumont und Brummett 1978). Für die Transportmessungen

wurden die Eizellen aus ihrem Verbund im Ovar-Teilstück gelöst und von Follikelzellschicht und weiter außen gelegenen Schichten befreit.

Hierfür wurden sie einer Kollagenase-Behandlung (Typ CLSII, Biochrom, Berlin) unterzogen. Um den Wirkungsgrad der Kollagenase zu verbessern, wurden die Oozyten zuvor mechanisch mit Hilfe von spitzen Pasteurpipetten vorsichtig aus dem sie umgebenden Bindegewebe herausgelöst und anschließend über Nacht in einer Kollagenase-Lösung (7 µg Kollagenase / 20 ml ORI) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Oozyten zum Stoppen der enzymatischen Reaktion für ca. 10 Minuten in calciumfreiem ORI inkubiert. An den Eizellen haftende Follikelreste wurden im Anschluss durch mehrfaches Waschen in ORI abgelöst.

Aus den so präparierten Oozyten konnten nun die für die geplanten Experimente geeigneten Eizellen in entsprechender Anzahl ausgesucht und mit cRNS bzw. Wasser injiziert werden. Zwischenzeitlich wurden die Oozyten bei 18 °C in ORI inkubiert (Oozyteninkubator/Kühlschrank: Umbau auf 18-20 °C durch die Werkstatt des Instituts; Liebherr, Biberach an der Riss, Deutschland).

2.7.4 Selektion der Oozyten

Da die Oogenese in ausgewachsenen weiblichen *Xenopus laevis*-Fröschen asynchron verläuft (Smith et al. 1991), enthält das entfernte Teilstück des Ovars alle Stadien der Entwicklung von Oozyten. Die Einteilung der Stadien erfolgt nach Dumont (1972) in Stadium I bis VI. Für die weitere Versuchsdurchführung wurden nur Oozyten der Stadien V und VI verwendet, was eine Selektion notwendig machte.

Die Auswahl der Eizellen erfolgte einen Tag nach deren Entfernung aus dem Froschweibchen unter stereomikroskopischer Kontrolle (Serie M 3; Wild/Swissopic, Heerbrugg, Schweiz und Carl Zeiss, Jena, Deutschland). Während der Selektion befanden sich die Oozyten in einer mit ORI befüllten Petrischale. Ausgesucht wurden nur unversehrte Zellen, die über regelmäßige Pigmentierung und Oberflächenform verfügten.

Oozyten der Stadien V und VI sind mit ca. 1,0 – 1,3 cm Durchmesser größer als Oozyten vorangehender Stadien. Ein unpigmentiertes Äquatorialband teilt Oozyten dieses Stadiums in einen hellen (vegetativen) Pol und einen dunklen (animalen) Pol. Neben der makroskopisch erkennbaren Färbung unterscheidet sich auch die Organellenverteilung in den Polen. Nukleus und endoplasmatisches Retikulum befinden sich im animalen Pol, die Ribosomen im vegetativen (Soreq und Seidman 1992). Die Mikroinjektion von cRNS erfolgte in den vegetativen Pol.

2.7.5 Injektion der Oozyten

Im direkten Anschluss an die Selektion geeigneter Oozyten wurden diese mit Hilfe eines Mikroinjektors mit Injektionsbank (Nanoject Auto - Nanoliter Injektor; Drummond

Scientific Company, Broomall, PA, USA) unter dem Stereomikroskop mit cRNS bzw. H₂O (Wasser) injiziert.

An einem für diesen Zweck hergestellten Mikropipetten-Puller (PE-2; Narishige, Tokyo, Japan) wurden dafür Glaskapillaren (Hilgenberg, Malsfeld, Deutschland) mittels eines Gewichts und durch die Einwirkung von Hitze unter Erhalt ihres Lumens langgezogen und dabei einseitig angespitzt. Durch Bearbeitung mit einer Metallschere wurden die so entstandenen Kapillarspitzen anschließend gekürzt und dabei auf einen Durchmesser von 10-20 µm eingestellt. Für die Verwendung mit dem Mikroinjektor wurde eine so hergestellte Mikropipette mit ihrem unangespitzten Ende in die Pumpe eingespannt und retrograd mit Mineralöl (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) gefüllt. Die für den Einstich vorgesehene Spitze der Kapillare zeigte dabei auf die Injektionsbank. Sie wurde anschließend mit der gelösten cRNS (bzw. nur mit H₂O) aufgefüllt, was durch Einsaugen mittels Injektor geschah.

Die dafür verwendete cRNS lag gelöst in H₂O in einer Konzentration von 1µg/µl vor und wurde mit einem Injektionsvolumen von 23nl (entspricht 23ng cRNS) pro Oozyte eingebracht. Hierfür musste jede zu injizierende Eizelle einzeln auf der Injektionsbank in Position gebracht werden, so dass ein Wegrutschen oder –rollen zum Zeitpunkt des Einstichs vermieden werden konnte. Die Kapillarspitze wurde mittels der im Mikroinjektor eingebauten Mechanik der Oozyte angenähert und anschließend erfolgte Einstich und Injektion im vegetativen Pol der Oozyte. Nicht zu transfizierende Eizellen wurden zu Kontrollzwecken nur mit 23nl H₂O, ohne RNS, injiziert.

Beim Umgang mit allen Gegenständen, die in Kontakt mit der zu injizierenden RNS kamen, wurde insbesondere darauf geachtet, die Kontamination mit RNS-abbauenden Enzymen (RNAsen), wie sie z. B. auf der Hautoberfläche des Menschen vorkommen, zu unterbinden. Außerdem wurde mit besonderer Sorgfalt die Freigängigkeit des Kapillarlumens bewahrt.

Während des gesamten Injektionsprozesses inkubierten die Oozyten in ORI und wurden anschließend für weitere drei Tage bei 18°C in modifizierter Barth-Lösung (88mM NaCl, 1mM KCl, 0,3mM Ca(NO₃)₂ (Calciumnitrat), 0,41mM CaCl₂, 0,82mM MgSO₄, 15mM HEPES/NaOH; pH7,6), supplementiert mit 50µM Gentamycin, aufbewahrt. Hierfür wurden 24-Well-Platten verwendet, die mit 2ml Medium und bis zu fünf Oozyten pro Well bestückt waren. Während dieser Zeit wurde täglich das Medium gewechselt und Oozyten mit äußerlich erkennbaren morphologischen Veränderungen wurden verworfen. Nach drei Tagen, in denen die Oozyten das Genprodukt der in sie injizierten cRNS exprimierten, konnten alle verbleibenden und intakten Oozyten einem Transport-Experiment zugeführt werden.

2.8 Transport-Experimente mit *Xenopus laevis*-Oozyten

hOAT4 exprimierende *X. laevis*-Oozyten wurden für Influx-Experimente benutzt. Für die Messung kamen radioaktiv markierte Substanzen wie auch Methoden der Elektrophysiologie zur Anwendung. Als Kontrollzellen wurden H₂O-injizierte Oozyten verwendet, die sonst genauso behandelt waren wie cRNS-injizierte Oozyten.

Drei Tage nach der Injektion wurden die Transportexperimente durchgeführt. Dafür wurden die Oozyten initial dreimal mit je 3 ml ORI gewaschen.

2.8.1 Influx-Experimente

Für Influx-Experimente wurden die Oozyten anschließend im Transportmedium in 24-Well-Platten inkubiert, je eine Oozyte pro Well. Verwendet wurden für Influx-Versuche, soweit nicht anders angegeben, Transportmedien bestehend aus Oozyten-Ringerlösung mit 100 µM Urat als Tracer, mit einem Volumen von 3 ml pro Oozyte und einer Inkubationszeit von 30 bzw. 60 Minuten. Die Zeitmessung erfolgte für jede Oozyte einzeln. Nach der vorher festgelegten Inkubationszeit wurde das Transportmedium abgesaugt und verworfen. Die Oozyten wurden je dreimal mit 4 °C kalter ORI-Lösung gewaschen (je 3 ml / Well) und anschließend mit 0,1 ml [1 M] NaOH aufgelöst. Nach einer Inkubationszeit von 15 bis 20 Minuten wurde die Lösung durch Zugabe von [1 M] HCl neutralisiert, anschließend erfolgte die Messung der von den Proben ausgehenden Strahlung sowie Standardisierung wie zuvor beschrieben. Aus Aktivität der jeweiligen Probe (dpm) und spezifischer Aktivität (dpm/pmol) wurde jeweils die aufgenommene Stoffmenge des radioaktivmarkierten Substrats (pmol) pro Oozyte bestimmt. Jedes Experiment wurde, soweit nicht anders angegeben, dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Für jedes Experiment wurde im Vorfeld eine Kontrollgruppe definiert. Die weitere statistische Auswertung erfolgte wie zuvor für Influx-Versuche mit HEK-Zellen beschrieben.

2.8.2 Elektrophysiologie

Benutzt wurde die „Zwei Elektroden Spannungsklemmtechnik“, diese Arbeiten wurden freundlicher Weise von Frau Prof. Dr. B. C. Burckhardt (Zentrum Physiologie und Pathophysiologie, Abteilung Vegetative Physiologie und Pathophysiologie, Georg-August Universität, Göttingen) durchgeführt.

Die Vorbereitung der Oozyten für elektrophysiologische Experimente erfolgte wie oben beschrieben, mit dem Unterschied, dass ein leicht verändertes Medium zur Anwendung kam. Für Defollikulierung, Selektion und Injektion wurde ORI-2 (Oozyten-Ringer-2; 110 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 5 mM HEPES/TRIS; pH 7,5) verwendet. Für die dreitägige Inkubation wurde dieses Medium mit 50 µg / ml Gentamycin und 2,5 mM Natriumpyruvat supplementiert.

Für die Versuchsdurchführung waren Stereomikroskop (Modell M3; Carl Zeiss, Jena, Deutschland) mit Kaltlichtquelle (KL 1500 electronic, Schott, Mainz, Deutschland), Perfusionskammer mit Polyäthylenschlauchsystem (Eigenbau der Werkstatt des Instituts) und Mikromanipulatoren (Modell M; Carl Zeiss, Jena, Deutschland) auf einem gedämpften Holzarbeitstisch (Eigenbau) positioniert, welcher von einem nach einer Seite offenen und geerdeten Faraday-Käfig (Eigenbau) umgeben war. Angeschlossen war ein Voltage-Clamp Verstärker (OC-725; Warner, Hamden, CT, USA) mit zugehörigen Elektrodenhaltern (E45W; Warner, Hamden, CT, USA) und ein Flachbetschreiber (2-Kanal Modell BD 112; Kipp & Zonen, Delft, Niederlande). Die aus Borosilikatglaskapillaren mit Filament (Hilgenberg, Malsfeld, Deutschland) hergestellten Mikroelektroden waren gefüllt mit 3 M KCl bei einem Widerstand von $\sim 1 \text{ M}\Omega$.

Nach dem Anstechen einer Oozyte mit beiden Elektroden (Kommando- und Meßelektrode) wurde diese mit ORI-2 perfundiert, bis sich ein stabiles Membranpotential einstellte (nach ca. 10 Minuten). Das Ruhemembranpotential der Oozyten lag zwischen -20 und -60 mV. Anschließend wurde die Membranspannung der Eizelle mittels der Kommandoelektrode auf -60 mV stabil eingestellt, „geklemmt“. Dieses Potential wurde gewählt, weil es in etwa dem Membranpotential einer frühproximalen Nierentubuluszelle entspricht.

Es wurden dann in 10 mV-Intervallen für jeweils 10 Sekunden Klemmspannungen zwischen -90 und +10 mV angelegt, und der zur Aufrechterhaltung des jeweils vorgegebenen Membranpotentials nötige Strom wurde gemessen. Um den durch das Substrat induzierten Strom zu registrieren, wurde die Perfusionskammer im Wechsel von Kontrollmedium (ORI-2) und Transportmedium (ORI-2 mit Substrat) durchflossen. Zwischen den Messungen wurde ausgiebig mit Kontrollmedium gespült, Experimente wurden jeweils erst nach einer Stabilisierung des Membranpotentials fortgeführt.

Für die Auswertung wurde die Differenz aus gemessenem Strom in An- und Abwesenheit des Substrats gebildet.

2.9 Berechnung der Michaelis-Menten-Konstante

Ähnlich wie bei der Enzymkinetik stellt die Michaelis-Menten-Konstante ein deskriptives Merkmal von Transportvorgängen über Membranen dar (Cornish-Bowden 2013). Diese Konstante, die auch K_m -Wert genannt wird, beschreibt diejenige Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Transportgeschwindigkeit des betreffenden Transportproteins in seinem Expressionssystem erreicht ist. Dieser Wert kann dann unter bestimmten Umständen als Maß für die Substrataffinität des Transporters angegeben werden, wobei ein niedriger K_m -Wert für eine hohe Substrataffinität steht und umgekehrt.

Bezogen auf den zeitlichen Ablauf eines Transportexperiments können drei Phasen unterschieden werden: Erstens eine sehr kurze Anfangsperiode, die normalerweise nicht

messbar ist. Zweitens ein Fließgleichgewicht, bei dem ein annähernd linearer zeitlicher Zusammenhang zum transportierten Substrat besteht. Drittens ein Gleichgewichtszustand, bei dem sich die Netto-Substratkonzentrationen auf beiden Seiten der Membran nicht mehr ändern.

Messungen von Transportvorgängen werden im Zustand des Fließgleichgewichts durchgeführt, also zu Beginn der Reaktion. Dann ist das zu transportierende Substrat konzentrationsmäßig sehr groß und dessen Konzentration bleibt (bei kurzer Messdauer) praktisch konstant. Die bereits auf die andere Seite der Membran transportierte Substratmenge ist dann noch sehr klein, es findet praktisch kein Rücktransport statt. Die Transportgeschwindigkeit ist dann konstant (Lorsch 2014). In diesem Fall kann dann der K_m -Wert graphisch ermittelt oder mit computergestützten Verfahren berechnet werden, nach der modifizierten Michaelis-Menten-Gleichung:

$$J = J_{max} * [S] / K_m + [S]$$

Hierbei sind J bzw. J_{max} die aktuelle bzw. die maximale Transportrate bei einer Substratkonzentration $[S]$.

Zur Ermittlung der K_m für die hOAT4-vermittelte [3 H]ES-Aufnahme in Oozyten sowie die 6-CF-Aufnahme in HEK-Zellen wurde die Aufnahme von [3 H]ES und 6-CF mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen gemessen. Andere Variablen wie Aufnahmezeit, Temperatur und pH wurden konstant gehalten. Die statistische Auswertung und graphische Darstellung erfolgte nach der modifizierten Michaelis-Menten-Gleichung nach Malo und Berteloot (1991) mit Sigma Plot 2001 (SPSS Science, Chicago, IL, USA) mittels nichtlinearer Regressionsanalyse.

2.10 Besonderheiten einiger Substrate

2.10.1 Das Fluorescein-Derivat 6-Carboxyfluorescein

Fluorescein ist ein Farbstoff, der u. a. in der Ophthalmologie verwendet wird, z. B. als Vitalfärbung zum Nachweis von Hornhautepitheldefekten, bei der Fluoreszenzangiographie zur Darstellung des Blutflusses am Augenhintergrund oder zur Untersuchung des Tränenabflusses. Es ergeben sich vielfältige weitere Anwendungsgebiete, so benutzt man das Natriumsalz des Fluoresceins, Uranin, z. B. zum Einfärben von Kosmetika und in der Hydrogeologie zum Verfolgen von Grundwasserströmen.

Das Absorptionsmaximum des Fluoresceins liegt bei Wellenlängen um 494 nm, das Emissionsmaximum bei 518 nm.

Als fluoreszierendes Substrat wurde in dieser Arbeit ein Derivat des Fluoresceins, das 6-Carboxyfluorescein (6-CF), verwendet. Es hat nach Angaben des Herstellers ein

Absorptionsmaximum um 492 nm und ein Emissionsmaximum um 515 nm, bei sonst ebenfalls ähnlichen Eigenschaften wie Fluorescein.

So ist 6-CF, genauso wie auch Fluorescein, von der sogenannten Photobleichung (engl. *Photobleaching*) betroffen. Darunter ist ein permanenter Fluoreszenzverlust nach anhaltender oder wiederholter Belichtung zu verstehen, der durch photochemische Zerstörung der Fluorophor-Moleküle durch das Anregungslicht entsteht (Song et al. 1995; Lakowicz 2006). Aus diesem Grund wurden alle Messungen im Spektralfluorimeter (vgl. Abschnitt 2.5.2) unmittelbar nach den Transportversuchen durchgeführt. Außer im Rahmen der Transportversuche und der Messungen wurde 6-CF vor Tageslicht und anderem Licht geschützt aufbewahrt.

Denkbar wäre ebenfalls, dass die sogenannte Fluoreszenzlöschung (engl. *Quenching*) einen Einfluss auf die Messungen haben könnte. Damit sind alle Einflüsse gemeint, die eine (potentiell reversible) Abnahme der Intensität der Fluoreszenz eines Fluorophors bewirken, ohne diesen dabei zu zerstören (Arık et al. 2005; Lakowicz 2006). Im Rahmen der cis- und trans-Stimulationsversuche könnten alle Substrate, die dem Transportmedium beigelegt werden, bspw. über eine Komplexbildung mit dem 6-CF dessen messbare Fluoreszenz reduzieren. Aus diesem Grund wurde der Einfluss aller entsprechenden Substrate auf die Fluoreszenz von 6-CF untersucht. In Verdünnungsreihen wurde die gemessene Fluoreszenz des Transportmediums mit 6-CF verglichen mit der Fluoreszenz des Transportmediums mit 6-CF plus Substrat. Bei gleichen Konzentrationen des 6-CF war bei allen untersuchten Substraten kein *Quenching* feststellbar.

Die Experimente wurden, soweit nicht anders beschrieben, bei einem pH-Wert von 7,4 durchgeführt. Einige Messungen wurden bei anderen pH-Werten durchgeführt. Herstellerseitig gibt es keine ausreichenden Informationen zu den entsprechenden pK_s -Werten bzw. zur Microspeziesverteilung bei den unterschiedlichen pH-Werten. Daher sind hier die Berechnungen von Online-Diensten dargestellt (Abbildung 2.1 und Abbildung 2.2). Nach diesen Berechnungen liegt 6-CF bei einem pH-Wert von 7,4 zu ca. 95,4% als Monoanion vor und zu ca. 4,6% als Dianion. Bei pH 8,0 liegt 6-CF zu ca. 83,3% als Monoanion vor, zu ca. 15,9% als Dianion und zu ca. 0,8% als Trianion. Bei einem pH von 7,0 sind ca. 98,1% des vorliegenden 6-CF einfach negativ geladen, bei pH 6,5 sind es ca. 99,3 %, bei pH 6,0 sind es ca. 99,5%, bei pH 5,5 sind es ca. 98,8%.

2.10.2 Esteronsulfat

Esteronsulfat (ES, engl. *estrone sulfate*, deutsch teilweise auch „Estronsulfat“ oder „Östronsulfat“) ist die sulfatierte Form des Esterons, einem Steroidhormon. Beide stehen in enger metabolischer Beziehung zum Estradiol, dem am stärksten wirksamen humanen Östrogen (Kuhl 1998). Im Vergleich zum 6-CF spielen Photobleichung sowie Fluoreszenzlöschung beim Tritium-markierten ES keine Rolle. Auch besitzt es einen niedrigen pK_s -Wert und liegt demzufolge zwischen pH 3,0 und 14,0 zu 100% als

Monoanion vor (übereinstimmende Herstellerangabe und Online-Dienste, vgl. Abbildung 2.3 und Abbildung 2.4).

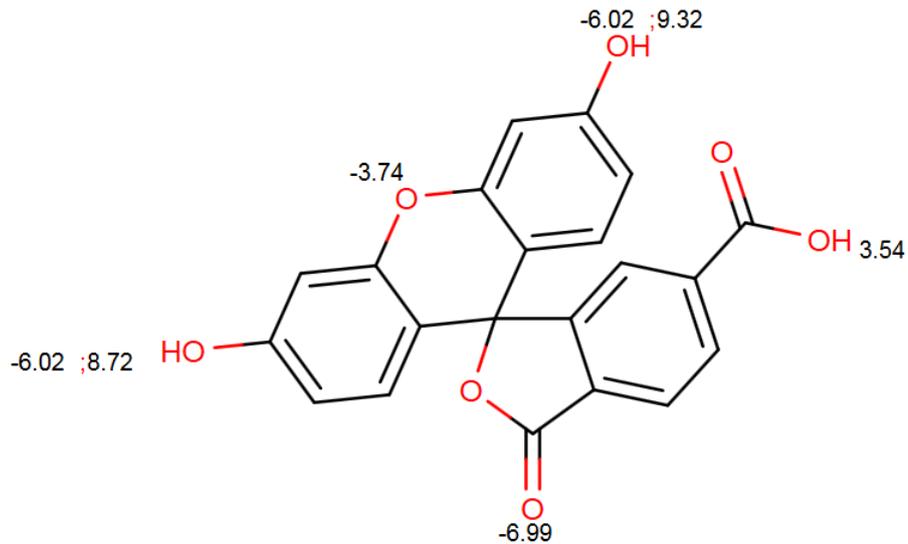


Abbildung 2.1: Strukturformel von 6-Carboxyfluorescein und zugehörige pK_s -Werte

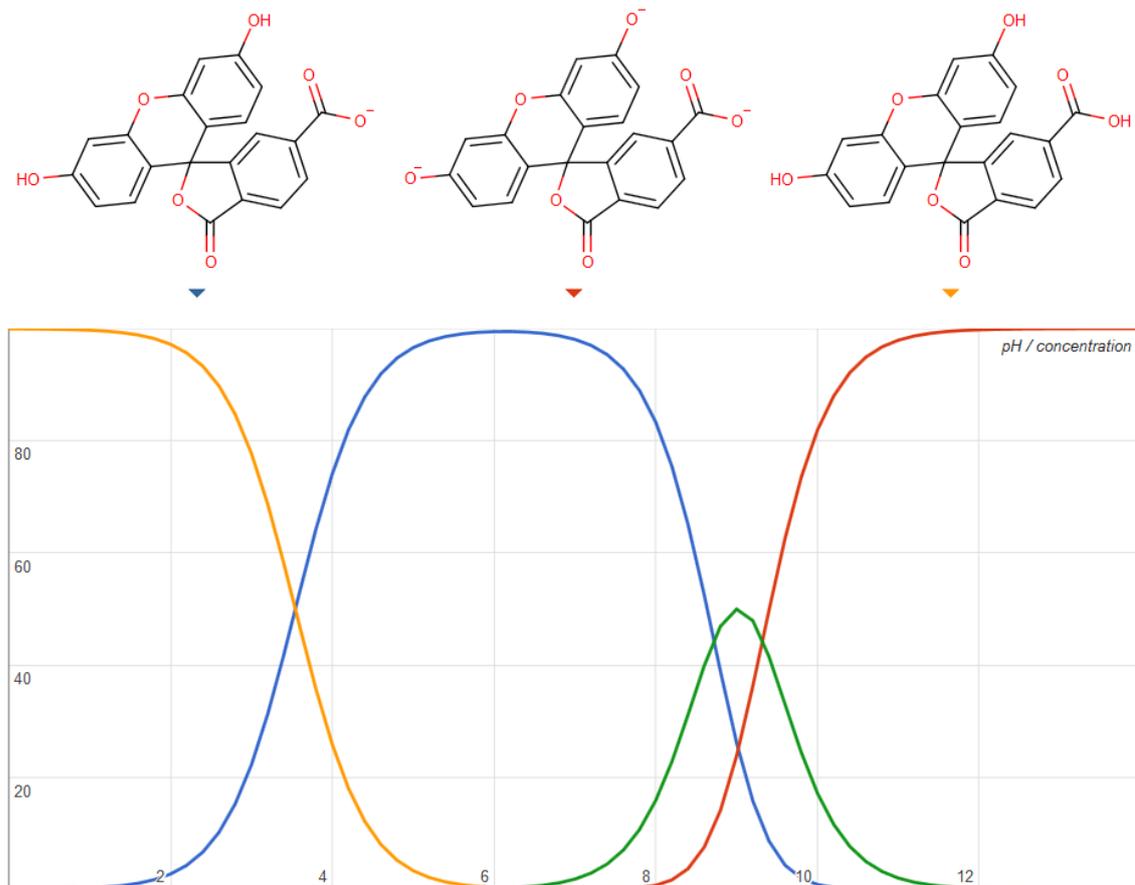


Abbildung 2.2: Mikrospeziesverteilung von 6-Carboxyfluorescein. x-Achse: pH-Wert, y-Achse: Konzentration in Prozent; orange: ungeladen, blau: Monoanion, grün: Dianion (ohne zusätzliche Strukturformel), rot: Trianion.

Abbildung 2.1 und Abbildung 2.2: Berechnet durch www.chemicalize.org, abgerufen am 26.03.2016, (<http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=6-carboxyfluorescein>), veröffentlicht unter der Creative Commons-Lizenz (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>)

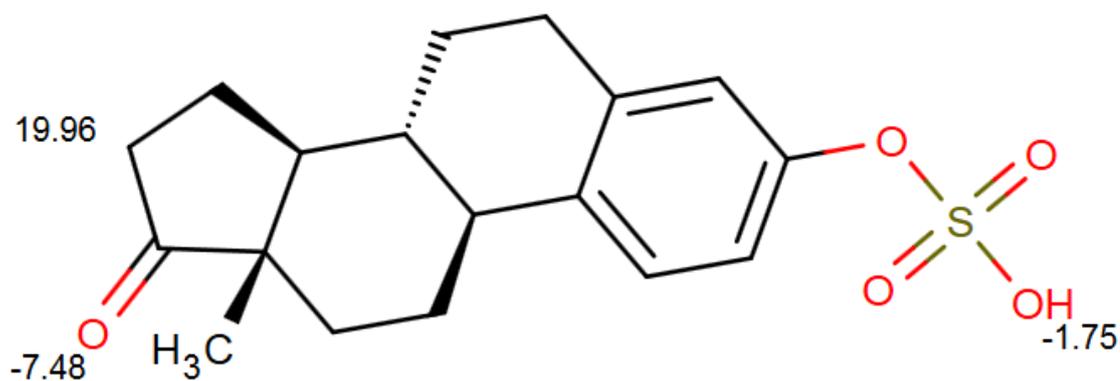
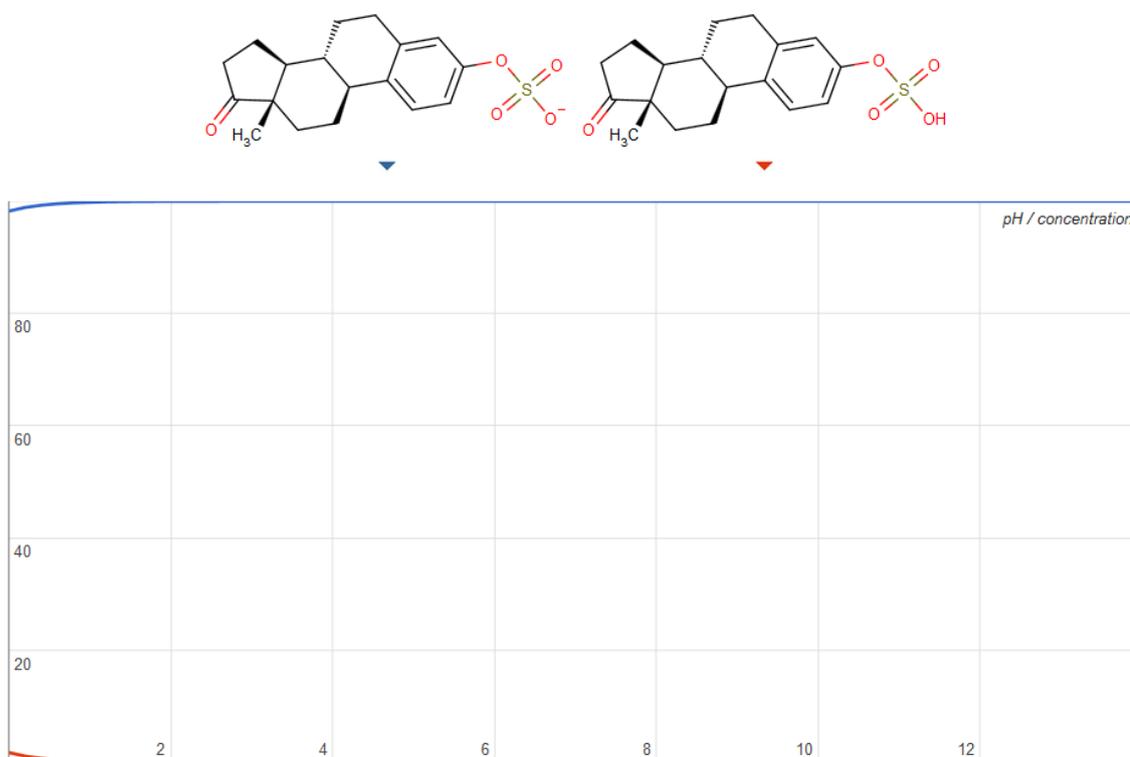
Abbildung 2.3: Strukturformel von Esteronsulfat und zugehörige pK_s-Werte

Abbildung 2.4: Mikrospeziesverteilung von Esteronsulfat. x-Achse: pH-Wert, y-Achse: Konzentration in Prozent; rot: ungeladen, blau: Monoanion

Abbildung 2.3 und Abbildung 2.4: Berechnet durch www.chemicalize.org, abgerufen am 26.03.2016 (<http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=estrone+sulfate>), veröffentlicht unter der Creative Commons-Lizenz (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>)

3 Ergebnisse

Um die physiologische Rolle, den Transport-Modus und die Triebkraft von hOAT4 zu untersuchen, wurden Transportexperimente an stabil transfizierten HEK-Zellen und an mit cRNS-injizierten *Xenopus laevis*-Oozyten durchgeführt.

3.1 Verifizierung funktioneller Eigenschaften des hOAT4-Klons

Die hOAT4-cDNS wurde von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande) bezogen und Sequenz-verifiziert. Vor der Gewinnung von eigenen Erkenntnissen wurde sichergestellt, dass es sich bei dem verwendeten hOAT4-Klon um einen funktionstüchtigen Klon handelt, der nach Expression in entsprechenden Transportsystemen mit den bereits bekannten Daten vergleichbare Ergebnisse zeigt.

Hierfür wurden die funktionellen Eigenschaften von hOAT4 evaluiert und sollten nach Expression in *X. laevis*-Oozyten durch grundlegende funktionelle Untersuchungen bestätigt werden: hOAT4-exprimierende Oozyten zeigten eine zehnfach höhere Aufnahme von Esteronsulfat als H₂O-injizierte Oozyten. Die für die Esteronsulfat-Aufnahme in Oozyten berechnete Michaelis-Menten-Konstante (K_m) betrug $1,1 \pm 0,2 \mu\text{M}$ (n=3).

3.2 Elektrophysiologie des hOAT4-vermittelten Transports

Für die Untersuchung der möglichen Spannungsabhängigkeit der Transportaktivität von hOAT4 wurden Messungen mit der „Zwei Elektroden Spannungsklemmtechnik“ an hOAT4-exprimierenden und Wasser-injizierten *X. laevis*-Oozyten durchgeführt.

Bei 4 unterschiedlichen transfizierten und 4 Kontroll-Oozyten wurden an die in An- und Abwesenheit von Esteronsulfat (50 μM) inkubierten Oozyten Klemmpotentiale von -90 mV bis +10 mV angelegt und die dadurch induzierten Einwärtsströme gemessen.

Unter der hOAT4-vermittelten Esteronsulfat-Aufnahme ließ sich keine elektrogene Aktivität feststellen. Daher wurden elektrophysiologische Methoden für die weitere Charakterisierung von hOAT4 nicht angewendet.

3.3 Eignung von 6-CF als Tracersubstanz für hOAT4-vermittelten Transport in HEK-Zellen

Um nach einer Alternative für die radioaktiv markierte Tracersubstanz [³H]Esteronsulfat zu suchen, wurde die fluoreszierende Substanz 6-Carboxyfluorescein getestet.

3.3.1 Fluoreszenzmessung nach Inkubation von HEK-Zellen in Transportmedium mit 6-Carboxyfluorescein

Hierfür wurde ein Experiment mit HEK-Zellen im Sinne eines Influx-Experimentes durchgeführt, wie unter Abschnitt 2.5.1 beschrieben. Die in den Zellen akkumulierte Fluoreszenz wurde anschließend im Spektrofluorimeter bestimmt. Zellen mit 30 minütiger Inkubation mit 50 μ M 6-CF wurden verglichen mit Zellen ohne Kontakt zum Fluoreszenzfarbstoff („Leerwert“), jeweils stabil mit hOAT4 transfizierte sowie nicht-transfizierte Zellen. Jede Bedingung bestand aus vier Einzelmessungen, der Versuch wurde nicht wiederholt, es wurde keine Konzentrationsbestimmung von Proteinen durchgeführt.

Es stellte sich heraus, dass stabil mit hOAT4 transfizierte HEK-Zellen im Vergleich mit nicht-transfizierten Zellen nach 6-CF-Aufnahme signifikant höhere Fluoreszenzmesswerte zeigten (Mittelwert \pm SEM: 1646,5 \pm 31,3 FU versus 71,8 \pm 11,3 FU, $p < 0,001$, siehe Abbildung 3.1). Die Fluoreszenzmesswerte der Zellen ohne Kontakt zum Fluoreszenzfarbstoff waren dagegen extrem gering (Mittelwert \pm SEM: 1,6 \pm 0,5 FU versus 2,7 \pm 0,9 FU, nicht dargestellt).

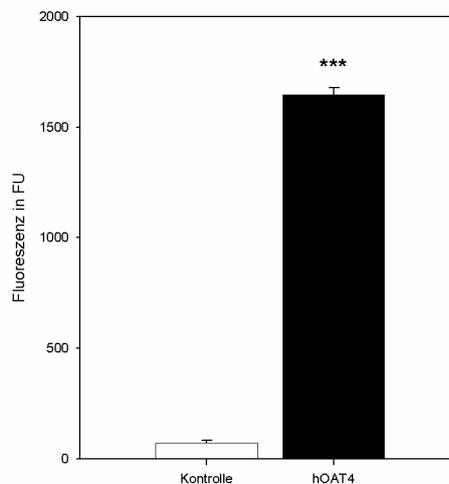
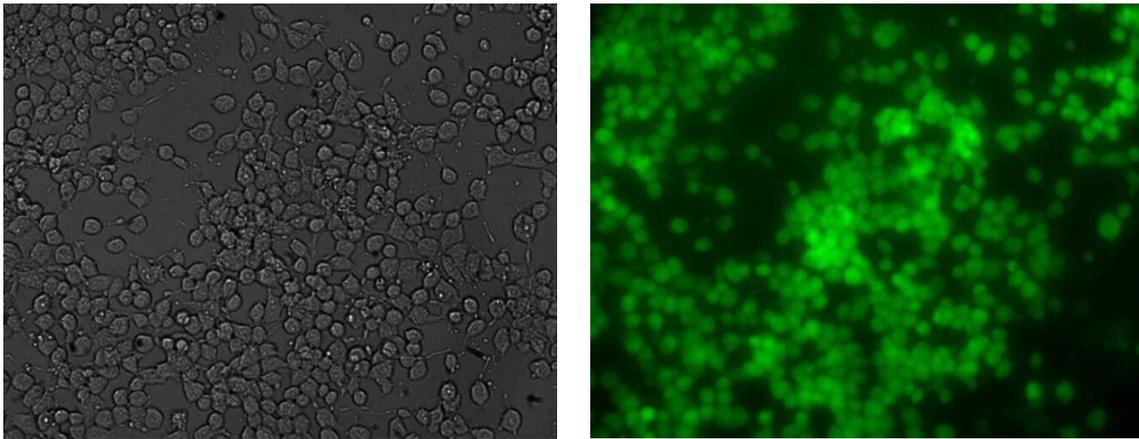


Abbildung 3.1: Fluoreszenzmessung nach Inkubation von HEK -Zellen im Transportmedium mit 6-CF. 50 μ M 6-CF, Inkubationszeit 30 min

3.3.2 Fluoreszenzmikroskopie von HEK-Zellen nach 6-CF-Aufnahme

Unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet war die intrazelluläre Anreicherung des 6-CF in HEK-hOAT4-Zellen nach einer Aufnahmezeit von 30 Minuten visuell gut nachvollziehbar (Abbildung 3.2). Qualitativ einwandfreie, „scharfe“ Aufnahmen der nicht-transfizierten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop sind bei verschiedenen Belichtungszeiten nicht gelungen (daher ohne Abbildung), die von den Zellen ausgehende Fluoreszenz war visuell deutlich geringer.



(A)

(B)

Abbildung 3.2: Fluoreszenzmikroskopie von HEK-hOAT4-Zellen nach 6-CF-Aufnahme. (A) Lichtmikroskopische Darstellung eines repräsentativen Areal in 400-facher Vergrößerung; (B) Fluoreszenzmikroskopische Darstellung desselben Areal wie bei (A) mit einer Exzitationswellenlänge von ca. 492 nm. Belichtungszeit 7 ms

Die weiteren Experimente wurden sowohl mit radioaktiv markierten Substraten wie [^3H]Esteronsulfat als auch mit der potentiell ungefährlicheren und kostengünstigeren Substanz 6-Carboxyfluorescein als Tracer durchgeführt.

3.4 Charakterisierung der hOAT4-vermittelten 6-CF-Aufnahme in HEK-Zellen

Nach der grundlegenden Untersuchung von 6-CF als Tracersubstanz für hOAT4-vermittelten Transport in HEK-Zellen wurde im nächsten Schritt die Kinetik untersucht, um geeignete Rahmenbedingungen für die folgenden Versuche zu finden. Hierfür wurden Zeitreihen und konzentrationsabhängige 6-CF-Aufnahmen in HEK-Zellen durchgeführt.

3.4.1 Zeitreihen der hOAT4-vermittelten 6-CF-Aufnahme in HEK-Zellen

Für die Bestimmung einer geeigneten Aufnahmezeit für die weiteren Transportexperimente mit 6-CF als Tracersubstanz wurde die 6-CF-Aufnahme von HEK-Zellen nach unterschiedlichen Aufnahmezeiten mit dem Spektrofluorimeter bestimmt und nach einer Proteinbestimmung mit der Proteinmasse ins Verhältnis gesetzt. Benutzt wurde hierfür 6-CF in einer Konzentration von 20 μM . Die Aufnahmezeiten betragen 15, 30, 45, 60, 120 und 300 Sekunden, bei drei unabhängigen Experimenten mit je vier Bestimmungen pro Bedingung.

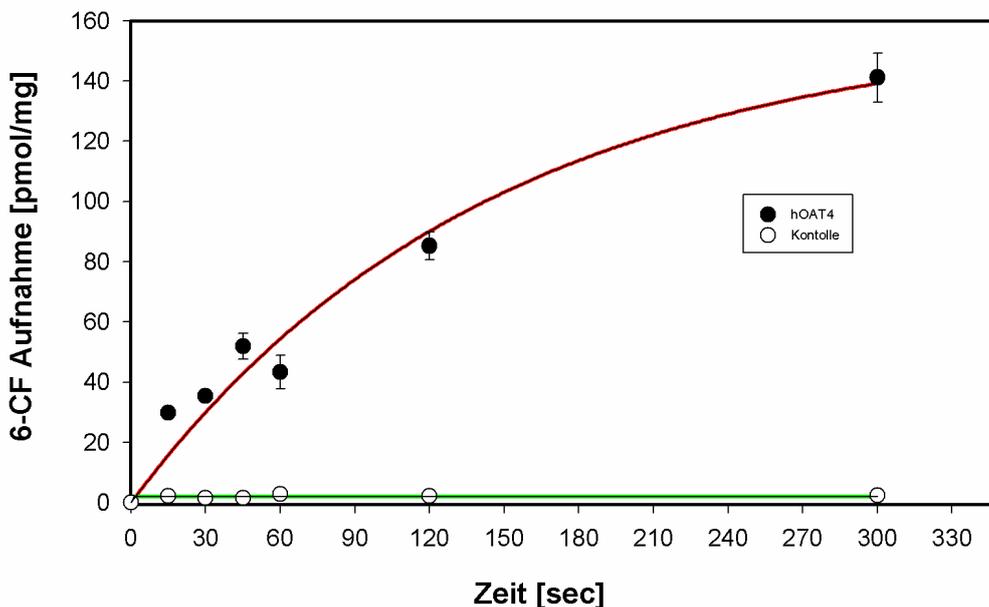


Abbildung 3.3: Zeitreihe der hOAT4-vermittelten 6-CF-Aufnahme in HEK-Zellen. 20 μ M 6-CF, Aufnahmezeiten 15, 30, 45, 60, 120 und 300 sec

Abbildung 3.3 zeigt die graphische Darstellung der 6-CF-Aufnahme in pmol 6-CF pro mg Protein in Abhängigkeit von der Aufnahmezeit, die Werte für hOAT4-transfizierte Zellen und nicht-transfizierte Zellen werden dabei separat in zwei Reihen dargestellt.

Während sich dadurch für die nicht-transfizierten Zellen gleichbleibend geringe Werte zu allen Messzeitpunkten ergaben, zeigten die ermittelten Werte für die hOAT4-transfizierten Zellen eine steigende 6-CF-Aufnahme über die Zeit mit Sättigungskinetik (Mittelwerte \pm SEM in pmol / mg: 15 sec: 29,8 \pm 1,2 versus 2,2 \pm 0,3; 30 sec: 35,3 \pm 0,9 versus 1,4 \pm 0,2; 45 sec: 52,0 \pm 4,3 versus 1,6 \pm 0,3; 60 sec: 43,4 \pm 5,6 versus 2,8 \pm 0,7; 120 sec: 85,2 \pm 4,6 versus 2,2 \pm 0,2; 300 sec: 141,2 \pm 8,1 versus 2,4 \pm 0,2). Die 6-CF-Aufnahme der HEK-hOAT4-Zellen stellte sich mit einem annähernd linearen Verlauf bis ca. 60 sec dar.

Für die weiteren Aufnahme-Experimente mit 6-Carboxyfluorescein als Tracersubstanz wurde eine Aufnahmezeit von 30 sec gewählt.

3.4.2 Konzentrationsreihen der hOAT4-vermittelten 6-CF-Aufnahme in HEK-Zellen

Für die Bestimmung einer geeigneten 6-CF-Konzentration für folgende Transportexperimente wurde die Aufnahme von 6-CF in unterschiedlichen Konzentrationen in HEK-Zellen mit dem Spektrofluorimeter bestimmt und nach einer

Proteinbestimmung nach Bradford mit der Proteinmasse ins Verhältnis gesetzt. Dies geschah bei Raumtemperatur mit einer Aufnahmezeit von 30 sec. Die verwendeten Konzentrationen des 6-CF betragen 1, 2, 5, 10, 25 und 50 μM . In drei unterschiedlichen Experimenten wurden je vier Bestimmungen pro Bedingung durchgeführt.

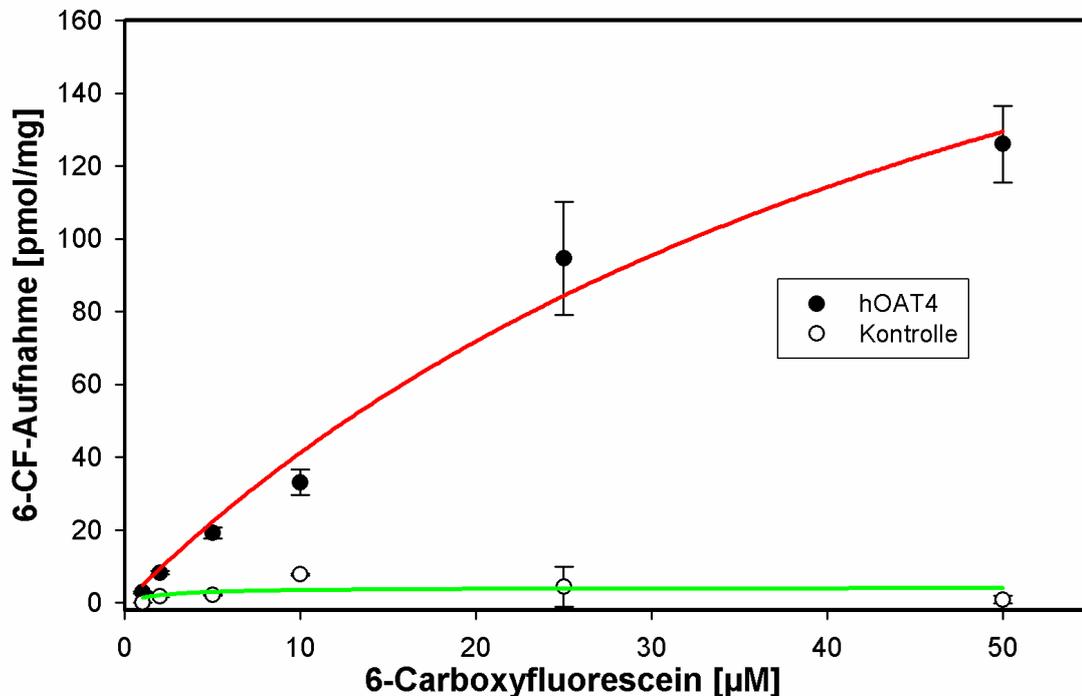


Abbildung 3.4: Konzentrationsabhängige 6-CF-Aufnahme in HEK-Zellen durch hOAT4. 6-CF in Konzentrationen von 1, 2, 5, 10, 25 und 50 μM ; Aufnahmezeit 30 sec

Abbildung 3.4 zeigt die graphische Darstellung der 6-CF-Aufnahme in pmol 6-CF pro mg Protein in Abhängigkeit von der Konzentration des verwendeten 6-CF. Die Werte für hOAT4-transfizierte Zellen und nicht-transfizierte Zellen werden dabei separat in zwei Reihen dargestellt. Die für HEK-hOAT4 ermittelten Werte zeigten mit steigenden Konzentrationen von 6-CF eine gesteigerte Aufnahme mit Sättigungskinetik, die Kontrollzellen zeigten gleichbleibend vernachlässigbar geringe Werte. Der für die 6-CF-Aufnahme von HEK-Zellen ermittelte K_m -Wert (vgl. Abschnitt 2.9) betrug $108,3 \pm 9,6$ μM .

Alle weiteren Experimente mit 6-CF wurden, soweit nicht anders angegeben, mit Konzentrationen von 50 μM durchgeführt.

3.5 Cis-Inhibitions-Studien der hOAT4-vermittelten 6-CF-Aufnahme

Einerseits um einen weiteren Vergleich mit bereits bekannten Daten zu erhalten, andererseits um neue Erkenntnisse zu gewinnen und eine Idee von der Größenordnung der erzielbaren Hemmung zu erhalten, wurden cis-Inhibitions-Studien der hOAT4-vermittelten 6-CF-Aufnahme an HEK-Zellen durchgeführt. Hierfür wurden mehrere unterschiedliche Substanzen getestet, um deren inhibitorische Potenz auf die 6-CF-Aufnahme zu untersuchen.

Dies waren zum einen Substanzen mit bekannten Interaktionen mit OATs (Abbildung 3.5). Des Weiteren wurden ausgewählte Carboxylate sowie weitere Substrate (Abbildung 3.6 und Abbildung 3.7) auf ihre cis-inhibitorische Potenz untersucht.

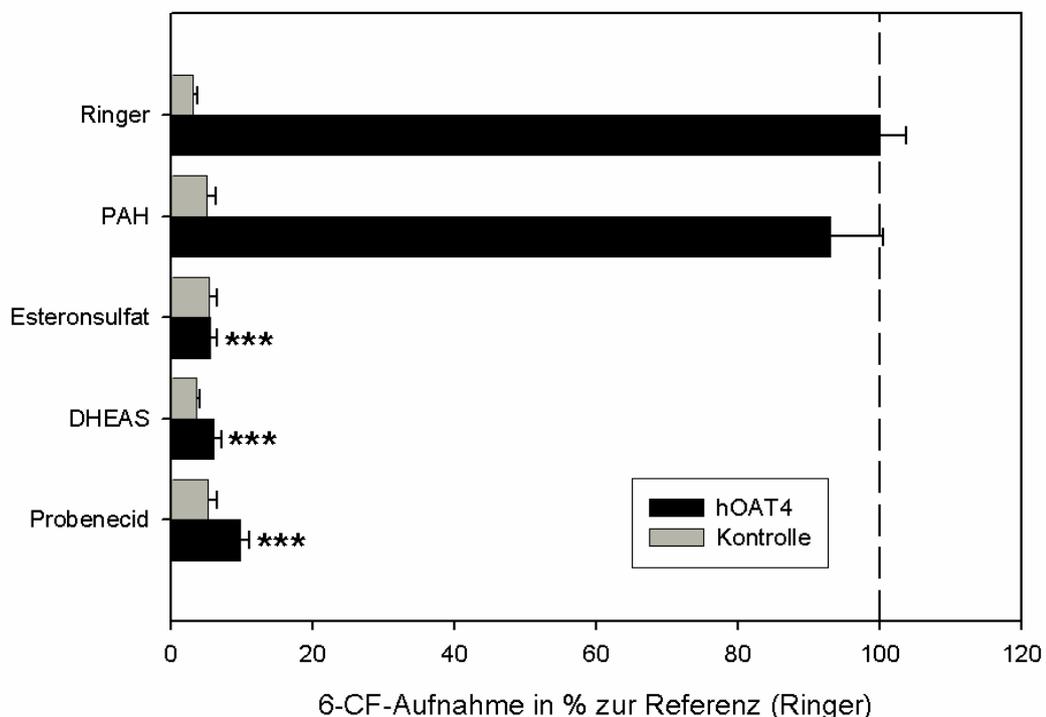


Abbildung 3.5: cis-Inhibition der hOAT4-vermittelten 6-CF-Aufnahme in HEK-Zellen: Bekannte Substanzen. 50 μ M 6-CF, Aufnahmezeit 30 sec, cis-Substanzen mit jeweils 500 μ M

Als Referenz dienten hOAT4-exprimierende HEK-Zellen ohne Inhibitor im Transportmedium, die in sieben unterschiedlichen Experimenten mit je vierfacher Bestimmung eine mehr als zehnfache 6-CF-Aufnahme ($60,8 \pm 6,4$ pmol/mg Protein x 30 sec) zeigten, verglichen mit nicht-transfizierten Kontrollzellen ($4,1 \pm 0,4$ pmol/mg Protein x 30 sec; $p < 0,00001$). Für einen Vergleich der folgenden getesteten Substrate wurde diese hOAT4-vermittelte 6-CF-Aufnahme im Transportmedium ohne Inhibitor als Standard definiert und auf $100 \pm 3,7$ % gesetzt.

Getestete Substanzen, von denen bereits bekannt war, dass sie von hOAT4 mit hoher Affinität transportiert werden, sind Esteronsulfat (ES) und Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS), während Para-Aminohippurat (PAH) das „Paradesubstrat“ für OATs der basolateralen Tubulusemembran ist und Probenecid bekannterweise den Transport anderer Substrate verhindert. Wie in Abbildung 3.5 dargestellt, wurde die hOAT4-vermittelte 6-CF-Aufnahme signifikant inhibiert durch jeweils 500 μM ES auf $5,5 \pm 0,9 \%$ ($p < 0,0001$), DHEAS auf $6,0 \pm 1,0 \%$ ($p < 0,0001$) und Probenecid auf $9,8 \pm 1,3 \%$ ($p < 0,0001$), verglichen mit der Kontrolle. PAH ($92 \pm 7,5 \%$) zeigte keine signifikante cis-Inhibition der 6-CF-Aufnahme.

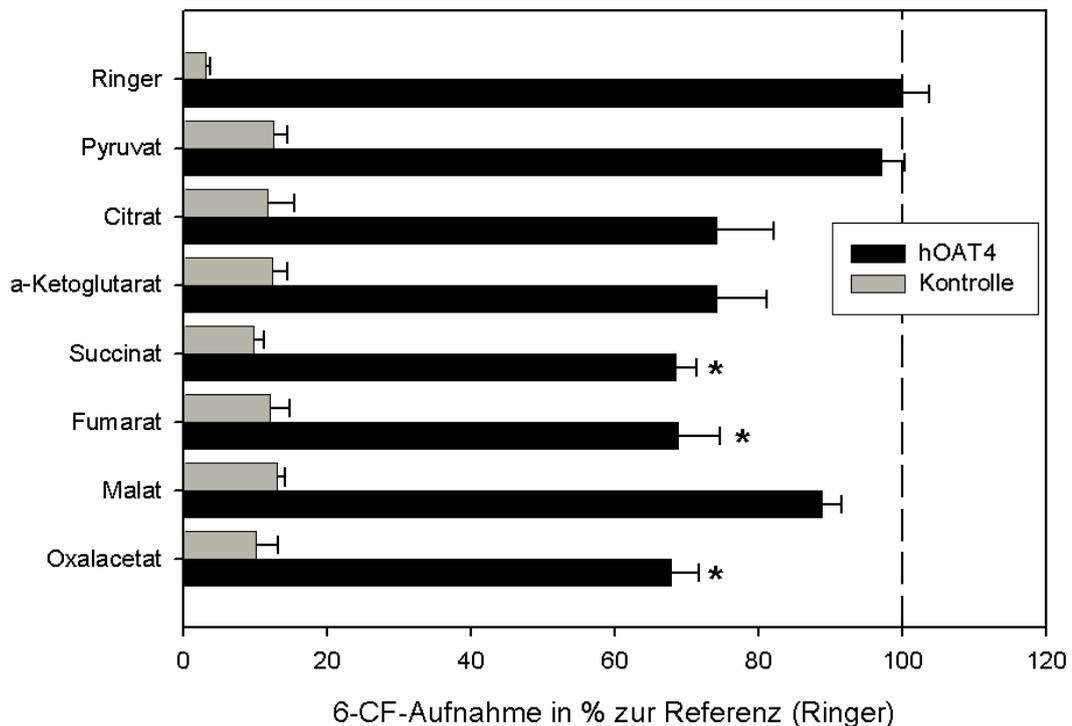


Abbildung 3.6: cis-Inhibition der hOAT4-vermittelten 6-CF-Aufnahme in HEK-Zellen: Ausgewählte Carboxylate. 50 μM 6-CF, Aufnahmezeit 30 sec, cis-Substanzen mit jeweils 500 μM

Die Untersuchungsergebnisse der Substrate des Zitratzyklus sind in Abbildung 3.6 dargestellt. Dabei zeigten Succinat, Fumarat und Oxalacetat, eine leichte, aber signifikante Reduktion der 6-CF-Aufnahme ($p < 0,05$) auf $68,5 \pm 2,9 \%$, $68,7 \pm 5,9 \%$, $67,9 \pm 3,7 \%$. Die Substanzen Pyruvat ($97,1 \pm 3,2 \%$), Citrat ($74,1 \pm 8,0 \%$), alpha-Ketoglutarat ($74,0 \pm 7,1 \%$) und Malat ($88,8 \pm 2,6 \%$) zeigten keine signifikante Hemmung der 6-CF-Aufnahme.

In Abbildung 3.7 sind Ergebnisse weiterer getesteter Substanzen dargestellt. L-Laktat ($99,8 \pm 3,0 \%$), Glutarat ($73,5 \pm 10,9 \%$), Orotat ($86,3 \pm 2,8 \%$) und Pyrazinoat ($103,8 \pm 5,0 \%$) zeigten unter den geschilderten Versuchsbedingungen keine signifikante cis-Hemmung. Um die Idee, hOAT4 könnte Urat transportieren, zu verfolgen, wurde hier zuerst dessen cis-inhibitorische Potenz untersucht. Es zeigte sich, dass 500 μM Urat im

Transportmedium die hOAT4-vermittelte 6-CF-Aufnahme in HEK-Zellen signifikant auf $61,0 \pm 7,8 \%$ ($p < 0,01$) reduziert.

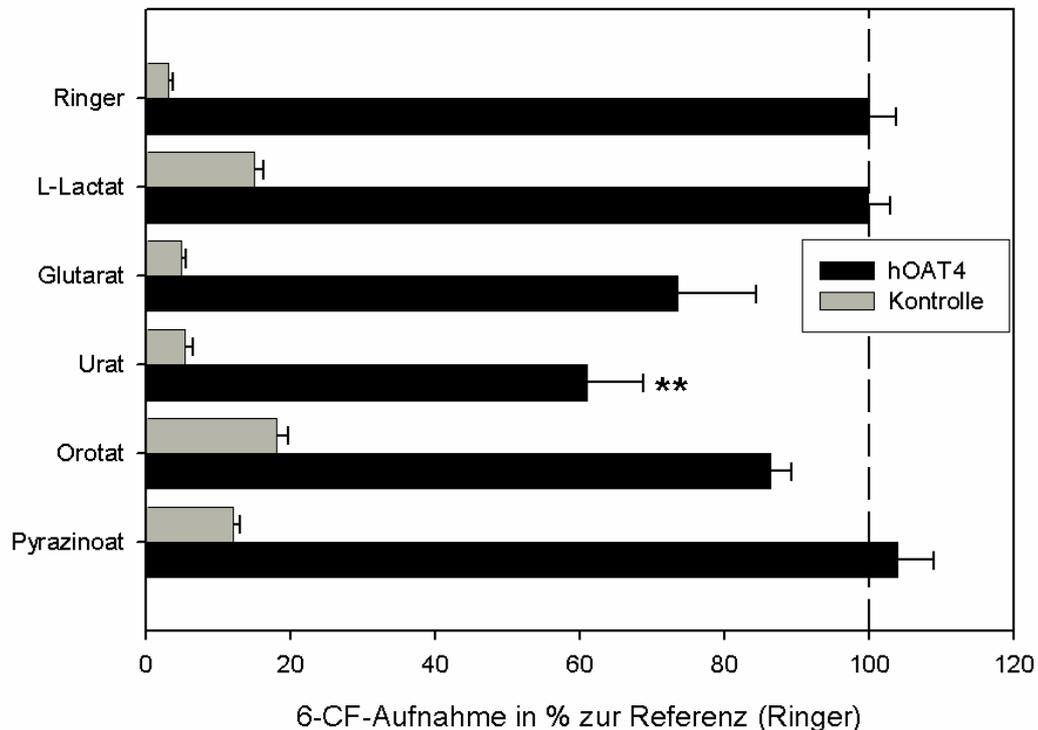


Abbildung 3.7: cis-Inhibition der hOAT4-vermittelten 6-CF-Aufnahme in HEK-Zellen: Weitere Substanzen. $50 \mu\text{M}$ 6-CF, Aufnahmezeit 30 sec, cis-Substanzen mit jeweils $500 \mu\text{M}$

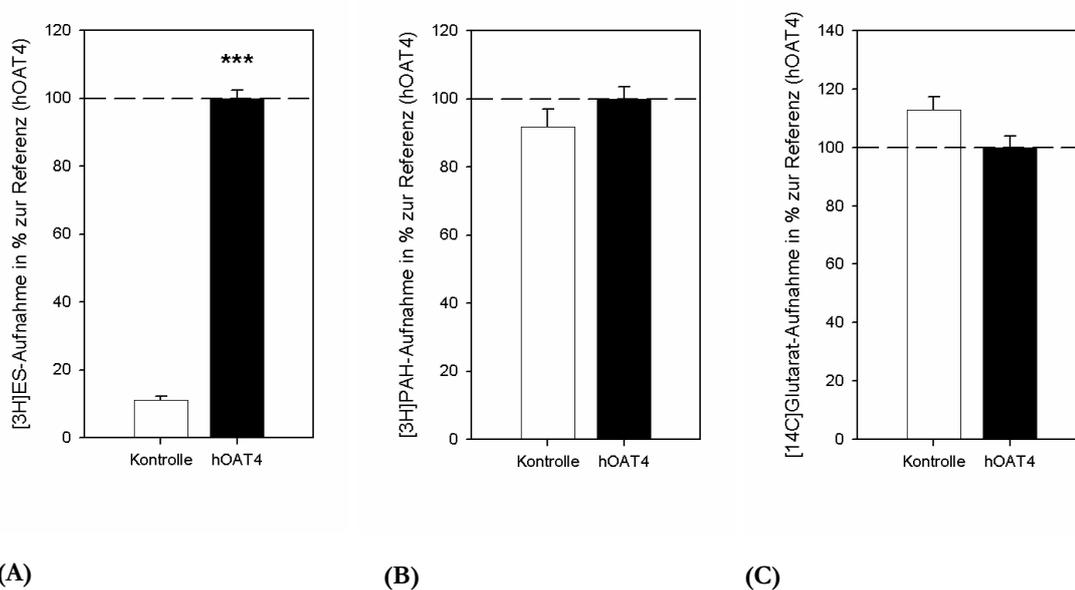
3.6 Aufnahme von radioaktiv markiertem ES, PAH, Glutarat und Urat durch hOAT4

Aufgrund des dargestellten cis-inhibitorischen Effekts von Esteronsulfat, Urat und Glutarat auf die 6-CF-Aufnahme wurden Aufnahme-Experimente mit den radioaktiv markierten Substraten [^3H]Esteronsulfat, [^{14}C]Glutarat und [^{14}C]Urat durchgeführt. Ergänzend kam die Untersuchung der hOAT4-vermittelten Aufnahme der radioaktiv markierten „Paradesubstanz“ für organische Anionen, [^3H]Para-Aminohippurat ([^3H]PAH), hinzu. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von Daten aus drei unabhängigen Experimenten mit je drei bzw. vier Einzelbestimmungen.

3.6.1 hOAT4-vermittelte Aufnahme von ES, PAH und Glutarat in HEK-Zellen

Die Untersuchung fand an HEK-Zellen statt, wobei hierfür [^3H]ES in einer Konzentration von 10 nM und mit einer Inkubationszeit von 2 min, [^3H]PAH in einer Konzentration von $20 \mu\text{M}$ und mit einer Inkubationszeit von 5 min sowie [^{14}C]Glutarat in einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ und mit einer Inkubationszeit von ebenfalls 5 min benutzt wurde. Für die graphische Darstellung wurde die gemessene absolute Aufnahme der jeweiligen Substrate

in die mit hOAT4 transfizierten Zellen zum Vergleich mit den jeweiligen nicht-transfizierten Zellen auf 100 % gesetzt.



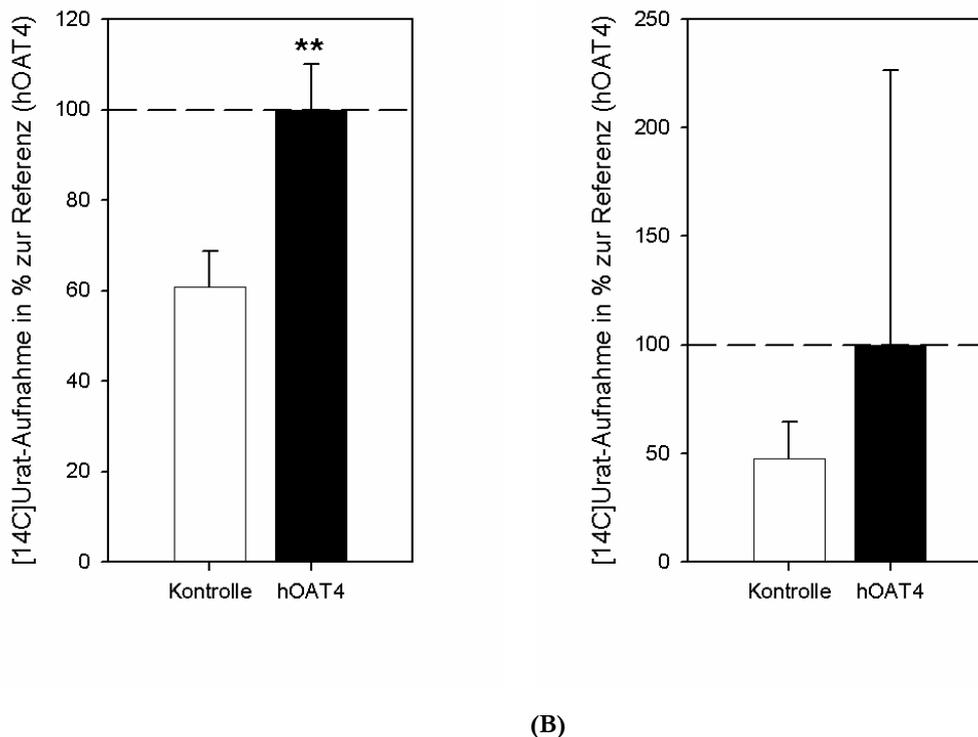
(A) **(B)** **(C)**
 Abbildung 3.8: Aufnahme radioaktiv markierter Substanzen durch hOAT4 in HEK-Zellen. (A) Aufnahme von 10 nM [³H]ES bei 2 min Inkubationszeit; (B) Aufnahme von 20 µM [³H]PAH bei 5 min Inkubationszeit; (C) Aufnahme von 10 µM [¹⁴C]Glutarat bei 5 min Inkubationszeit

In hOAT4-transfizierten HEK-Zellen akkumulierte zehnfach mehr Esteronsulfat ($185,5 \pm 14,2$ fmol pro mg Protein) als in nicht-transfizierten Zellen ($12,03 \pm 1,4$ fmol pro mg Protein). Im Gegensatz dazu zeigten hOAT4-exprimierende Zellen im Vergleich mit den Kontrollzellen weder eine signifikante Mehraufnahme von [³H]PAH ($100 \pm 3,5$ % versus $91,8 \pm 5,0$ %) noch von [¹⁴C]Glutarat ($100 \pm 3,8$ versus $112 \pm 4,5$ %).

3.6.2 hOAT4-vermittelte Aufnahme von Urat in HEK-Zellen und *X. laevis*-Oozyten

Für die an HEK-Zellen durchgeführten Untersuchungen wurde [¹⁴C]Urat in einer Konzentration von 50 µM und mit einer Inkubationszeit von 5 min benutzt.

Mit hOAT4 transfizierte HEK-Zellen zeigten eine 1,4-fach höhere Urat-Aufnahme als nicht-transfizierte Zellen ($p < 0,01$). Die durch hOAT4-vermittelte Urat-Aufnahme betrug $7,7 \pm 2,4$ pmol/mg Protein x 5 min, die der Kontrollzellen im Vergleich dazu $4,5 \pm 1,0$ pmol/mg Protein x 5 min (Abbildung 3.9 (A)).



(A) (B)
Abbildung 3.9: Aufnahme von radioaktiv markiertem Urat durch hOAT4. (A) in HEK-Zellen: Aufnahme von 50 μM [^{14}C]Urat bei 5 min Inkubationszeit; (B) in *X. laevis*-Oozyten: Aufnahme von 100 μM [^{14}C]Urat bei 30 min Inkubationszeit

Um diese Daten zu bestätigen, wurden weitere Aufnahme-Versuche an *X. laevis*-Oozyten durchgeführt. Die dafür verwendete [^{14}C]Urat-Konzentration betrug 100 μM bei einer Aufnahmezeit von 30 min.

Die hOAT4-exprimierenden Oozyten zeigten eine Urat-Aufnahme von $1,9 \pm 2,4$ pmol/Oozyte x 30 min, Wasser-injizierte Oozyten dagegen Aufnahmen von $0,9 \pm 0,33$ pmol/Oozyte x 30 min (n=3, Abbildung 3.9 (B)).

3.7 Trans-Stimulation der Transportaktivität von hOAT4 in HEK-Zellen

Für die weitergehende Untersuchung des Transportmodus und der Triebkräfte des hOAT4 wurden zunächst trans-Stimulationsexperimente durchgeführt. Falls hOAT4 als Austauscher funktioniert, sollte sich seine Transportrate durch das Angebot von passenden Substraten auf beiden Seiten der Plasmamembran erhöhen lassen.

Benutzt wurden HEK-Zellen, die für 2 h mit den im Kulturmedium gelösten Testsubstanzen vorbeladen wurden, wie in Abschnitt 2.5.1 beschrieben. Die Testsubstanzen waren PAH, Glutarat, L-Laktat, Nicotinat und Pyrazinoat, mit einer Konzentration von je 10 mM, und Urat in einer Konzentration von 1 mM (10 mM Urat ist

nicht löslich). Im Anschluss hieran wurde die hOAT4-vermittelte 6-CF-Aufnahme gemessen. Parallel dazu fanden Experimente mit sonst gleichem Versuchsaufbau statt, bei denen die [³H]ES-Aufnahme gemessen wurde.

Als Referenz wurden mit Ringer vorbeladene Zellen benutzt. Für einen Vergleich der getesteten Substrate wurde die hOAT4-vermittelte 6-CF- bzw. [³H]ES-Aufnahme dieser Zellen als Referenz definiert und auf $100 \pm 8,7 \%$ bzw. $100 \pm 3,4 \%$ gesetzt. Die dargestellten Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM von je drei unterschiedlichen Experimenten mit je vier Bestimmungen.

3.7.1 Trans-Stimulation der hOAT4-vermittelten 6-CF-Aufnahme in HEK-Zellen

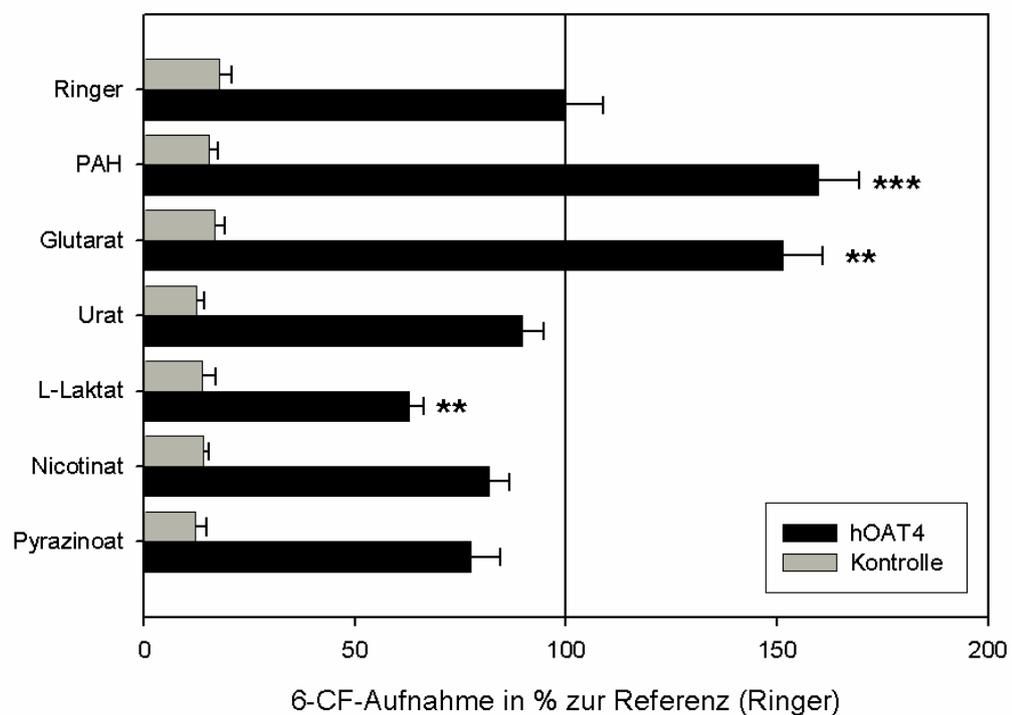


Abbildung 3.10: trans-Stimulation der hOAT4-vermittelten 6-CF-Aufnahme in HEK-Zellen. 50 μ M 6-CF, Aufnahmezeit 30 sec; Vorbeladung mit trans-Substanzen für 2 h, Urat in einer Konzentration von 1 mM, die anderen Substanzen in einer Konzentration von 10 mM

Abbildung 3.10 zeigt eine um $59,8 \pm 9,6 \%$ ($p < 0,001$) gesteigerte 6-CF-Aufnahme durch Vorbeladung mit PAH und eine um $51,3 \pm 9,3 \%$ ($p < 0,01$) gesteigerte Aufnahme durch Vorbeladung mit Glutarat. Während Urat, Nicotinat und Pyrazinoat mit 6-CF-Aufnahmen von $89,5 \pm 5,2 \%$ versus $81,8 \pm 4,8 \%$ versus $77,3 \pm 7,2 \%$ keinen signifikanten trans-Effekt zeigten, hemmte L-Laktat die 6-CF-Aufnahme signifikant auf $62,8 \pm 3,3 \%$, verglichen mit den Kontrollzellen ($p < 0,01$).

3.7.2 Trans-Stimulation der hOAT4-vermittelten ES-Aufnahme in HEK-Zellen

Die parallel mit [³H]ES als Tracersubstanz durchgeführten trans-Stimulationsuntersuchungen sind in Abbildung 3.11 dargestellt. Durch Vorbeladung mit PAH zeigte sich eine Steigerung der [³H]ES-Aufnahme um $23,9 \pm 3,6 \%$ ($p < 0,01$), durch Vorbeladung mit Glutarat eine Steigerung um $68,4 \pm 3,5 \%$ ($p < 0,001$). Urat, Nicotinat und Pyrazinoat zeigten eine [³H]ES-Aufnahme von $107,4 \pm 3,6 \%$ versus $105,7 \pm 7,7 \%$ versus $98,4 \pm 11,2 \%$ und damit keinen signifikanten trans-Effekt. Die bei Laktat beobachtete leichte Hemmung ($94,5 \pm 1,2 \%$) war ebenfalls nicht signifikant.

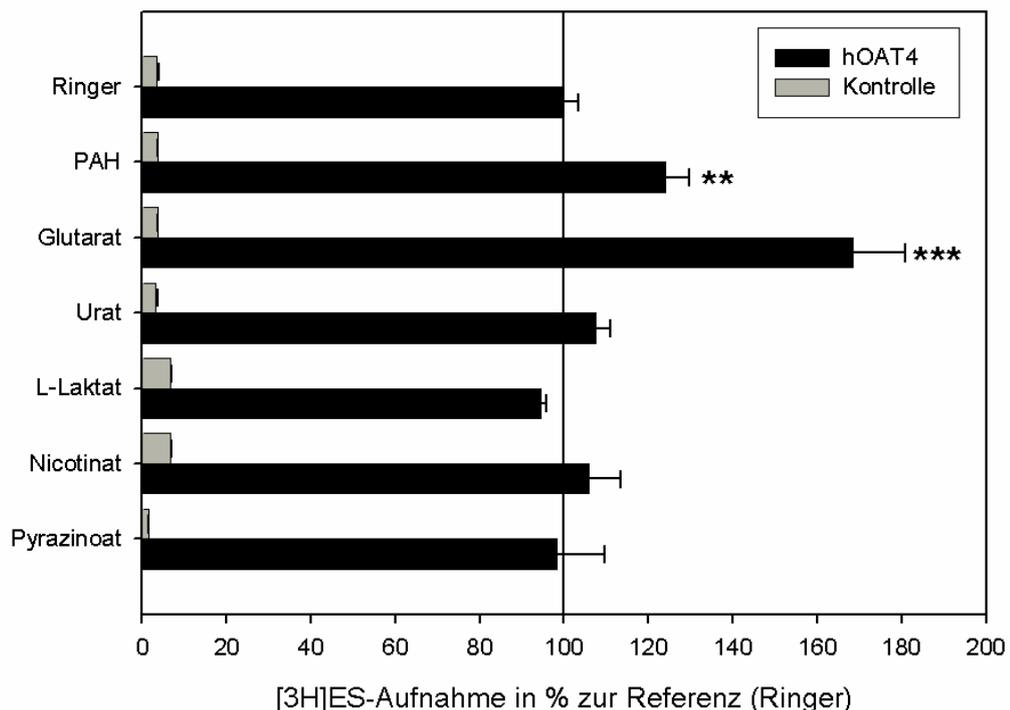


Abbildung 3.11: trans-Stimulation der hOAT4-vermittelten [³H]ES-Aufnahme in HEK-Zellen. 10 nM [³H]ES, Aufnahmezeit 120 sec; Vorbeladung mit trans-Substanzen für 2 h, Urat in einer Konzentration von 1 mM, die anderen Substanzen in einer Konzentration von 10 mM

Diese für die [³H]ES-Aufnahme beobachteten Werte zeigen also ähnliche Tendenzen wie die bei der 6-CF-Aufnahme beobachteten trans-Stimulations-Muster.

3.8 pH-Wert-Abhängigkeit des hOAT4-vermittelten Transports

Die bei der Vorbeladung mit L-Laktat beobachtete signifikante Hemmung der hOAT4-vermittelten 6-CF-Aufnahme in HEK-Zellen führte zu der Frage, welcher Effekt für diese Hemmung verantwortlich sein könnte bzw. welche Veränderungen intrazelluläres Laktat

auslösen könnte. Daher wurde der Einfluss der Protonen- bzw. Hydroxylionenkonzentration auf die Transportaktivität von hOAT4 untersucht.

Hierfür wurden Versuche der hOAT4-vermittelten 6-CF- und [³H]ES-Aufnahme durchgeführt, die im Transportmedium mit verändertem pH-Wert stattfanden. In weiteren Experimenten wurde der Versuch unternommen, Einflüsse von intrazellulären pH-Änderungen auf die Transportaktivität von hOAT4 darzustellen.

3.8.1 hOAT4-vermittelte 6-CF-Aufnahme mit unterschiedlichen pH-Werten extrazellulär

Mit hOAT4 transfizierte HEK-Zellen und Kontrollzellen wurden für die 6-CF-Aufnahme 30 Sekunden lang im Transportmedium (*Mammalian Ringer*) inkubiert, das 6-CF in einer Konzentration von 50 µM enthielt und mittels NaOH bzw. HCl auf pH-Werte von 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,4 und 8,0 titriert war.

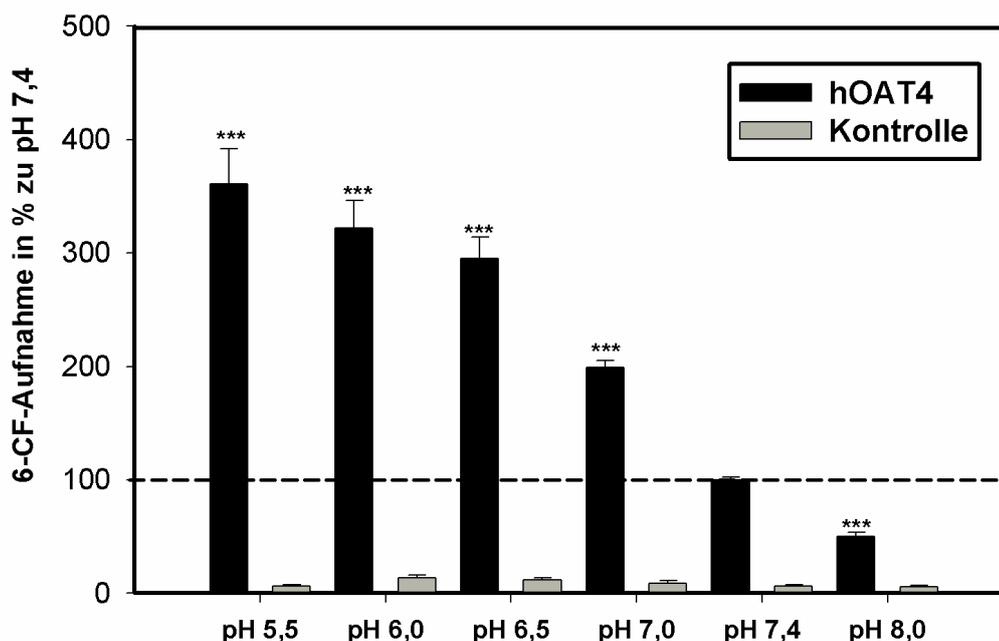


Abbildung 3.12: pH-Wert-abhängige hOAT4-vermittelte 6-CF-Aufnahme in HEK-Zellen. 50µM 6-CF, Aufnahmezeit 30 sec, bei pH Werten von 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,4 und 8,0

Als Referenz dienten hOAT4-exprimierende Zellen mit einem pH-Wert von 7,4 im Transportmedium, die in drei unterschiedlichen Experimenten mit je vierfacher Bestimmung eine mehr als zehnfache 6-CF-Aufnahme ($58,8 \pm 4,5$ pmol/mg Protein x 30 sec) zeigten, verglichen mit nicht-transfizierten Zellen ($4,0 \pm 1,0$ pmol/mg Protein x 30

sec; $p > 0,001$). Für einen Vergleich der verschiedenen pH-Werte wurde diese hOAT4-vermittelte 6-CF-Aufnahme im Transportmedium mit dem pH-Wert 7,4 als Referenz definiert und auf $100 \pm 2,6$ % gesetzt.

Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 3.12 dargestellt. Während die hOAT4-vermittelte 6-CF-Aufnahme bei pH 8,0 signifikant auf $49,8 \pm 4,0$ % ($p < 0,001$) im Vergleich mit der Aufnahme bei pH 7,4 gehemmt war, führte die Ansäuerung des extrazellulären Mediums auf pH 7,0 zu einer Stimulation der 6-CF-Aufnahme auf $199,2 \pm 5,8$ % ($p < 0,001$). Bei weiterer Ansäuerung auf pH-Werte von 6,5 bzw. 6,0 war diese Stimulation sogar noch ausgeprägter ($295,1 \pm 18,7$ % bzw. $321,8 \pm 24,4$ %) und erreichte bei dem pH-Wert von 5,5 einen Wert von $360,8 \pm 30,8$ % und damit eine 3,6-fache Steigerung der Aufnahme im Vergleich mit pH 7,4.

Die Kontrollzellen zeigten gleichbleibend geringe Messwerte bei allen getesteten pH-Werten. Zeichen der Zellablösung waren auch bei den extremen pH-Werten nicht erkennbar.

3.8.2 hOAT4-vermittelte ES-Aufnahme mit unterschiedlichen pH-Werten extrazellulär

Parallel mit den eben beschriebenen Versuchen wurde auch die [^3H]ES-Aufnahme bei unterschiedlichen pH-Werten gemessen. Mit hOAT4 transfizierte HEK-Zellen und nicht-transfizierte Zellen wurden für die [^3H]ES-Aufnahme 1 min lang im Transportmedium (*Mammalian Ringer*) inkubiert, das [^3H]ES in einer Konzentration von 10 nM enthielt und mittels NaOH bzw. HCl auf pH Werte von 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,4 und 8,0 titriert war.

Als Referenz dienten hOAT4-exprimierende Zellen mit einem pH-Wert von 7,4 im Transportmedium, die in drei unterschiedlichen Experimenten mit je vierfacher Bestimmung eine mehr als 30-fache [^3H]ES-Aufnahme zeigten, verglichen mit den nicht-transfizierten Kontrollzellen. Für einen Vergleich der Experimente verschiedener Versuchstage wurde diese hOAT4-vermittelte [^3H]ES-Aufnahme im Transportmedium mit dem pH-Wert 7,4 als Referenz definiert und auf $100 \pm 2,8$ % gesetzt.

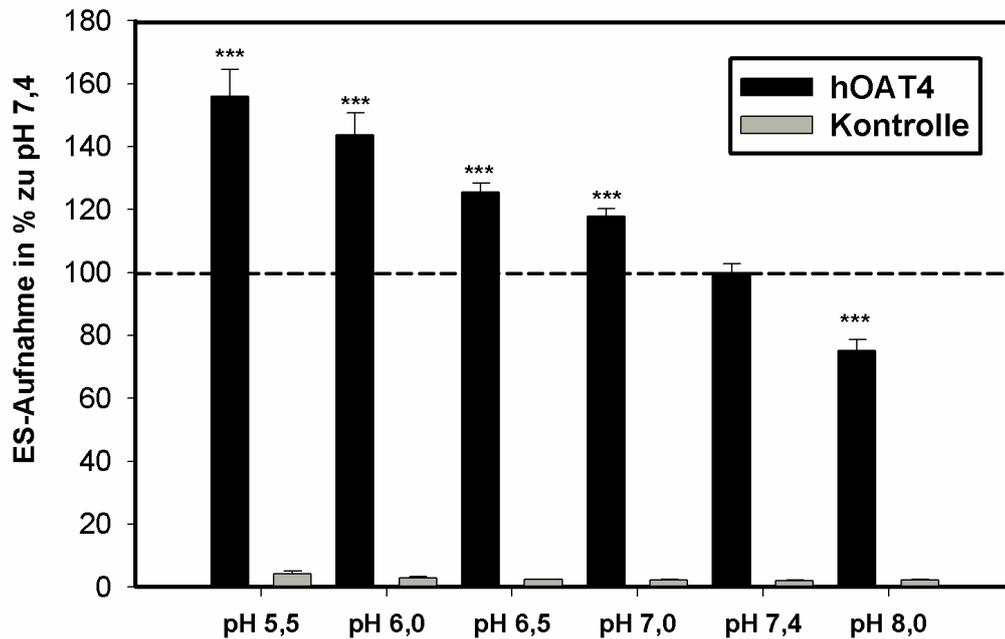


Abbildung 3.13: pH-Wert-abhängige hOAT4-vermittelte [^3H]ES-Aufnahme in HEK-Zellen. 10nM [^3H]ES, Aufnahmezeit 1 min, bei pH Werten von 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,4 und 8,0

Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 3.13 dargestellt. Während die hOAT4-vermittelte [^3H]ES-Aufnahme bei pH 8,0 signifikant auf $75,2 \pm 3,3 \%$ ($p < 0,001$) im Vergleich mit der Aufnahme bei pH 7,4 gehemmt war, führte die Ansäuerung des extrazellulären Mediums auf pH 7,0 zu einer signifikanten Stimulation der [^3H]ES-Aufnahme auf $117,8 \pm 2,2 \%$ ($p < 0,001$). Bei weiterer Ansäuerung auf pH-Werte von 6,5 bzw. 6,0 war diese Stimulation noch ausgeprägter ($125,5 \pm 2,7 \%$ bzw. $143,6 \pm 6,9 \%$) und erreichte bei dem pH-Wert von 5,5 einen Wert von $156,0 \pm 4,2 \%$.

Die Kontrollzellen zeigten gleichbleibend geringe Messwerte bei allen getesteten pH-Werten. Zeichen der Zellablösung waren auch hier nicht erkennbar.

Um die zuvor gesehenen pH-Effekte weiter zu beleuchten, wurde die [^3H]ES-Aufnahme bei pH-Werten mit und ohne Zugabe von Nigericin im Transportmedium (Ringer) gemessen. Mit hOAT4 transfizierte HEK-Zellen und nicht-transfizierte Zellen wurden für die [^3H]ES-Aufnahme 1 min lang im Transportmedium (*Mammalian Ringer*) inkubiert, das [^3H]ES in einer Konzentration von 10 nM enthielt und mittels HCl auf einen pH Wert von 5,5 titriert war. In Abbildung 3.14 sind die Ergebnisse aus zwei unterschiedlichen Versuchen mit je vierfacher Bestimmung dargestellt. Hier zeigt sich eine signifikante

Hemmung der hOAT4-vermittelten [^3H]ES-Aufnahme durch Nigericin um $23,8\% \pm 1,6\%$ ($p < 0,001$), bezogen auf die [^3H]ES-Aufnahme ohne Nigericin („Ringer“) bei pH 5,5.

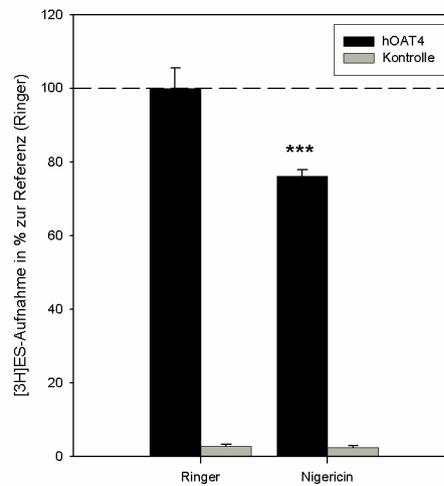


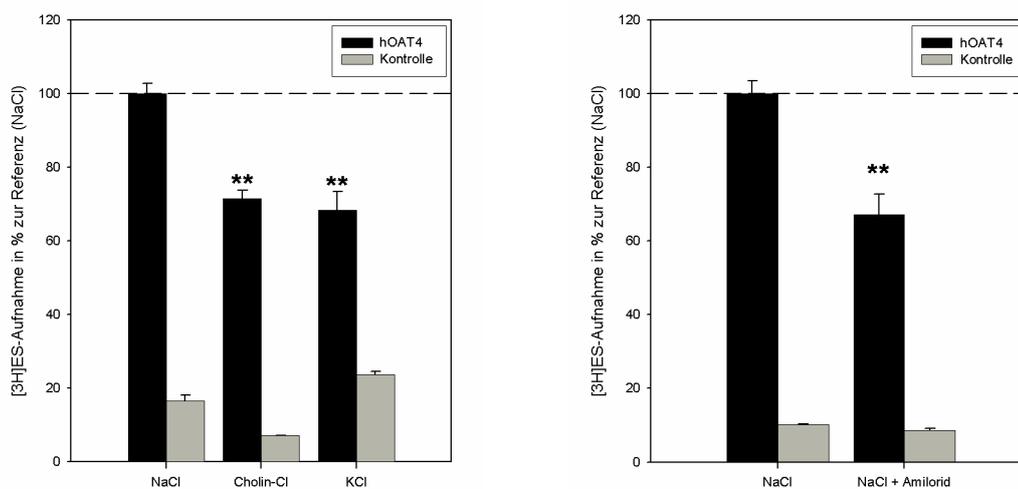
Abbildung 3.14: Nigericin-abhängige hOAT4-vermittelte [^3H]ES-Aufnahme in HEK-Zellen bei pH 5,5. 10nM [^3H]ES, Aufnahmezeit 1 min, bei einem pH Wert von 5,5; ohne („Ringer“) oder mit („Nigericin“) 10 μM Nigericin im Transportmedium

3.9 Natrium- und Chloridabhängigkeit der hOAT4-vermittelten ES-Aufnahme in HEK-Zellen

3.9.1 Natriumabhängigkeit der hOAT4-vermittelten ES-Aufnahme in HEK-Zellen

Aufgrund der Ergebnisse bezüglich der pH-Wert-Abhängigkeit des hOAT4-vermittelten Transports wurde auch die Natriumabhängigkeit der hOAT4-vermittelten [^3H]ES-Aufnahme an HEK-Zellen untersucht. Dafür wurde das im Transportmedium („*Mammalian Ringer*“) befindliche Natrium durch Cholin bzw. Kalium ersetzt und so unter natriumfreien Bedingungen für 2 min die Aufnahme des 10 nM [^3H]ES gemessen. In diesem Zusammenhang wurde auch die hOAT4-vermittelte 10 nM [^3H]ES-Aufnahme von HEK-Zellen in An- und Abwesenheit von 1 mM Amilorid untersucht.

Zur Standardisierung der Daten von drei unterschiedlichen Experimenten mit je vierfacher Einzelbestimmung wurde die hOAT4-vermittelte [^3H]ES-Aufnahme im Transportmedium mit Natrium („*Mammalian Ringer*“, unmodifiziert, bezeichnet als „NaCl“) der einzelnen Experimente auf je 100% gesetzt.



(A)

(B)

Abbildung 3.15: Natriumabhängige Aufnahme von $[^3\text{H}]$ ES durch hOAT4 in HEK-Zellen. 10nM $[^3\text{H}]$ ES, Aufnahmezeit 2 min: (A) Natriumfreie Medien („Cholin-Cl“ und „KCl“) im Vergleich zum unveränderten Transportmedium („NaCl“); (B) Unverändertes, natriumhaltiges Transportmedium („NaCl“) und Zugabe von 1 mM Amilorid zum sonst unveränderten, natriumhaltigen Transportmedium („NaCl + Amilorid“)

Wie in Abbildung 3.15 (A) gezeigt, konnte mit der Substitution von Natrium durch Cholin eine signifikante Reduktion der hOAT4-vermittelten $[^3\text{H}]$ Esteronsulfat-Aufnahme auf $71,5 \pm 2,3 \%$ ($p < 0,01$) beobachtet werden. Ein Austausch von Natrium gegen Kalium zeigte ebenfalls eine signifikante Reduktion der $[^3\text{H}]$ Esteronsulfat-Aufnahme auf $68,4 \pm 5,0 \%$ ($p < 0,01$).

Wie in Abbildung 3.15 (B) gezeigt, reduzierte die Anwesenheit von 1 mM Amilorid im sonst nicht modifizierten, natriumhaltigen Transportmedium signifikant die Aufnahme von $[^3\text{H}]$ Esteronsulfat auf $67,2 \pm 5,6 \%$ ($p < 0,001$), verglichen mit der $[^3\text{H}]$ Esteronsulfat-Aufnahme in Abwesenheit von Amilorid ($100,0 \pm 3,4 \%$).

3.9.2 Chloridabhängigkeit der hOAT4-vermittelten ES-Aufnahme in HEK-Zellen

Um den Einfluss von Chlorid auf die Transportaktivität von hOAT4 zu untersuchen, wurde Chlorid im Transportmedium durch Glukonat ersetzt. So wurde unter chloridfreien Bedingungen für 2 min die Aufnahme des 10 nM $[^3\text{H}]$ ES an HEK-Zellen gemessen. Zur Standardisierung der Daten von vier unterschiedlichen Experimenten mit je drei Einzelbestimmungen wurde die hOAT4-vermittelte $[^3\text{H}]$ ES-Aufnahme im Transportmedium mit Chlorid („Mammalian Ringer“, unmodifiziert, bezeichnet als „NaCl“) der einzelnen Experimente auf $100 \pm 5,7 \%$ gesetzt.

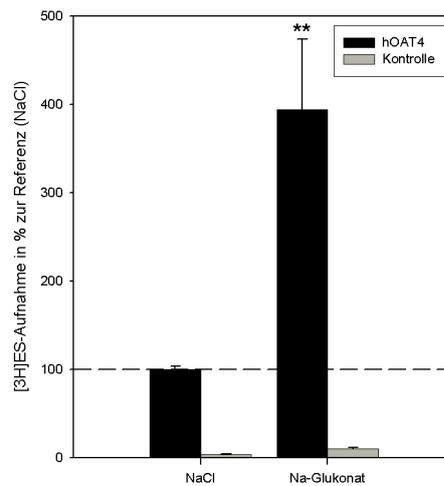


Abbildung 3.16: Chloridabhängige Aufnahme von $[^3\text{H}]\text{ES}$ durch hOAT4 in HEK-Zellen. 10nM $[^3\text{H}]\text{ES}$, Aufnahmezeit 2 min: Chloridfreies Medium („Na-Gluconat“) im Vergleich zum unveränderten Transportmedium („NaCl“)

Im chloridfreien Medium war die $[^3\text{H}]\text{ES}$ -Aufnahme in hOAT4-HEK-Zellen bemerkenswert erhöht, auf bis zu vierfache Werte ($393,7 \pm 79 \%$, $p < 0,01$) im Vergleich mit der Referenz. Die Kontrollzellen dagegen zeigten gleichbleibend geringe Messwerte.

4 Diskussion

Um die physiologische Rolle und den Transportmodus von hOAT4 näher zu untersuchen, wurde eine HEK-Zellkultur-Linie stabil mit hOAT4 transfiziert. Als weiteres Expressionssystem wurden *Xenopus laevis*-Oozyten verwendet. Neben einer elektrophysiologischen Untersuchung wurden überwiegend Transportexperimente mit Fluoreszenzfarbstoffen oder radioaktiv markierten Substanzen durchgeführt.

4.1 Verifizierung funktioneller Eigenschaften des hOAT4-Klons

In Übereinstimmung mit denen von Cha et al. (2000) publizierten Daten gehen andere Autoren zur Identifizierung einer funktionstüchtigen Expression von hOAT4 in den jeweiligen Expressionssystemen davon aus, dass dieser ES und DHEAS mit hoher Affinität transportiert. Dieser Transport ist durch Probenecid und Sulfbromophthalein, nicht jedoch durch PAH, hemmbar und besitzt keine Natriumabhängigkeit.

Die in Abschnitt 3.1 dargestellten, grundlegenden Charakteristika der hOAT4-vermittelten Esteronsulfat-Aufnahme in *X. laevis*-Oozyten befinden sich in guter Übereinstimmung zu den bereits veröffentlichten Daten (vgl. Abschnitt 1.1.2). Aufgrund dieser Vergleichbarkeit konnte man prinzipiell davon ausgehen, dass der vorliegende Klon zur Expression eines funktionstüchtigen hOAT4 führte, und so wurde mit der weiteren Charakterisierung des Transportverhaltens begonnen.

4.2 Elektrophysiologie

Wie in Abschnitt 3.2 beschrieben, ließ sich mit der „Zwei Elektroden Spannungsklemmtechnik“ an hOAT4-exprimierenden *Xenopus laevis*-Oozyten kein elektrogenes Potential feststellen. Einschränkend muss bedacht werden, dass die angeführten Daten von nur einem Versuchstag stammen und bewusst nicht wiederholt wurden. Man könnte also vermuten, dass die injizierten Oozyten das Zielprotein hOAT4, womöglich fehlerhaft, gar nicht exprimiert hätten und sich daher auch keine elektrogene Aktivität ableiten ließ. Allerdings haben die in der eigenen Arbeitsgruppe am selben Tag durchgeführte Transportexperimente mit radioaktiv markiertem Esteronsulfat an mit hOAT4-cRNS injizierten Oozyten derselben Charge einwandfreie Ergebnisse erbracht. Auch deshalb war davon auszugehen, dass das hier festgestellte Resultat valide ist.

Bezogen auf den Transportmodus ergeben sich daraus prinzipiell zwei Möglichkeiten, die diese Elektroneutralität erklären würden. Beim Transport des einfach-negativ geladenen Esteronsulfats in die Zelle wird entweder ein ebenfalls einfach-negativ geladenes Molekül im Antiport aus der Zelle heraus transportiert oder ein einfach-positiv geladenes Molekül

wird im Symport mit in die Zelle transportiert. Die zuletzt genannte Möglichkeit, also der Transport von Kationen durch hOAT4, kann als unwahrscheinlich angesehen werden. Daher lässt dieses Ergebnis darauf schließen, dass hOAT4 am ehesten als Antiporter arbeiten könnte. Dies deckt sich mit den Transportmodi anderer OATs und war so zuvor sowohl in der eigenen Arbeitsgruppe wie auch von anderen Autoren vermutet worden (Ekaratanawong et al. 2004).

4.3 Tracersubstanz 6-CF bei hOAT4-vermitteltem Transport in HEK-Zellen

Zu Beginn der durchgeführten Studien war nicht bekannt, ob hOAT4 auch Fluoreszenzfarbstoffe transportiert. Hier wurde erstmals das Fluoresceinderivat 6-Carboxyfluorescein (6-CF) auf seine Transporteigenschaften getestet. Es zeigte sich, dass im Zell-Lysat von hOAT4-transfizierten HEK-Zellen nach 30-minütiger Inkubation in 50 μM 6-CF mehr als 20-mal so viel Fluoreszenz messbar war, wie bei den nicht-transfizierten Zellen, bei sonst gleicher Behandlung (vgl. Abschnitt 3.3.1). Unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet zeigten hOAT4-transfizierte Zellen eine intrazelluläre Anreicherung der Fluoreszenz, im Gegensatz zu den nicht-transfizierten Zellen (vgl. Abschnitt 3.3.2). Dies kann als Beweis angesehen werden für die tatsächliche Translokation des 6-CF von extra- nach intrazellulär in hOAT4-exprimierenden HEK-Zellen. Diese Ergebnisse ließen auf eine mögliche Eignung des 6-CF als Tracersubstanz für die Untersuchung des Transportverhaltens von hOAT4 schließen und zeigen außerdem, dass das gewählte Protokoll für Influxversuche (vgl. Abschnitt 2.5.1 ff.) adäquat ist.

Um geeignete Variablen für weitere Transportexperimente festzusetzen, wurde nun die Kinetik des hOAT4-vermittelten 6-CF-Transports untersucht.

Die zeitabhängige 6-CF-Aufnahme durch HEK-hOAT4-Zellen stellte sich mit einem annähernd linearen Verlauf bis ca. 60 sec dar (Abbildung 3.3). Um sicher im linearen Teil der Substrat-Zeitkurve zu sein, wurde daher die Transportzeit für Folgeversuche mit 6-CF in HEK-Zellen auf 30 sec festgesetzt. Dies ist eine relativ geringe Transportzeit, was die Durchführung von Transportexperimenten technisch anspruchsvoll macht. Da aber 6-CF andererseits nicht radioaktiv wirksam ist, war die durch eine kurze Transportzeit entstehende potentielle Gefahr für den Anwender gering.

Die 6-CF Aufnahme in HEK-hOAT4-Zellen war zeit- und konzentrationsabhängig mit einem errechneten K_m -Wert von 108 μM (Abbildung 3.4). Ein so bestimmter K_m -Wert kann prinzipiell variieren, in Abhängigkeit von der Spezies, dem Expressionssystem und der verwendeten Untersuchungsmethode, wie u. a. für OAT1 und die PAH-Aufnahme gezeigt (Burckhardt und Burckhardt 2003). Vergleiche zu anderen Untersuchungen wären also wünschenswert, um den Wert einordnen zu können, jedoch sind keine weiteren K_m -Werte für OAT4 und 6-CF publiziert.

Allerdings ist hOAT4 im verwendeten Expressionssystem ein verhältnismäßig niedrig affiner Transporter für 6-CF, im Vergleich bspw. mit hOAT1, für den in stabil transfizierten CHO-Zellen (*“Chinese Hamster Ovary Cells”*) ein K_m -Wert von $3,9 \mu\text{M}$ bestimmt wurde (Cihlar und Ho 2000).

Einschränkend ist zu bedenken, dass bei der Bestimmung von K_m -Werten bestenfalls eine große Spannbreite von Konzentrationen rings um den K_m -Wert benutzt werden sollte, von ca. zehnfach kleineren Konzentrationen als der K_m -Wert bis ca. zehnfach größeren Konzentrationen, soweit dies möglich ist. In der dargestellten Messreihe sind alle verwendeten 6-CF-Konzentrationen kleiner als der bestimmte K_m -Wert, was auch an der Löslichkeit von 6-CF liegt. Dies schränkt die Genauigkeit des so bestimmten, konkreten K_m -Werts zwar ein, dessen Größenordnung sollte jedoch trotzdem zutreffend sein.

Bei einer Substratkonzentration im Bereich des K_m -Wertes liegt die halbmaximale Transportgeschwindigkeit vor, es sind die Hälfte aller Bindungsstellen besetzt. Um sicher im linearen Teil der Geschwindigkeits-Substratkonzentrations-Kurve zu sein, also außerhalb von Sättigungseffekten, sollte die verwendete Substratkonzentration im Bereich des K_m -Wertes oder darunter liegen. Daher wurden für weitere Transportexperimente mit 6-CF bei HEK-Zellen eine Substratkonzentration von $50 \mu\text{M}$ gewählt, was den o.g. Voraussetzungen entspricht.

4.4 Interaktionen bei der hOAT4-vermittelten Substrat-Aufnahme in HEK-Zellen

Nach der Festlegung geeigneter Rahmenbedingungen für Transportexperimente mit 6-CF in HEK-Zellen wurden cis-Inhibitionsversuche durchgeführt. Hierfür wurden einerseits Substrate verwendet, deren Interaktionen mit hOAT4 bereits in anderen Expressionssystemen beschrieben wurden, wie auch radioaktiv markiertes Esteronsulfat. Andererseits wurden auch Substrate verwendet, für die Interaktionen zuvor nicht bekannt waren.

4.4.1 Stabil transfizierte HEK-hOAT4-Zellen liefern valide Daten

Die cis-Inhibitionsstudien der 6-CF-Aufnahme an HEK-hOAT4-Zellen zeigten eine fast totale Inhibition der hOAT4-vermittelten 6-CF-Aufnahme durch ES, DHEAS und Probenecid, während PAH keinen cis-Inhibitionseffekt hatte (Abbildung 3.5). Dagegen zeigten die HEK-hOAT4 Zellen eine zehnfach höhere [^3H]ES-Aufnahme, im Vergleich mit den nicht transfizierten HEK-Zellen (Abbildung 3.8 (A)). Dies stimmt mit den Eckpunkten der bereits bekannten und von Cha et al. (2000) beschriebenen hOAT4-Transportcharakteristika überein und zeigt daher ebenso (s. a. Abschnitt 4.1), dass das hier verwendete Expressionssystem mit der Tracersubstanz 6-CF verlässliche Daten liefert.

Falls also später einmal der luminal im proximalen Nierentubulus lokalisierte Transporter OAT4, ebenso wie aktuell die allesamt basolateral lokalisierten OAT1, OAT3 und OCT2, in die Liste der Transportproteine aufgenommen werden sollte, die von der FDA/EMA für eine *In-vitro*-Testung von neuen Substanzen vorgesehen sind (vgl. Abschnitt 1), stünde mit dem beschriebenen Expressionssystem ein adäquates Instrument für die einfache und sichere Untersuchung zur Verfügung.

4.4.2 Cis-Inhibition der hOAT4-vermittelten 6-CF-Aufnahme in HEK-Zellen

Während die Triebkräfte für OAT4-vermittelten Transport unklar sind, benutzen die an der basolateralen Membran gelegenen OAT1 und OAT3 das Dicarboxylat alpha-Ketoglutarat als Triebkraft für ihren tertiär-aktiven und indirekt natriumabhängigen Transport organischer Anionen (Burckhardt 1984; Shimada et al. 1987; Kekuda et al. 1999; Burckhardt et al. 2001; Cha et al. 2001). Außerdem akzeptiert ein genetisch eng mit OAT4 verwandter Transporter Urat als Substrat. Daher wurden hier ausgewählte Carboxylate, inklusive alpha-Ketoglutarat, sowie Urat auf ihre cis-inhibitorischen Effekte auf hOAT4 untersucht.

Von den getesteten Substraten zeigten solche mit nur einer Carboxy-Gruppe (Pyruvat, Laktat; Orotat, Pyrazinoat) keinen Einfluss auf die 6-CF-Aufnahme, während einige Dicarboxylate (Glutarat, alpha-Ketoglutarat und Malat) sowie Citrat einen nicht signifikanten, hemmenden Einfluss hatten. Auch Succinat, Fumarat und Oxalacetat bewirkten eine zwar leichte, aber signifikante Hemmung der 6-CF-Aufnahme (Abbildung 3.6 und Abbildung 3.7). Angesichts der relativ hohen Konzentration der cis-Hemmstoffe (500 µM), verglichen auch mit OAT1 und OAT3 (Kaufhold et al. 2011) spricht dies für einen eher geringen physiologischen Einfluss der entsprechenden Substanzen auf den hOAT4-vermittelten Transport.

Einen größeren hemmenden Einfluss hatte jedoch das Urat, welches daher im Folgenden näher betrachtet wurde.

4.4.3 Vergleich von hOAT4 und hURAT1 – cis- und trans- Effekte

Wie in den Abschnitten 1.1.1 und 1.1.3 beschrieben, war zuvor ein Transportprotein der SLCA22-Familie mit großer genetischer Ähnlichkeit zu hOAT4 gefunden worden, welches aufgrund seiner Transporteigenschaften hURAT1 genannt wurde. Dieser Transporter zeigte Interaktionen mit verschiedenen Substraten, welche die hURAT1-vermittelte Urat-Aufnahme in *X. laevis*-Oozyten signifikant hemmten, darunter L-Laktat (64,6 %), Nicotinat (26,1 %) und Orotat (26,5 %), je in einer Konzentration von 1 mM (Enomoto et al. 2002).

Die hier vorgelegten Daten zeigen, dass die hOAT4-vermittelte 6-CF-Aufnahme durch Urat signifikant um knapp 40 % gehemmt wurde (Abbildung 3.7). In der Zusammenschau legt dies die Vermutung nahe, hOAT4 könnte ebenfalls Urat transportieren und ein ähnliches Substratspektrum haben wie hURAT1. Jedoch zeigten andere diesbezüglich

getestete Substanzen, inklusive L-Laktat, Orotat und Glutarat, nur einen leichten oder keinen signifikanten Einfluss auf die 6-CF-Aufnahme. Damit wird hier ein klarer Unterschied der Transporteigenschaften von hOAT4 und hURAT1 demonstriert.

Weitere Unterschiede des Transportverhaltens von hOAT4 und hURAT1 wurden durch trans-Stimulationsexperimente herausgearbeitet. Bei diesen hatten Nikotinat sowie Pyrazinoat keinen signifikanten trans-Effekt, während Glutarat und PAH eine wesentliche Erhöhung sowohl der 6-CF- als auch [³H]ES-Aufnahme durch hOAT4-exprimierende HEK-Zellen hervorriefen (Abbildung 3.10 und Abbildung 3.11). Im Gegensatz dazu werden beide Substrate von hURAT1 nicht als Austauschionen für die Urat-Aufnahme akzeptiert (Enomoto et al. 2002).

Interessanterweise führte die Vorbeladung der Zellen auch mit Urat nicht zu einer signifikanten Zunahme weder der 6-CF- noch der [³H]ES-Aufnahme (Abbildung 3.10 und Abbildung 3.11), was für eine Affinität von hOAT4 zu Urat nur von der extrazellulären Seite der Zelle aus spricht.

Während also PAH und Glutarat keinen cis-Effekt zeigten, wohl aber eine trans-Stimulation, konnte für Urat eine cis-Inhibition, aber kein trans-Effekt demonstriert werden. Dies spricht für ein asymmetrisches Transportverhalten von hOAT4.

4.5 Transport von PAH und Glutarat durch hOAT4 - Asymmetrie

Weitere Beweise für diese beobachtete Asymmetrie von hOAT4 wurden durch Aufnahme-Experimente mit radioaktiv markiertem PAH und Glutarat gewonnen (Abbildung 3.8 (B) und (C)). Dabei führten hOAT4-exprimierende HEK-Zellen keine signifikante [³H]PAH- oder [¹⁴C]Glutarat-Aufnahme im Vergleich mit den nicht-transfizierten Zellen aus, was für eine extrem geringe oder gar keine Affinität von hOAT4 für diese Substanzen spricht.

Diese fehlende Interaktion von PAH mit hOAT4 von der extrazellulären Seite der Zelle aus wurde bereits von Ugele et al. (2003) an hOAT4-exprimierenden mononukleären Trophoblastenzellen beobachtet. Hier stellt sich damit eine vom Expressionssystem unabhängige Eigenschaft von hOAT4 dar, im Unterschied zu den Transporteigenschaften von hURAT1, denn es wurde berichtet, dass das Maus-Ortholog von hURAT1 (mURAT1) PAH mit niedriger Affinität (K_m -Wert von 234 μ M) transportieren kann (Imaoka et al. 2004).

Auch Cha et al. (2000) zeigten keine Hemmung der hOAT4-vermittelten [³H]ES-Aufnahme durch 0,5 mM PAH, aber eine geringe [³H]PAH-Aufnahme durch hOAT4, die sich jedoch nicht als signifikant darstellte. Ebenso wurde in den Untersuchungen von Zhou et al. (2004) bei COS7-Zellen (eine etablierte Zellkulturlinie, entstanden aus Affenierengewebe) aufgezeigt, dass hOAT4 keine PAH-Aufnahme vermittelt. Dies befindet sich in voller Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit erhobenen Daten.

Im Gegensatz dazu wurde von Ekaratanawong et al. (2004), im Vergleich zu nicht-transfizierten Zellen, eine zweifache [^3H]PAH- und [^{14}C]Glutarat-Aufnahme durch stabil mit hOAT4 transfizierten proximalen Mäusetubuluszellen (S2-Zellen) gezeigt. Dies steht im Widerspruch zu den anderen bekannten, eben diskutierten Daten der Literatur wie auch den eigenen Ergebnissen. Auch wäre der Nachweis einer luminalen Aufnahme von PAH durch hOAT4 oder ein anderes Transportprotein beim Menschen, zumindest *in vivo*, eine große Überraschung. Denn gerade das Wissen darum, dass PAH beim Menschen glomerulär filtriert und tubulär sezerniert, aber nicht tubulär reabsorbiert wird (Burckhardt et al. 2001), macht es möglich, den renalen Plasmafluss (Chasis et al. 1945) und damit unter gewissen Umständen auch das Herz-Zeit-Volumen zu bestimmen. Eine mögliche Erklärung für diese festgestellten Diskrepanzen könnte ein anderer Transportmodus speziell bei den von den Kollegen als Expressionssystem verwendeten Mäuse-S2-Zellen sein, unter den dort herrschenden Versuchsbedingungen. Dies lässt dann jedoch die Übertragbarkeit dieser Erkenntnisse auf andere Systeme oder den Menschen fraglich erscheinen, wodurch auch zuvor postulierter Transportmechanismus und Triebkräfte von hOAT4 neu zu diskutieren sind (vgl. auch Abschnitt 1.1.4).

Zusammenfassend zeigt sich hOAT4 nach den Erkenntnissen in dieser Arbeit bis hierher am ehesten als elektroneutraler Antiporter mit asymmetrischem Transportmodus, dessen Triebkräfte bislang unbekannt sind.

4.6 Urat-Aufnahme durch hOAT4 und die mögliche physiologische Rolle

Die *cis*-Inhibitionsstudien der hOAT4-vermittelten 6-CF-Aufnahme führten zu der Spekulation, dass Urat als Substrat für hOAT4 in Frage kommen könnte (vgl. Abschnitt 4.4.3). Daher wurden Aufnahme-Experimente mit radioaktiv markiertem Urat durchgeführt. Die [^{14}C]Urat-Aufnahme-Experimente an HEK-hOAT4-Zellen und auch an hOAT4-exprimierenden Oozyten (Abbildung 3.9) zeigten eine deutliche Mehraufnahme von Urat im Vergleich mit den Kontrollzellen, wobei die Urat-Mehraufnahme in HEK-Zellen signifikant war. Damit wurde zum ersten Mal dargestellt, dass hOAT4 ein Urat-Transporter ist, der diese wichtige physiologische Rolle mit hURAT1 teilt.

Urat ist das Endprodukt des Purinstoffwechsels in höheren Primaten, inklusive des Menschen, und wird hauptsächlich über die Nieren eliminiert. Die fraktionelle Exkretion von Urat in diesen Spezies ist niedrig ($FE_{\text{Urat}} \sim 10\%$), was zu einem hohen Urat-Plasmalevel führt. Dies wird als Vorteil für die menschliche Evolution angesehen, wegen des kompensatorischen Effekts von Urat für den Blutdruck unter Ernährungsbedingungen mit salzarmer Nahrung (Watanabe et al. 2002; Hediger et al. 2005; Mount et al. 2006).

Der mit hOAT4 verwandte Transporter hURAT1 hat eine plasmaäquivalente Affinität für Urat (K_m : $371\mu\text{M}$) und wird für 50% der renalen Urat-Reabsorption verantwortlich

gemacht (Enomoto et al. 2002; Enomoto und Endou 2005). Diese Annahme wird durch die Tatsache unterstützt, dass Mutationen im *bURAT1*-Gen die FE_{Urat} stark, und zwar auf bis zu 60%, erhöhen können und zur klinischen Manifestation der Hypourikämie führen (Enomoto et al. 2002; Wakida et al. 2005). Interessanter Weise zeigen einige Patienten ohne irgendeine Mutation des *bURAT1*-Gens trotzdem Hypourikämie, weshalb noch andere apikale Urat-Transporter postuliert wurden (Ichida et al. 2004). Einer davon könnte hOAT4 sein.

In der eigenen Arbeitsgruppe wurde eine konzentrationsabhängige Inhibition der hOAT4-vermittelten Esteronsulfat-Aufnahme durch Urat festgestellt, mit einer IC_{50} von 925 μM (Hagos et al. 2007). Dies ist übereinstimmend mit der Vermutung, hOAT4 repräsentiere einen Urat-Transporter mit niedriger Affinität im Vergleich mit hURAT1 (Enomoto et al. 2002).

4.6.1 Urat: Vier-Komponenten-Modell und Hypourikämie

Generell wird über die Elimination von Urat angenommen, sie folge einem Vier-Komponenten-Modell von Filtration, „präsekretorischer“ Reabsorption, Sekretion und „postsekretorischer“ Reabsorption (Roch-Ramel und Guisan 1999). Die Tatsache, dass Spezies generell als Netto-Urat-Sezernierer (z. B. Kaninchen und Schwein) oder Netto-Urat-Reabsorbierer (z. B. Ratte, Hund, Mensch) klassifiziert werden, könnte ein Resultat der unterschiedlichen Expressierung von Transportproteinen, besonders von hURAT1, sein. Daher könnte so eine Spezies-spezifische Konstellation dieses Vier-Komponenten-Modells vorliegen. Neben Kenntnissen über hURAT1 ist wenig bekannt über Transportproteine, die in die renale Urat-Reabsorption oder -Sekretion einbezogen sind.

Bezugnehmend auf das Vier-Komponenten-Modell wurden fünf Typen der renalen Hypourikämie postuliert, was durch die Untersuchung der FE_{Urat} von Patienten, die mit dem Antiurikosurikum Pyrazinamid (die pharmakologisch aktive Form ist Pyrazinoat) und dem Urikosurikum Probenecid behandelt wurden, zustande kam. In der japanischen Bevölkerung scheinen Mutationen, die zu einem Verlust der Transportfähigkeit von hURAT1 führen (was die „Präsekretorische Hypourikämieform“ repräsentiert), für die meisten der renalen Hypourikämiefälle verantwortlich zu sein. Aber basierend auf den FE_{Urat} -Untersuchungen nach Medikamentenbehandlung berichten manche Autoren von Patienten mit Hypourikämie, die keine Mutation des *bURAT1/SLC22A12*-Gens besitzen. Diese Autoren vermuten eine mögliche Verwicklung anderer Urat-Transporter und klassifizierten diese Hypourikämieform als „Postsekretorischen Reabsorptions-Defekt“ (Ichida et al. 2004; Wakida et al. 2005).

Die in dieser Arbeit vorgelegten Daten zeigen, dass hOAT4 wesentlich mit dem Urikosurikum Probenecid interagiert. Außerdem wurde in der eigenen Arbeitsgruppe gezeigt, dass hOAT4 auch mit den Urikosurika Benzbromaron und Sulfinpyrazon interagiert (Hagos et al. 2007), also ähnlich wie hURAT1. Jedoch wurde ebenfalls gezeigt,

dass hOAT4 nicht mit dem Antiurikosurikum Pyrazinamid/Pyrazinoat interagiert, welches eines der Hauptaustausch-Ionen des hURAT1 ist. Dem folgend reagierten Patienten mit Hypourikämie auf Medikamentenbehandlung mit Pyrazinoat unterschiedlich, je nachdem ob eine detektierbare hURAT1-Mutation vorlag oder nicht. Dies führt zu der Vermutung, hOAT4 könne ein guter Kandidat für diese „Postsekretorische Hypourikämie“ sein.

Es stellt sich nun aber die Frage, warum ein Transporter mit niedriger Affinität zu Urat im Nephron hinter einem Transporter mit hoher Affinität angeordnet sein sollte. Physiologisch gesehen macht dies wegen der recht geringen Uratkonzentration, die nach dem ersten hURAT1-vermittelten Reabsorptionsprozess übrig bleibt, auf den ersten Blick keinen Sinn. Diese Diskrepanz könnte auf der Grundlage des Vier-Komponenten-Modells erklärt werden durch eine hohe Urat-Sekretion, einhergehend mit einer massiven Wasser-Reabsorption, die zur Konzentrierung der Uratsäure in diesem Nephronsegment führt und die dem sekundären Reabsorptionsprozess, vermittelt durch hOAT4, vorangeht (Enomoto und Endou 2005).

4.6.2 Hyperurikämie, assoziiert mit hOAT4

Die Interaktion von Diuretika wie z. B. Carboanhydrasehemmer, Schleifendiuretika und Thiaziden mit humanen Organische-Anionen-Transportern ist gut beschrieben und bekannt (Hasannejad et al. 2004). Die Transporter hOAT1 und hOAT3 vermitteln die basolaterale Aufnahme dieser Substanzen in die proximale Tubuluszelle und sind daher verantwortlich für den ersten Schritt der aktiven Sekretion vieler dieser Substanzen. Dies ist auch aus pharmakologischer Sicht notwendig, denn als Medikamente eingesetzt erreichen alle diese Substanzen ihre medizinisch erwünschte Wirkung an (Transport-) Proteinen, die sich auf der luminalen Seite der Tubuluszelle befinden.

Von hURAT1 konnte gezeigt werden, dass er wesentlich mit den Schleifendiuretika Bumetanid und Furosemid interagiert (Enomoto et al. 2002), während von hOAT4 berichtet wurde, dass er substantiell nur mit den Schleifendiuretika Furosemid und Ethacrinsäure interagiert und so gut wie keine Affinität für Carboanhydrasehemmer und Thiazide besitzt (Hasannejad et al. 2004).

Es ist bekannt, dass Patienten, die mit Thiaziden behandelt werden, Hyperurikämie bekommen (Reyes 2003). In der eigenen Arbeitsgruppe wurde der cis-inhibitorische wie trans-stimulatorische Effekt von HCT (Hydrochlorothiazid) auf die HEK-hOAT4-vermittelte ES- und Urat-Aufnahme getestet. Es wurde die gleiche, bereits zuvor beschriebene geringe Interaktion von hOAT4 mit HCT von der extrazellulären (cis-) Seite beobachtet. Aber es wurde zum ersten Mal dokumentiert, dass die Urat-Aufnahme über hOAT4 signifikant durch die Vorbeladung der *X. laevis*-Oozyten mit 1 mM HCT erhöht wird (Hagos et al. 2007). Aus diesem Grund könnte die HCT-assoziierte Hyperurikämie durch den folgenden Mechanismus erklärt werden: HCT tritt nach Aufnahme durch hOAT1 auf der basolateralen Seite in die Zelle ein und wird auf der luminalen Seite über

hOAT4 in den Harn abgegeben, wobei die Aufnahme von Urat angetrieben wird. Dieses wird im Folgenden über hOAT1 ins Blut reabsorbiert, wiederum im Austausch mit HCT.

Davon abgesehen sind mittlerweile genomweite Assoziationsstudien (engl. *genome-wide association studies*, GWAS) durchgeführt worden, die einen Zusammenhang von Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP) im *hOAT4/SLC22A11*-Gen mit erhöhten Uratplasmaspiegeln herstellen (Kolz et al. 2009; van der Harst et al. 2010; Yang et al. 2010). Für mindestens einen entdeckten SNP ist dabei eine statistisch klare Häufung von klinisch symptomatischer Gicht aufgrund von Mindersekretion festgestellt worden (vgl. Vier-Komponenten-Modell, Abschnitt 4.6.1.; Sakiyama et al. 2014). Dies untermauert auch die oben aufgestellte Vermutung, dass hOAT4 überhaupt relevante Mengen Urat transportiert.

Ein Zusammenhang mit der zuvor erwähnten Hypourikämie ist derzeit nicht gefunden worden. Allerdings postulieren Xu et al. (2005), es sei sinnvoll, das Vorkommen von SNPs in basolateralen sowie apikalen Transporter-Genen in der Zusammenschau zu untersuchen. Möglicherweise ergeben sich daher zukünftig weitere diesbezügliche Erkenntnisse.

4.6.3 Möglicher Einfluss auf kardiovaskuläre Ereignisse und fetale Entwicklung

Mehr und mehr Indizien sprechen für die Vermutung, dass Gicht nicht die einzige Konsequenz der Hyperurikämie ist. Momentan wird darüber diskutiert, dass bei erhöhten Urat-Plasmaleveln ein höheres Risiko für die Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen und Hypertension (Watanabe et al. 2002; Hediger et al. 2005) auf dem Boden einer Urat-induzierten Proliferation von glatten Muskelzellen und endothelialen Dysfunktion (Kanellis und Kang 2005; Kang et al. 2005) besteht. Folgerichtig wird Urat als neu identifizierter Risikofaktor für die Entwicklung des essentiellen Hypertonus postuliert (Johnson et al. 2003; Johnson et al. 2005).

Urat ist andererseits auch ein potenter endogener Radikalfänger, welcher den Körper und damit auch das Gehirn vor oxidativem Schaden bewahrt (Hooper 2000). Neben den Nieren ist hOAT4 auch in der Plazenta exprimiert (Cha et al. 2000), wo hURAT1 nicht detektiert wurde und wo Urat eine wichtige Rolle spielt, speziell im ersten Trimenon. Dies ist eine Zeit, in der die antioxidative Enzymaktivität und die Level von reduzierenden Substanzen wie Gluthation oder alpha- und gamma-Tokopherol gering sind (Jauniaux et al. 2004). In dieser sehr verletzlichen Phase der fetalen Entwicklung, wo oxidativer Stress erhebliche Auswirkungen auf das normale Organwachstum hat, könnte hOAT4 für die plazentare Urat-Homöostase und folgerichtig für die Bewahrung des Feten vor oxidativem Schaden verantwortlich sein.

4.7 Triebkräfte des hOAT4-vermittelten Transports

Bereits vor der molekularen Identifikation und Klonierung einzelner Transportproteine wurden mittels Vesikelstudien der Bürstensaum-Membran erstaunlich präzise Daten erhoben, welche in guter Übereinstimmung sind mit den tatsächlichen Transportcharakteristika der danach entdeckten Transporter. Aufgrund der Erkenntnis, dass hOAT4 Urat transportiert, wurde die Literatur nach Triebkräften für Urat-Transporter an der Bürstensaum-Membran durchsucht, und es wurden entsprechende weiterführende Transportexperimente durchgeführt, um die Triebkräfte für hOAT4 zu beleuchten.

4.7.1 Chlorid als Triebkraft von hOAT4

Es ist gut beschrieben, dass die Urat-Aufnahme in hBBMV stark stimuliert wird durch einen auswärts gerichteten Cl⁻-Gradienten (Roch-Ramel et al. 1994). Auch hURAT1, der nächste bekannte mit hOAT4 verwandte Transporter, benutzt einen auswärts gerichteten Chloridgradienten als Triebkraft für die Urat-Aufnahme (Enomoto et al. 2002).

Durch das Ersetzen von Natrium-Chlorid durch Natrium-Glukonat im Transportmedium wurde solch ein Gradient hergestellt. Resultat war eine starke signifikante Stimulation der hOAT4-vermittelten Substrat-Aufnahme in HEK-Zellen (Abbildung 3.16). Zu diskutieren ist, ob dieser Effekt durch das Hinzufügen des Glukonats oder durch das Entfernen des Chlorids hervorgerufen wird. Das zu transportierende Substrat und das relativ große Molekül Glukonat befinden sich jedoch auf derselben Seite der Membran. Dass Glukonat also durch andere Transportprozesse auf die Zellinnenseite gelangt und von dort aus relevant trans-stimulieren könnte, kann als sehr unwahrscheinlich angesehen werden. Auch ist eine cis-Stimulation im dargestellten Umfang mechanistisch nur schlecht denkbar. Die logische Schlussfolgerung ist, dass der Chloridgradient für die Stimulation der Substrat-Aufnahme verantwortlich ist, nicht das Hinzufügen des Glukonats zum Transportmedium.

Daher wird mit den hier erhobenen Daten zum ersten Mal dargestellt, dass hOAT4, so wie auch hURAT1 (Enomoto et al. 2002) und NPT1 (der Natrium-abhängige Phosphat-Transporter, über den berichtet wurde, dass er PAH gegen Cl⁻ austauscht bzw. sezerniert, Uchino et al. 2000), einen auswärts gerichteten Cl⁻-Gradienten für die Substrat-Aufnahme benutzen kann.

Unter physiologischen Bedingungen besteht im proximalen Tubulus jedoch ein einwärts gerichteter Chloridgradient. Hier konnte in der Folge an *X. laevis*-Oozyten gezeigt werden, dass hOAT4 einen relevanten PAH-Efflux vermittelt. Dieser Efflux wird jedoch durch chloridfreies extrazelluläres Medium aufgehoben. Wird diesem chloridfreien extrazellulären Medium aber ES hinzugefügt, wird damit die zuvor beobachtete, hOAT4-vermittelte PAH-Effluxrate wiederhergestellt (Hagos et al. 2007). Dies zeigt eindeutig, dass auch der einwärts gerichtete Gradient von Chlorid oder Esteronsulfat als Triebkraft zum PAH-Efflux via hOAT4 genutzt wird.

4.7.2 Auswärts gerichteter OH⁻-Gradient als Triebkraft für hOAT4

Bei BBMV des Menschen, Hundes und der Ratte wurde die Urat-Aufnahme durch einen auswärts gerichteten OH⁻-Gradienten stimuliert (Kahn et al. 1983; Kahn und Aronson 1983), was nicht für BBMV des Hasen und Schweins beobachtet wurde (Martinez et al. 1990; Werner et al. 1990; Roch-Ramel et al. 1994). Es wurde gezeigt, dass hURAT1 nicht als Urat/OH⁻-Austauscher arbeitet (Enomoto et al. 2002).

Eine Alkalisierung des extrazellulären Mediums hemmte sowohl die 6-CF- wie auch die [³H]ES-Aufnahme signifikant (Abbildung 3.12 und Abbildung 3.13). Eine Ansäuerung des extrazellulären Mediums dagegen stimulierte sowohl die hOAT4-vermittelte 6-CF- als auch [³H]ES-Aufnahme. Dabei können pH-Wert-abhängige Änderungen der Substratladung zum Zeitpunkt des Transports für ES aufgrund des niedrigen pK_s-Werts komplett ausgeschlossen werden. Esteronsulfat liegt im Bereich bis unter pH 3 einzig als Monoanion vor (vgl. Abschnitt 2.10.2). Bei 6-CF erfolgt die Protonierung zwar bereits ab etwas höheren pH-Werten (vgl. Abschnitt 2.10.1), jedoch ist nach Angaben des Herstellers auch hier zwischen pH 5,5 und 7,4 das Monoanion die quasi einzige Microspezies (> 98,5%). Damit ist der Grund für den beobachteten geringeren pH-Effekt auf den hOAT4-vermittelten ES-Transport im Vergleich zum 6-CF-Transport unklar.

Ob wirklich der auswärts gerichtete OH⁻-Gradient für die verstärkte Aufnahme sowohl von ES als auch von 6-CF verantwortlich ist, wurde im folgenden Experiment untersucht. Hierfür wurde Nigericin verwendet, welches eine Substanz ist, die als H⁺/K⁺-Ionophor zur Equilibration von intra- und extrazellulärem pH-Wert führt (Negulescu und Machen 1990). Dabei wurde die Stimulation der [³H]ES-Aufnahme durch Ansäuerung des extrazellulären Mediums auf einen pH-Wert von 5,5 nach Zugabe von Nigericin signifikant reduziert (Abbildung 3.14). Daraus kann geschlossen werden, dass mit dem Zusammenbruch des OH⁻-Gradienten auch eine Triebkraft für die [³H]ES-Aufnahme fehlt.

In der Zusammenschau unterstützt dies alles die Idee eines 6-CF/OH⁻- und ES/OH⁻-Austausch-Modus von hOAT4 und erlaubt auch die Spekulation, hOAT4 könnte als Urat/OH⁻-Austauscher arbeiten. Dies ist die erste Demonstration eines pH-Wert-abhängigen Transportmodus eines Transporters der OAT-Familie.

4.7.3 Funktionelle Koppelung von hOAT4 mit NHE3

Der intrazelluläre pH-Wert von proximalen Tubuluszellen und damit auch der OH⁻-Gradient wird u. a. aufrechterhalten durch den luminalen Natrium-Protonen-Austauscher NHE3 (*Na⁺/H⁺ Exchanger 3*, Burckhardt et al. 2002). Dieser wird auch in HEK-Zellen exprimiert (Lang et al. 2003). Von Cha et al. (2000) wurde beschrieben, dass hOAT4 Substrate Natrium-unabhängig transportiert, in *X. laevis*-Oozyten.

Um den Einfluss des Natrium-Protonen-Austauscher NHE3 auf die Transportaktivität von hOAT4 zu untersuchen, wurde die Natriumabhängigkeit der hOAT4-vermittelten [³H]ES-

Aufnahme in HEK-hOAT4-Zellen bestimmt. Angetrieben durch den Transport von Natrium, kann NHE3 die Translokation von Protonen vermitteln. Im Natrium-freien Medium sollte es zu einer Hemmung der Aktivität des Na^+/H^+ -Austauschers kommen, was wiederum zu einem verminderten intra- zu extrazellulären OH^- -Ionen Gradienten führen könnte. Daher wurde Natrium durch Cholin bzw. Kalium ersetzt. Es wurde dabei eine signifikante Reduktion der [^3H]ES-Aufnahme in HEK-hOAT4-Zellen durch den Entzug von Natrium im extrazellulären Medium dargestellt (Abbildung 3.15 (A)). Dabei hatten beide Ersatzstoffe einen Effekt in der gleichen Größenordnung. Dies spricht dafür, dass der beobachtete Effekt nicht durch die Zugabe einer der beiden Ersatzstoffe ausgelöst wird, sondern durch die Entfernung des Natriums aus dem Transportmedium.

In dem einen Expressionssystem (*X. laevis*-Oozyten) arbeitet hOAT4 also natriumunabhängig. In einem anderen (HEK-Zellen) wird hiermit nun erstmals auch ein natriumabhängiger Transport nachgewiesen. Diese scheinbare Diskrepanz ließe sich damit erklären, dass hOAT4 zwar nicht direkt natriumabhängig arbeitet, indirekt aber auf die Anwesenheit von Natrium als Substrat für andere Transporter im Proteinverbund der Zellmembran angewiesen ist.

Eine Hemmung der Aktivität des Na^+/H^+ -Austauschers sollte nicht nur durch Entzug eines seiner Substrate zu erreichen sein, sondern auch durch den spezifischen NHE-Inhibitor Amilorid (Dunham et al. 2004). Aus diesem Grund wurde die hOAT4-vermittelte [^3H]ES-Aufnahme von HEK-Zellen in An- und Abwesenheit von 1 mM Amilorid untersucht. Durch die Hinzugabe von Amilorid zum natriumhaltigen Transportmedium, also durch die Hemmung von NHE3, wurde die [^3H]ES-Aufnahme in der gleichen Größenordnung gehemmt, wie zuvor im natriumfreien Medium (Abbildung 3.15 (B)).

Zusammen mit der zuvor nachgewiesenen pH-Wert-Abhängigkeit lässt dies eine mögliche funktionelle Koppelung von hOAT4 mit der Transportaktivität von NHE3 vermuten, sowohl für die untersuchten HEK-Zellen wie auch *in vivo*.

In der Zusammenschau zeigen diese Beobachtungen, dass hOAT4 und hURAT1 neben ihrer gemeinsamen und wichtigen physiologischen Rolle als Urat-Transporter von unterschiedlichen Transportsystemen abhängen. Während hURAT1 funktionell mit dem zuvor identifizierten Natrium-Monocarboxylat-Transporter 1 (SMCT1) gekoppelt ist (Miyachi et al. 2004), welcher Natrium-abhängige Reabsorption von L-Laktat, Pyrazinoat und Nicotinat vermittelt, ist hOAT4 eher abhängig von der Aktivität des NHE3 und des Natrium-Dicarboxylat-Transporters NaDC-1, von welchem berichtet wurde, dass er für die Aufrechterhaltung des intrazellulären alpha-Ketoglutarats mitverantwortlich ist (Shuprisha et al. 1999).

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden Triebkräfte und Transportmodus des humanen Organische-Anionen-Transporters 4 untersucht und dessen potentielle physiologische Rolle diskutiert. Dafür wurden Transportexperimente an stabil transfizierten HEK-Zellen wie auch an *Xenopus laevis*-Oozyten durchgeführt. Die Transportvorgänge wurden dabei sowohl mittels radioaktiv markierter Substrate als auch mit Fluoreszenzfarbstoffen untersucht. Außerdem wurde eine elektrophysiologische Untersuchung durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass stabil transfizierte HEK-Zellen als Expressionssystem für hOAT4, gekoppelt mit der Tracersubstanz 6-Carboxyfluorescein, verlässliche Daten liefern. Damit ist ein Versuchsaufbau etabliert worden, der die weitere Untersuchung von hOAT4 effektiv und sicher erlaubt.

Die vorgelegten Daten erbringen den Beweis, dass hOAT4 ein Urat-Transporter ist, der elektroneutral als asymmetrischer Austauscher arbeitet. Dabei werden einige Substrate wie Esteronsulfat und Urat nur von der extrazellulären Seite akzeptiert. Andere Daten zeigen, dass diese Urat-Aufnahme durch die Sekretion des Diuretikums Hydrochlorothiazid erhöht ist. In der Zusammenschau könnte hOAT4 *in vivo* daher an der Entstehung der Hydrochlorothiazid-assoziierten Hyperurikämie beteiligt sein.

Weiterhin wird dokumentiert, dass die hOAT4-vermittelte Aufnahme von Esteronsulfat und 6-Carboxyfluorescein durch auswärts gerichtete Gradienten von PAH und Glutarat sowie OH⁻- und Cl⁻-Ionen trans-stimuliert wird. Auch lassen die vorgelegten Daten eine funktionelle Koppelung von hOAT4 mit NHE3 wahrscheinlich erscheinen.

Daraus geschlussfolgert repräsentiert hOAT4 den lange postulierten, apikalen, niedrig affinen Urat/OH⁻- bzw. Urat/Cl⁻- Austauscher, welcher einen physiologisch relevanten Urat-Transport durchführt und für die postsekretorische Reabsorption von Urat aus dem Primärharn verantwortlich sein könnte.

6 Literaturverzeichnis

- Arik M, Çelebi N, Onganer Y (2005): Fluorescence quenching of fluorescein with molecular oxygen in solution. *J Photochem Photobiol Chem* 170, 105–111
- Asif AR, Steffgen J, Metten M, Grunewald RW, Muller GA, Bahn A, Burckhardt G, Hagos Y (2005): Presence of organic anion transporters 3 (OAT3) and 4 (OAT4) in human adrenocortical cells. *Pflugers Arch* 450, 88–95
- Babu E, Takeda M, Narikawa S, Kobayashi Y, Yamamoto T, Cha SH, Sekine T, Sakthisekaran D, Endou H (2002a): Human organic anion transporters mediate the transport of tetracycline. *Jpn J Pharmacol* 88, 69–76
- Babu E, Takeda M, Narikawa S, Kobayashi Y, Enomoto A, Tojo A, Cha SH, Sekine T, Sakthisekaran D, Endou H (2002b): Role of human organic anion transporter 4 in the transport of ochratoxin A. *Biochim Biophys Acta* 1590, 64–75
- Blaustein MP, Lederer WJ (1999): Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev* 79, 763–854
- 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
- Burckhardt BC (2015): Transport organischer Ionen in der Niere. *Nephrol* 10, 322–326
- Burckhardt BC, Burckhardt G (2003): Transport of organic anions across the basolateral membrane of proximal tubule cells. *Rev Physiol Biochem* 146, 95–158
- Burckhardt G (1984): Sodium-dependent dicarboxylate transport in rat renal basolateral membrane vesicles. *Pflugers Arch* 401, 254–261
- Burckhardt G, Bahn A, Wolff NA (2001): Molecular physiology of renal p-aminohippurate secretion. *News Physiol Sci* 16, 114–118
- Burckhardt G, Di Sole F, Helmle-Kolb C (2002): The Na⁺/H⁺ exchanger gene family. *J Nephrol* 15 Suppl 5, S3-21
- 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
- Chasis H, Redish J, Goldring W, Ranges HA, Smith HW (1945): The use of sodium p-aminohippurate for the functional evaluation of the human kidney. *J Clin Invest* 24, 583–588

- Cihlar T, Ho ES (2000): Fluorescence-based assay for the interaction of small molecules with the human renal organic anion transporter 1. *Anal Biochem* 283, 49–55
- Cornish-Bowden A (2013): The origins of enzyme kinetics. *FEBS Lett* 587, 2725–2730
- Dumont JN (1972): Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol* 136, 153–179
- Dumont JN, Brummett AR (1978): Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). V. Relationships between developing oocytes and their investing follicular tissues. *J Morphol* 155, 73–97
- Dunham PB, Kelley SJ, Logue PJ (2004): Extracellular Na⁺ inhibits Na⁺/H⁺ exchange: cell shrinkage reduces the inhibition. *Am J Physiol Cell Physiol* 287, C336–C344
- 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 PharmacolSci* 94, 297–304
- Enomoto A, Endou H (2005): Roles of organic anion transporters (OATs) and a urate transporter (URAT1) in the pathophysiology of human disease. *Clin Exp Nephrol* 9, 195–205
- Enomoto A, Kimura H, Chairoungdua A, Shigeta Y, Jutabha P, Ho CS, Hosoyamada M, Takeda M, Sekine T, Igarashi T, et al. (2002): Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels. *Nature* 417, 447–452
- Eraly SA, Hamilton BA, Nigam SK (2003): Organic anion and cation transporters occur in pairs of similar and similarly expressed genes. *Biochem Biophys Res Commun* 300, 333–342
- Gründemann D, Gorboulev V, Gambaryan S, Veyhl M, Koepsell H (1994): Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. *Nature* 372, 549–552
- Gurdon JB, Lane CD, Woodland HR, Marbaix G (1971): Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* 233, 177–182
- 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 JASN* 18, 430–439
- van der Harst P, Bakker SJL, de Boer RA, Wolffenbuttel BHR, Johnson T, Caulfield MJ, Navis G (2010): Replication of the five novel loci for uric acid concentrations and potential mediating mechanisms. *Hum Mol Genet* 19, 387–395
- Hasannejad H, Takeda M, Taki K, Shin HJ, Babu E, Jutabha P, Khamdang S, Aleboeyeh M, Onozato ML, Tojo A, et al. (2004): Interactions of human organic anion transporters with diuretics. *J Pharmacol Exp Ther* 308, 1021–1029
- Hediger MA, Johnson RJ, Miyazaki H, Endou H (2005): Molecular Physiology of Urate Transport. *Physiology* 20, 125–133

- Hooper DC, S GS, Zborek A, Mikheeva T, Kean RB, Koprowski H, Spitsin SV. (2000): Uric acid, a peroxynitrite scavenger, inhibits CNS inflammation, blood-CNS barrier permeability changes, and tissue damage in a mouse model of multiple sclerosis. *FASEB J* 14, 691–698
- Huang S-M, Strong JM, Zhang L, Reynolds KS, Nallani S, Temple R, Abraham S, Habet SA, Baweja RK, Burckart GJ, et al. (2008): New era in drug interaction evaluation: US Food and Drug Administration update on CYP enzymes, transporters, and the guidance process. *J Clin Pharmacol* 48, 662–670
- Ichida K, Hosoyamada M, Hisatome I, Enomoto A, Hikita M, Endou H, Hosoya T (2004): Clinical and molecular analysis of patients with renal hypouricemia in Japan— influence of URAT1 gene on urinary urate excretion. *J Am Soc Nephrol* 15, 164–173
- Imaoka T, Kusuhara H, Adachi-Akahane S, Hasegawa M, Morita N, Endou H, Sugiyama Y (2004): The renal-specific transporter mediates facilitative transport of organic anions at the brush border membrane of mouse renal tubules. *J Am Soc Nephrol* 15, 2012–2022
- International Transporter Consortium, Giacomini KM, Huang S-M, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KLR, Chu X, Dahlin A, Evers R, Fischer V, et al. (2010): Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov* 9, 215–236
- Jauniaux E, Cindrova-Davies T, Johns J, Dunster C, Hempstock J, Kelly FJ, Burton GJ (2004): Distribution and transfer pathways of antioxidant molecules inside the first trimester human gestational sac. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 1452–1458
- Johnson RJ, Kang DH, Feig D, Kivlighn S, Kanellis J, Watanabe S, Tuttle KR, Rodriguez-Iturbe B, Herrera-Acosta J, Mazzali M (2003): Is there a pathogenetic role for uric acid in hypertension and cardiovascular and renal disease? *Hypertension* 41, 1183–1190
- Johnson RJ, Segal MS, Srinivas T, Ejaz A, Mu W, Roncal C, Sanchez-Lozada LG, Gersch M, Rodriguez-Iturbe B, Kang DH, Acosta JH (2005): Essential hypertension, progressive renal disease, and uric acid: a pathogenetic link? *J Am Soc Nephrol* 16, 1909–1919
- Kahn AM, Aronson PS (1983): Urate transport via anion exchange in dog renal microvillus membrane vesicles. *Am J Physiol* 244, F56–F63
- Kahn AM, Branham S, Weinman EJ (1983): Mechanism of urate and p-aminohippurate transport in rat renal microvillus membrane vesicles. *Am J Physiol* 245, F151–F158
- Kanellis J, Kang D-H (2005): Uric acid as a mediator of endothelial dysfunction, inflammation, and vascular disease. *Semin Nephrol* 25, 39–42
- Kang DH, Han L, Ouyang X, Kahn AM, Kanellis J, Li P, Feng L, Nakagawa T, Watanabe S, Hosoyamada M, et al. (2005): Uric acid causes vascular smooth muscle cell proliferation by entering cells via a functional urate transporter. *Am J Nephrol* 25, 425–433
- Kaufhold M, Schulz K, Breljak D, Gupta S, Henjakovic M, Krick W, Hagos Y, Sabolic I, Burckhardt BC, Burckhardt G (2011): Differential interaction of dicarboxylates

- with human sodium-dicarboxylate cotransporter 3 and organic anion transporters 1 and 3. *Am J Physiol Renal Physiol* 301, F1026-1034
- Kekuda R, Wang H, Huang W, Pajor AM, Leibach FH, Devoe LD, Prasad PD, Ganapathy V (1999): Primary structure and functional characteristics of a mammalian sodium-coupled high affinity dicarboxylate transporter. *J Biol Chem* 274, 3422–3429
- Khamdang S, Takeda M, Noshiro R, Narikawa S, Enomoto A, Anzai N, Piyachaturawat P, Endou H (2002): Interactions of human organic anion transporters and human organic cation transporters with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 303, 534–539
- Khamdang S, Takeda M, Shimoda M, Noshiro R, Narikawa S, Huang XL, Enomoto A, Piyachaturawat P, Endou H (2004): Interactions of human- and rat-organic anion transporters with pravastatin and cimetidine. *J Pharmacol Sci* 94, 197–202
- Kimura H, Takeda M, Narikawa S, Enomoto A, Ichida K, Endou H (2002): Human organic anion transporters and human organic cation transporters mediate renal transport of prostaglandins 1. *J Pharmacol Exp Ther* 301, 293–298
- Koepsell H, Endou H (2004): The SLC22 drug transporter family. *Pflugers Arch* 447, 666–676
- Kolz M, Johnson T, Sanna S, Teumer A, Vitart V, Perola M, Mangino M, Albrecht E, Wallace C, Farrall M, et al. (2009): Meta-Analysis of 28,141 Individuals Identifies Common Variants within Five New Loci That Influence Uric Acid Concentrations. *PLoS Genet* 5, e1000504
- Kuhl H (1998): Pharmakologie von Sexualsteroiden. *Gynäkol* 31, 832–847
- Lakowicz JR: Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed; Springer, New York 2006
- Lang K, Wagner C, Haddad G, Burnekova O, Geibel J (2003): Intracellular pH activates membrane-bound Na(+)/H(+) exchanger and vacuolar H(+)-ATPase in human embryonic kidney (HEK) cells. *Cell Physiol Biochem* 13, 257–262
- Lorsch JR (2014): Practical steady-state enzyme kinetics. *Methods Enzymol* 536, 3–15
- Lotspeich WD (1958): Kidney, water and electrolyte metabolism. *Annu Rev Physiol* 20, 339–376
- Malo C, Berteloot A (1991): Analysis of kinetic data in transport studies: new insights from kinetic studies of Na(+)-D-glucose cotransport in human intestinal brush-border membrane vesicles using a fast sampling, rapid filtration apparatus. *J Membr Biol* 122, 127–141
- Marshall EKJ, Vickers JL (1923): The mechanism of elimination of phenolsulphonephthalein by the kidney—A proof of secretion by the convoluted tubules. *Bull Johns Hopkins Hosp* 34, 1–7
- Martinez F, Manganel M, Montrose-Rafizadeh C, Werner D, Roch-Ramel F (1990): Transport of urate and p-aminohippurate in rabbit renal brush-border membranes. *Am J Physiol* 258, F1145–F1153

- Miyauchi S, Gopal E, Fei YJ, Ganapathy V (2004): Functional identification of SLC5A8, a tumor suppressor down-regulated in colon cancer, as a Na(+)-coupled transporter for short-chain fatty acids. *J Biol Chem* 279, 13293–13296
- Mount DB, Kwon CY, Zandi-Nejad K (2006): Renal urate transport. *Rheum Dis Clin North Am* 32, 313–331, vi
- Negulescu PA, Machen TE (1990): Intracellular ion activities and membrane transport in parietal cells measured with fluorescent dyes. *Methods Enzymol* 192, 38–81
- Nigam SK, Bush KT, Martovetsky G, Ahn S-Y, Liu HC, Richard E, Bhatnagar V, Wu W (2015): The organic anion transporter (OAT) family: a systems biology perspective. *Physiol Rev* 95, 83–123
- 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
- Nozawa T, Imai K, Nezu J, Tsuji A, Tamai I (2004): Functional characterization of pH-sensitive organic anion transporting polypeptide OATP-B in human. *J Pharmacol Exp Ther* 308, 438–445
- Pritchard JB, Miller DS (1993): Mechanisms mediating renal secretion of organic anions and cations 2. *Physiol Rev* 73, 765–796
- Prueksaritanont T, Chu X, Gibson C, Cui D, Yee KL, Ballard J, Cabalu T, Hochman J (2013): Drug–Drug Interaction Studies: Regulatory Guidance and An Industry Perspective. *AAPS J* 15, 629–645
- Reyes AJ (2003): Cardiovascular drugs and serum uric acid. *Cardiovasc Ther* 17, 397–414
- Rizwan AN, Burckhardt G (2007): Organic anion transporters of the SLC22 family: biopharmaceutical, physiological, and pathological roles. *Pharm Res* 24, 450–470
- Roch-Ramel F, Guisan B (1999): Renal Transport of Urate in Humans. *News Physiol Sci* 14, 80–84
- Roch-Ramel F, Werner D, Guisan B (1994): Urate transport in brush-border membrane of human kidney. *Am J Physiol* 266, F797–F805
- Roch-Ramel F, Guisan B, Schild L (1996): Indirect coupling of urate and p-aminohippurate transport to sodium in human brush-border membrane vesicles. *Am J Physiol* 270, F61–F68
- Saier MH, Tran CV, Barabote RD (2006): TCDB: the Transporter Classification Database for membrane transport protein analyses and information. *Nucleic Acids Res* 34, D181–186
- Sakiyama M, Matsuo H, Shimizu S, Nakashima H, Nakayama A, Chiba T, Naito M, Takada T, Suzuki H, Hamajima N, et al. (2014): A common variant of organic anion transporter 4 (OAT4/SLC22A11) gene is associated with renal underexcretion type gout. *Drug Metab Pharmacokinet* 29, 208–210

- Shimada H, Moewes B, Burckhardt G (1987): Indirect coupling to Na⁺ of p-aminohippuric acid uptake into rat renal basolateral membrane vesicles. *Am J Physiol* 253, F795–F801
- Shin HJ, Anzai N, Enomoto A, He X, Kim DK, Endou H, Kanai Y (2007): Novel liver-specific organic anion transporter OAT7 that operates the exchange of sulfate conjugates for short chain fatty acid butyrate. *Hepatology* 45, 1046–1055
- Shuprisha A, Lynch RM, Wright SH, Dantzer WH (1999): Real-time assessment of alpha-ketoglutarate effect on organic anion secretion in perfused rabbit proximal tubules. *Am J Physiol* 277, F513–F523
- Smith LD, Xu WL, Varnold RL (1991): Oogenesis and oocyte isolation. *Methods Cell Biol* 36, 45–60
- Song L, Hennink EJ, Young IT, Tanke HJ (1995): Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys J* 68, 2588–2600
- Soreq H, Seidman S (1992): *Xenopus* oocyte microinjection: from gene to protein. *Methods Enzymol* 207, 225–265
- Sun W, Wu RR, van Poelje PD, Erion MD (2001): Isolation of a family of organic anion transporters from human liver and kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 283, 417–422
- 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 M, Khamdang S, Narikawa S, Kimura H, Hosoyamada M, Cha SH, Sekine T, Endou H (2002a): Characterization of methotrexate transport and its drug interactions with human organic anion transporters. *J Pharmacol Exp Ther* 302, 666–671
- Takeda M, Khamdang S, Narikawa S, Kimura H, Kobayashi Y, Yamamoto T, Cha SH, Sekine T, Endou H (2002b): Human organic anion transporters and human organic cation transporters mediate renal antiviral transport 2. *J Pharmacol Exp Ther* 300, 918–924
- Uchino H, Tamai I, Yamashita K, Minemoto Y, Sai Y, Yabuuchi H, Miyamoto K, Takeda E, Tsuji A (2000): p-aminohippuric acid transport at renal apical membrane mediated by human inorganic phosphate transporter NPT1. *Biochem Biophys Res Commun* 270, 254–259
- Ugele B, St Pierre MV, Pihusch M, Bahn A, Hantschmann P (2003): Characterization and identification of steroid sulfate transporters of human placenta. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284, E390–E398
- Wagner CA, Friedrich B, Setiawan I, Lang F, Broer S (2000): The use of *Xenopus laevis* oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins. *Cell Physiol Biochem* 10, 1–12
- Wakida N, Tuyen do G, Adachi M, Miyoshi T, Nonoguchi H, Oka T, Ueda O, Tazawa M, Kurihara S, Yoneta Y, et al. (2005): Mutations in human urate transporter 1 gene in

- presecretory reabsorption defect type of familial renal hypouricemia. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 2169–2174
- Watanabe S, Kang DH, Feng L, Nakagawa T, Kanellis J, Lan H, Mazzali M, Johnson RJ (2002): Uric acid, hominoid evolution, and the pathogenesis of salt-sensitivity. *Hypertension* 40, 355–360
- Weber WM (1999): Endogenous ion channels in oocytes of *xenopus laevis*: recent developments. *J Membr Biol* 170, 1–12
- Werner D, Martinez F, Roch-Ramel F (1990): Urate and p-aminohippurate transport in the brush border membrane of the pig kidney. *J Pharmacol Exp Ther* 252, 792–799
- Xu G, Bhatnagar V, Wen G, Hamilton BA, Eraly SA, Nigam SK (2005): Analyses of coding region polymorphisms in apical and basolateral human organic anion transporter (OAT) genes [OAT1 (NKT), OAT2, OAT3, OAT4, URAT (RST)]. *Kidney Int* 68, 1491–1499
- Yang Q, Köttgen A, Dehghan A, Smith AV, Glazer NL, Chen M-H, Chasman DI, Aspelund T, Eiriksdottir G, Harris TB, et al. (2010): Multiple genetic loci influence serum urate levels and their relationship with gout and cardiovascular disease risk factors. *Circ Cardiovasc Genet* 3, 523–530
- Zhou F, Tanaka K, Pan Z, Ma J, You G (2004): The role of glycine residues in the function of human organic anion transporter 4. *Mol Pharmacol* 65, 1141–1147
- Zhu C, Nigam KB, Date RC, Bush KT, Springer SA, Saier MH, Wu W, Nigam SK (2015): Evolutionary Analysis and Classification of OATs, OCTs, OCTNs, and Other SLC22 Transporters: Structure-Function Implications and Analysis of Sequence Motifs. *PLoS One* 10, e0140569

Danksagung

Herrn Professor Dr. med. G. Burckhardt danke ich für sein hohes Engagement als Hochschullehrer und Physiologe. Dies führte zur Vergabe des Themas und war die Grundlage für eine gute Supervision.

Für die freundschaftliche und fortwährende, sehr gute Unterstützung und Betreuung bedanke ich mich besonders bei Herrn Professor Dr. rer. nat. Y. Hagos. Über die bloße Vermittlung praktischer Techniken hinaus lernte ich von ihm die Faszination einer lebendigen Forschung kennen.

Für die konstruktive Kritik und wissenschaftliche Diskussionen danke ich Herrn Privatdozent Dr. rer. nat. Andrew Bahn.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Vegetative Physiologie und Pathophysiologie, insbesondere S. Schindelmann, S. Petzke und G. Dallmeyer für die fachliche und persönliche Unterstützung und Anleitung während der experimentellen Phase.