

**Identifizierung des physiologischen Substrates und
funktionelle Charakterisierung des organischen
Kationentransporters OCTN1 mittels LC-MS/MS**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Stephanie Harlfinger

aus

Alsfeld

Bonn

31. Mai 2005

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Dekan: Prof. Dr. A. B. Cremers, Institut für Informatik der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. med. E. Schömig, Institut für Pharmakologie des Klinikums der Universität zu Köln

2. Referent: Prof. Dr. med. K. Mohr, Abteilung Pharmakologie und Toxikologie, Pharmazeutisches Institut, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Erscheinungsjahr: 2005

Tag der Disputation: 14. September 2005

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbst und ohne jede unzulässige Hilfe angefertigt habe. Aus fremden Quellen entnommene Gedanken und Daten sind als solche kenntlich gemacht. Diese oder eine ähnliche Arbeit sind von mir noch an keiner anderen Stelle einer Prüfungsbehörde vorgelegt worden. Ich habe vormals noch keinen Promotionsversuch unternommen. Die Ergebnisse dieser Dissertation sind an der nachstehend aufgeführten Stelle auszugsweise veröffentlicht worden.

Gründemann D, Harlfinger S, Golz S, Geerts A, Lazar A, Jung N, Rubbert A and Schömig E (2005) Discovery of the ergothioneine transporter. *PNAS* **102**:5256-5261.

Köln, den 26.05.2005

Danksagungen

Die Arbeiten zu dieser Dissertation wurden am Institut für Pharmakologie des Klinikums der Universität zu Köln bei Herrn Prof. Dr. med. E. Schömig durchgeführt. Mein Dank gilt daher in besonderer Weise Herrn Prof. Schömig für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die fortwährende wohlwollende Unterstützung und Förderung meiner Arbeit und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen im Institut für Pharmakologie. Darüber hinaus möchte ich mich bei Herrn Prof. Schömig und Herrn Dr. D. Gründemann für die interessante Aufgabenstellung dieses Projektes bedanken. Herr Dr. Gründemann hat mich während der Arbeiten zu dieser Dissertation wissenschaftlich in besonderer Weise unterstützt. Für seinen großen Einsatz, die vielen fachlichen Hilfestellungen und seine geduldige Betreuung möchte ich mich besonders herzlich bedanken. In diesem Zusammenhang möchte ich ferner vor allem Frau Beatrix Steinrücken und darüber hinaus Frau Katja Rolshofen, Frau Kristine Helfert, Frau Kathi Krüsemann, Frau Gundula Grimberg, Frau Regina Baucks und Frau Dr. Liliane Henkes nennen, deren molekular- und mikrobiologischen Fertigkeiten ich sehr viel zu verdanken habe. Ein großer Dank gilt auch Herrn Dr. D. Kasel, der mich freundlich und kompetent in die instrumentelle Analytik mittels LC-MS/MS eingearbeitet hat. Herrn Dr. med. A. Jetter, Herrn Dr. med. A. Lazar und Herrn Dr. R. Berkels sei für ihre wertvolle Hilfsbereitschaft und Unterstützung gedankt. Allen nun nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern des Institutes für Pharmakologie und den Mitgliedern der weiteren Arbeitsgruppen im Institut danke ich für das freundschaftliche Umfeld und die gute Zusammenarbeit während meiner Promotion. Herrn Dr. S. Golz sowie Herrn Dr. A. Geerts (Pharma Research-Molecular Screening Technology, Bayer Healthcare AG) danke ich für das zur Verfügungstellen der Real-Time-PCR Daten zur Lokalisation von OCTN1 im menschlichen Organismus. Herrn Prof. Dr. med. K. Mohr danke ich sehr für seine freundliche Betreuung und Unterstützung und seine Stellungnahme zu dieser Arbeit.

Ein ganz persönlicher Dank gilt meinen Eltern, Christoph und Annette.

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	9
<i>1.1 OCTN1 innerhalb der SLC22 Transporterfamilie</i>	9
<i>1.2 Einsatz der LC-MS Technik in der Substratforschung</i>	15
<i>1.3 Zielsetzung: Substratidentifizierung für OCTN1</i>	18
2. Material und Methoden	21
2.1 Material	21
2.1.1 Chemikalien und Enzyme	21
2.1.2 Puffer und Lösungen	22
2.1.3 Nährmedien	23
2.1.4 Kits	24
2.1.5 Escherichia coli Bakterienstamm	24
2.2 Mikrobiologische Methoden	25
2.2.1 Allgemeines für den Umgang mit E. coli	25
2.2.2 Kultur und Lagerung von E. coli	25
2.2.3 Elektrotransformation von E. coli	26
2.3 Molekularbiologische Methoden	27
2.3.1 Phenol-Chloroform-Extraktion	27
2.3.2 Alkoholpräzipitation von DNA	28
2.3.3 Dephosphorylierung von DNA-Enden	28
2.3.4 Ligation von DNA	28
2.3.5 Restriktion von DNA	29
2.3.6 Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli	29

2.3.7 Agarosegelelektrophorese nativer DNA	30
2.3.8 Isolierung von DNA nach präparativer Agarosegelelektrophorese	31
2.4 Expressionssysteme	32
2.4.1 Eukaryonten-Zelllinie und Zellkultur	32
2.4.2 Transfektionsreagenz	32
2.4.3 Stabile Transfektion	33
2.4.4 Transiente Transfektion	34
2.4.5 Flp-In™ T-Rex™ System	35
2.4.6 Epstein-Barr Expressionssystem	38
2.4.7 Kryokonservierung der Zellen	39
2.5 Aufnahmeversuche	40
2.5.1 Aussaat der Zellen	40
2.5.2 Vorinkubation	41
2.5.3 Substrataufnahme	41
2.5.4 Lyse der Zellen	42
2.5.5 Bestimmung der Radioaktivität	42
2.5.6 Proteinbestimmung	43
2.6 LC-MS und –MS/MS Analytik	44
2.6.1 Instrumente	44
2.6.2 Ionisierung	46
2.6.3 Chromatographie	47
2.6.4 Full Scan Experimente	48
2.6.5 Difference Shading	48
2.6.6 Produktionenspektren und SRM Experimente	49
2.6.7 Kalibration	52
2.7 Datenauswertung	55

2.8 Anmerkung zum Dezimalpunkt	55
3. Ergebnisse	56
3.1 Entwicklung der LC-MS Screening Analytik und Auswertung mittels „Difference Shading“	56
3.2 Substratidentifizierung für OCTN1h	58
3.2.1 Konditionelles Expressionssystem für OCTN1h	58
3.2.2 Substratsuche	60
3.3 Vergleich der Quantifizierungsmethoden LC-MS/MS und Flüssigszintillationszählung	66
3.4 Proteinbestimmung für die LC-MS/MS Analytik	68
3.5 Funktionelle Charakterisierung von OCTN1h	69
3.5.1 Substratspektrum von OCTN1h	69
3.5.2 Ergothionein ist das physiologische Substrat von OCTN1h	75
3.5.3 Hemmstoffe von OCTN1h	87
3.5.4 Thiamazol ist kein Substrat von OCTN1h	90
3.6 Funktionelle Charakterisierung von OCTN1m	92
3.6.1 Konditionelles Expressionssystem für OCTN1m	92
3.6.2 Substratspektrum von OCTN1m und OCTN1r	95
3.6.3 Vergleich der Transportcharakteristika von OCTN1h und OCTN1m	99
3.7 Steuerbarkeit der eingesetzten Expressionssysteme	102

4. Diskussion	104
<i>4.1 Methodische Aspekte</i>	<i>104</i>
<i>4.2 Der Ergothioneintransporter OCTN1 (ETT)</i>	<i>106</i>
<i>4.3 Lokalisation des ETT beim Menschen</i>	<i>112</i>
<i>4.4 Ergothionein</i>	<i>114</i>
<i>4.5 Mögliche Funktion des Ergothioneins in Erythrozyten</i>	<i>116</i>
4.5.1 Spezifische ETT Expression auf den Vorläuferzellen der Erythrozyten	116
4.5.2 Antioxidative Eigenschaften des Ergothioneins	117
4.5.3 Ergothionein und Ferrylhämoglobin	120
<i>4.6 ETT und chronisch entzündliche Erkrankungen</i>	<i>126</i>
4.6.1 ETT Expression auf immunologischen Zellen	126
4.6.2 Ergothionein und die Myeloperoxidase	127
4.6.3 Genetische Variationen von ETT sind assoziiert mit rheumatoider Arthritis und Morbus Crohn	129
<i>4.7 Ausblick</i>	<i>132</i>
5. Zusammenfassung	134
6. Abkürzungen	137
7. Literaturverzeichnis	139
8. Lebenslauf	149

1. Einleitung

1.1 OCTN1 innerhalb der SLC22 Transporterfamilie

Transportsysteme ermöglichen die Aufnahme essentieller Nahrungsbestandteile und Ionen sowie die Ausscheidung von Stoffwechselendprodukten und xenobiotischen Substanzen. Darüber hinaus sind sie wichtige Bestandteile des intrazellulären Stoffwechsels und der Organisation und sie sind beteiligt an der Kommunikation zwischen Zellen und ihrer Umwelt (Mitchell, 1967). Transportphänomene für ansonsten nicht biomembrangängige Substanzen werden heute an unterschiedlichen Organen und Geweben untersucht. Häufig stehen hierbei die Eliminationsorgane wie die Niere oder die Leber als Hauptort der enzymatischen Biotransformation im Mittelpunkt (Roch-Ramel et al., 1992; Koepsell, 1998; Burckhardt and Wolf, 2000). Besonders in den letzten 15 Jahren ist es gelungen, viele dieser Transportproteine auf molekularer Ebene zu identifizieren. Im gleichen Zeitraum wurde die große physiologische Bedeutung solcher Transporter in fast allen Organen und Geweben des hoch kompartimentierten Organismus evident.

Die so genannte Major Facilitator Superfamily (MFS) beinhaltet ein Kollektiv von 18 einzelnen Transporterfamilien. Dazu gehören Transporter von Bakterien, Pflanzen, niedrigen Eukaryonten und Säugetieren, die als Uniporter, Symporter oder Antiporter fungieren und so unterschiedliche Substrate wie Zucker, Antibiotika und Nukleoside transportieren. Auf der anderen Seite zeichnen sich diese Transporter durch strukturelle Gemeinsamkeiten, z. B. in der Membrantopologie aus und sie sind evolutionär auf denselben genetischen Ursprung zurückzuführen (Marger and Saier, 1993; Pao et al., 1998). Bestandteil dieser übergeordneten Familie ist auch die so genannte SLC22 Familie (Solute Carrier), die ausschließlich Eukaryontenproteine beinhaltet. Auf der Grundlage der Gensymbole, die im Zuge des Human-Genom-Projektes vergeben worden sind (Human Genome Nomenclature Comittee), erfolgte zum ersten Mal eine allgemein akzeptierte Einteilung und neutrale Namensgebung der humanen Transporter (Koepsell et al., 2003). Eine andere Bezeichnung, die auf die Natur der Substrate dieser Transporterfamilie zurückgeht, ist Amphiphilic Solute Facilitator (ASF) (Gründemann et al., 1998b; Schömig et al., 1998). Abb. 1 zeigt

einen phylogenetischen Stammbaum der SLC22 bzw. ASF Familie, zu der Transporter für organische Anionen und Kationen gehören. Mittlerweile ist es möglich, mehrere Untergruppen innerhalb dieser Familie zu bilden (Koepsell and Endou, 2004). Dazu zählen die *Organic Anion Transporter* (OAT), die *Organic Cation Transporter* (OCT) und die sogenannten *Novel Organic Cation Transporter* (OCTN).

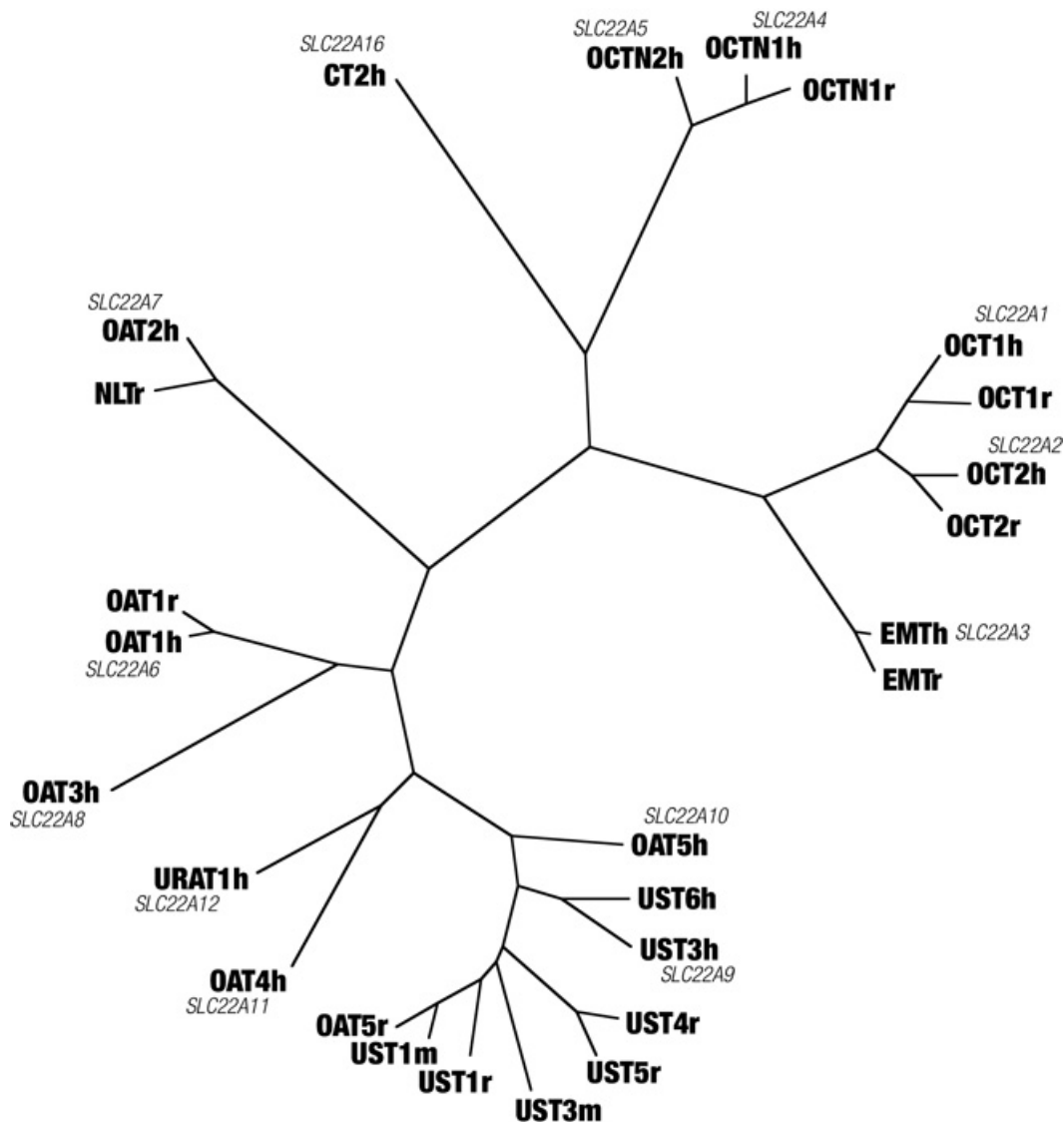


Abb. 1

Evolutionstammbaum der SLC22 Familie. Je kürzer der Abstand zwischen zwei Transportern, desto höher ist der Verwandtschaftsgrad zwischen den Proteinen basierend auf Identität und Ähnlichkeit ihrer Aminosäuresequenz. Die Konstruktion des Baumes erfolgte nach der gruppenweisen Ausrichtung der Aminosäuresequenzen (PILEUP) mit dem „quartet puzzling“-Algorithmus (Strimmer and Von Haessler, 1996).

Die OATs sind in der Lage, einen bidirektionalen Transport organischer Anionen über Biomembranen zu vermitteln (Burckhardt and Burckhardt, 2003; Koepsell and Endou, 2004). Physiologisch von besonderer Bedeutung ist in dieser Gruppe der Transporter für Urat (Gensymbol: SLC22A12, bzw. URAT1). Er ist in der Niere für die Uratresorption aus dem Primärharn verantwortlich und somit für die Aufrechterhaltung der Harnsäurespiegel im Blut. URAT1 funktioniert als Urat/Anionen Antiporter. Die so genannte idiopathische renale Hypourikämie wird durch eine Mutation im URAT1 Gen und den dadurch hervorgerufenen Verlust der Transportleistung ausgelöst (Enomoto et al., 2002).

Die Untergruppe der OCTs transportiert organische Kationen und schwache Basen. OCT1r war der erste Vertreter dieser Familie, der molekular identifiziert wurde (Gründemann et al., 1994). Der humane Transporter erhielt das Gensymbol SLC22A1 (Zhang et al., 1997). Weitere Vertreter dieser Untergruppe von SLC22 sind OCT2 und EMT (Extraneuronaler Monoamintransporter), der in der Literatur zum Teil noch als OCT3 bezeichnet wird. Gemeinsame Charakteristika des Transportes der drei OCTs sind Elektrogenität, es werden positive Nettoladungen transportiert, Unabhängigkeit vom Natriumionengradienten und die Fähigkeit, das Substrat in beide Richtungen zu transportieren (Koepsell and Endou, 2004). Der Tatsache folgend, dass die physiologischen Monoamine Dopamin, Noradrenalin, Adrenalin und Serotonin Substrate der OCTs sind, kann diese Gruppe auch als nicht-neuronale Monoamintransporter bezeichnet werden (Gründemann et al., 1998a; Gründemann et al., 1999). Obwohl sich die Substratspektren der drei Transporter überschneiden und sie auch als polyspezifische organische Kationentransporter angesehen werden (Gorboulev et al., 1997; Koepsell and Endou, 2004), ist es doch möglich, funktionelle Unterschiede herauszuarbeiten (Gründemann et al., 1999). Auf Grund ihres Expressionsmusters im Organismus und ihres Substratspektrums wird die physiologische Rolle von OCT1 und OCT2 primär in der Niere und der Leber bei der Elimination und Metabolisierung von organischen Kationen gesehen (Gründemann et al., 1994; Martel et al., 1996; Gorboulev et al., 1997; Gründemann et al., 1998a). Für EMT auf der anderen Seite wurde gezeigt, dass es sich um den Transporter handelt, der dem so genannten „Uptake 2“ zugrunde liegt (Gründemann et al., 1998b). Dieses Transportsystem ist physiologisch und pharmakologisch von großer Bedeutung, da es an der Inaktivierung der Katecholamine beteiligt ist (Iversen, 1965; Iversen and

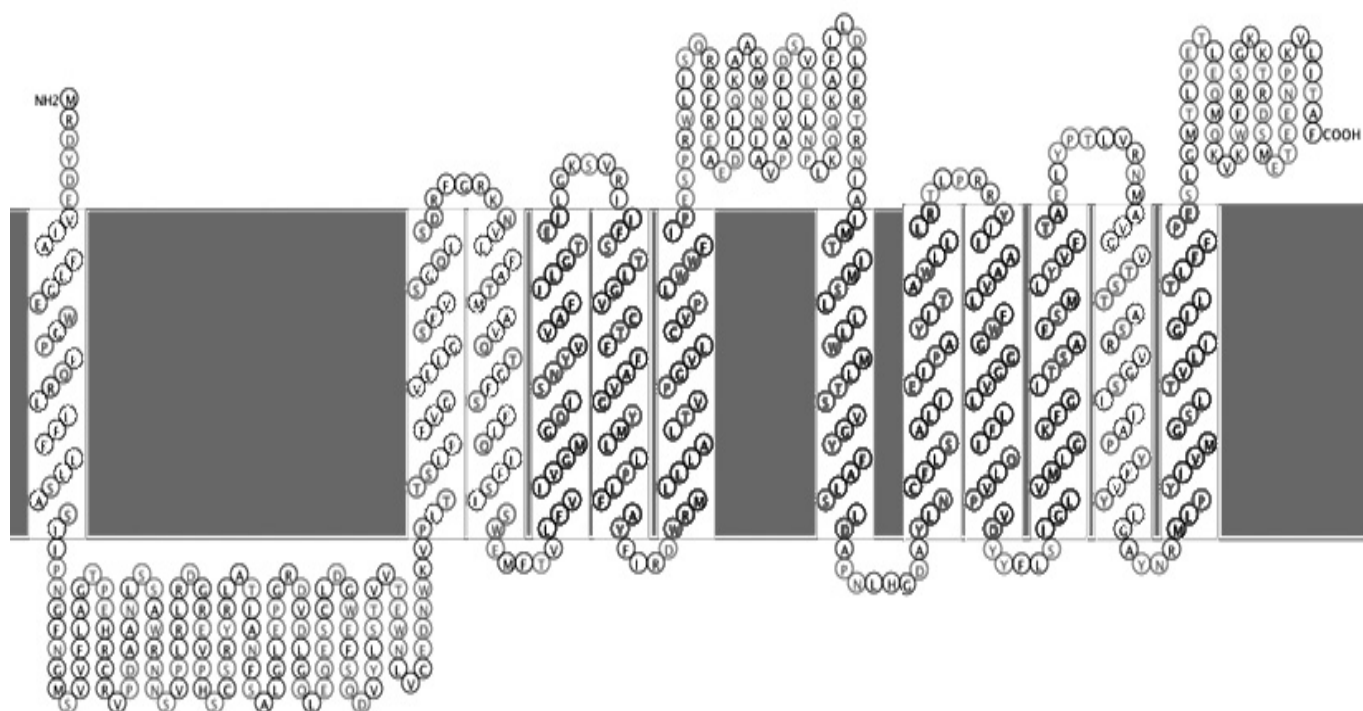
Salt, 1970). Demzufolge ist es eine Aufgabe von EMT, die physiologischen Monoamine in Zellen zu transportieren und sie so dem enzymatischen Abbau zuzuführen. Zusammen mit dem NET (Neuronaler Noradrenalintransporter), der auf den Neuronen selbst lokalisiert ist und als „Uptake 1“ bezeichnet wird (Pacholsky et al., 1991), ist er für die Termination des Transmittersignals verantwortlich.

OCTN1 und OCTN2 bilden eine weitere kleine Untergruppe der SLC22 Familie. Eine dritte Variante, OCTN3, ist bisher nur in der Maus nachgewiesen worden (Tamai et al., 2000). OCTN2 wurde erstmals aus der Rattenniere kloniert und mit UST2 (Unspecified Substrate Transporter) bezeichnet (Schömig et al., 1998). Eine spezifischere Namensgebung war zunächst nicht möglich, da man das Substratspektrum des Transporters nicht kannte und keine Aussage über seine Bedeutung machen konnte. Mittlerweile ist OCTN2 ausführlich funktionell charakterisiert worden und seine Rolle im Organismus ist aufgeklärt. Für den menschlichen Transporter wurde als erstes das prototypische organische Kation TEA (Tetraethylammonium) als Substrat identifiziert. Ihm folgten mehrere andere kationische Substanzen, so dass OCTN2h (SLC22A5) als polyspezifischer organischer Kationentransporter galt (Wu et al., 1998). Daraufhin wurde entdeckt, dass OCTN2 mit hoher Effizienz Carnitin und auch die kurzkettigen Acylcarnitine transportiert und für diesen Transport den nach innen gerichteten Natriumionengradienten als Triebkraft für einen Carnitin/Na⁺ Kotransport nutzt (Tamai et al., 1998). Trotz der Tatsache, dass es sich beim Carnitin um das führende Substrat des Transporters handelt, wird in der Literatur noch Wert darauf gelegt, dass OCTN2 insgesamt eine duale Funktion besitzt. Er wird zwar als spezifischer Carnitintransporter angesehen, aber auch weiterhin als polyspezifischer Kationentransporter bezeichnet, obwohl die anderen organischen Kationen mit deutlich geringerer Effizienz als Carnitin und unabhängig von der Na⁺ Konzentration transportiert werden (Wu et al., 1999; Ohashi et al., 2001). OCTN2 wird vor allem in der Skelettmuskulatur, der Niere, dem Herz und im Gehirn exprimiert (Schömig et al., 1998; Tamai et al., 1998; Wu et al., 1998; Wu et al., 1999). In der Niere ist der Transporter für die Rückresorption des Carnitins aus dem Primärharn verantwortlich. Er soll aber aufgrund seiner weiteren Transportfähigkeiten auch bei der Elimination anderer organischer Kationen im proximalen Tubulus von Bedeutung sein (Ohashi et al., 2001; Tamai et al., 2001). Darüber hinaus ist OCTN2 spezifisch für die Aufnahme

von Carnitin vor allem in die Muskelzellen des Organismus wichtig. Carnitin spielt eine bedeutende Rolle im Fettstoffwechsel und wird intrazellulär für den Transport von Fettsäuren über den so genannten Carnitin-Acyl-Kotransporter in der Mitochondrienmembran benötigt. Unter Bildung von ATP (Adenosintriphosphat) werden die Fettsäuren in den Mitochondrien der β -Oxidation unterworfen (Bremer, 1983). Man hat zeigen können, dass Mutationen im OCTN2 Gen und der Ausfall des Transporters zur primären systemischen Carnitinefizienz führen (Nezu et al., 1999; Tang et al., 1999). Die Erkrankung ist gekennzeichnet durch sehr niedrige intrazelluläre Carnitinkonzentrationen (Karpati et al., 1975), hohe Carnitinausscheidungsraten im Urin (Engel et al., 1981) und manifestiert sich vor allem in schwerwiegenden Myopathien (Karpati et al., 1975).

OCTN2 gehört zu den am besten untersuchten und verstandenen Transportern der SLC22 Familie. Über seinen nächsten Verwandten OCTN1 ist im Vergleich deutlich weniger bekannt, obwohl dieser zeitlich vor OCTN2 entdeckt worden war. OCTN1h (SLC22A4) wurde aus fötaler menschlicher Leber kloniert (Tamai et al., 1997). Auch die orthologen Transporter von Maus (Tamai et al., 2000) und Ratte (Wu et al., 2000) sind molekular identifiziert worden. Demzufolge besteht OCTN1h aus 551 Aminosäuren und bildet ein integrales Membranprotein mit 12 Transmembransegmenten. Zwischen der ersten und der zweiten Transmembrandomäne befindet sich eine große extrazelluläre und zwischen der sechsten und der siebten Transmembrandomäne eine kleinere intrazelluläre Schleife. Beide Proteinenden liegen intrazellulär, dies sind typische Merkmale für Transporter der SLC22 Familie (Marger and Saier, 1993) (Abb. 2). Zur funktionellen Charakterisierung von OCTN1h wurde zunächst wieder das physiologische Kation TEA herangezogen. Der beobachtete Transport war sättigbar mit einem K_m -Wert von 436 $\mu\text{mol/l}$ und erhöht bei einem nach außen gerichteten Protonengradienten (Tamai et al., 1997). Um diese Affinität einzuordnen, kann man sie vergleichen mit dem K_m -Wert eines nicht-neuronalen Monoamintransporters für TEA z. B. OCT2p der bei 20 $\mu\text{mol/l}$ liegt (Gründemann et al., 1997). Trotz der vergleichsweise geringen Affinität ergab sich aus diesen Befunden initial die Hypothese, es könnte sich bei OCTN1 um einen Protonenantiporter von organischen Kationen handeln.

Intrazellulärer Raum



Extrazellulärer Raum

Abb. 2

Schematische Darstellung der Membrantopologie von OCTN1h. Die Vorhersage beruht auf einer Hydrophathieanalyse der Aminosäuresequenz (Kyte and Doolittle, 1982).

Weitere Untersuchungen, bei denen der Einfluss anderer organischer Kationen auf den TEA Transport von OCTN1h und OCTN1r und somit zumindest eine Interaktion mit dem Transporter gezeigt wurde, stützten zunächst diese Hypothese (Yabuuchi et al., 1999; Wu et al., 2000). Weder das Membranpotential noch der Natriumionengradient schienen Einfluss auf diesen Transport zu nehmen, dafür bestätigte sich die Auswirkung des pH-Wertes (Yabuuchi et al., 1999; Tamai et al., 2004).

Die Lokalisation von OCTN1 im menschlichen Organismus wurde zuerst mittels Northern Blot Analysen untersucht. Dabei wurde eine hohe Expression des Transporters vor allem in der Niere, der Luftröhre und im Knochenmark nachgewiesen, eine schwache Expression zeigte sich z. B. in der Prostata, der

Lunge, in der Plazenta und im Herz. Keine OCTN1h Expression gab es z. B. in den Hoden, im Thymus und den Lymphknoten. Während in der fötalen Leber ein starkes Signal für OCTN1h erhalten wurde, konnte man den Transporter in der Leber eines Erwachsenen nicht nachweisen (Tamai et al., 1997). Die Leber als primäres enzymatisches Metabolisierungsorgan exprimiert OCTN1h zumindest beim Erwachsenen nicht, die Niere (Elimination) allerdings schon. Diese ersten Ergebnisse weisen auf ein spezifisches Expressionsmuster für OCTN1h hin. Bei Northern Blot Analysen von Geweben der Ratte fand man eine starke OCTN1r Expression in der Leber, der Niere und im Dünndarm (Wu et al., 2000). Darüber hinaus konnte OCTN1m immunohistochemisch in der Niere der Maus genauer in der apikalen Membran des proximalen Tubulus lokalisiert werden (Tamai et al., 2004). Bei der Sekretion organischer Kationen in der Niere wird die Existenz eines apikal gelegenen Transporters, der elektroneutral als Protonenantiporter organische Kationen in das Tubuluslumen transportiert, angenommen (Takano et al., 1984). Über die molekulare Identität dieses Transporters herrscht allerdings noch keine allgemeine Einigkeit, obwohl deutliche Hinweise dafür sprechen, dass es sich hierbei um OCT2 handelt (Gründemann et al., 1997). Aber auch OCTN1 wird mit diesem bekannten Transportmechanismus in Verbindung gebracht. Zumindest gilt er als polyspezifischer und pH-sensitiver Transporter organischer Kationen und es wird ihm eine wichtige physiologische Rolle beigemessen (Yabuuchi et al., 1999; Tamai et al., 2004).

1.2 Einsatz der LC-MS Technik in der Substratforschung

Die bisherigen Ausführungen zu den Transportern der SLC22 Familie haben deutlich gemacht, dass die Interpretationen und Hypothesen zur physiologischen Bedeutung der Transporter vor allem von zwei Merkmalen abhängen: Von der Lokalisation im Organismus und vom Substratspektrum. Die Substratforschung nimmt auf diesem Gebiet eine Schlüsselrolle ein, denn erst wenn man weiß, was ein Transporter transportiert, kann man sich letztendlich Gedanken darüber machen, welchen Zweck dies erfüllen könnte. Zur Untersuchung der Lokalisation stehen heute weit fortgeschrittene molekularbiologische Techniken zur Verfügung (v. a. quantitative

Real-time PCR, Reverse-Transkription PCR, Northern Blot Analysen, immunohistochemische Verfahren), mit denen nach molekularer Identifikation eines Transporters seine Expressionsorte im Organismus ermittelt werden können. Klassischerweise werden Transportaktivitäten mit so genannten Radio Tracer Assays untersucht. Diese etablierte und spezifische Methode hat den Nachteil, dass man eine Vorstellung von der Struktur des Substrates haben muss, das man am Transporter testen will, denn man muss es entsprechend markiert erwerben oder synthetisieren lassen. Dies schränkt die zur Verfügung stehen Substanzen ein. Um trotzdem bei einer funktionellen Charakterisierung ein großes Kollektiv an möglichen Substraten zu testen, greift man auf Konkurrenzexperimente zurück. Hierbei wird versucht, den Transport eines bekannten radioaktiv markierten Substrates, durch die Zugabe anderer Substanzen kompetitiv zu hemmen. Eine solche indirekte Methode macht allerdings lediglich eine Aussage über eine Interaktion beider Substanzen am Transporter, ist aber kein Beweis für einen Transport. Dieser kann nur durch ein direktes Aufnahmeexperiment nachgewiesen werden. Bei Transportern, deren Substratspektren noch unbekannt sind, werden üblicherweise zunächst die Substrate der nächstverwandten bekannten Transporter getestet. So ist dies z. B. für OCTN1 mit den Substraten der OCTs und OCTN2 geschehen. Auf diese Weise werden allerdings keine neuen Substratspektren aufgedeckt.

Im Allgemeinen erfährt man über einen neuen Transporter auf Grund seines Verwandtschaftsgrades, beruhend auf der Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen, etwas über seine mögliche Zugehörigkeit zu einer bestimmten Familie oder Gruppe. Dadurch hat man aber eigentlich keine genauere Vorstellung von der Struktur eines Substrates, als dass es sich um ein biologisches Anion oder Kation handeln müsste, das eine gewisse Größe nicht überschreitet. Es gibt neben den Radio Tracer Assays bisher noch kein beschriebenes Verfahren, unvoreingenommener an die Fragestellung der Substratspektren heranzugehen. Methodisch war es daher das Ziel dieser Arbeit, die analytischen Möglichkeiten, die die Massenspektrometrie bietet, für die Substratforschung einzusetzen. Hierbei steht die selektive Detektion unmarkierter Substanzen im Vordergrund. Durch wesentliche technische Weiterentwicklungen können heute massenselektive Detektoren zur qualitativen und quantitativen Analyse gekoppelt an ein HPCL System (High Performance Liquid Chromatography) eingesetzt werden. Auf diese Weise wurde es möglich, die Fähigkeiten zweier

wichtiger instrumenteller Verfahren gemeinsam zu nutzen. Entwickelt werden sollte ein LC-MS Screeningverfahren (Liquid Chromatography – Mass Spectrometry) zur Substratidentifizierung. Hierfür wurde als Detektor ein Triple Quadrupol Tandem Massenspektrometer mit einem vorgeschalteten HPLC System eingesetzt. Die geplante Vorgehensweise ist schematisch in Abb. 3 dargestellt.

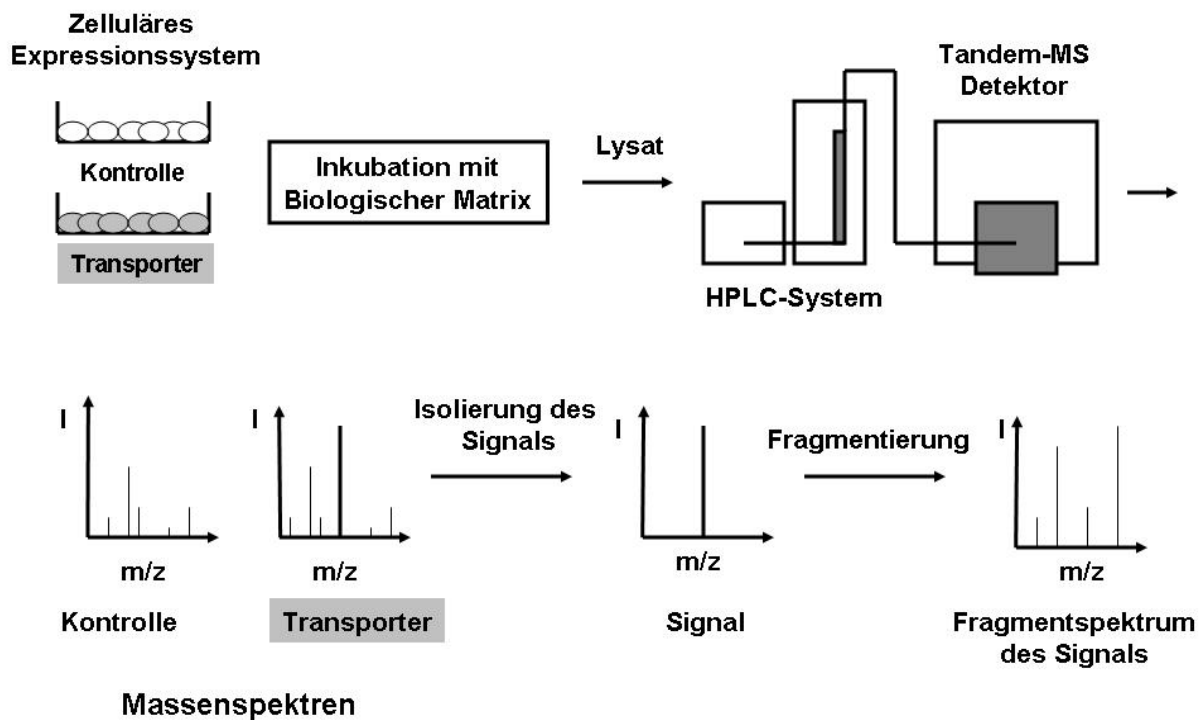


Abb. 3

Schematische Darstellung zur Substratidentifizierung mittels eines LC-MS Screenings.

Um funktionelle Eigenschaften von Transportern isoliert zu untersuchen, können sie in zellulären Systemen heterolog zur Expression gebracht werden. Normalerweise wird den Zellen in einem physiologischen Puffer dann eine markierte Substanz zur Aufnahme angeboten und die Aufnahmerate im Zellysate mittels Flüssigszintillationszählung quantifiziert. Als Negativkontrolle werden Zellen eingesetzt, die den Transporter nicht exprimieren. Für die neu zu entwickelnde Methode kann nun keine spezifische Aufnahmelösung eingesetzt werden, vielmehr sollten die Zellen mit einer biologischen Matrix inkubiert werden (z. B. Plasma, Organhomogenate, Zellysate). Würde sich in einem solchen komplexen Stoffgemisch eine Substanz befinden, die vom Transporter als Substrat akzeptiert wird, so reichert sich diese im Zuge der Inkubation in den Transporterzellen an,

während das in den Kontrollzellen nicht der Fall ist. Die Zelllysate können anschließend per LC-MS analysiert werden. Eine transportierte Substanz sollte in den resultierenden Massenspektren der Transporterzellen (Transporterspektren) ein entsprechendes Signal ergeben, das in den Kontrollspektren von Zellen, die den Transporter nicht exprimieren, nicht auftritt. An die Isolierung eines solchen Signals müsste sich die Strukturaufklärung der Substanz anschließen. Die Erkenntnisse der MS bzw. MS/MS Analysen können hierzu herangezogen werden. Durch die gezielte Fragmentierung einer Masse im Tandem MS Detektor kann man ein Produktionenspektrum generieren, das spezifisch ist für die Substanz, die das Signal erzeugt.

Nach der Identifizierung kann in einem Aufnahmeexperiment untersucht werden, ob die Verbindung speziell über den Transporter in die Zellen gelangt ist. Durch die Entwicklung von sensitiven LC-MS/MS Methoden zur quantitativen Analyse von Substraten im Zelllysate könnte man von radioaktiv markierten Substanzen zur funktionellen Charakterisierung von Transportern weitestgehend unabhängig werden. Der Einsatz nativer Stoffe würde zu einer größeren Flexibilität bei der Auswahl der Substrate führen und sollte zumindest teilweise die kostspieligen Radio Tracer und ihre Entsorgung ersetzen können.

1.3 Zielsetzung: Substratidentifizierung für OCTN1

Das bisher in der Literatur beschriebene Substratspektrum von OCTN1 geht in erster Linie auf bekannte organische Kationen zurück, die zumeist Substrate anderer organischer Kationentransporter (OCTN2, OCTs) sind (Tamai et al., 1997; Yabuuchi et al., 1999; Wu et al., 2000). Betrachtet man jedoch z. B. den Verwandtschaftsgrad beruhend auf der Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen zwischen OCTN1h und den nicht-neuronalen Monoamintransportern OCT1h sowie OCT2h, so beträgt er nur 31% bzw. 33% (siehe auch Abb. 1) (Tamai et al., 1997). Diese Ähnlichkeit darf nicht zur vereinfachenden Annahme führen, dass sich die Substratspektren der Transporter entsprechen könnten. Ausschlaggebend für die Substratspezifität eines Transporters ist die Beschaffenheit der Substratbindungsstelle, so können Unterschiede der

Aminosäuresequenz an dieser Stelle zu unterschiedlichen Substratspezifitäten führen, auch wenn sich die Proteine ansonsten sehr ähnlich sind. Deutlich näher als mit den OCTs ist OCTN1h mit OCTN2h verwandt. Hier wird eine Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen von nahezu 76% beschrieben (Tamai et al., 1998). Betrachtet man die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen von OCTN1 zwischen Spezies z. B. der Ratte und des Menschen, so wird sie mit 91% angegeben (Wu et al., 2000). Es gibt aber zwischen OCTN1 und OCTN2 distinkte Unterschiede in den Aminosäuresequenzen, die zwischen den Spezies konserviert sind und somit unterschiedliche Substratspezifitäten möglich erscheinen lassen (Wu et al., 2000). Zwar ist OCTN2 in der Lage, eine Reihe von organischen Kationen zu transportieren. Erwiesenermaßen ist aber seine physiologische bzw. pathophysiologische Bedeutung im Organismus verknüpft mit seinem spezifischen Substrat Carnitin, das sich im Ausmaß der Transporteffizienz deutlich von den anderen Kationen unterscheidet (Tamai et al., 1998; Nezu et al., 1999). Wir haben angenommen, dass es sich mit dem führenden Substrat von OCTN1 ähnlich verhält.

In der jüngeren Vergangenheit sind Polymorphismen im OCTN1h Gen mit chronisch entzündlichen Erkrankungen assoziiert worden. Der chromosomale Genort von OCTN1 (5q31) ist für solche Erkrankungen von Bedeutung, da in diesem Bereich viele Gene lokalisiert sind, deren Proteine an immunologischen Reaktionen teilnehmen. Es handelt sich um ein so genanntes Zytokin-Gencluster (Rioux, 2001; Lee et al., 2002). So konnte gezeigt werden, dass ein einzelner intronischer Nukleotidaustausch in der Bindungsstelle eines Transkriptionsfaktors (RUNX1) (Coffmann, 2003) im OCTN1h Gen mit rheumatoider Arthritis assoziiert ist (Tokuhira et al., 2003). In diesem Fall wird die Hypothese aufgestellt, dass durch den Nukleotidaustausch eine verstärkte Suppression der Transkription von SLC22A4 (OCTN1h) durch den inhibitorischen Transkriptionsfaktor RUNX1 bewirkt wird, welche mit der Empfänglichkeit für rheumatoide Arthritis einhergeht. Wie OCTN1h pathophysiologisch zur rheumatoiden Arthritis beiträgt ist unbekannt. Ähnliche Befunde liegen auch für die chronisch entzündliche Darmerkrankung Morbus Crohn vor (Peltekova et al., 2004). In diesem Fall führt ein exonischer Nukleotidaustausch in der Sequenz des OCTN1h Gens zu einem Aminosäureaustausch im Protein. Er soll Auswirkungen auf die Transporterleistung haben. Funktionelle Untersuchungen mit der entsprechenden Mutante ergaben eine um den Faktor vier erhöhte Aufnahme

von TEA gegenüber dem Wildtyp. Carnitin hingegen wurde vom Transporter mit der Mutation schlechter transportiert (Peltekova et al., 2004). In den beiden beschriebenen Fällen konnten die Assoziationen von OCTN1h mit den chronisch entzündlichen Erkrankungen auf genetischer Ebene gezeigt werden. Allerdings ist völlig unklar, über welche Mechanismen OCTN1h in der Pathophysiologie dieser Erkrankungen eine Rolle spielt. Die bisher bekannten Fakten zur funktionellen Charakterisierung des Transporters bieten keinen Erklärungsansatz.

Wir haben vermutet, dass das eigentliche Substratspektrum von OCTN1 bisher noch nicht aufgedeckt worden ist. Mit der Kenntnis des richtigen Substrates könnten physiologische und pathophysiologische Zusammenhänge klarer werden. Da für OCTN1h mit der rheumatoiden Arthritis bereits ein Zusammenhang zwischen dem Transporter und einer weit verbreiteten Erkrankung besteht und ein ungefähres Bild seiner Lokalisation im Organismus existiert, war es das Ziel dieser Arbeit, das führende Substrat dieses Transporters zu ermitteln. Dafür wurde ein neuer methodischer Ansatz per LC-MS Analytik zur Substratidentifizierung entwickelt. Diese Technik wurde dann an OCTN1h zum ersten Mal erfolgreich zum Einsatz gebracht. Es gelang, sein Substratspektrum aufzudecken und sein spezifisches physiologisches Substrat zu identifizieren.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Allgemeine Chemikalien wie z. B. Bestandteile der Puffer und Lösungen waren von entsprechender analytischer Qualität und wurden von folgenden Firmen bezogen: Fluka (Neu-Ulm, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland) oder Sigma Aldrich (München, Deutschland).

Folgende Restriktionsenzyme (MBI Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland) wurden eingesetzt: EcoRV, HindIII, KpnI, PstI und XhoI. Die T-4-DNA-Ligase und die alkalische Phosphatase (CIAP = calf intestine alkaline phosphatase) stammten ebenfalls von der Fa. MBI Fermentas.

Folgende Substanzen wurden in Aufnahmeexperimenten als Substrate oder Hemmstoffe eingesetzt: Stachydrinhydrochlorid und Betonicin (Extrasynthese, Genay, Frankreich), γ -Butyrylbetain (Sigma Aldrich, München, Deutschland), L-(+)-Ergothionein (Bachem, Bubendorf, Schweiz.), Thiamazol (Sigma Aldrich), N-Methyl-L-Prolin Monohydrat (Sigma Aldrich), 1-Methyl-4-Phenylpyridinium (Sigma Aldrich), Lidocain (Pfrimmer KABI GmbH, Deutschland), Clemastinfumarat (Sigma Aldrich), L-Carnitin (Fluka, Neu-Ulm, Deutschland), Thioperamidmaleat (Sigma Aldrich), Disprocynium₂₄ (1,1'-Diisopropyl-2,4-cyaniniodid bzw. D24) wurde wie beschrieben synthetisiert (Russ et al., 1993a).

Folgende radioaktiv markierte Substanzen wurden in Aufnahmeexperimenten als Substrate eingesetzt: 3-O-Acetyl-L-Carnitin (H-3, 2.96 kBq/pmol), L-Carnitin (H-3, 2.96 kBq/pmol), Glycinbetain (C-14, 1.85 kBq/pmol), L-Histidin (H-3, 1.48 kBq/pmol), 4-Hydroxy-L-Prolin (H-3, 0.555 kBq/pmol), L-Prolin (H-3, 3.33 kBq/pmol) Tetraethylammonium (C-14, 2.04 kBq/pmol) alle von ARC, St. Louis, MO, USA.

2.1.2 Puffer und Lösungen

Wasser wurde aus einer Wasseraufbereitungsanlage (SG Clear, SG Wasseraufarbeitungs- und Regenerationsstation GmbH, Barsbüttel, Deutschland) verwendet.

Auftragslösung für DNA-Gele

10%	Glycerol
0.01%	Bromphenolblau
0.05%	Orange G
	In TAE

KRH (modifizierter Krebs-Ringer-Henseleit-Puffer)

5.6 mmol/l	Glukose
125 mmol/l	NaCl
4.8 mmol/l	KCl
1.2 mmol/l	KH ₂ PO ₄
1.2 mmol/l	CaCl ₂
1.2 mmol/l	MgSO ₄
25 mmol/l	HEPES
	pH 7.4 mit NaOH

Poly-Ornithin-Lösung

0.1 g/l	Poly-L-Ornithin
150 mmol/l	Borsäure
	pH 8.4 mit NaOH

Lyselösung Flüssigszintillationszählung

5 mmol/l Tris
0.1% Triton X-100 (v/v)
pH 7.4 mit HCl

Lyselösung LC-MS/MS Analytik

4 mmol/l HClO₄

1 x TAE

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

1 x TE

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

2.1.3 Nährmedien

LB

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

SOB-Mg

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

SOC

10 mmol/l	MgCl ₂
10 mmol/l	MgSO ₄
20 mmol/l	Glukose
	In SOB-Mg

2.1.4 Kits

Folgende Kits wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet: QIAGEN Plasmid Maxi Kit, QIAGEN Plasmid Mini Kit, QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) und BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA).

2.1.5 Escherichia coli Bakterienstamm

Hierbei handelte es sich um den Genotyp des Escherichia coli (E. coli) Stamms DH10B.

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Allgemeines für den Umgang mit E. coli

Alle Geräte und Lösungen, die im Umgang mit E. coli eingesetzt worden sind, wurden autoklaviert, sterilfiltriert (0.22 µm Porengröße) oder mit 70% Ethanol desinfiziert. Die Arbeiten wurden in einer Reinraumwerkbank (Laminar Flow, Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland) durchgeführt. Nach ihrer Herstellung wurden Nährmedien sofort autoklaviert und bis zum weiteren Gebrauch bei 4° C gelagert. SOC-Medium, das für die Anzucht von E. coli nach einer Elektroporation eingesetzt wird, wurde aliquotiert (1 ml) und bei -20° C gelagert. Um Agarplatten herzustellen, wurde LB-Medium mit 15 g/l Agar versetzt, autoklaviert und anschließend bei 4° C gelagert. Vor dem Gießen der Platten wurde der Agar erneut aufgeköcht und nach Abkühlen auf ca. 50° C mit entsprechenden Mengen an Antibiotikum versetzt und in sterile Petrischalen (Durchmesser 10 mm) gegossen, wo er aushärtete. Als Antibiotikum wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml den Nährmedien zugesetzt. Ampicillin-Stammlösungen zu 100 mg/ml wurden in Aliquots bei -20° C gelagert.

2.2.2 Kultur und Lagerung von E. coli

Für Kulturen auf Agarplatten wurden 100 µl einer Bakteriensuspension auf eine Agarplatte pipettiert und mit einem sterilen Drigalsky-Spatel gleichmäßig verteilt bis der Nährboden alle Flüssigkeit aufgenommen hatte. Die Inkubation der Agarplatte erfolgte bei 37° C über Nacht. Mit Parafilm abgedichtet konnten die Agarplatten bis zu acht Wochen bei 4° C aufbewahrt werden. Für die Anzucht größerer Mengen von Bakterien wurde eine Flüssigkultur in 20 - 400 ml LB-Medium mit der entsprechenden Menge Antibiotikum angelegt. Mit einer ausgeglühten Platinöse wurde von einer Plattenkultur eine einzelne Kolonie übertragen und die Flüssigkultur über Nacht bei 37° C, 200-300 UpM (Umdrehungen pro Minute) inkubiert (Inkubationsschüttler Minitron HT, Infors AG, Bottmingen, Deutschland). Für eine dauerhafte Aufbewahrung wurde 1 ml LB-Medium mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und bis

zur deutlichen Trübung inkubiert (37° C, 300 UpM). Die Kultur wurde anschließend mit Glycerol bis zu einer Endkonzentration von 10% versetzt und in Kryoröhrchen bei -80° C gelagert.

2.2.3 Elektrotransformation von E. coli

Zellmembranen von Bakterien sind nicht permeabel für Nukleinsäuren. Um DNA-Moleküle in Bakterien zu replizieren oder auch zur Expression zu bringen, muss ihrem Eintritt in die Zellen assistiert werden. Bei der Elektroporation werden die Bakterienzellen kurzzeitig einer hohen Spannung ausgesetzt. Dabei destabilisiert ihre Zellmembran und es entstehen vorübergehend Löcher bzw. Poren durch welche ein ungehinderter Stoffaustausch zwischen Medium und Zytosol möglich ist. Auf diese Weise können DNA-Moleküle in die Zellen gelangen (Neumann et al., 1982; Zimmermann, 1982). Zur Herstellung elektrokompetenter E. coli müssen die Bakterienzellen speziell behandelt werden. Dafür werden 5 ml SOB-Mg-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37° C, 200 UpM hochgezogen. Am folgenden Tag werden 4 ml dieser Vorkultur in 200 ml SOB-Mg-Medium suspendiert und erneut 2 – 2.5 Stunden bei 37° C, 200 UpM inkubiert. Die Kultur wird dann für 10 min auf Eis gekühlt und anschließend bei 3000 g (Ausschwingrotor, Sorvall RC5B Plus, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland) und 4° C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wird daraufhin in 200 ml eiskalter 10%iger Glycerol-Lösung resuspendiert. Daran schließt sich erneut die beschriebene Zentrifugation an und der Waschschrift wird insgesamt wiederholt. Zum Schluss wird das Pellet in 500 µl 10% Glycerol aufgenommen, die Zellsuspension zu je 50 µl aliquotiert und bei -80° C gelagert. Für die Elektroporation wurden die Aliquots auf Eis aufgetaut. Die DNA-Proben sollten für die Elektroporation eine möglichst geringe Ionenstärke haben. Daher wurden sie einer speziellen Aufarbeitung unterzogen. Die Ligationsansätze wurden zunächst durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe 2.3.1) aufgereinigt und die DNA mit Ethanol gefällt (siehe 2.3.2). Daraufhin wurde das DNA-Pellet zweimal mit 150 µl 70% Ethanol gewaschen und 5 min zentrifugiert (16000 g, Centrifuge 5415 D, Eppendorf). Die DNA wurde getrocknet und in 0.5 x TE aufgenommen. Für die Elektroporation wurde 1 µl DNA-Lösung (5-20 ng) mit 25 µl Bakteriensuspension gemischt und eine Minute auf Eis inkubiert. Gleichzeitig wurde eine Küvette (1 mm Elektrodenabstand, BioRad, München, Deutschland) auf Eis

vorgekühlt in die die Suspension aus Bakterien und DNA luftblasenfrei überführt wurde. Zur Elektroporation selbst wurde ein Gene Pulser und Pulse Controller (BioRad, München, Deutschland) bei 25 μ F [Kapazität], 200 Ω [Widerstand], 1.6 kV [Spannung] (Zeitkonstante < 5 ms) eingesetzt. Die eiskalte Elektroporationsküvette wurde außen abgetrocknet und mit dem Spannungsgenerator verbunden. Unmittelbar nach dem Stromstoss wurde 1 ml SOC-Medium in die Küvette gegeben und vorsichtig gemischt. Die Zellsuspension wurde 1 h in einem Glasröhrchen bei 37° C, 200 U μ M inkubiert. Währenddessen wird die auf dem Plasmid kodierte β -Lactamase exprimiert, die eine Ampicillinresistenz vermittelt. Anschließend wurden 100 μ l der Kultur, sowie eine 1:100 Verdünnung mit LB-Medium auf Agarplatten mit Antibiotikum-Zusatz ausplattiert (siehe 2.2.2).

2.3 Molekularbiologische Methoden

Ausführliche Informationen und zusätzliche Verweise auf die Originalliteratur der nachfolgend beschriebenen molekularbiologischen Methoden sind enthalten in der aktuellen Sammlung der „Current Protocols“, in „Molecular Cloning“ (Sambrook and Russell, 2001) und in „Methods of Enzymology“.

2.3.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die organischen Lösungsmittel Phenol und Chloroform können eingesetzt werden, um Proteine zu denaturieren. Während Nukleinsäuren in der wässrigen Phase gelöst bleiben, sammeln sich die denaturierten Proteine meist zwischen organischer und wässriger Phase und können so abgetrennt werden. Phenol wurde vor Gebrauch mit Tris/HCl pH 8.0 (1 mol/l) und TE equilibriert, danach mit 0.1% 8-Hydroxychinolin als Antioxidationsmittel versetzt und unter TE bei 4° C gelagert. Zur Extraktion wurde die Nukleinsäurelösung mit einem gleichen Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, 20 sec. durchmischt und anschließend 1 min abzentrifugiert (16000 g, Centrifuge 5415 D, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Die untere organische Phase wurde mit 0.5 x Volumen an TE wie beschrieben nachextrahiert.

Die wässrigen Phasen wurden vereinigt und zur Extraktion von Phenolresten mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt, gut durchmischt und abzentrifugiert. Die wässrige Phase wurde erneut abgenommen und die DNA durch Fällung mit Alkohol konzentriert (siehe 2.3.2).

2.3.2 Alkoholpräzipitation von DNA

Zur Reinigung und Konzentrierung werden Nukleinsäuren mit Alkohol gefällt. Hierfür wurden die DNA-Lösungen mit 0.1 x Volumen Natriumacetat pH 5.2 (3 mol/l) und 2.5 x Volumen 96% Ethanol bzw. 1 x Volumen Isopropanol versetzt, gemischt und für 10 – 30 min zentrifugiert (16000 g). Nach der Zentrifugation wurde das DNA-Pellet mit 150 µl 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, die DNA bei 60° C getrocknet und in TE oder H₂O aufgenommen.

2.3.3 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Phosphatasen sind Hydrolasen, die organische Phosphorsäureester unter Freisetzung von Phosphat und einem Alkoholrest spalten. Um einen intramolekularen Ringschluss der Vektor-DNA während einer Ligation zu verhindern, wird die 5'-terminale Phosphatgruppe durch das Enzym alkalische Phosphatase aus Kälberdarm abgespalten. Hierfür wurden pro µg DNA 1 U alkalische Phosphatase eingesetzt, sie wurden in einem Phosphatase-Puffer (50 mmol/l Tris, 0.1 mmol/l EDTA, pH 8.5, Endvolumen 50 µl) für 1 h bei 37° C inkubiert. Die alkalische Phosphatase wurde anschließend durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion wieder entfernt (siehe 2.3.1).

2.3.4 Ligation von DNA

Während einer Ligation werden die Enden von doppelsträngigen DNA-Fragmenten durch die T4-DNA-Ligase miteinander verknüpft. Hierbei entsteht eine Bindung zwischen einem 5'-Phosphat- und einem 3'-Hydroxylrest der DNA-Moleküle. Das Endvolumen des Reaktionsansatzes wurde bei einem gerichteten Einbau mit

kohäsiven Enden so gewählt, dass die Konzentration aller Enden 2 nmol/l betrug. Das Insert wurde im Verhältnis zum Vektor in dreifachem Überschuss eingesetzt. Es wurden 2 U T-4-DNA-Ligase eingesetzt und die Ligation erfolgte über Nacht bei 16° C. Die Ligase kann anschließend durch Phenol-Chloroform-Extraktion wieder entfernt werden (siehe 2.3.1).

2.3.5 Restriktion von DNA

Restriktionsenzyme vom Typ 2 sind Endoribonukleasen, die sequenzspezifisch an bestimmten Stellen die doppelsträngige DNA schneiden. Sie erkennen häufig palindrome Nukleotidsequenzen (4 – 8 bp) und hydrolysieren in Gegenwart von Mg^{2+} eine Phosphodiesterbindung, so dass ein 5'-Phosphat freigelegt wird. Die Spaltaktivität eines Restriktionsenzym gibt an welche DNA-Stoffmenge (bezogen auf eine Referenz z. B. Adenovirus-DNA) von 1 U Enzym pro Stunde gespalten werden kann. Aus der Stoffmenge der zu verdauenden DNA und der Anzahl der Schnittstellen kann dann die Enzymmenge berechnet werden, um die eingesetzte DNA in einer Stunde vollständig zu verdauen. Restriktionsenzyme werden in einem Puffer mit 50% Glycerolzusatz geliefert, um die Kristallbildung während der Lagerung bei -20° C zu verhindern. In den Restriktionsansätzen wurden die Volumina so gewählt, dass der Glycerolgehalt letztendlich unter 5% lag. Die Restriktionen wurden dann für eine Stunde im Wasserbad bei einer vom Hersteller angegebenen Temperatur und unter Anwendung des vom Hersteller angegebenen Puffers durchgeführt. Die Ansätze wurden zur Aufreinigung einer Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe 2.3.1) unterzogen, die DNA anschließend mit Alkohol gefällt (siehe 2.3.2) und in einem kleinen Volumen TE oder H₂O aufgenommen. Die Restriktion wurde stets durch Agarosegelelektrophorese (siehe 2.3.7) überprüft.

2.3.6 Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli

Die Präparation von Plasmiden erfolgte mit Hilfe von Reagenziensätzen der Firma Qiagen. Das „Qiagen Plasmid Mini Kit“ wurde zu Aufarbeitung von 20 ml Flüssigkulturen eingesetzt und für 200 - 400 ml Flüssigkulturen wurde das „Qiagen Plasmid Maxi Kit“ verwendet. Nach diesen Protokollen beruht die Isolation der

Plasmid-DNA auf der Grundlage, dass hochmolekulare Substanzen wie chromosomale DNA und Proteine im Gegensatz zu zirkulär geschlossener Plasmid-DNA in einem definierten alkalischen pH-Bereich selektiv denaturieren. Anschließend erfolgt eine Neutralisierung unter hoher Salzkonzentration bei der die denaturierten Moleküle sowie restliche Zellbestandteile präzipitieren, wohingegen die Plasmid-DNA gelöst bleibt und abgetrennt werden kann (Birnboim and Doly, 1979). Das Protokoll sieht daraufhin vor, die Plasmid-DNA über eine Silikat-Matrix aufzureinigen. Die Konzentration der resultierenden DNA-Lösung wurde mittels eines so genannten Spot-Tests bestimmt. Hierzu wurde 1 μ l der DNA-Lösung auf eine ethidiumbromidhaltige (5 μ g/ml) Agaroseplatte (1% w/v) aufgetragen und diese für 10 min bei 37° C inkubiert. Der Farbstoff Ethidiumbromid interkaliert zwischen die DNA-Basen und fluoresziert bei Anregung durch UV-Licht orangefarben. Die Proportionalität zwischen der Intensität der Fluoreszenz und der DNA-Menge kann auch semiquantitativ ausgewertet werden. Hierfür werden Kontrollen unterschiedlicher λ -DNA Konzentrationen (5 – 200 ng/ μ l) ebenfalls auf die Agaroseplatte aufgetragen.

2.3.7 Agarosegelelektrophorese nativer DNA

Für die Auftrennung, Identifizierung und Reinigung von DNA-Fragmenten wird standardmäßig die Agarosegelelektrophorese eingesetzt. Sie basiert auf der Tatsache, dass Nukleinsäure bei pH-Werten > 7 negativ geladen sind und auf Grund dieser Ladung und ihrer Größe in einem elektrischen Feld getrennt werden können. Die Trennschärfe der Elektrophorese hängt dabei von der Porengröße des entsprechenden Gels ab. Das Molekulargewicht und die Konformation des DNA-Fragments bedingen die im Gel zurückgelegte Wegstrecke. Für lineare doppelsträngige DNA gilt hierbei, dass die Wanderungsgeschwindigkeit umgekehrt proportional zum Logarithmus der Anzahl der Basenpaare ist. Die Länge einer unbekannt Probe kann man daher durch das parallele Auftragen eines DNA-Längenstandards mit Fragmenten bekannter Größe abschätzen. Andere DNA-Konformationen wie z. B. überspiralisierte Plasmid-DNA zeigen aber ein gänzlich anderes Laufverhalten während der Agarosegelelektrophorese, deshalb sind Proben unterschiedlicher Konformation nicht miteinander vergleichbar. In dieser Arbeit wurden Agarosekonzentrationen von 0.8% (w/v) für Fragmente zwischen 1.0 und 10

kb und 1 kb DNA Leiter als Längenstandard eingesetzt. Die Gelelektrophorese selbst wurde mit einer Flachbettapparatur (BioRad, München, Deutschland) mit TAE als Laufpuffer durchgeführt. Die entsprechende Menge Agarose wurde in TAE aufgeköcht und nach dem Abkühlen auf ca. 55° C in eine mit einem Probenkamm bestückte Gelform gegossen. Nach dem Erstarren der Agarose wurde das Gel in der Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit Auftragslösung gemischt und anschließend in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 5 V/cm Elektrodenabstand. Zur Detektion der Banden wurde das Gel anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt, dafür wurde es in einem Ethidiumbromidbad (1 µg/ml Ethidiumbromid in H₂O) für 10 min bei 60° C inkubiert. Die aufgetrennten Fragmente wurden durch die Fluoreszenz des Farbstoffs unter UV-Bestrahlung sichtbar. Neben analytischen Gelen, bei denen es um die Identifizierung bestimmter DNA-Fragmente geht, kann die Agarosegelelektrophorese auch für präparative Arbeiten eingesetzt werden. Hierbei wird die entsprechende DNA aus dem Gel wieder extrahiert und weiter verwendet. Um diese DNA vor einer Degeneration durch das UV-Licht zu schützen wird dem TAE-Puffer Cytidin in einer Endkonzentration vom 5 mmol/l zugesetzt (Gründemann and Schömig, 1996).

2.3.8 Isolierung von DNA nach präparativer Agarosegelelektrophorese

Um DNA-Fragmente aus präparativen Agarosegelen zu extrahieren, wurde in dieser Arbeit das „Qiaquick Gel Extraction Kit“ (Quiagen) verwendet. In einem ersten Schritt wird hierbei die Agarose durch das Einwirken eines chaotropen Salzes solubilisiert. Die DNA wird daraufhin durch Adsorption an eine Silikatgelmatrix isoliert (Vogelstein and Gillespie, 1979). Die gewünschte DNA-Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und gewogen. Dem Protokoll folgend wurden die Agarosegelstücke (100 - 400 mg) anschließend mit dem dreifachen Volumen QG-Puffer versetzt. Er bewirkt eine Auflösung des Agarosegels bei 50° C nach ca. 10 min. Anschließend wurde die Lösung auf eine Säule mit einer Silikatmembran gegeben auf der die DNA zurückgehalten wird. Nach Zentrifugation wurde mit PE-Puffer gewaschen, um Verunreinigungen abzutrennen. Zur Elution der DNA wurden 50 µl TE auf die Säule gegeben, es wurde 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 1 min zentrifugiert. Für die nachfolgende Verwendung wurde die extrahierte DNA durch

Alkoholfällung (siehe 2.3.2) konzentriert. Eine Quantifizierung der isolierten DNA erfolgte mittels Spot-Test (siehe 2.3.6).

2.4 Expressionssysteme

2.4.1 Eukaryonten-Zelllinie und Zellkultur

HEK-293-Zellen (human embryonic kidney, American Tissue Type Culture Collection 1988, ATCC CRL-1573) sind menschliche embryonale Nierenzellen, die mit dem humanen Adenovirus Typ 5 transformiert wurden. Adhäsiv wachsend wurden sie in entsprechenden Plastikkulturflaschen (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) bei 37° C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre (5% CO₂) kultiviert. Als Wachstumsmedium wurde Dulbeco's Modified Eagle Medium (DMEM, Life Technologies, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) eingesetzt. Es wurde mit 10% hitzeinaktiviertem (30 min, 56° C) fötalem Kälberserum (FCS, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) supplementiert, Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage erneuert. Wöchentlich wurde die Kultur geteilt. Dazu wurden sie Zellen durch Klopfen gegen die Gefäßwand abgelöst und nach Resuspendieren in frischem Wachstumsmedium auf neue Kulturflaschen verteilt. Die Arbeiten mit den Zellkulturen erfolgten unter sterilen Bedingungen in einer Reinraumwerkbank mit vertikaler Luftströmung (Hera Safe, Heraeus, Kendro Laboratoy Products, Hanau, Deutschland). Sämtliche Gegenstände und Lösungen im Gebrauch waren durch Autoklavierung bzw. Sterilfiltration (Porengröße 0.22 µm) sterilisiert oder mit 70% Isopropanol desinfiziert worden.

2.4.2 Transfektionsreagenz

Prinzipiell versteht man unter einer Transfektion das Einbringen fremder DNA in eukaryontische Zellen. Die Zellmembran ist für Nukleinsäuren allerdings nicht permeabel. Die Transfektionen innerhalb dieser Arbeit wurden per Lipofektion durchgeführt (Sambrook and Russell, 2001). Hierbei wird die zu transfizierende DNA

von Lipiden umschlossen und es werden Liposomen gebildet, die entweder direkt mit der Plasmamembran interagieren und hindurch gelangen oder endozytotisch von der Zelle aufgenommen werden. Ein kleiner Anteil dieser Liposomen ist dann in der Lage, seine DNA-Fracht bis in den Nukleus zu bringen. Dort kann sie ins Genom integriert werden (stabile Transfektion) oder für einen gewissen Zeitraum episomal transkribiert und exprimiert werden (transiente Transfektion). Als Transfektionsreagenz wurde Tfx™-50 eingesetzt (Tfx™-50-Reagent, Promega Corporation, Madison, USA). Hierbei handelt es sich um eine Mischung zweier synthetischer kationischer Lipidmoleküle. Kationische Lipide reagieren spontan mit DNA-Molekülen und formen unilamelare Vesikel, wobei die positiv geladene Kopfgruppe des Lipids mit den negativen Phosphatgruppen der DNA interagiert, um den DNA-Lipid-Komplex zu bilden (Sambrook and Russell, 2001).

2.4.3 Stabile Transfektion

Bei einer stabilen Transfektion integriert die eingeschleuste DNA in das Genom der Zelle, diese permanente Veränderung des Erbguts führt zu einer kontinuierlichen Expression des neuen Gens. Man erzeugt eine neue klonale Zelllinie. Als Transfektionsreagenz wurde Tfx-50 (Promega) eingesetzt und die Durchführung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll. Hierfür werden die Zellen (HEK-293-Zellen oder FIT host cell line) auf 75 cm² Plastikkulturflaschen (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) ausgesät. Für die Transfektion sollten sie 20 – 30% konfluent sein. In 4 ml serumfreiem Wachstumsmedium werden 10 µg der entsprechenden Plasmid-DNA in TE mit 40 µl Transfektionsreagenz gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, damit sich die Vesikel bilden können. Das DNA-Liposomen-Gemisch wird auf die Zellen gegeben und diese müssen anschließend für vier Stunden im Brutschrank (5% CO₂, 37° C) inkubieren. Währenddessen sollen die Liposomen mit der DNA die Zellmembran überwinden. Nach Abschluss der Inkubation wird der Überstand durch 15 ml Wachstumsmedium mit 10% FCS ersetzt. Am zweiten bis dritten Tag nach der Transfektion stellt man die Zellen auf Selektionsmedium um, da man davon ausgehen kann, dass sich die Zellen ausreichend von der Transfektion erholt haben. Neben dem gewünschten Gen ist in dem transfizierten DNA-Vektor auch ein Resistenzgen z. B. für ein Antibiotikum enthalten. Durch die Zugabe des Selektionsreagenz zum Wachstumsmedium

erreicht man, dass sich nur solche Zellen weiter vermehren, die das Plasmid integriert haben und die Gene funktionell exprimieren, während die anderen absterben. In dieser Zeit wird das Wachstumsmedium durch die Freisetzung des Zellinhaltes der toten Zellen sehr schnell verbraucht, so dass ein täglicher Mediumswechsel nötig ist, um die transfizierten Zellen nicht zu schädigen. Bei entsprechender Konfluenz erfolgt die Passage der Zellen in 175 cm² Plastikkulturflaschen. Durch das Resuspendieren der Zellen in neuem Selektionsmedium wird jede einzelne Zelle dem Selektionsdruck ausgesetzt. So kommt es auch zum Absterben derjenigen Zellen, die sich der Selektion durch Wachstum innerhalb eines Zellverbandes entziehen konnten.

2.4.4 Transiente Transfektion

Bei einer transienten Transfektion ist es nicht das Ziel, die eingesetzte DNA in das Genom der Zellen zu integrieren, sondern sie wird nur für einen kurzen Zeitraum im Nukleus erhalten und transkribiert, der dann für Versuche genutzt werden muss. Der Vorteil der transienten Transfektion liegt in der schnellen Generierung (1 – 4 Tage) von Zellen, die das gewünschte Gen, wenn auch zeitlich begrenzt, exprimieren. Eine transiente Transfektion wurde innerhalb dieses Projektes nur einmalig eingesetzt, um das Substratspektrum von OCTN1 speziesübergreifend auch am entsprechenden Transporter der Ratte zu bestätigen. Per Lipofektion wurde OCTN1r cDNA (r = rat) transient in die FIT host cell line (FIT-NT) transfiziert. Als Transfektionsreagenz wurde Tfx™-50 (siehe 2.4.2) eingesetzt. Die OCTN1r cDNA entspricht dem Genbankeintrag AF169831 und wurde freundlicher Weise von Dr. V. Ganapathy zur Verfügung gestellt (Wu et al., 2000). Die cDNA wurde in den Expressionsvektor pcDNA5/FRT/TO (siehe 2.4.5) (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) eingebaut. Das 5'-Ende zwischen cDNA und Vektor lautet **CTTAAGCTT**gccaccATGAGGGAC, wobei der Polylinkerabschnitt fett dargestellt ist, die Kozaksequenz in Kleinbuchstaben und das Startcodon unterstrichen. Das 3'-Ende zwischen Vektor und OCTN1r cDNA ist in diesem Fall GGCAAACTGA₂₅**GCGGCCGCT**, hierbei ist der Polylinkerabschnitt fett dargestellt und die cDNA ist unterstrichen. Am Tag vor der transienten Transfektion wurden HEK-293-Zellen auf mit Poly-Ornithin beschichteten Polystyrolschälchen (60 mm Durchmesser, Nunclon™, Nunc, Wiesbaden, Deutschland) ausgesät (2 Mio. Zellen pro Schälchen). Ornithin ist eine nicht-proteinogene Aminosäure. Zur

Beschichtung, die zu einer stärkeren Adhäsion der Zellen führt, wurden die Schälchen 20 min bei Raumtemperatur mit steriler Poly-Ornithin-Lösung (siehe 2.1.2) inkubiert. Anschließend wurde die Lösung wieder entfernt und die Schälchen mit serumfreiem Wachstumsmedium gewaschen, bevor die Zellsuspension aufgegeben wurde. Pro Schälchen werden 2 µg Plasmid-DNA und 10 µl Transfektionsreagenz (Tfx-50) eingesetzt. Die entsprechenden Mengen wurden in serumfreiem Wachstumsmedium (V = 0.5 ml pro Schälchen) gemischt und für 15 min inkubiert. Daraufhin wurden 0.5 ml des DNA-Liposomen-Gemisches zuzüglich 1.5 ml Wachstumsmedium auf die Zellen gegeben und sie wurden für vier Stunden im Brutschrank (5% CO₂, 37° C) inkubiert (vgl. 2.4.3). Der Überstand wurde dann durch 4 ml Wachstumsmedium mit 10 % FCS ersetzt. Am zweiten Tag nach der transienten Transfektion war die Expression eine solche, dass die Zellen für Experimente eingesetzt werden konnten.

2.4.5 Flp-In™ T-Rex™ System

Zur funktionellen Expression von OCTN1h und OCTN2r in HEK-293-Zellen wurde das so genannte Flp-In™ T-Rex™ System (Abkürzung: FIT, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) eingesetzt. Es bietet die Möglichkeit zur stabilen regulierbaren Expression der Transporter. Die Expression kann über ein Tet-Repressor bzw. – Operator Zusammenspiel mit einem Antibiotikum (Tetracyclin) gesteuert werden. Tetracyclin selbst ist ein aus verschiedenen Streptomycesarten isoliertes Breitspektrumantibiotikum, innerhalb dieser Arbeit wurde allerdings zur Induktion der Expression sein partialsynthetisches Derivat Doxycyclin eingesetzt. Zusammen mit dem FIT-System wurde die so genannte FIT host cell line (FIT-NT: NT = nicht transfiziert) erworben. Hierbei handelt es sich um HEK-293-Zellen, die nach zwei stabilen Transfektionen und anschließenden Selektionen über entsprechende Resistenzgene das Gen für den Tet-Repressor sowie eine einzelne FRT-Bindungsstelle (Flp recombination target) in ihr Genom integriert haben (Abb. 4). Über diese FRT-Bindungsstelle schafft das System die Möglichkeit das gewünschte Gen enzymatisch an einer vorbestimmten Stelle im Genom der Zellen zu integrieren. Hierfür wird ein Rekombinationssystem, das aus *Saccharomyces cerevisiae* stammt, eingesetzt. Es basiert auf einer Rekombinase, die durch Erkennung der spezifischen FRT-Bindungsstellen das Gen an der entsprechenden Stelle platziert. Die

Transportergene wurden jeweils in einen Expressionsvektor pcDNA5/FRT/TO (Invitrogen) eingebaut (Abb. 4). Die cDNA Sequenzen von OCTN1h und OCTN2r entsprechen den Genbankeinträgen Y09881 und AJ001933 (Schömig et al., 1998). Das 5'-Ende zwischen cDNA und Vektor für OCTN1h lautet **TCTGCAGATT**CGAgccaccATGCGGGAC, der Polylinkerabschnitt ist fett dargestellt, die Kozaksequenz in Kleinbuchstaben und das Startcodon ist unterstrichen. Das entsprechende 3'-Ende lautet ATTCTAGATCCAGCAC, wobei die cDNA unterstrichen und der Polylinkerabschnitt fett dargestellt sind. Für OCTN2r lautet das 5'-Ende zwischen cDNA und Vektor **CTTAAGCTT**TGGGAGGCTG, hierbei ist der Polylinkerabschnitt fett dargestellt und die cDNA unterstrichen. Das 3'-Ende lautet in diesem Fall TTTTTAAATA₂₂**GCGGCCGCT**, die cDNA ist unterstrichen und der Polylinkerabschnitt fett dargestellt. Die fertigen Expressionsplasmide beinhalten das entsprechende Transportergen unter der Kontrolle eines mit Tetracyclin regulierbaren CMV-Promotors (Cytomegalie Virus). Daran schließt sich wieder die Erkennungssequenz für die Rekombinase an (FRT). Das pOG44-Plasmid exprimiert konstitutiv die Flp-Rekombinase unter der Kontrolle eines CMV-Promotors (Abb. 4). Beide Plasmide müssen zeitgleich in die FIT host cell line transfiziert werden. Durch die Expression der Flp-Rekombinase aus pOG44 wird eine homologe Rekombination zwischen den FRT-Bindungsstellen im Zellgenom und im Expressionsvektor initiiert. Nur durch den Einbau des Konstrukts an der vorgesehenen Stelle im Genom wird eine Hygromycinresistenz aktiv über die diese Zellen selektiert werden können. Die Generierung der Expressionsplasmide wurde anhand der vorgeschriebenen Protokolle des Flp-In™ T-Rex™ Systems durchgeführt (Flp-In™ T-Rex™ Core Kit Version C for generating stable, inducible mammalian expression cell lines by Flp recombinase mediated integration, Catalog No. K6500-01). Die stabile Transfektion in die FIT host cell line erfolgte mittels Lipofektion (siehe 2.4.2 und 2.4.3). Auf diese Weise wurden zwei neue Zelllinien geschaffen, die OCTN1h bzw. OCTN2r stabil und konditionell exprimieren.

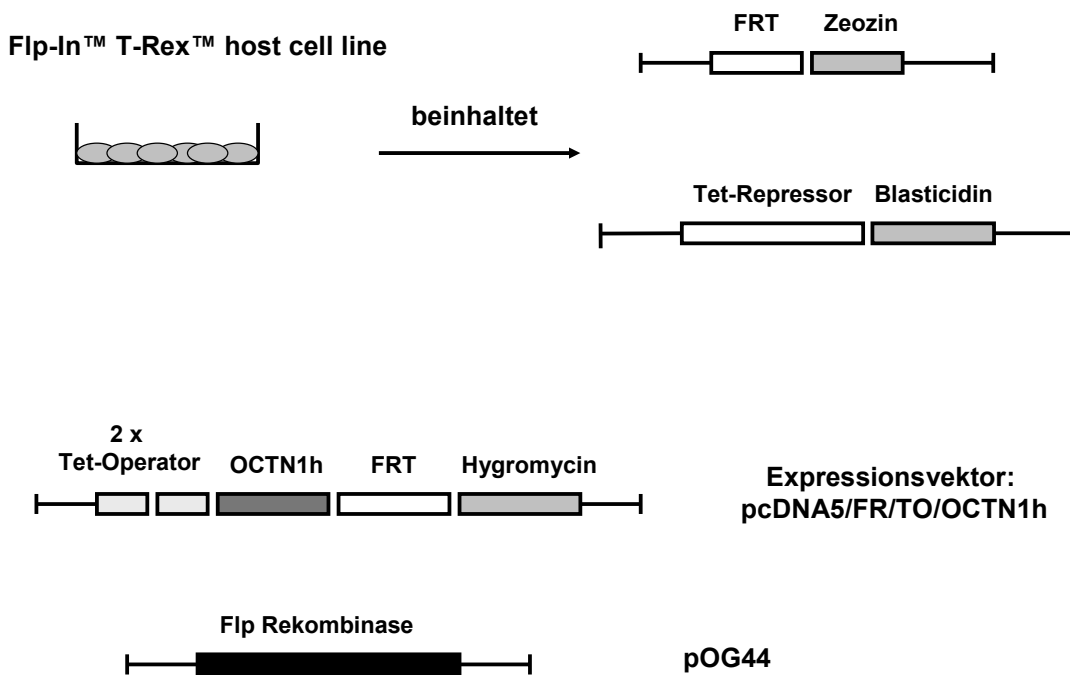


Abb. 4

Schematische Darstellung zum Flp-In™ T-Rex™ Expressionssystem.

Die Steuerung der Expression im Flp-In™ T-Rex™ System basiert auf Regulationselementen der Tetracyclin Resistenz aus *Escherichia coli*. In der FIT host cell line (FIT-NT) wird der so genannte Tet-Repressor stabil exprimiert (Abb. 5). Er formt Homodimere, die an die Tet-Operatoren, die vor dem Transportergen liegen, binden und somit eine Transkription verhindern. Doxycyclin, das dem Wachstumsmedium zugesetzt wird, bildet hochaffine Komplexe mit den Tet-Repressoren und durch eine Konformationsänderung können diese dann nicht mehr an die Tet-Operatoren binden. Die Tet-Operatoren werden frei und die Expression des Transportergens wird ermöglicht (Abb. 5). Um die Transporterexpression für entsprechende Versuche anzuschalten, wurde das Wachstumsmedium der Zellen mindestens 20 Stunden zuvor mit 1 µg/ml Doxycyclin (MP Biomedicals, Eschwege, Deutschland) supplementiert.

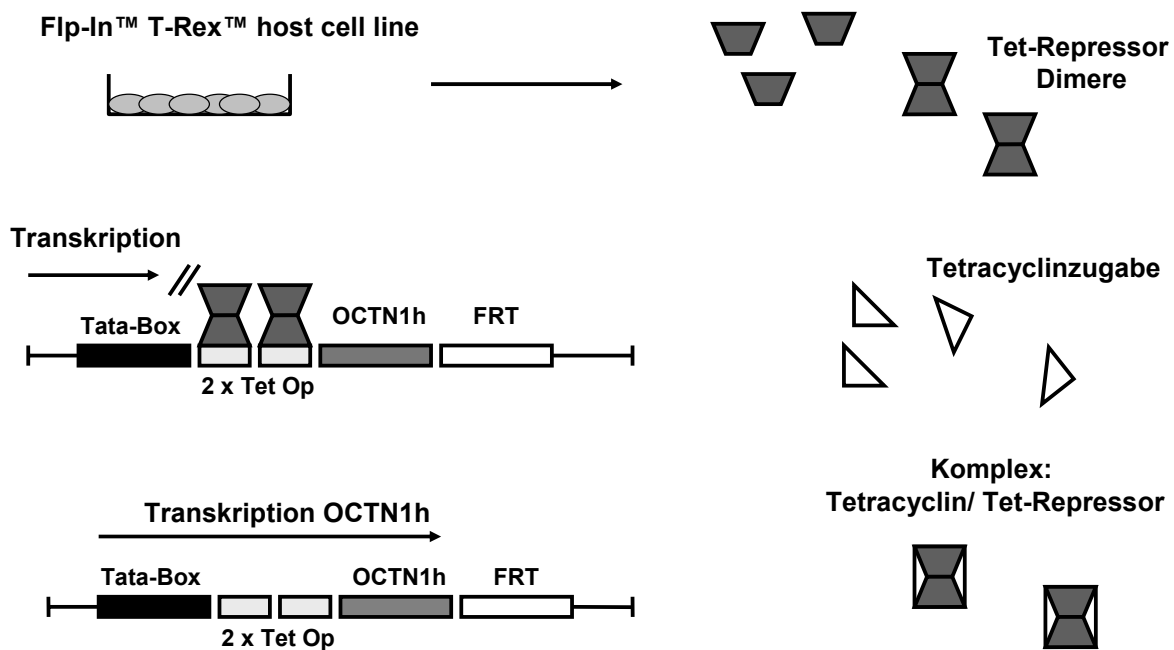


Abb. 5
Steuerung der Expression im Flp-In™ T-Rex™ System.

2.4.6 Epstein-Barr Expressionssystem

Das Epstein-Barr Expressionssystem basiert auf Bestandteilen eukaryontischer Viren, die es ermöglichen, heterologe DNA in Säugerzelllinien stabil und induzierbar zur Expression zu bringen. Obwohl es sich auch hierbei um eine stabile Transfektion handelt, verbleibt die gewünschte DNA extrachromosomal in einem viralen Plasmidsystem und heftet sich an die Chromosomen im Zellkern an. Schon seit geraumer Zeit ist bekannt, dass Vektoren mit viralen Bestandteilen eingesetzt werden können, um fremde DNA in Säugerzelllinien zu exprimieren (Goff and Berg, 1976; Sarver et al., 1981). Das Epstein-Barr Virus (Epstein et al., 1964) zeichnet sich durch einen Latenzstatus aus bei dem die virale DNA in den infizierten Zellen (z. B. B-Lymphozyten) extrachromosomal in einem doppelsträngigen zirkulären DNA-Molekül in 10-200 Kopien pro Zelle vorliegt (Dambaugh et al., 1984). Die meisten viralen Gene werden während dieser Zeit nicht exprimiert. Zwei virale Elemente sind wesentlich, um die Virus-DNA als Plasmid permanent in den infizierten Zellen zu erhalten. Der Replikationsursprung (OriP) erlaubt die episomale Replikation der

Virus-DNA. Das EBNA-1 Gen (Epstein-Barr Virus Nukleäres Antigen) ist ein DNA-Bindungsprotein. Es muss mit der OriP-Region interagieren, um die Replikation zu ermöglichen. Kombiniert man beide Elemente in einem System, so erhält man ein DNA-Molekül, das extrachromosomal in nicht-infizierten Mamaliazellen repliziert und erhalten wird (Yates et al., 1985). Über einen solchen so genannten EBV-Vektor (Epstein-Barr Virus) können heterologe Gene in HEK-293- Zellen zur Expression gebracht werden. Für die konditionelle Expression von OCTN1m im Epstein-Barr System wurde als EBV-Vektor pCEP-Pu/TO eingesetzt (siehe Ergebnisse 3.6.1, Abb. 39) (Kohfeldt et al., 1997). Zusätzlich zum Replikationsursprung OriP und dem EBNA-1 Gen enthält das Plasmid zwei Tet-Operatoren und die genetische Information für eine Puromycinresistenz. Die Steuerung der Expression wird wie im Flp-In™ T-Rex™ System über eine Tetracyclin-Regulation erreicht (siehe 2.4.5). Hierfür muss zusätzlich zum Expressionsvektor noch ein weiteres Plasmid (pcDNA6/TR/OP), das die Gene für den Tet-Repressor und eine Blastocidinresistenz enthält, transfiziert werden (siehe Ergebnisse 3.6.1, Abb. 39). Die OCTN1m cDNA entspricht dem Genbankeintrag AB016257. Die stabile Transfektion wurde an HEK-293-Zellen mittels Tfx™-50 (siehe 2.4.2 und 2.4.3) durchgeführt. Die Zellen wurden anschließend mit 3 µg/ml Puromycin (MP Biomedicals, Eschwege, Deutschland) und 30 µg/ml Blastocidin (MP Biomedicals) im Wachstumsmedium selektiert auch weiterführend blieb die neue Zelllinie unter permanentem Selektionsdruck. Damit wird sichergestellt, dass nur solche Zellen überleben, die die beiden extrachromosomalen Plasmidsysteme permanent replizieren und exprimieren. Die Expression des OCTN1m Gens wurde für Versuche 20 Stunden zuvor durch die Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin zum Wachstumsmedium eingeschaltet.

2.4.7 Kryokonservierung der Zellen

Um klonale Zelllinien zu erhalten, ohne sie kontinuierlich in Kultur zu führen, werden die Zellen in flüssigem Stickstoff konserviert. Hierfür werden Zellen einer konfluenten Kulturflasche (175 cm²) in 15 ml serumfreiem Wachstumsmedium vereinzelt und abzentrifugiert (500 g, 5 min, Raumtemperatur). Der Überstand wird abgenommen und das Zellpellet in 8 ml eiskaltem Einfriermedium resuspendiert. Das Einfriermedium setzt sich aus 15% DMSO (Dimethylformamid), 40% FCS und 45% serumfreiem Wachstumsmedium zusammen. Zügig werden dann jeweils 1.8 ml der

Zellsuspension in entsprechende Kryoröhrchen pipettiert und diese sofort fest zugeschraubt und auf Eis gelagert. Daraufhin werden die Kryoröhrchen in einer Styroporbox langsam über Nacht auf -80° C abgekühlt und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff umgelagert. Zum Auftauen der Zellen wird ein Röhrchen in 70% Ethanol (37° C) rasch erwärmt. Der Inhalt wird in 15 ml serumfreies Wachstumsmedium 37° C pipettiert und abzentrifugiert (500 g, 5 min), um das DMSO und abgestorbene Zellen zu entfernen. Das Zellpellet wird erneut resuspendiert und in eine 75 cm² Kulturflasche mit frischem Wachstumsmedium überführt.

2.5 Aufnahmeversuche

2.5.1 Aussaat der Zellen

Um Transporter funktionell untersuchen zu können, werden sie in zellulären Systemen wie beschrieben zur Expression gebracht. Für ein Aufnahmeexperiment wurden die Zellen der entsprechenden Zelllinie in Polystyrolschälchen (60 mm Durchmesser, Nunclon™, Nunc, Wiesbaden, Deutschland) ausgesät. Zunächst wurden diese Schälchen mit Poly-Ornithin beschichtet, dafür wurden sie für 20 min mit 1.5 ml steriler Poly-Ornithin-Lösung inkubiert (siehe 2.4.4). Die Lösung wurde daraufhin entfernt und die Schälchen mit serumfreiem Wachstumsmedium gewaschen. 48 Stunden vor einem Aufnahmeexperiment wurden 2 Mio. Zellen pro Schälchen in 4 ml Wachstumsmedium je nach Expressionssystem mit entsprechendem Antibiotikazusatz ausgesät. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Bei den konditionellen Expressionssystemen wurde 20 Stunden vor dem Aufnahmeexperiment das Wachstumsmedium gewechselt und mit 1 µg/ml Doxycyclin versetzt, um die Expression des Transporters zu induzieren. Für die Aufnahmeversuche waren die Zellen 70% konfluent.

2.5.2 Vorinkubation

Die nun beschriebenen Schritte der Aufnahmeversuche werden nicht mehr unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Vor der Substrataufnahme wurde das Wachstumsmedium der Zellen entfernt und sie wurden für 24 min bei 37° C mit 4 ml KRH (37° C) (siehe 2.1.2) vorinkubiert. Hierbei werden Serum- und Mediumbestandteile abgetrennt und die Zellen equilibrieren in der KRH-Lösung. Sollten z. B. die Auswirkungen verschiedener pH-Werte oder Ionenkonzentrationen der Aufnahmelösung auf den Transportvorgang untersucht werden, so schloss sich an die Vorinkubation noch ein Umpuffern oder Waschen der Zellen mit Pufferlösungen den Aufnahmebedingungen entsprechend an.

2.5.3 Substrataufnahme

Vor der Substrataufnahme wurde die Vorinkubationslösung entfernt. Das Substrat wurde den Zellen in einem physiologischen Puffer (KRH, 37° C) angeboten. Zwei ml der entsprechenden Aufnahmelösung wurden dafür jeweils in die Schälchen gegeben. Je nach experimentellem Ansatz enthielt die Aufnahmelösung radioaktiv markierte oder nur native Substratmoleküle in bestimmten Konzentrationen. Allgemein wurden für die Radiotracer Assays Substratkonzentrationen von 0.1 µmol/l eingesetzt. Wenn die Aufnahmeversuche mittels LC-MS/MS quantifiziert wurden, betrug die Konzentration der unmarkierten Substrate in der Regel 10 µmol/l. Variierende Substratkonzentrationen wurden bei der Untersuchung von Sättigungskinetiken eingesetzt. Zur Bestimmung initialer Aufnahmeraten betrug die Aufnahmezeit in der Regel 1 min. Die Aufnahmezeit variierte entsprechend bei der Untersuchung von Zeitverläufen der Substrataufnahme. Bei Hemmexperimenten war der Aufnahmelösung neben dem Substrat in konstanter Konzentration noch der Hemmstoff in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt. Zur Bestimmung von möglichen endogenen Substratgehalten der Zelllinien wurden die Zellen nur mit KRH ohne Substrat inkubiert. Wenige Sekunden vor Beendigung der Aufnahmezeit wurde die Aufnahmelösung entfernt, so dass genau zur Beendigung der Aufnahmezeit die Aufnahme durch Waschen der Zellen mit 4 ml KRH (4° C) gestoppt werden konnte. Bei 4° C kann man davon ausgehen, dass die Transporter keine Aktivität mehr

zeigen. Die eiskalte KRH wurde sofort wieder entfernt und der Waschschrift wurde insgesamt drei mal wiederholt, um sämtliche Substratmoleküle, die vielleicht noch außen an den Zellen gebunden oder adsorbiert sein könnten, zu entfernen.

2.5.4 Lyse der Zellen

Je nach Quantifizierungsmethode wurden die Zellen unterschiedlich behandelt, um das Lysat freizusetzen, in dem die Substratkonzentration anschließend bestimmt wurde. Bei Aufnahmeversuchen mit radioaktiv markierten Substraten wurde 1 ml einer detergenzhaltigen Lyselösung (0.1 % (v/v) Triton X-100 in 5 mmol/l Tris, pH 7.4) auf die Schälchen gegeben und 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, bevor das Zelllysate mit einer Pipette homogenisiert und in Reagiergefäße (1.5 ml) überführt wurde. Für die LC-MS/MS Analytik wurde ein saurer Aufschluss eingesetzt. Hierfür wurde 1 ml 4 mmol/l HClO_4 auf die Zellen gegeben und auch für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor das Lysat mit einer Pipette homogenisiert und überführt wurde. Wenn die so gewonnenen Lysate nicht sofort analytisch weiterbearbeitet werden konnten, wurden sie bei -20°C gelagert.

2.5.5 Bestimmung der Radioaktivität

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

Von den Zelllysaten wurden jeweils 700 µl mit 2.1 ml Szintillationsflüssigkeit in einem Szintillationsröhrchen gemischt. Von allen Zählraten wurde die so genannte Nullrate abgezogen, hierfür wurden 100 µl Vorinkubationslösung (KRH, pH 7.4) und 700 µl Lyselösung (0.1 % (v/v) Triton X-100 in 5 mmol/l Tris, pH 7.4) mit 2.1 ml Szintillationsflüssigkeit gemischt und gemessen. Als Eichpunkt für die Konzentrationsbestimmung wurden von den Aufnahmelösungen jeweils 100 µl mit 700 µl Lyselösung und 2.1 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt, bei einer Substratkonzentration von 0.1 µmol/l entspricht diese Zählrate dann einer Stoffmenge von 0.01 nmol. Da das Detergenz Triton X-100 zu einem so genannten Quenching der erzeugten Lichtemission führt, ist darauf zu achten, dass in allen Proben jeweils das gleiche Volumen Lyselösung enthalten ist. Quenching kommt im Szintillationsansatz zustande, wenn Substanzen enthalten sind, vor allem aromatische Ringsysteme, die die Beta-Strahlung oder die Energie der Lösungsmittelmoleküle selber absorbieren. Jedes Röhrchen wurde dreimal für 10 min im Flüssigszintillationszähler gezählt. Bei der Auswertung wurde aus den Zählraten der Mittelwert gebildet.

2.5.6 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der Aufnahmeprouben wurde mit der so genannten BCA-Methode (Smith et al., 1985) bestimmt. Hierfür wurde der BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) eingesetzt. Der Kit enthält prinzipiell die Lösung A (BCA) und Lösung B (CuSO₄). Die Methode beruht auf der Tatsache, dass Proteine in alkalischem Milieu Cu²⁺ zu Cu⁺ reduzieren (Biuret-Reaktion). Die Bichinolin-4-carbonsäure (BCA) bildet einen wasserlöslichen und intensiv purpur gefärbten Chelatkomplex mit den Cu⁺-Ionen, wobei ein Cu⁺ zwei Bichinolinsäuremoleküle koordiniert. Die Färbung ist stabil und nimmt über einen weiten Bereich proportional mit der Proteinkonzentration zu. Die Reaktion toleriert nicht-ionische Detergenzien und Puffersalze. Die Aufnahmeprouben wurden zunächst aufgetaut und zentrifugiert, anschließend wurden sie 1:10 mit 0,15 mol/l NaCl-Lösung verdünnt. 40 µl dieser Verdünnung wurden jeweils in Vertiefungen einer 96-Well-Platte pipettiert. Daraufhin wurden 200 µl Färbelösung hinzugefügt, diese setzt sich aus 50 Teilen Lösung A und 1 Teil Lösung B zusammen. Die Platte wurde zuerst für 30 min bei 37° C inkubiert, bevor die Extinktion bei 570 nm in einem ELISA-Reader (Thermo Max Microplate

Reader, Molecular Devices) gemessen wurde. Anhand einer Eichreihe aus Rinder-Serum-Albumin (BSA) konnte die Proteinkonzentration der unbekanntenen Proben bestimmt werden. Die BCA-Methode konnte zur Proteinbestimmung der Zelllysate eingesetzt werden, die durch Lyse der Zellen mit 0.1 % (v/v) Triton X-100 in 5 mmol/l Tris, pH 7.4 erhalten wurden. Für saure Zelllysate, die durch den Aufschluss mit 4 mmol/l HClO₄ erhalten wurden, konnte sie nicht zum Einsatz gebracht werden, da die oben beschriebenen Reaktionen ein alkalisches Milieu vorsehen. Um die Proteinkonzentration dieser Proben zu bestimmen, wurde die Proportionalität zwischen dem Prolingehalt der Proben und der Proteinmenge ausgenutzt. Für die Aufnahmeversuche, die per LC-MS/MS quantifiziert werden sollten, mussten jeweils zusätzlich Zellen ausgesät werden, die mit dem Detergenz lysiert wurden und deren Proteingehalt direkt bestimmt wurde. Über eine entsprechende Kalibration von Proteinmenge gegen Prolingehalt, letzterer wurde mit LC-MS/MS gemessen, wurde dann die Proteinkonzentration der unbekanntenen Proben bestimmt (siehe Ergebnisse 3.4).

2.6 LC-MS und –MS/MS Analytik

2.6.1 Instrumente

Für die massenspektrometrische Detektion wurde das TSQ Quantum der Fa. Thermo Electron (Dreieich, Deutschland) eingesetzt. Hierbei handelt es sich um ein so genanntes Triple Quadrupol Tandem Massenspektrometer (Abb. 6). Zur Ionisierung wurde innerhalb der gesamten Arbeit Atmospheric Pressure Ionisation (API) mittels Elektrospray angewendet. Der MS Detektor war an ein Surveyor HPLC System (Thermo Electron) gekoppelt, bestehend aus der entsprechenden LC-Pumpe und einem Autosampler. Das Prinzip der massenspektrometrischen Detektion besteht in der Auftrennung der Analyten nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) (Budzikiewicz, 1998). Voraussetzung hierfür ist, dass die Analyten ionisiert und in der Gasphase vorliegen, diese Voraussetzungen werden während der Ionisierung in der Ionenquelle erfüllt. Nach dem Eintritt der geladenen Analyten in den TSQ Quantum MS Detektor werden die Ionen zunächst durch drei Kammern geführt. Über diese

wird schrittweise ein Hochvakuum aufgebaut. Die Kammern sind durch Linsensysteme voneinander getrennt, die Ionen werden durch elektrische Felder auf einer stabilen Bahn gehalten, während nicht geladene Matrixbestandteile abgetrennt werden können. Die eigentliche Auftrennung nach m/z erfolgt dann unter Hochvakuum ($10^{-7} - 10^{-5}$ Torr) im Quadrupol-System (Analysator). Ein Quadrupol-System besteht aus vier parallel im Quadrat angeordneten Metallstäben. Zwei gegenüberliegende Stäbe sind jeweils gleich gepolt. Durch das Übereinanderlagern von Gleich- und Wechselspannung wird zwischen den Stäben ein elektrisches Feld erzeugt in dem die Analyten nach Masse-zu-Ladungs-Verhältnis aufgetrennt werden können. In Abhängigkeit von den Spannungsverhältnissen haben nur Teilchen mit einem bestimmten m/z eine stabile oszillierende Bahn durch das Stabsystem, während alle anderen abgelenkt und an den Stäben entladen werden. An den ersten Quadrupol schließt sich die so genannte Kollisionszelle an. Auch hierbei handelt es sich um ein Quadrupol-System, das im TSQ Quantum in einem rechten Winkel angeordnet ist. In der Kollisionszelle können die Analyten durch die Kollision mit Argonatomen und durch Zuführen von Energie über Spannungen fragmentiert werden. Die Art und Weise wie ein bestimmte Verbindung fragmentiert ist abhängig von ihrem molekularen Aufbau. Es entsteht hierbei ein Fragmentmuster oder auch Produktionenspektrum, das spezifisch ist für die entsprechende Substanz. Hinter der Kollisionszelle befindet sich ein drittes Quadrupol-System in dem die Teilchen erneut nach m/z aufgetrennt werden können, um so z. B. ein Produktionenspektrum aufzuzeichnen. Der Elektronenmultiplier wandelt die Ionen in ein elektrisches Signal um.

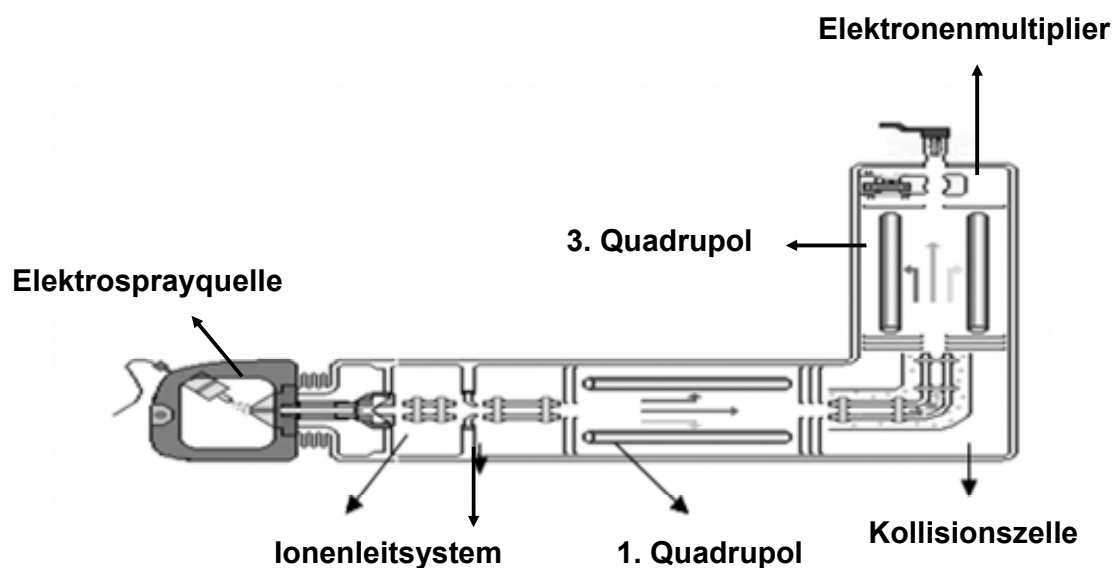


Abb. 6
Schematischer Aufbau des TSQ Quantum (Thermo Electron).

2.6.2 Ionisierung

Bei der Ionisierung mittels Elektrospray (Kearle and Ho, 1997) wird der Laufmittelfluss durch das Anlegen einer Hochspannung (Sprayvoltage) zerstäubt. Der Sprayvorgang wird pneumatisch durch zwei Stickstoffgasflüsse (sheath gas, auxiliary gas) unterstützt. Währenddessen werden die Analytenmoleküle ionisiert und gehen durch Evaporation des Laufmittels letztendlich in die Gasphase über. Wenn sie in den MS Detektor eintreten durchqueren sie zunächst eine beheizte Kapillare (heated capillary), dort werden letzte Laufmittelreste zu verdunstet. Prinzipiell ist es möglich, je nach Polarität der Spannung positive oder negative Ionen zu generieren. Die Ionisierung mittels Elektrospray wird erheblich unterstützt, wenn sich bereits im Laufmittel aus den Analyten Kationen oder Anionen durch Protonierung bzw. Deprotonierung bilden. Hierfür kann das Laufmittel einen sauren (z. B. Ameisensäure, Essigsäure, 0.1 – 1%) oder basischen Zusatz (z. B. Triethylamin, 1 – 10 mmol/l) enthalten. Eine wichtige Voraussetzung für sämtliche Laufmittel und deren Zusätze ist, dass sie flüchtig sind, da ansonsten die Bestandteile (z. B. Puffersalze) in der Ionenquelle auskristallisieren.

Elektrospray-Parameter für die positive Ionisierung:

Sprayvoltage: 4500 V
Sheath gas: 40 arbitrary units (gerätespezifisch)
Auxillary gas: 4 arbitrary units (gerätespezifisch)
Capillary temperature: 350° C

Elektrospray-Parameter für die negative Ionisierung:

Sprayvoltage: 3000 V
Sheath gas: 40 arbitrary units (gerätespezifisch)
Auxillary gas: 4 arbitrary units (gerätespezifisch)
Capillary temperature: 350° C

2.6.3 Chromatographie

Da innerhalb dieses Projektes hauptsächlich polare Moleküle mit ähnlichen funktionellen Gruppen chromatographiert werden mussten, war es möglich, mit einer Methode für alle Substanzen zufriedenstellende chromatographische Ergebnisse zu erzielen. Um den polaren Verbindungen ausreichend Retention an der stationären Phase zu vermitteln, wurde eine Normalphasensäule (Atlantis™ HILIC, 100 x 3 mm, 5 µm, Waters Corporation, Milford, USA) mit entsprechender Vorsäule (20 x 4.6 mm, 5 µm) eingesetzt. Während der isokratischen Chromatographie war das Laufmittel aus 70% Methanol (Rotisolv®, HPLC Gradient Grade, Roth, Karlsruhe, Deutschland) und 30% Ameisensäure (0.1%) (Merck, Darmstadt, Deutschland) zusammengesetzt. Die Ameisensäure im Laufmittel dient der Unterstützung der Protonierung und somit der positiven Ionisierung in der Ionenquelle. Für eine negative Ionisierung wurde dem wässrigen Laufmittel kein Zusatz beigefügt. Der Laufmittelfluss betrug 250 µl/min. Der Säulenofen war auf 20° C temperiert, die Proben wurden im Autosampler auf 6° C gekühlt. Das Injektionsvolumen betrug immer 20 µl, während die Dauer eines chromatographischen Laufes in Abhängigkeit der Retentionszeit der Analyten zwischen acht und zehn Minuten variierte. Zwischen den Injektionen wurde das Injektionssystem mit Methanol gespült, um Verschleppungen zu vermeiden. Ein Zwei-Positionen-Ventil wurde eingesetzt, um zu Beginn der Chromatographie den

Laufmittelfluss an der Ionenquelle vorbei in den Abfall zu leiten. Erst kurz vor der Elution des ersten Analyten schaltete das Ventil um, das Laufmittel gelangte in die Ionenquelle und die eigentliche Detektion begann. Auf diese Weise wurde die Elektrosprayquelle vor eluierender Matrix geschützt und möglichst wenig verschmutzt.

2.6.4 Full Scan Experimente

Mittels Full Scan Experimenten werden Massenspektren generiert, dabei wird ein bestimmter Massenbereich (m/z) abgedeckt. Für ein solches Experiment wird nur ein Quadrupol-System benötigt, das zweite Quadrupol-System und die Kollisionszelle transportieren die Ionen in diesem Fall nur weiter. Innerhalb des Projektes wurden Massenspektren im Bereich von m/z 50 – 500 aufgezeichnet, da dies den Größenbereich der erwarteten Substrate abdeckt. Prinzipiell ist es möglich positive und negative Ionen in der Elektrosprayquelle zu erzeugen und anschließend deren Spektren zu detektieren. Die Auflösung (FWHM = Full Width at Half Maximum) betrug bei den Full Scan Experimenten 0.7. Die Scanzeit war zwei Sekunden lang.

2.6.5 Difference Shading

Während eines chromatographischen Laufes werden mehrere hundert Massenspektren für Transporter- und Kontrollzellen generiert. Um diese Spektren miteinander vergleichen und Unterschiede detektieren zu können, hat Dr. D. Gründemann (Institut für Pharmakologie, Universität zu Köln) eine Software entwickelt, die Intensitätsunterschiede in den Massensignalen der Spektren optisch gut sichtbar heraushebt. Die Software arbeitet mit den Rohdatensätzen der Massenspektren eines chromatographischen Laufes, die die Dimensionen Intensität, m/z und Zeit aufweisen. In einem ersten Schritt werden die Daten in eine zweidimensionale Ebene projiziert. Hierbei wird die Zeit auf der Y-Achse und m/z auf der X-Achse dargestellt. Die Intensität wird sigmoidal in 256 Graustufen abgebildet. Je intensiver das Signal ist, desto heller ist seine Färbung. Durch den sigmoidalen Verlauf der Farbstufen wird die Differenzierung des Mittelteils der Intensitätsskala gegenüber den extrem hohen und extrem niedrigen Signalen begünstigt. Im

nächsten Schritt werden zwei so konvertierte Datensätze zur Deckung gebracht. Hierbei wird die Information der einzelnen RGB-Farbkanäle von Transporter- und Kontrollspektren herangezogen und basierend darauf wird ein gemeinsames Bild erzeugt. Signale mit einer höheren Intensität in den Transporterspektren werden bei der Kombination der einzelnen Farbkanäle rot eingefärbt. Der Hintergrund ist schwarz, so dass farbige Signale schnell auffallen. Signale, die in den Kontrollspektren intensiver sind, erzeugen türkise Banden. Sind die Signale auf den Massenspuren in beiden Spektren gleich hoch, so sind sie weiß bzw. haben mit abnehmender Intensität dunklere Grauabstufungen. Schwarz bedeutet, dass kein Signal zu detektieren war (siehe 3.1).

2.6.6 Produktionenspektren und SRM Experimente

Zur Generierung von Produktionenspektren werden alle analytischen Quadrupol-Systeme des Tandem MS Detektors benötigt. Im ersten Quadrupol wird die Muttermasse oder das Molekülion isoliert ($[M-H^+]$ bzw. $[M]$). Sie kann als einzige das Stabsystem passieren, während alle anderen m/z ausselektiert werden. In der Kollisionszelle herrscht ein Argonpartialdruck von 1.5 mTorr. Durch den Zusammenstoß mit Argon und das Zuführen von Energie über Spannung (Kollisionsenergie: CE, 15 – 60 V) werden die Analytenmoleküle fragmentiert. Der nachfolgende Quadrupol scant über den Massenbereich in dem die Fragmente erwartet werden und zeichnet so ein Fragment- oder Produktionenspektrum des Molekülions auf. Der Produktionenscan kann als Detektionsmodus einer Chromatographie eingesetzt werden, so wie das bei der Identifizierung des Stachydrins im Zelllysate und seiner Strukturaufklärung der Fall war (siehe Ergebnisse, 3.2). Bei der Entwicklung von LC-MS/MS Quantifizierungsmethoden wird er benötigt, um den Analyten zu detektieren und seine intensivsten Fragmente für die Quantifizierung zu bestimmen. Zu diesem Zweck werden wässrige oder methanolische Standards des Analyten (1000 – 10000 ng/ml) über eine Spritzenpumpe direkt in die Elektrosprayquelle infundiert (Flussrate 10 – 20 μ l/min). Zunächst wird ein Full Scan Spektrum generiert und das Molekülion identifiziert. Daraufhin fragmentiert man das Molekülion und erhält ein Produktionenspektrum. Beispielhaft sind ein solches Produktionenspektrum aus der Direktinfusion und die anschließende Fragmentanalyse für Ergothionein gezeigt (Abb. 7 und 8).

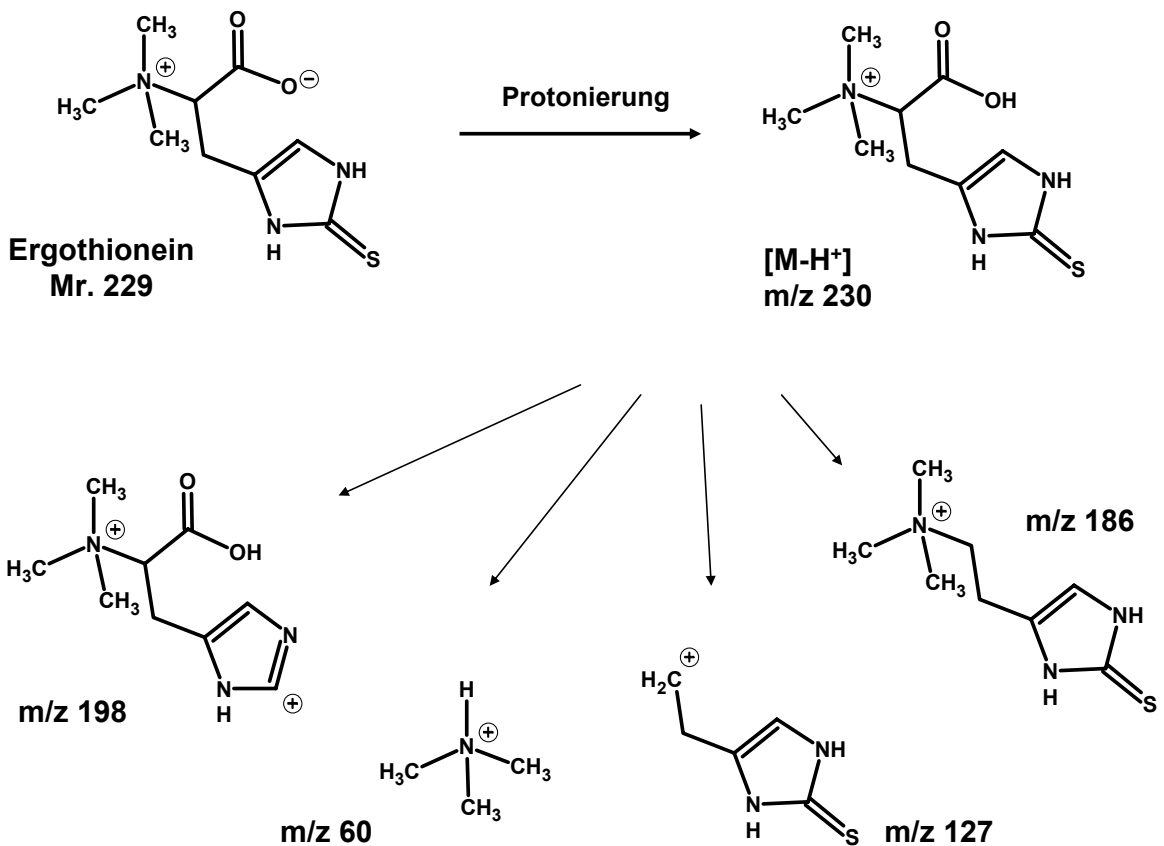
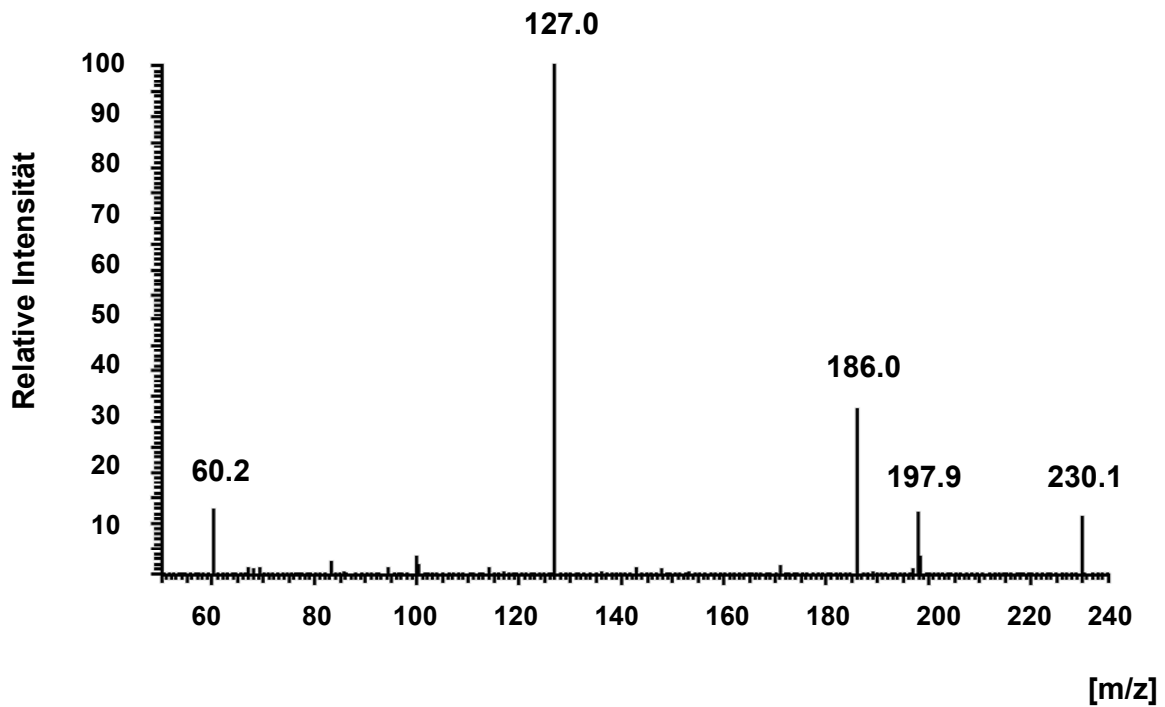


Abb. 7 und 8

Oben: Produktionenspektrum des Ergothioneins, Direktinfusion (1000 ng/ml, 20 µl/min), Kollisionsenergie 20 V, 1.5 mTorr Argon. Unten: Fragmentierung des Ergothioneins.

Mit Hilfe der Gerätesoftware (XCalibur™, Thermo Electron) ist es möglich, das intensivste Fragment eines Moleküliions zu identifizieren und seine Kollisionsenergie bzw. den Argonpartialdruck optimieren zu lassen. Zur Quantifizierung einer Substanz aus dem Laufmittelstrom der Chromatographie wählt man zur Detektion den so genannten SRM Scanmodus (Selected Reaction Monitoring). Hierbei wird im ersten Quadrupol wieder nur das Moleküliion selektiert und in der Kollisionszelle wird unter den optimierten Bedingungen fragmentiert. Der dritte Quadrupol lässt nur das intensivste Produktion passieren, dessen Signal dann detektiert und ausgewertet wird. Dieser Detektionsmodus bietet die höchste mögliche Sensitivität und Spezifität des Instruments. Die Sensitivität wird dadurch erzielt, dass nur eine bestimmte und spezifische Fragmentierungsreaktion beobachtet wird und alle anderen Teilchen ausgeblendet werden. Dadurch wird der Hintergrund der Detektion auf ein Minimum reduziert. In der nachfolgenden Tabelle sind für sämtliche Analyten, die mittels LC-MS/MS bestimmt worden sind, die Moleküliionen, das intensivste Fragment und die optimierten Kollisionsenergien dargestellt. Alle Analyten wurden positiv ionisiert und mit 1.5 mTorr Argon fragmentiert. Für die SRM Experimente wurde die Scanzeit auf 0.3 sec gesetzt, die Auflösung betrug für beide Quadrupol-Systeme 0.7 (FWHM). Die Scanweite für die Einzelmassen betrug m/z 0.5.

Name	Moleküliion [M-H⁺] [m/z]	Fragment [m/z]	Kollisionsenergie [V]
Stachydrin	144	84	30
Ergothionein	230	127	16
Betonicin	160	88	26
γ-Butyrylbetain	146	60	20
Prolin	116	70	24
Thiamazol	115	57	24
N-Methylprolin	130	84	20
MPP ⁺	170	128	25

2.6.7 Kalibration

Zur Quantifizierung wurden Standard-Kalibrationsproben bekannter Konzentration eingesetzt. Diese Kalibrationsproben wurden in Zelllysate hergestellt, um die Matrix der Aufnahmeprobe möglichst genau zu imitieren. Für die LC-MS/MS Quantifizierung ist es von großer Bedeutung, dass die Kalibration und die unbekanntes Proben dieselbe Matrixbeschaffenheit haben, da die Matrixbestandteile die Ionisierung und somit die Intensität der Signale stark beeinflussen können (Matrixeffekte) und somit Konzentrationsbestimmungen verfälscht werden könnten. Um Zelllysate für die Kalibration herzustellen, wurden mit FIT-OCTN1h Zellen dicht bewachsene Plastikkulturflaschen (175 cm²) mit 12 ml 4 mmol/l HClO₄ für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend das Lysat abgenommen. Diesem Lysat wurden dann die entsprechenden Analytenkonzentrationen zugesetzt. Die Kalibrationsproben wurden immer in einem Volumen von 1 ml hergestellt. Für eine Kalibrationsgerade wurden mindestens zehn Konzentrationen des Analyten gleichmäßig über den Kalibrationsbereich verteilt. Der Kalibrationsbereich war für die einzelnen Analyten unterschiedlich und richtete sich nach der Sensitivität der LC-MS/MS Quantifizierungsmethode und der erwarteten Konzentration in den Aufnahmeprobe.

Name	Kalibrationsbereich [nmol/l]
Stachydrin	2.8 – 4454.3
Ergothionein	21.8 – 8722.2
Betonicin	31.4 – 1257.9
γ- Butyrylbetain	2.8 – 1101.3
Thiamazol	43.8 – 3508.8
N-Methylprolin	6.8 – 1360.5
MPP ⁺	10 - 1000

Für die Quantifizierungsgrenze wurde immer ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis von mindestens 3:1 zu Grunde gelegt. Zur Kalibration herangezogen wurde der Quotient aus der Fläche des Analyten und der Fläche des internen Standards. Als interner Standard für die Chromatographie wurde MPP⁺ eingesetzt. Um die Güte der linearen Regression im unteren Konzentrationsbereich zu erhöhen wurde eine Wichtung (1/x)

durchgeführt ($R^2 > 0.99$). Die Kalibrations- und Aufnahmeproben wurden folgendermaßen für die LC-MS/MS Analytik vorbereitet:

- Proben auftauen und gut mischen.
- Zentrifugation für 3 min, 16000 g bei Raumtemperatur (Centrifuge 5415 D, Eppendorf) um Zelltrümmer abzutrennen.
- 100 µl der Lysate wurden in Reagiergefäße (1.5 ml) überführt.
- 10 µl interner Standard (MPP⁺, 18 µmol/l in H₂O) wurden zugesetzt.
- Gut mischen und anzentrifugieren.
- 110 µl wurden in die Microeinsätze der Glasvials pipettiert und diese mit einer Schraubkappe fest verschlossen.

Die Aufarbeitung wurde unmittelbar vor der Analyse vorgenommen. In Abb. 9 – 11 sind Beispielchromatogramme der Analyten dargestellt.

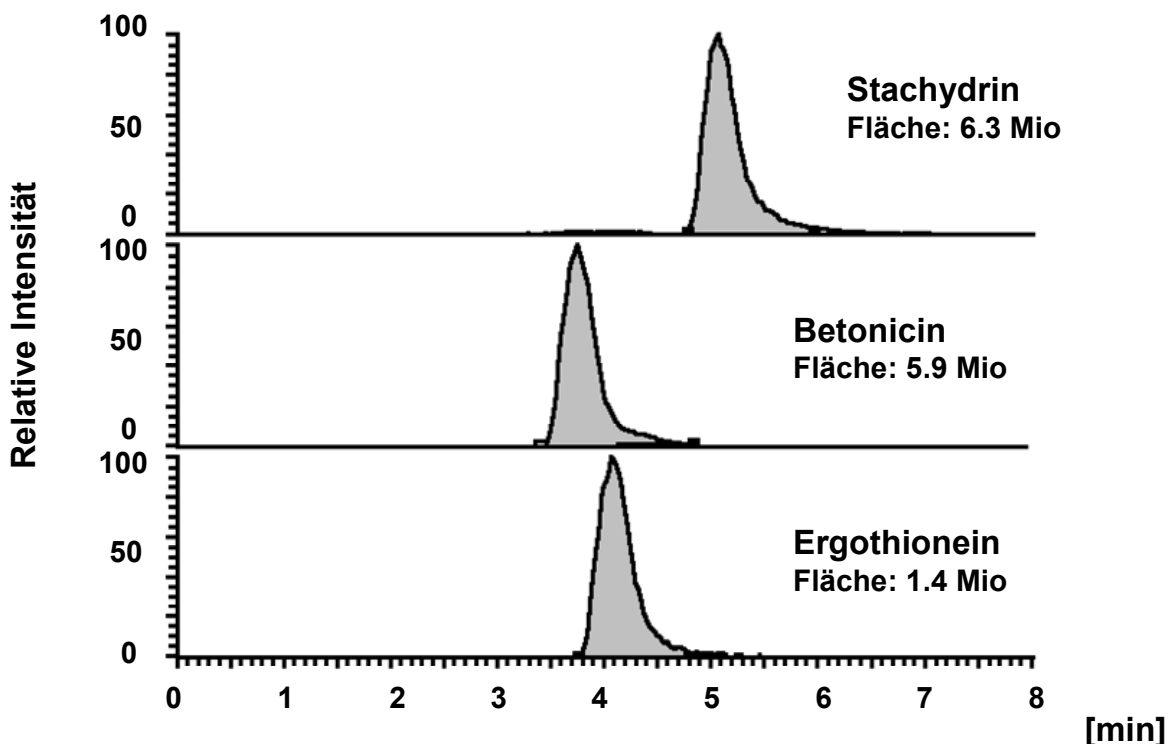


Abb. 9

Beispielchromatogramme: Stachydrin (1.1 µmol/l), Betonicin (1.3 µmol/l), Ergothionein (1.7 µmol/l) Standards in Zelllysate.

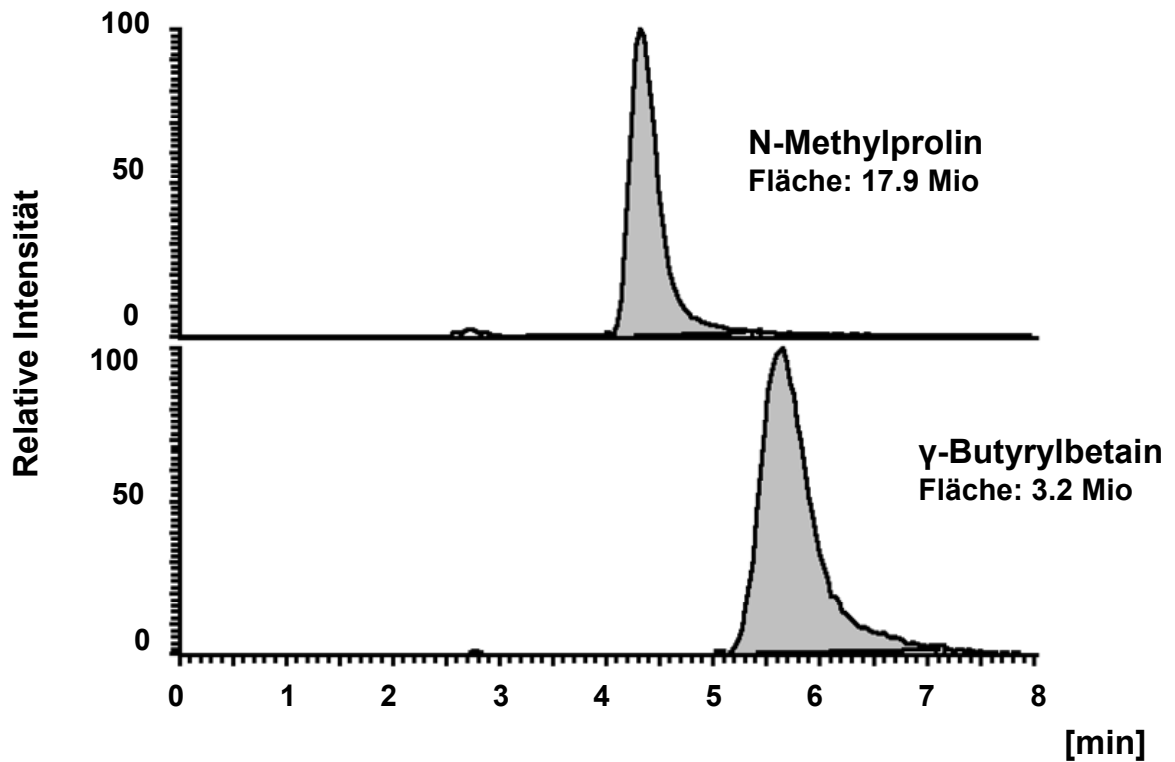


Abb. 10

Beispielchromatogramme: N-Methylprolin (1.4 $\mu\text{mol/l}$), γ -Butyrylbetain (1.1 $\mu\text{mol/l}$) Standards in Zelllysate.

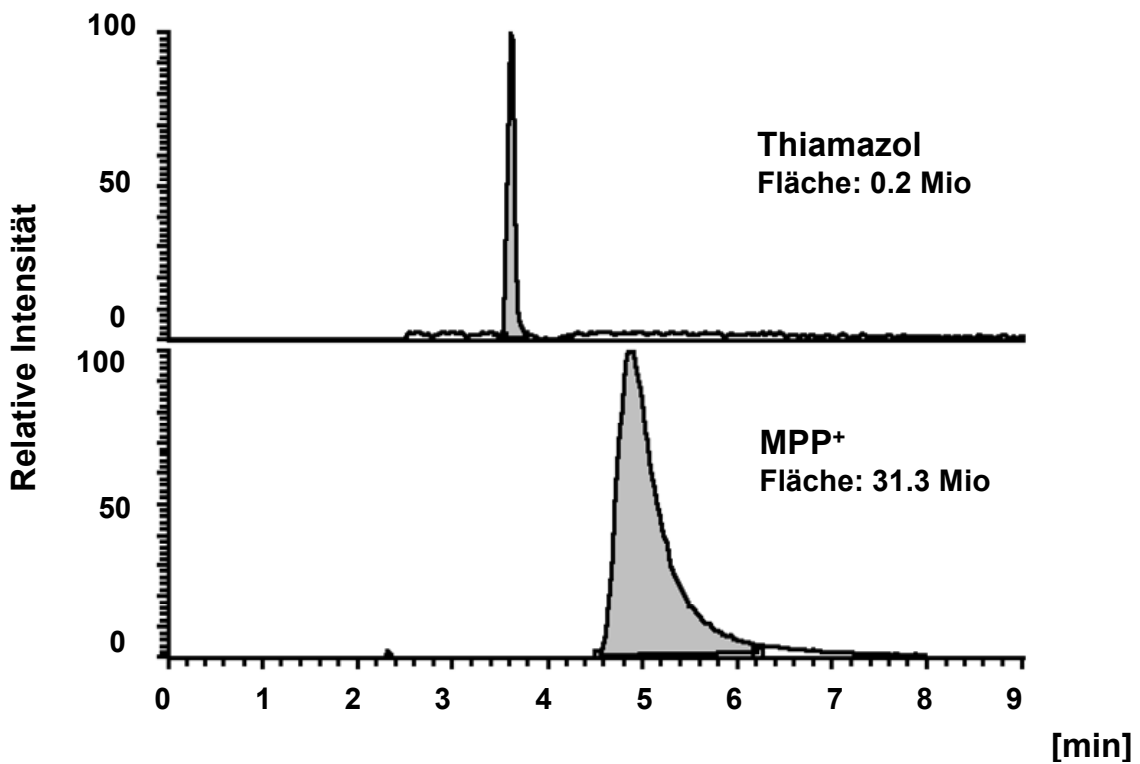


Abb. 11

Beispielchromatogramme: Thiamazol (3.5 $\mu\text{mol/l}$), MPP⁺ (1.8 $\mu\text{mol/l}$) Standards in Zelllysate.

2.7 Datenauswertung

Die chromatographischen Daten wurden mit der Software XCalibur™ LC-Quan 1.3 ausgewertet. Zur Integration wurde der ISIS Peak Detektions Algorithmus eingesetzt. Die Integration sämtlicher Signale wurde aber auch optisch kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert. Aufnahmezeiten und Transporteffizienzen sind als arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler dieses Mittelwertes angegeben. Die Fehlerfortpflanzung bei Addition und Subtraktion bzw. Multiplikation und Division dieser Werte während der Auswertung wurde entsprechend berücksichtigt. Die die Daten beschreibende Funktionen wurden nicht an die gemittelten, sondern an die Originalwertepaare angepasst. Die angewendeten Funktionen sind in den Bildunterschriften der Graphen im Ergebnisteil aufgeführt. Daraus resultierende K_m -Werte sind als geometrische Mittelwerte mit 95% Konfidenzintervallen angegeben.

2.8 Anmerkung zum Dezimalpunkt

Innerhalb dieser Arbeit sind wie im englischen Sprachgebrauch üblich die Dezimalstellen mit einem Punkt abgetrennt worden.

3. Ergebnisse

3.1 Entwicklung der LC-MS Screening Analytik und Auswertung mittels „Difference Shading“

Zur Identifizierung neuer Substrate für Transporter sollte die qualitative Analytik mittels LC-MS zum Einsatz kommen (siehe Schema in Einleitung 1.2). Dafür wurden als erstes die Chromatographie und die MS Detektion entwickelt. Erfahrungsgemäß handelt es sich bei den Substraten der Transporter der SLC22 Familie um verhältnismäßig kleine polare Moleküle, organische Anionen und Kationen (Koepsell et al., 2003). Als stationäre Phase in der Chromatographie erschien daher eine Normalphasensäule geeigneter als ein hydrophob modifiziertes Säulenmaterial, um ausreichend Retention für polare Analyten zu gewährleisten. Prinzipiell besteht bei der MS Detektion die Möglichkeit positive und negative Ionen in der Elektrosprayquelle durch Protonierung bzw. Deprotonierung der Analyten zu generieren (siehe 2.6).

Die Entwicklung der Chromatographie und der Detektionsmethode wurde anhand von drei Standardanalyten: Carnitin, MPP⁺ (1-Methyl-4-Phenyl-Pyridinium) und der Aminosäure Prolin durchgeführt. Zur Detektion wurden mittels positiver Ionisierung Full Scan Spektren im Massenbereich m/z 50 – 500 aufgenommen. Mit einer Zusammensetzung der flüssigen Phase aus 70% Methanol und 30% Ameisensäure (0.1 %Vol.) wurden die besten Ergebnisse bezüglich Retentionszeit und Signalintensität erzielt. Die chromatographischen Parameter wurden für eine negative Ionisierung so beibehalten, außer dass dem wässrigen Laufmittel keine Säure zugesetzt wurde (siehe 2.6.2). Allgemein betrachtet ist ein großer Teil der Biomoleküle positiv ionisierbar, da die Verbindungen oft protonierbare Stickstofffunktionen enthalten.

Bei der Betrachtung der komplexen Massenspektren als primäre Rohdaten wurde deutlich, dass ein optischer Vergleich von Spektren zur Identifizierung von Unterschieden nicht praktikabel durchführbar ist. Hinzu kommt, dass bei einem chromatographischen Lauf von 10 min mit einer Scanzeit von 2 sec 300 Spektren

(m/z 50 – 500) entstehen, die mit ihrer jeweiligen Kontrolle verglichen werden müssen. Aus diesem Grund wurde von Dr. D. Gründemann eine Software als Hilfsmittel entwickelt, die mit den Rohdaten der LC-MS Analysen arbeitet. Diese Datensätze beinhalten die Massenspektren der Transporterzellen oder der Kontrollzellen aus einem chromatographischen Lauf und weisen die Dimensionen m/z, Zeit und Intensität auf. Zuerst werden die Daten in eine zweidimensionale Ebene projiziert wobei die Zeit auf der Y-Achse, [m/z] auf der X-Achse und die Intensität sigmoidal in 256 Grauabstufungen dargestellt wird. Bei dem nun folgenden Vergleich bringt die Software zwei so konvertierte Datensätze, einen der Transporterzellen und einen der Kontrollzellen, zur Deckung. Basierend auf der Information der einzelnen RGB-Farbkanäle, wird ein gemeinsames Bild erzeugt. In diesem Bild kann man Intensitätsunterschiede auf den einzelnen Massenspuren optisch gut erkennen.

Bei der Kombination der Farbkanäle werden Signale mit einer höheren Intensität in den Transporterspektren rot eingefärbt. Der Hintergrund ist schwarz, so dass farbige Signale schnell auffallen. Signale, die in den Kontrollspektren intensiver sind, erzeugen türkise Banden. Sind die Signale auf den Massenspuren in beiden Datensätzen gleich hoch, so sind sie weiß bzw. haben mit abnehmender Intensität dunkler werdende Grautöne. Schwarz bedeutet, dass kein Signal zu detektieren war. Diese Methode wird mittlerweile als „Difference Shading“ oder Differenz-Abtönung bezeichnet (siehe 2.6.4 und 2.6.5).

In Abb. 12 ist das Ergebnis der beschriebenen LC-MS Analytik und der anschließenden Auswertung der Spektren mittels „Difference Shading“ für 1 µmol/l Carnitin, MPP⁺ und Prolin verglichen mit reinem 4 mmol/l HClO₄ Standard als Negativkontrolle dargestellt. Um die Bilder aus der „Difference Shading“ Auswertung auf weißem Hintergrund besser darstellen zu können, sind sie innerhalb dieser Arbeit farblich invertiert worden. Türkise Signale bedeuten daher eine höhere Intensität in den Spektren mit den Standardsubstanzen und rote Signale in den Spektren der Negativkontrolle. Grauabstufungen bedeuten, dass die entsprechenden Signale in beiden Spektren gleich hoch sind, je dunkler die Bande ist desto intensiver ist das Signal auf der Massenspur. Deutlich zu erkennen sind die distinkten türkisen Banden der drei Analyten, die den eluierenden Peaks entsprechen und beim Vergleich in den

Kontrollspektren nicht vorkommen. Anhand solcher Standards wurde die Optimierung der methodischen Parameter für die Chromatographie und die MS Detektion dokumentiert.

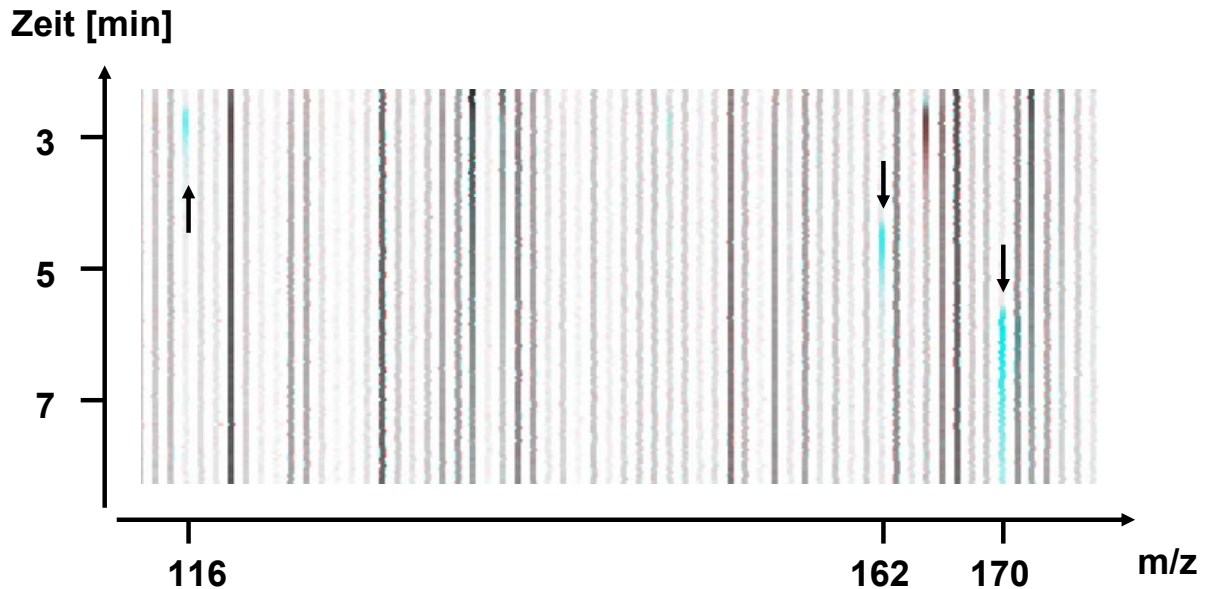


Abb. 12

Kontrollexperiment: Bildausschnitt der Auswertung von Standardspektren mittels „Difference Shading“. 1 $\mu\text{mol/l}$ Prolin, Carnitin und MPP^+ in 4 mmol/l HClO_4 wurden auf einer Normalphasensäule chromatographiert und Full Scan Massenspektren (m/z 50-500, Scan Zeit: 2 sec) wurden aufgenommen. Diese wurden mit den Spektren eines reinen HClO_4 Standards mittels der „Difference Shading“ Software verglichen. In der resultierenden Graphik markieren Pfeile die eluierenden Peaks der drei Standards, die durch die Software türkis eingefärbt worden sind. Auf der X-Achse [m/z] sind die Molekülionen [M-H^+] und auf der Y-Achse die Retentionszeiten eingetragen.

Prolin: [M-H^+] m/z = 116, RT = 3 min, Carnitin: [M-H^+] m/z = 162, RT = 5 min, MPP^+ : [M-H^+] m/z = 170, RT = 7 min.

3.2 Substratidentifizierung für OCTN1h

3.2.1 Konditionelles Expressionssystem für OCTN1h

Zu den Voraussetzungen des LC-MS Screenings zur Substratidentifizierung gehört es, dass die Transporter, die untersucht werden sollen, in einem zellulären System

funktionell zur Expression gebracht werden. Essentiell ist hierbei, dass die gewählte Zelllinie den zu untersuchenden Transporter nicht nativ exprimiert. Für die HEK-293-Zellen wurde gezeigt, dass keine mRNA für OCTN1h vorhanden ist (siehe Diskussion, Abb. 49). Der humane OCTN1 wurde in einem konditionellen Expressionssystem, dem Flp-In™ T-Rex™ System der Fa. Invitrogen (siehe 2.4.5), stabil exprimiert und diese Zelllinie wurde für die Experimente eingesetzt (FIT-OCTN1h). Das Flp-In™ T-Rex™ Expressionssystem bietet den Vorteil, dass das neue Gen an einer festgelegten Stelle und nicht willkürlich im Genom integriert wird. So erzielt man eine hohe Uniformität der transfizierten Zellen. Darüber hinaus ist die Expression des eingeschleusten Gens mit Doxycyclin induzierbar. Im ausgeschalteten Zustand wird der Zellstoffwechsel nicht mit der Überexpression eines fremden Proteins belastet. In diesem Zustand könnten die Zellen, zumindest theoretisch, auch als negative Kontrollzellen ohne Transporterexpression in Versuchen dienen. Da sie den exprimierenden Zellen genetisch identisch sind, würde das zu einer hohen Vereinheitlichung des Hintergrunds führen.

Dieses Expressionssystem war neben OCTN1h noch für eine Reihe weiterer Transporter zur Anwendung gebracht worden. Dazu gehörten EMTh, EMTr und OCTN2r. Für diese Transporter konnte die Steuerbarkeit der Expression funktionell mit bekannten Substraten getestet werden. Bei OCTN2r wurde der Carnitintransport untersucht. Für EMT wurde als Substrat das Modellkation MPP^+ eingesetzt, das wesentlich effizienter transportiert wird als die physiologischen Monoamine (Russ et al., 1992). Dabei stellte sich heraus, dass die Aufnahmeraten auch im ausgeschalteten Zustand erheblich waren. Für EMTh ging die MPP^+ Aufnahme ohne Doxycyclin im Wachstumsmedium nur auf 25% der Aufnahme in eingeschaltetem Zustand zurück, für EMTr waren es sogar noch mehr als 50%. Die Carnitinaufnahme über OCTN2r ging nur auf rund 40% der Positivkontrolle mit Doxycyclin zurück (Daten nicht graphisch dargestellt).

Da die Auswertung der LC-MS Rohdaten mittels „Difference Shading“ auf einem direkten Vergleich von Transporter- und Kontrollspektren beruht (siehe 3.1), ist es essentiell, dass in den Kontrollzellen der Transporter tatsächlich nicht exprimiert wird. Ansonsten könnten mögliche Intensitätsunterschiede der Signale abgeschwächt und übersehen werden. Die Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen mit anderen

Transportern zeigten, dass die Steuerung der Expression nicht so absolut ist, wie es für einen solchen Einsatz notwendig wäre. Daher wurden als negative Kontrollzellen für die Substratidentifizierung von OCTN1h nicht transfizierte Zellen der Flp-In™ T-Rex™ host cell line (FIT-NT) verwendet.

3.2.2 Substratsuche

Für das erfolgreiche Inkubationsexperiment wurden eingeschaltete FIT-OCTN1h Zellen und FIT-NT Zellen als Negativkontrolle eingesetzt. Diese Zelllinien wurden mit humanem Plasma (50 %Vol. KRH pH 7.4, 1 min, 37° C) in der Hoffnung inkubiert, dass sich in dem komplexen Gemisch eine Substanz befindet, die von OCTN1h als Substrat akzeptiert wird. Diese Substanz sollte sich dann im Gegensatz zu den Kontrollzellen in den Transporterzellen anreichern (siehe 1.2). Zur Lyse wurde ein saurer Aufschluss mit 1 ml 4 mmol/l HClO₄ durchgeführt (siehe 2.5).

Das Zelllysate wurde anschließend per LC-MS analysiert, dabei wurden Massenspektren im Bereich m/z 50 – 500 generiert. Mit den Proben wurde eine positive und eine negative Ionisierung durchgeführt, um sowohl anionische als kationische Substrate erfassen zu können. Die MS Daten wurden per „Difference Shading“ ausgewertet (siehe 3.1). Dabei wurde bei positiver Ionisierung ein klares reproduzierbares Signal auf der Massenspur m/z = 144 detektiert (Abb. 13). Zeitgleich mit diesem trat ein weiteres, weniger intensives Signal um 39 Masseneinheiten erhöht auf. Die Vermutung liegt nahe, dass dort ein Addukt mit einem Metallkation (K⁺) anstatt des Protons als Ladungsträger detektiert wird. Strukturell spricht dies für eine Carbonsäurefunktion im Molekül.

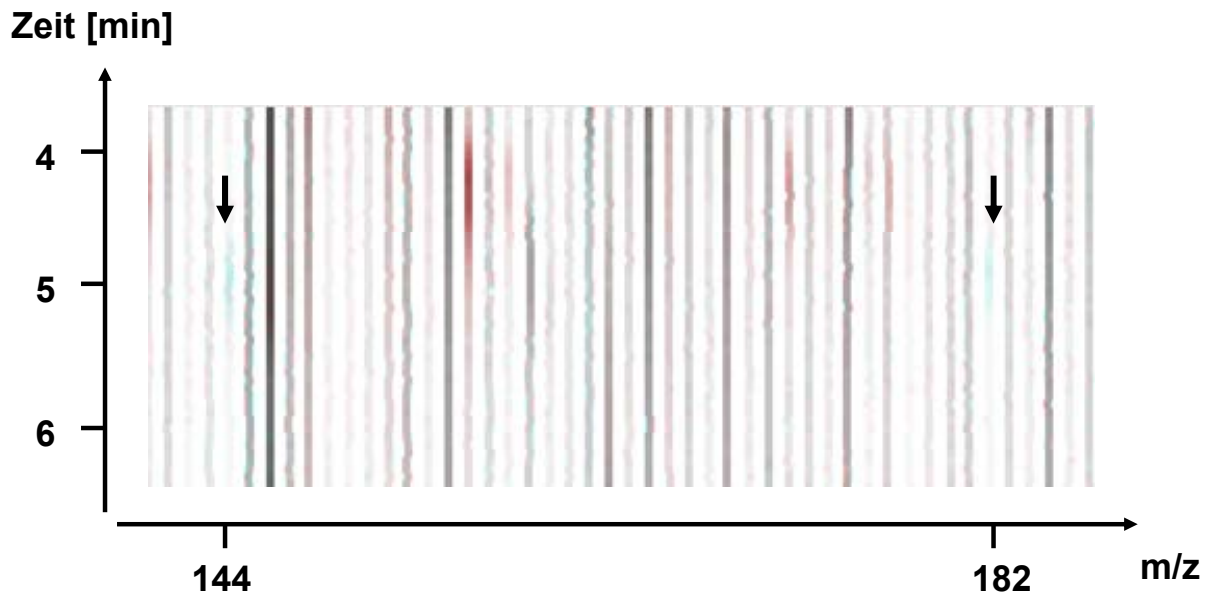


Abb. 13

Bildausschnitt der „Difference Shading“ Auswertung der Zellysate des Inkubationsversuchs von FIT-OCTN1h und FIT-NT Zellen mit humanem Plasma (50 %Vol. in KRH) nach LC-MS Analyse. Insgesamt wurde bei jedem Scan der Massenbereich m/z 50 – 500 abgedeckt. Die Pfeile markieren die detektierten türkisen Intensitätsunterschiede zwischen den Transporter- und den Kontrollspektren (vgl. Abb.12 in 3.1). Auf der X-Achse [m/z] sind die Molekülonen eingetragen. Die Retentionszeit der Signale liegt bei 5 min.

Mit Hilfe des Tandem MS Detektors wurde daraufhin ein Produktionenspektrum des Signals bei m/z 144 generiert. Im Chromatogram des Produktionenstroms von m/z 144 tritt das Signal wieder zur erwarteten Retentionszeit (5 min) auf (Abb. 14). Darunter ist das für die Substanz, die das Signal erzeugt, spezifische Produktionenspektrum abgebildet. Unter den gewählten Fragmentierungsbedingungen treten zwei intensive Fragmente bei m/z 58 und 84, sowie eine Reihe deutlich schwächerer, z. B. bei m/z 72 und 98, auf. Außerdem detektiert man das Molekülion $[M-H]^+$ bei m/z 144.

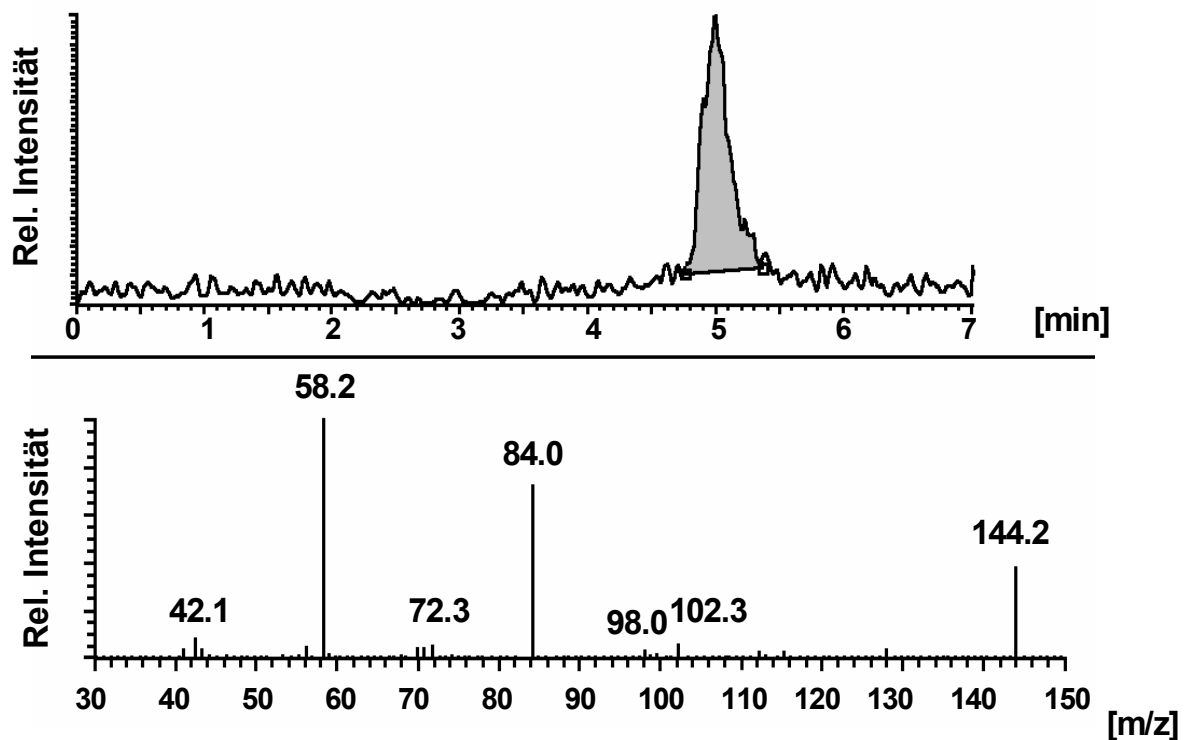


Abb. 14

Oberes Bild: Produktionenstrom von m/z 144, Bedingungen in der Kollisionszelle: 1,5 mTorr Argon, Kollisionsenergie 20 V.

Unteres Bild: Produktionenspektrum m/z 144 zum Zeitpunkt 5 min.

Innerhalb dieser Arbeit sind wie im englischen Sprachgebrauch üblich die Dezimalstellen mit einem Punkt abgetrennt worden.

Das Molekulargewicht der ungeladenen Substanz läge somit bei 143 g/mol. Die positive Ionisierung mittels Elektrospray spricht bei den meisten Biomolekülen für eine protonierbare bzw. positiv geladene Stickstofffunktion. Das Auftreten von Addukten mit Metallkationen als Ladungsträger ist ein Hinweis auf eine Carbonsäurefunktion im Molekül. Diese Informationen konnten zur Strukturaufklärung des Signals herangezogen werden. Auf Grund der relativ kleinen Molmasse war die Wahrscheinlichkeit hoch, dass das Molekül sich nur aus den vier wesentlichen Elementen Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff und Sauerstoff zusammensetzen würde. So wurden zunächst nur Summenformeln und Strukturen dieser Elemente untersucht.

Ein Kandidat, der alle Strukturmerkmale erfüllte und auch in verhältnismäßig hohen Konzentrationen im Plasma vorkommt, war das Stachydrin. Bei dieser Substanz (Abb. 15) handelt es sich um das Betain der Aminosäure Prolin. Im Organismus wird es nicht synthetisiert, sondern ist ein Pflanzeninhaltsstoff, der mit der Nahrung (z. B. Zitrusfrüchte, Beerenfrüchte) aufgenommen wird. Daher rührt auch der Gehalt dieser Substanz im Plasma (20 – 60 µmol/l). Untersuchungen haben gezeigt, dass mit der Nahrung aufgenommenes Stachydrin unverändert im Urin ausgeschieden wird. Gemessene Konzentrationen im Plasma werden von Konzentrationen im Urin reflektiert, so dass man davon ausgeht, dass Stachydrin nicht im Gewebe gespeichert wird und man ihm keine physiologische Bedeutung beimisst (Lever et al., 1994).

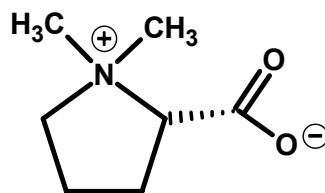


Abb. 15

Strukturformel des Stachydrins [(2S)-2-carboxy-1,1-dimethylpyrrolidinium].

Mit einem Stachydrin Standard (0,5 µmol/l) wurde dann ein Produktionenspektrum als Referenz erzeugt. Die gefundenen Fragmente entsprechen in Masse und relativer Intensität zueinander denen des Signals in der Probe (Abb. 16). Alle Ergebnisse deuteten darauf hin, dass das Signal auf m/z 144 von Stachydrin verursacht worden war. Die Verschiebung der Retentionszeit des Peaks ist auf den Einsatz einer längeren Vorsäule bei der Chromatographie in diesem Experiment zurückzuführen.

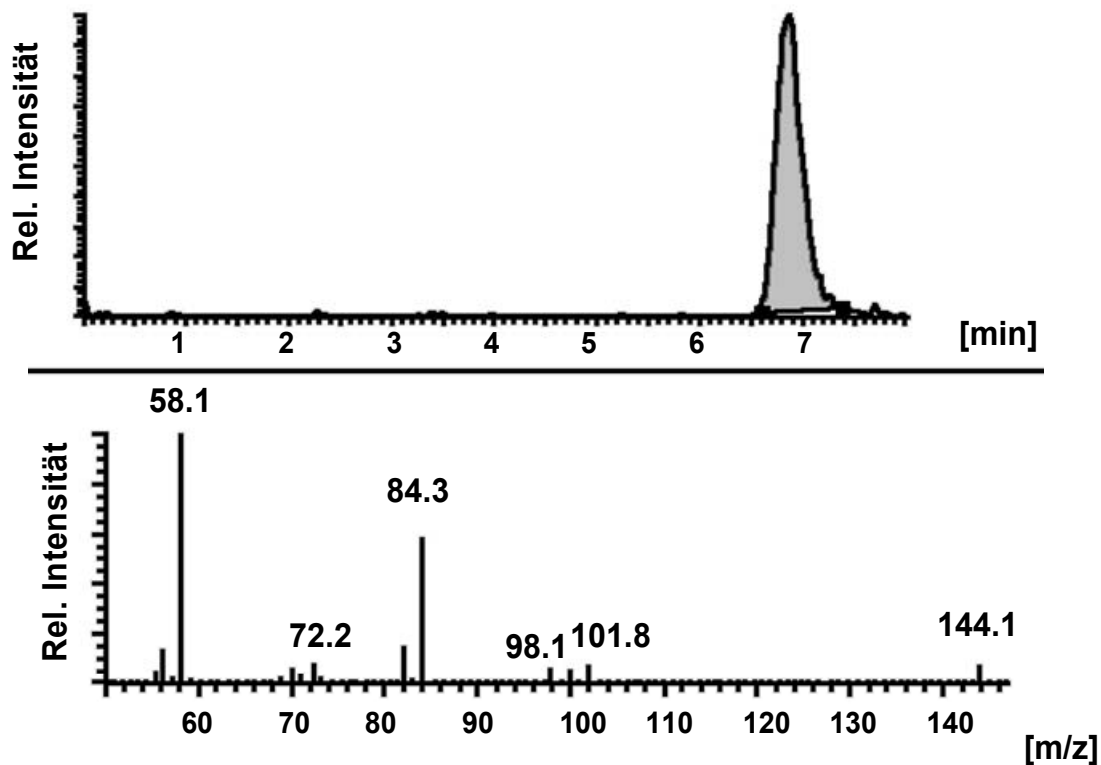


Abb. 16

Stachydrin Standard in Wasser 0,5 µmol/l.

Oberes Bild: Produktionsstrom von m/z 144, Bedingungen in der Kollisionszelle:

1.5 mTorr Argon, Kollisionsenergie 20 V.

Unteres Bild: Produktionenspektrum m/z 144 zum Zeitpunkt 6.8 min.

In Triple Quadrupol Massenspektrometern findet eine so genannte sequentielle Fragmentierung statt. In der Kollisionszelle werden nicht nur die Moleküle, sondern auch bereits gebildete Fragmente weiter fragmentiert, was die Strukturaufklärung der Fragmente erschwert. Trotzdem kann man vor allem bei verhältnismäßig kleinen Molekülen, wenn die Struktur des Moleküls $[M-H]^+$ bekannt ist, in der Regel auch den Fragmenten entsprechende Strukturen zuordnen (Abb. 17).

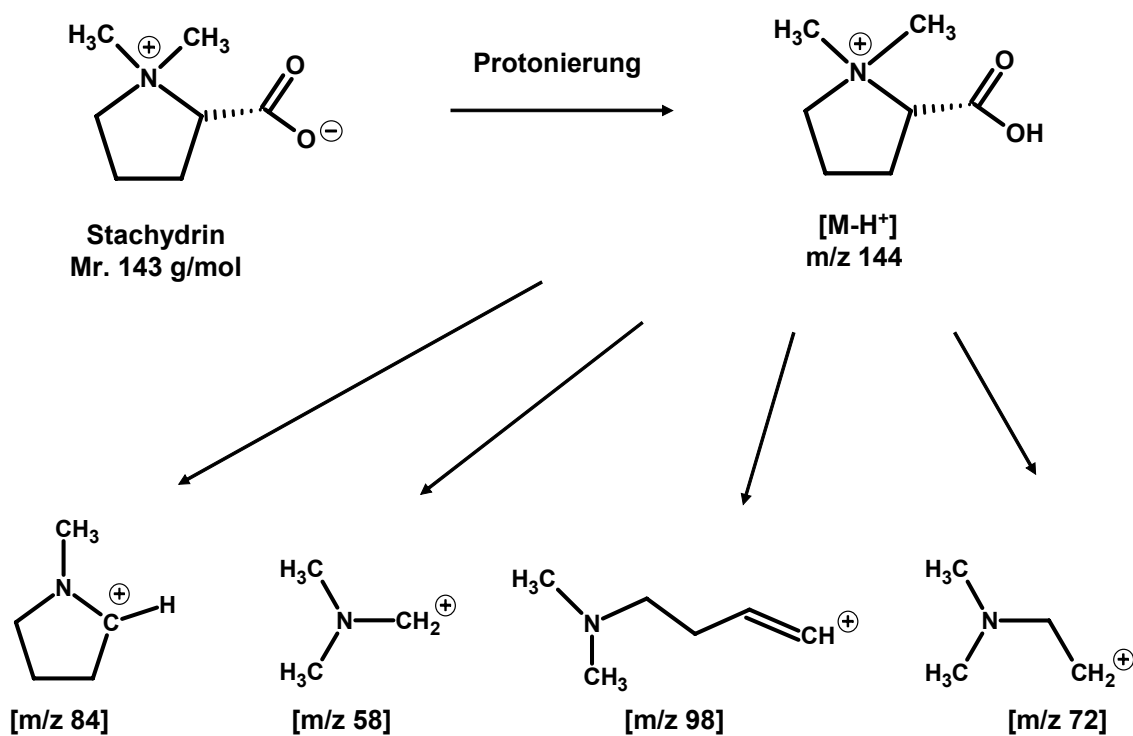


Abb. 17

Fragmentierung des Stachydrins.

Ein Aufnahmeexperiment (siehe 2.5) sollte nun zeigen, ob das beobachtete Signal durch einen spezifischen Transport über OCTN1h zustande gekommen ist (Abb. 18). Neben der FIT-OCTN1h Zelllinie wurden in diesem Versuch auch FIT-OCTN2r Zellen sowie FIT-NT Zellen als Negativkontrolle untersucht. Die Stachydrinkonzentration im Aufnahmebuffer (KRH, pH 7.4) betrug 10 µmol/l. Um möglichst initiale Aufnahmegeschwindigkeiten zu messen, wurde als Aufnahmezeit 1 min gewählt. Nach der Lyse der Zellen mit 1 ml 4 mmol/l HClO₄ wurde die Stachydrinkonzentration im Zelllysate mittels LC-MS/MS quantifiziert (siehe 2.6.6 und 2.6.7). Das Ergebnis bestätigte, dass OCTN1h Stachydrin als Substrat akzeptiert (spez. Aufnahme: 158 ± 9 pmol/min*mg Protein). Die unspezifische Aufnahme der FIT-NT Zellen lag in diesem Experiment unterhalb der Quantifizierungsgrenze (Signal-Rausch-Verhältnis mind. 3:1, bei einer Stachydrinkonzentration von 2.8 nmol/l im Zelllysate). Allerdings transportierte auch OCTN2r das Stachydrin in einem nicht unerheblichen Ausmaß (41 ± 3 pmol/min*mg Protein), so dass es sich bei der Substanz nicht um ein spezifisches Substrat für OCTN1h handelt. Nichtsdestotrotz war mit diesem Ergebnis ein neues Substrat für OCTN1 entdeckt worden. Damit wurde vor allem bestätigt,

dass die Inkubation mit komplexen biologischen Matrices und die entwickelte LC-MS Analytik erfolgreich zur Substratidentifizierung eingesetzt werden können.

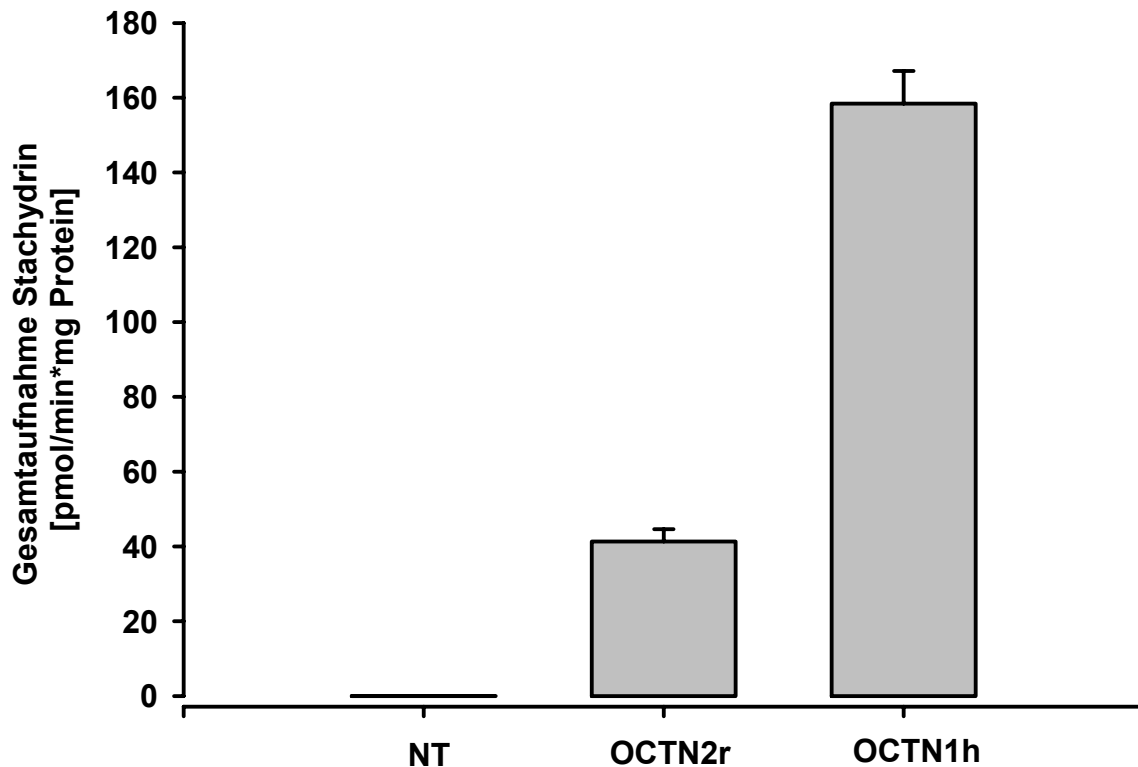


Abb. 18

Aufnahmebedingungen: Aufnahmebuffer 10 $\mu\text{mol/l}$ Stachydrin in KRH, Aufnahmezeit 1 min, 37° C. Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM), n = 3.

3.3 Vergleich der Quantifizierungsmethoden LC-MS/MS und Flüssigszintillationszählung

Bei der funktionellen Charakterisierung von OCTN1h wurden zur Quantifizierung der Substrataufnahmen in die Zellen sowohl radioaktiv markierte Substrate und Flüssigszintillationszählung als auch native Substanzen und LC-MS/MS eingesetzt. Je nach Quantifizierungsmethode gab es Unterschiede im Aufnahmeexperiment, z. B. in der Lysetechnik der Zellen. In einem Kontrollexperiment sollte geprüft werden, ob die Ergebnisse der beiden Methoden gleich sind. Hierfür wurden zwei Aufnahmeexperimente mit EMTh, der stabil in HEK-293 Zellen exprimiert wurde, durchgeführt. Das Neurotoxin MPP⁺ wurde als Substrat eingesetzt. Dysprocynium24

(D24) ist ein potenter und spezifischer Inhibitor des EMT mit einem Ki-Wert von 15 nmol/l (Russ et al., 1993b; Gründemann et al., 1998b). Die in diesem Experiment eingesetzte Konzentration des D24 führt zu einer kompletten Hemmung der spezifischen MPP⁺ Aufnahme über EMTh, so dass das dort gemessene Niveau der unspezifischen Aufnahme, z. B. über Diffusion, entspricht. Zur Quantifizierung wurde je eine der beiden Analysemethoden angewandt. Die Ergebnisse beider Quantifizierungen entsprachen einander ohne signifikanten Unterschied ($p > 0.05$) (Abb. 19). Es gibt somit auch keine Abweichungen bei der Freisetzung des Zellinhaltes mit einem Detergenz (0.1 %Vol. Triton X-100 in 5 mmol/l Tris-HCl, pH 7.4) für die Flüssigszintillationszählung oder mit einer Säure (4 mmol/l HClO₄) für die LC-MS/MS Analytik. Mit beiden Methoden gewonnene Daten sind direkt vergleichbar.

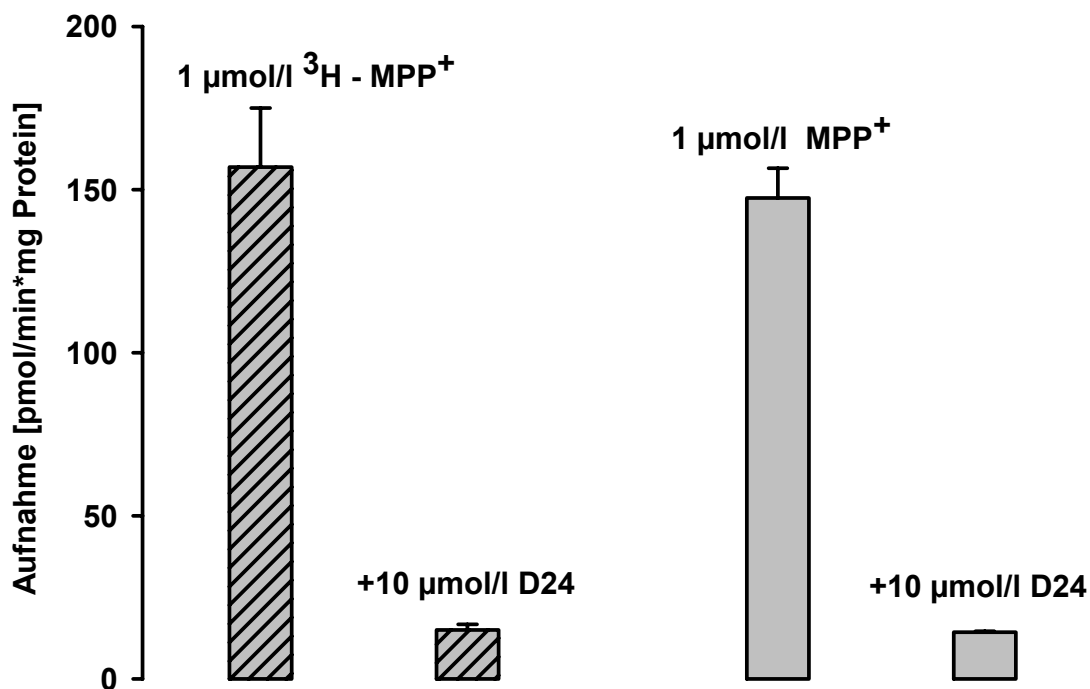


Abb. 19

Aufnahmebedingungen für beide Versuche: 1 µmol/l MPP⁺ mit und ohne spezifischem Hemmstoff Dysprocynium24, Aufnahmezeit: 1 min, 37° C. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n = 3.

Schraffierte Balken: Radio Tracer Assay, Zellyse mit Detergenz (0.1 %Vol. Triton X-100 in 5 mmol/l Tris-HCl, pH 7.4).

Unschraffierte Balken: LC-MS/MS Analytik, Zellyse mit 4 mmol/l HClO₄.

Statistische Auswertung mittels T-Test (Test auf Normalverteilung: positiv, Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha \leq 0.05$): spezifische Aufnahmen $p = 0.67$, unspezifische Aufnahmen $p = 0.72$.

3.4 Proteinbestimmung für die LC-MS/MS Analytik

Die spezifische Aufnahme eines Substrates ist direkt proportional zur Anzahl der Transporter in der Zellmembran. Da dies eine schwer zugängliche Größe ist, werden die Aufnahmezeiten auf die individuell ermittelte Proteinmenge der Probe bezogen. Während bei der Flüssigszintillationszählung das detergentzhaltige Zelllysate zur Proteinbestimmung mit einem BCA-Test (Smith et al., 1985) eingesetzt werden kann, ist dies für die saure Lösung der HClO_4 -Lyse nicht der Fall. Daher wurde für die LC-MS/MS Quantifizierung getestet, ob der Prolingehalt einer Probe eine der Proteinmenge proportionale Größe ist und ob es möglich ist darüber schließlich den Proteingehalt zu ermitteln. Für die Untersuchung wurden FIT-OCTN1h Zellen in verschiedenen Anzahlen ausgesät, um unterschiedliche Zelldichten und somit Proteinmengen pro Schälchen zu erzielen. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen zum einen Teil mit 4 mmol/l HClO_4 und zum anderen mit Triton X-100 in 5 mmol/l Tris-HCl, pH 7.4 lysiert. Letztere Proben wurden dem BCA-Test zur Bestimmung der Proteinmenge unterzogen. Bei ersteren wurde der Prolingehalt mittels LC-MS/MS bestimmt. Zwischen dem Prolingehalt und der Proteinmenge gibt es einen linearen Zusammenhang (Abb. 20). Diese Proportionalität wurde für die Proteinbestimmung der HClO_4 -Proben ausgenutzt. Für jedes Aufnahmeexperiment wurde eine entsprechende Eichreihe für die Beziehung zwischen der Proteinmenge pro Schälchen und dem Prolingehalt erstellt und darüber der Proteingehalt der LC-MS/MS Proben bestimmt. Eine aktuelle Kalibration dieses Zusammenhanges war auf Grund der schwankenden Sensitivität der LC-MS/MS Detektion notwendig.

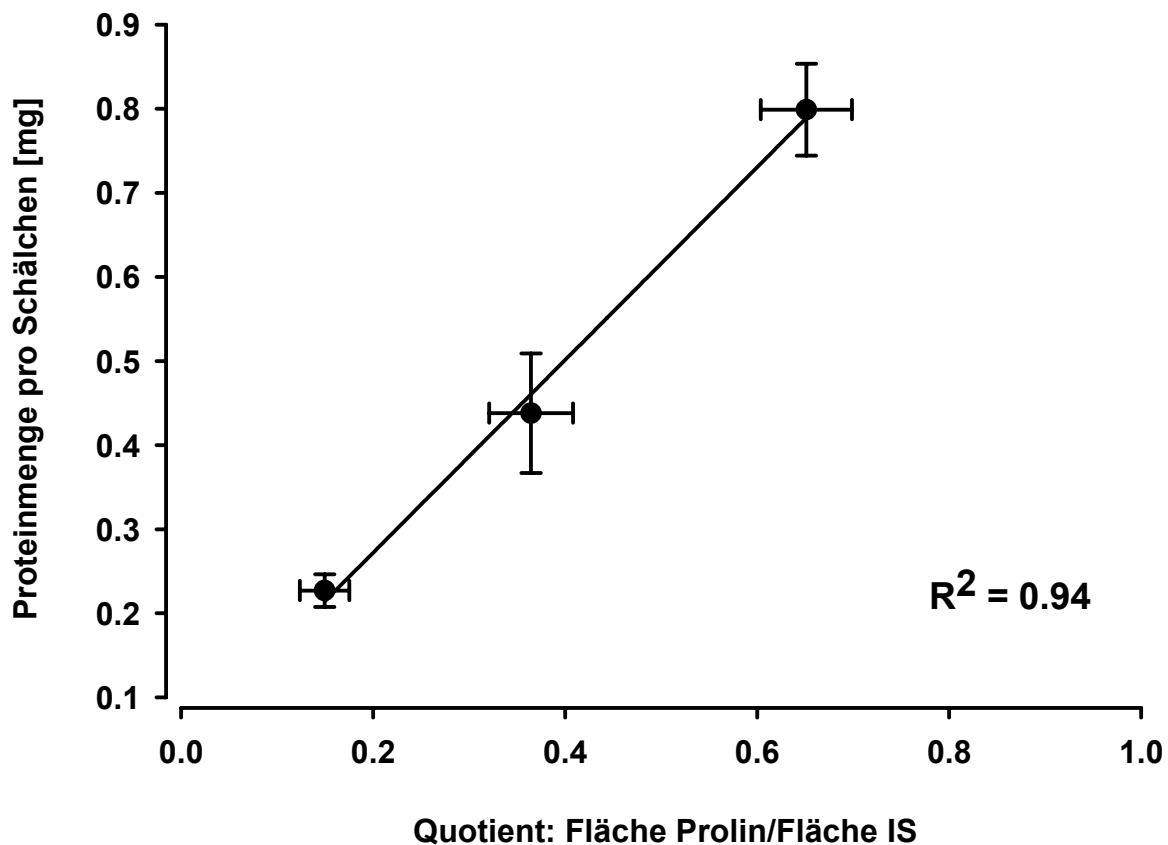


Abb. 20

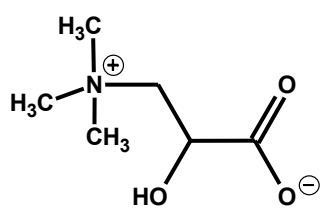
Zur Bestimmung der Proteinmenge wurden die Zellen mit 0.1 %Vol. Triton X-100 in 5 mmol/l Tris-HCl, pH 7.4 lysiert und dem BCA-Test unterzogen. Der Prolingehalt wurde nach saurer Lyse mittels LC-MS/MS bestimmt und ist hier als Quotient zum internen Standard der Chromatographie (1,8 $\mu\text{mol/l}$ MPP⁺) aufgetragen. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n = 6.

3.5 Funktionelle Charakterisierung von OCTN1h

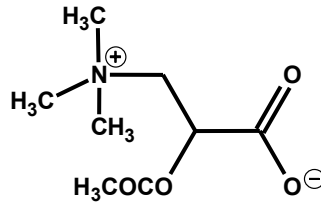
3.5.1 Substratspektrum von OCTN1h

Nachdem es gelungen war, mittels der massenspektrometrischen Analyse von Zelllysaten und der „Difference Shading“ Auswertung der Spektren ein neues Substrat für OCTN1h zu identifizieren, schloss sich nun die weitere funktionelle Charakterisierung des Transporters an. Um das Substratspektrum von OCTN1h

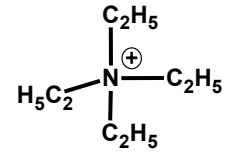
aufzudecken, wurde der Transport von einer Reihe strukturverwandter Substanzen des Stachydrins untersucht, so dass Stachydrin als Leitstruktur fungierte (Abb. 21).



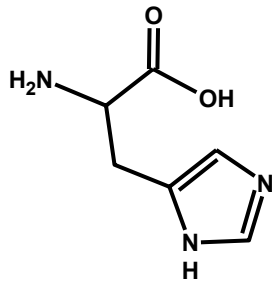
Carnitin



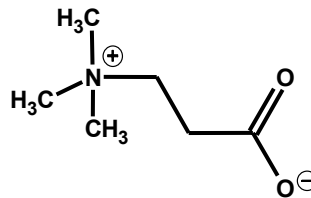
O-Acetylcarnitin



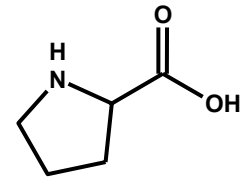
Tetraethylammonium



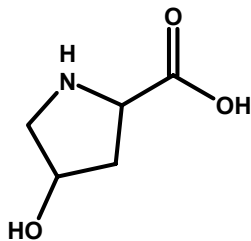
Histidin



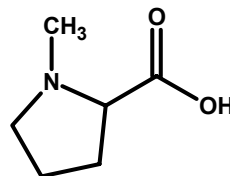
γ-Butyrylbetain



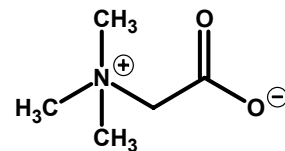
Prolin



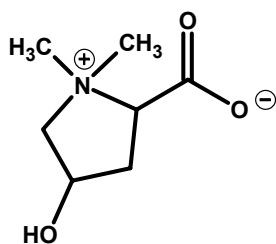
4-Hydroxyprolin



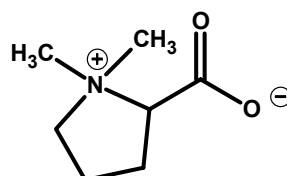
N-Methylprolin



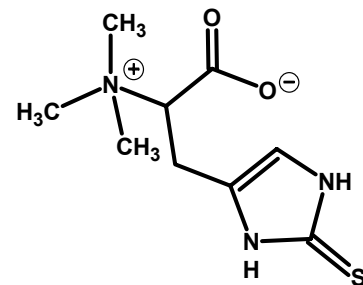
Glycinbetain



Betonicin



Stachydrin



Ergothionein

Abb. 21

Strukturformeln der auf Transport durch OCTN1h und OCTN2r untersuchten Substanzen.

Eingesetzt wurden beschriebene Substrate von OCTN1 wie Carnitin (Xuan et al., 2003) und Tetraethylammonium (Tamai et al., 1997) darüber hinaus zwei Derivate des Carnitins das O-Acetylcarnitin und das γ -Butyrylbetain. Bei letzterem fehlt die Hydroxylgruppe am C2. Außerdem wurden auch die dem Stachydrin zugrunde liegende Aminosäure Prolin und zwei physiologische Derivate des Prolins das 4-Hydroxyprolin und das N-Methylprolin getestet. Die Überlegung, dass es sich bei der permanent positiv geladenen Betaingruppe um ein Strukturmerkmal der guten Substrate von OCTN1 handeln könnte, lag nahe und so wurden weitere Aminosäurebetainderivate mit physiologischer Bedeutung ausgewählt, z. B. das einfachste vorstellbare Betain, das der Aminosäure Glycin. Beim Betonicin handelt es sich um das Betain des 4-Hydroxyprolins. Das Ergothionein ist ein Betainderivat der Aminosäure Histidin, bei dem der Imidazolring am C2 einen Schwefelsubstituenten trägt. Untersucht wurde auch die dem Ergothionein zugrunde liegende Aminosäure. Charakteristischerweise liegt Ergothionein in einem tautomeren Gleichgewicht zwischen Thiol- und Thionform vor, wobei unter physiologischen Bedingungen das Gleichgewicht auf der Seite der Thion-Form liegt (Hartman, 1990) (Abb. 22).

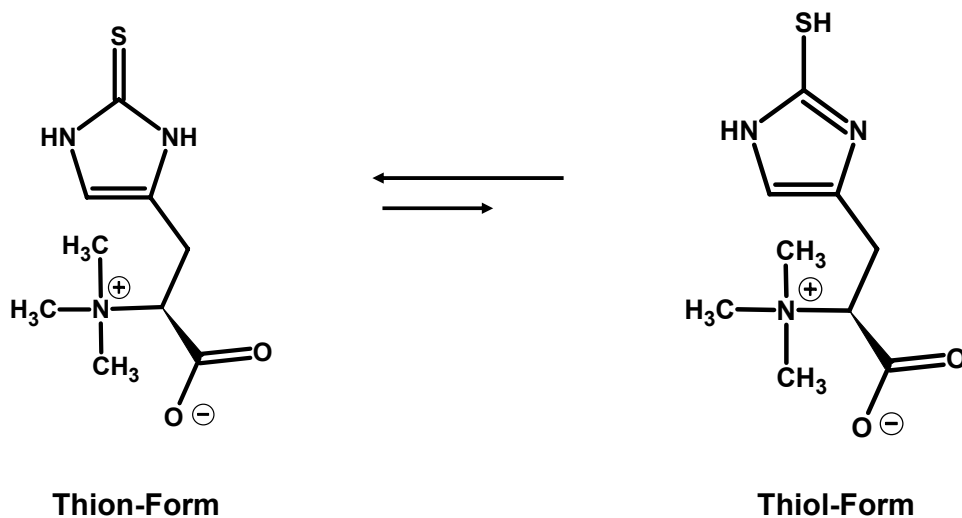


Abb. 22

Ergothionein [(1S)-1-carboxy-*N,N,N*-trimethyl-2-(2-thioxo-2,3-dihydro-1*H*-imidazol-4-yl)ethanaminium], Tautomerie.

Für die Aufnahmeexperimente wurden zum Teil die nativen unmarkierten Verbindungen eingesetzt, da sie im Zelllysate mit der entsprechend entwickelten LC-MS/MS Methode quantifiziert werden konnten. Dies ermöglichte eine hohe Flexibilität in der Auswahl und eine rasche Durchführung der Versuche. Der Einsatz der massenspektrometrischen Detektion war allerdings nicht möglich, wenn Substanzen als Substrate untersucht werden sollten, die selbst Bestandteile des Zellstoffwechsels sind und in hohen Konzentrationen in den Zellen vorkommen (z. B. Aminosäuren, Glycinbetain). In solchen Fällen ist der Hintergrund bei den Messungen zu hoch, um akkurate Aufnahmeleistungen zu bestimmen. Dort wurden klassisch Radiotracer Assays eingesetzt.

Bei der LC-MS/MS Analytik muss prinzipiell ein möglicher endogener Gehalt eines physiologischen Substrates in den Zellen berücksichtigt werden. Zur Bestimmung eines endogenen Gehaltes wurden die Zellen mit physiologischem Puffer (KRH) ohne Substrat inkubiert. Ein solcher Wert muss dann abgezogen werden, um die spezifische Aufnahme zu erhalten. Die unspezifische Aufnahme eines Substrates wurde in einem parallelen Ansatz mit FIT-NT Zellen ermittelt und falls vorhanden zur Bestimmung der spezifischen Aufnahme ebenfalls subtrahiert. Eine solche unspezifische Aufnahme findet z. B. durch Diffusion oder Endozytose statt.

Für OCTN1h wurde ein Vergleich zwischen bisher beschriebenen Substraten und den neu entdeckten angestrebt. Daneben wurde parallel auch jeweils der Transport für OCTN2r ermittelt. So sollte gezeigt werden, inwiefern sich die Substratspektren der beiden OCTNs überschneiden. Durch die Aufnahmezeit von 1 min wurden initiale Aufnahmeleistungen bestimmt (siehe 3.5.2, Abb. 28). Der Vergleich wurde anhand der Transporteffizienzen, bzw. der Clearance-Werte, vollzogen. Analog zur klassischen Enzymkinetik wird die Effizienz des Transportes durch den Quotienten aus der Wechselzahl (turnover number k_{cat}) und der Affinität (K_m) zum Ausdruck gebracht. Da außerdem gilt, dass $V_{max} = k_{cat} * T_{total}$, kann man beim Vergleich mehrerer Substrate an einem Transporter die Transporteffizienz durch V_{max}/K_m (V_{max} = maximale Aufnahmegeschwindigkeit) berechnen, wenn man dabei voraussetzt, dass die Gesamtanzahl der Transportermoleküle T_{total} konstant ist. Dies ist eine gängige Annahme für ein Überexpressionsmodell, wie das hier eingesetzte, da die Expression des Transporters von einem starken viralen Promotor kontrolliert wird.

Die initiale Aufnahmegeschwindigkeit ist nach der Michaelis-Menten-Gleichung (siehe 3.5.2) der Transporteffizienz direkt proportional, wenn die Substratkonzentration deutlich kleiner ist als der K_m -Wert. Zur Berechnung der Clearance wird die initiale Aufnahmegeschwindigkeit durch die Substratkonzentration dividiert (Gründemann et al., 1999).

Der Erwartung entsprechend transportiert OCTN2r mit hoher Effizienz Carnitin und auch die kurzkettigen Acylcarnitine wie Acetylcarnitin gehören zum Substratspektrum des Transporters (Abb. 23) (Tamai et al., 1998; Ohashi et al., 1999). Auf der anderen Seite ist die Transporteffizienz von OCTN1h für diese Substanzen vergleichsweise gering. Weder für TEA, das für die nicht-neuronalen Monoamintransporter OCT1 und OCT2 ein wichtiges Substrat darstellt (Gründemann et al., 1999), noch für die Aminosäure Histidin zeigen die beiden OCTNs hohe Transporteffizienzen. Gegenüber Carnitin fehlt γ -Butyrylbetain eine Hydroxylgruppe, trotzdem wird es von OCTN2r noch effizient transportiert.

Die Transporteffizienz von OCTN2r lässt bei Strukturen mit einem Prolingrundgerüst (4-Hydroxyprolin, N-Methylprolin) im Vergleich zu OCTN1h erheblich nach. Diese Substrate werden von OCTN1h besser transportiert als von OCTN2r. Hierbei macht die Aminosäure Prolin selbst noch einmal eine Ausnahme, da die Transporteffizienz beider Transporter wieder annähernd ausgeglichen ist. Bekannterweise soll OCTN2h mit Glycinbetain kaum interagieren (Tamai et al., 1998). Unsere Ergebnisse bestätigen dies und zeigen für OCTN1h einen effizienteren Transport als für OCTN2r.

Bei den Transporteffizienzen für Betonicin und Stachydrin wird deutlich, welcher erhebliche positive Einfluss die Einführung der beiden Methylgruppen am Stickstoff auf den Transport dieser Substanzen durch OCTN1h hat, vergleicht man sie mit 4-Hydroxyprolin und Prolin. Obwohl schon eine klare Präferenz von OCTN1h für diese beiden Substanzen vorliegt, transportiert doch auch OCTN2r sie mit nicht vernachlässigbarer Effizienz.

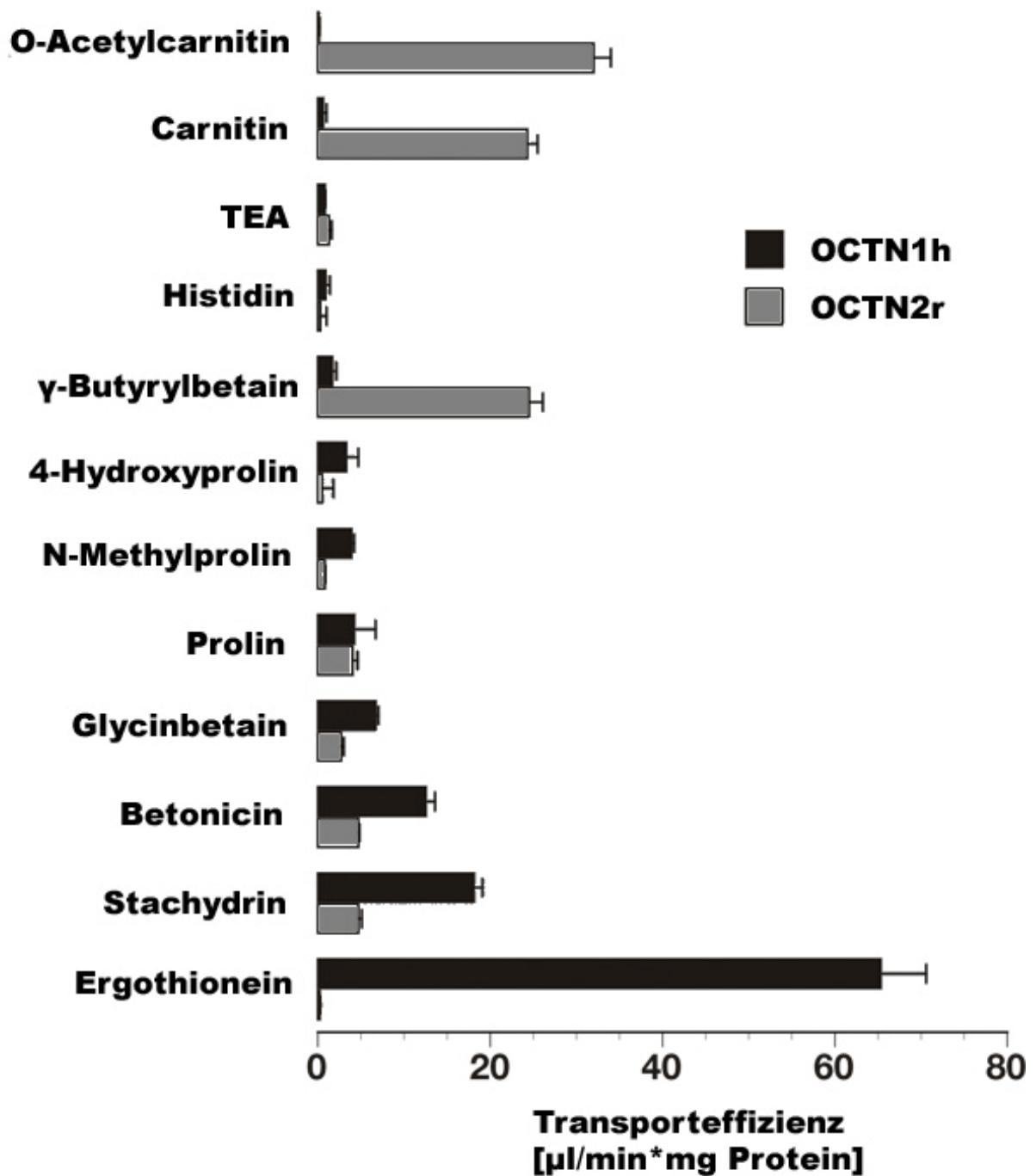


Abb. 23

Die experimentellen Bedingungen zur Aufnahme der dargestellten Substrate waren für die eingesetzten Zelllinien (FIT-OCTN1h, FIT-OCTN2r, FIT-NT) jeweils identisch: 1 min, 37° C. Die Substratkonzentrationen der Aufnahmelösungen betragen für die LC-MS/MS Analytik 10 μmol/l (γ-Butyrylbetain, N-Methylprolin, Betonicin, Stachydrin und Ergothionein) und verbleibend für die Radiotracer Assays 0.1 μmol/l. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n = 3. Die Transporteffizienzen von oben nach unten aufsteigend für OCTN1h geordnet.

Für das Ergothionein weist OCTN1h mit Abstand die höchste Transporteffizienz auf ($65 \pm 5 \mu\text{l}/\text{min} \cdot \text{mg Protein}$) (Abb. 23). Diese ist fast um den Faktor vier höher als für das Stachydrin ($18 \pm 1 \mu\text{l}/\text{min} \cdot \text{mg Protein}$) und liegt um den Faktor 100 über den bisher beschriebenen Substraten TEA und Carnitin ($0.8 \pm 0.1 \mu\text{l}/\text{min} \cdot \text{mg Protein}$ bzw. $0.6 \pm 0.4 \mu\text{l}/\text{min} \cdot \text{mg Protein}$). Auf der anderen Seite wird Ergothionein vom engverwandten OCTN2r praktisch nicht mehr als Substrat akzeptiert ($0.2 \pm 0.1 \mu\text{l}/\text{min} \cdot \text{mg Protein}$). In diesem Fall geht daher eine hohe Transporteffizienz augenscheinlich mit einer hohen Spezifität des OCTN1h für das Substrat einher. Dies unterscheidet das Ergothionein essentiell von den anderen getesteten Substanzen und lässt eine genauere Untersuchung dieses Substrates sinnvoll erscheinen.

3.5.2 Ergothionein ist das physiologische Substrat von OCTN1h

Der Transport des Ergothioneins über OCTN1h wurde genauer charakterisiert, um die Ausnahmestelle dieses Substrates im dargestellten Spektrum zu untersuchen. Bei der Bestimmung des K_m -Wertes wird mit steigenden Substratkonzentrationen in der Aufnahmelösung letztendlich eine Sättigung des spezifischen Transportes erzielt. Die Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Aufnahmegeschwindigkeit erreicht wird, dient als Maß für die Affinität des Transporters für das Substrat (K_m -Wert). Entsprechend den Regeln der Enzymkinetik folgt der Kurvenverlauf der Michaelis-Menten-Funktion ($v = V_{\text{max}} \cdot [S] / K_m + [S]$, v = Aufnahmegeschwindigkeit, V_{max} = maximale Aufnahmegeschwindigkeit, K_m = Michaelis-Menten-Konstante, Substratkonzentration bei Halbsättigung des Transporters, $[S]$ = Substratkonzentration).

Neben FIT-OCTN1h Zellen wurden FIT-NT Zellen eingesetzt, um die unspezifische Ergothioneinaufnahme zu ermitteln. Zellen, die OCTN1 exprimieren, weisen von sich aus einen geringen endogenen Ergothioneingehalt vermutlich durch Aufnahme der Substanz aus dem Wachstumsmedium auf. Zur Bestimmung desselben wurden die FIT-OCTN1h Zellen nur mit substratfreiem Puffer inkubiert. Die Quantifizierung im Zelllysate erfolgte mittels LC-MS/MS. Die Affinität von OCTN1h für Ergothionein wurde direkt bestimmt und beträgt $21 \mu\text{mol/l}$ (95% Konfidenzintervall: $15 - 27 \mu\text{mol/l}$) (Abb. 24). Sie ist um den Faktor 20 höher als für die bisher dahingehend untersuchten Substrate TEA ($K_m = 436 \mu\text{mol/l}$) und Carnitin ($K_m = 413 \mu\text{mol/l}$) (Tamai et al., 1997;

Xuan et al., 2003), liegt aber in demselben Bereich wie die Affinität von OCTN2h für sein physiologisches Substrat Carnitin ($4 \pm 0.6 \mu\text{mol/l}$) (Tamai et al., 1998). Das Diagramm nach Eadie-Hofstee zeigt einen linearen Zusammenhang und spricht somit für eine einzelne Substratbindungsstelle am Transporter (Abb. 25).

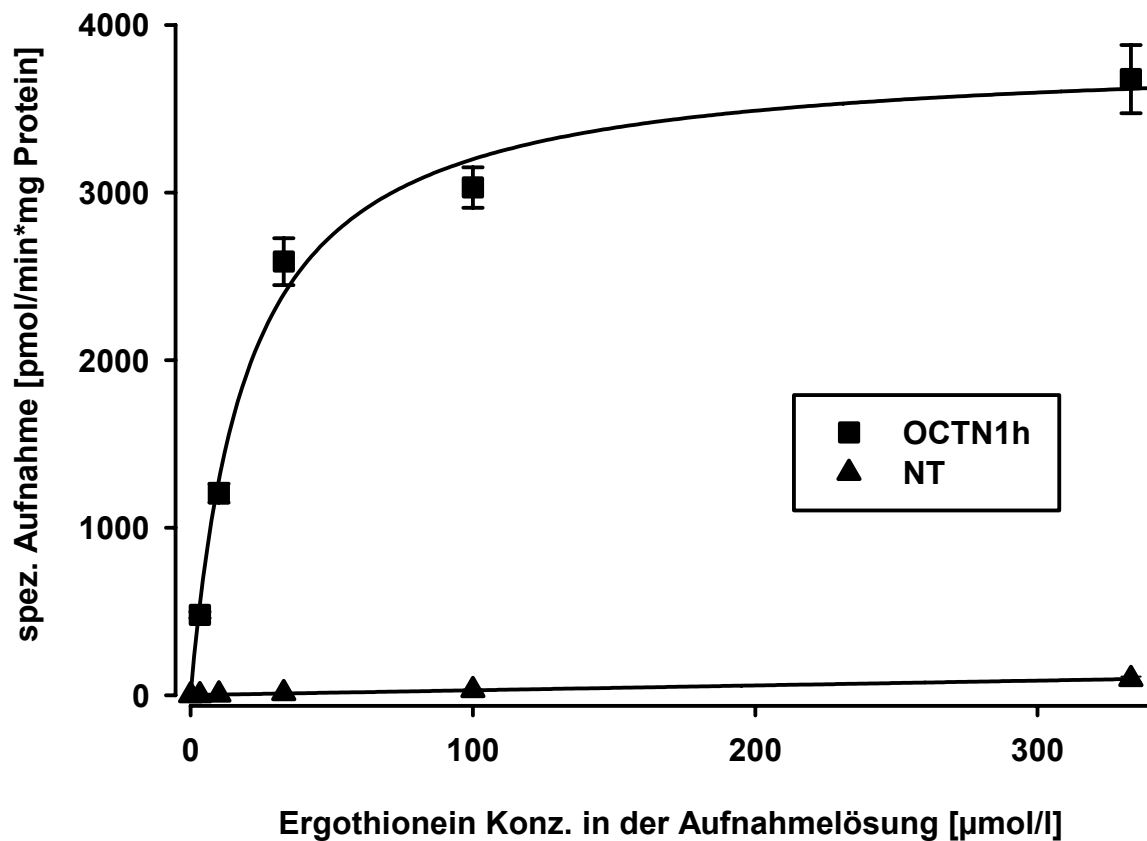


Abb. 24

Sättigungskurve für die Ergothioneinaufnahme (1 min, 37°C) durch OCTN1h. Parallel wurde der endogene zelluläre Gehalt des Ergothioneins bestimmt und subtrahiert. Die unspezifische Aufnahme (NT = nicht transfizierte Zellen) nimmt linear mit der Substratkonzentration zu (Steigung der Geraden: $0.3 \text{ pmol/min*mg Protein}$, $R^2 = 0.99$) und ist ebenfalls subtrahiert worden. V_{max} beträgt für OCTN1h $3.7 \pm 0.2 \text{ nmol/min*mg Protein}$. Dargestellt und angegeben sind Mittelwerte und SEM, $n = 3$.

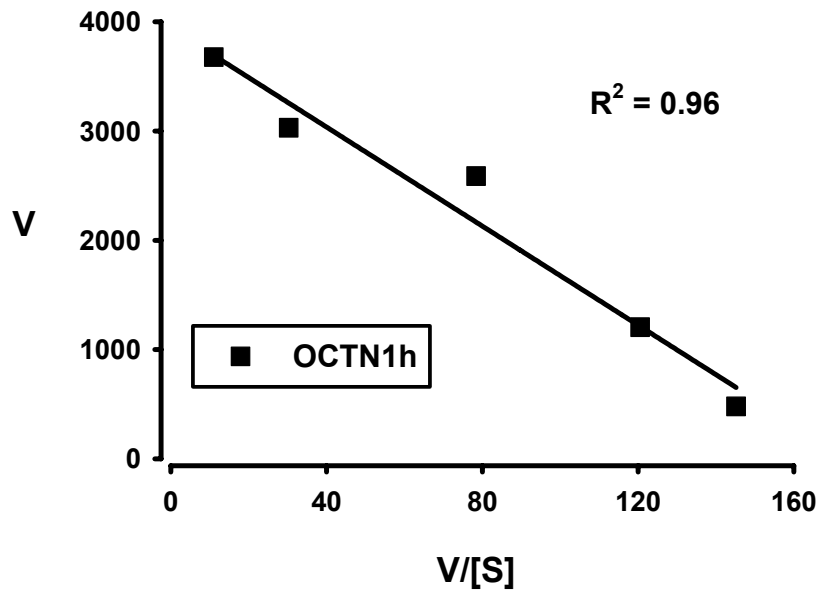


Abb. 25

Eadie-Hofstee-Linearisierung der Michaelis-Menten-Funktion für die Sättigungskinetik von Ergothionein an OCTN1h durch Auftragen von v = Aufnahmegeschwindigkeit (pmol/min*mg Protein) gegen $v/[S]$, $[S]$ = Substratkonzentration ($\mu\text{mol/l}$). Dargestellt sind Mittelwerte, $n = 3$.

Der K_m -Wert des Stachydrins für den humanen OCTN1 konnte aus einem Hemmexperiment abgeleitet werden, bei dem die Betonicinaufnahme über OCTN1h mit steigenden Stachydrinkonzentrationen in der Aufnahmelösung kompetitiv gehemmt wurde (Abb. 26). Der aus dem sigmoidalen Kurvenverlauf resultierende IC_{50} -Wert (Hemmstoffkonzentration, bei der 50% Hemmung des Transportes erzielt wird) entspricht unter der Annahme nicht sättigender Betonicinkonzentrationen dem K_i -Wert (Cheng and Prusoff, 1973). Der K_i -Wert, der dem K_m -Wert identisch ist, quantifiziert die Affinität des Transporters für die untersuchte Verbindung bzw. deren Hemmpotenz.

Die Affinität von OCTN1h für Stachydrin ist demnach mit $270 \mu\text{mol/l}$ (95% Konfidenzintervall: $210 - 350 \mu\text{mol/l}$) deutlich geringer als für Ergothionein. Der niedrige K_m -Wert des OCTN1h für Ergothionein führt dazu, dass unsere Untersuchungen zur Transporteffizienz von Ergothionein mit einer Substratkonzentration von $10 \mu\text{mol/l}$ unter teilweiser Sättigung stattfanden (siehe 3.5.1), so dass die Leistung des Transporters für diese Substanz unterschätzt wurde. Zieht man zur Berechnung V_{max}/K_m heran, so liegt die Transporteffizienz bei $176 \mu\text{l/min*mg Protein}$, also fast zehnmal so hoch wie der unter 3.5.1 angegebene Wert für Stachydrin.

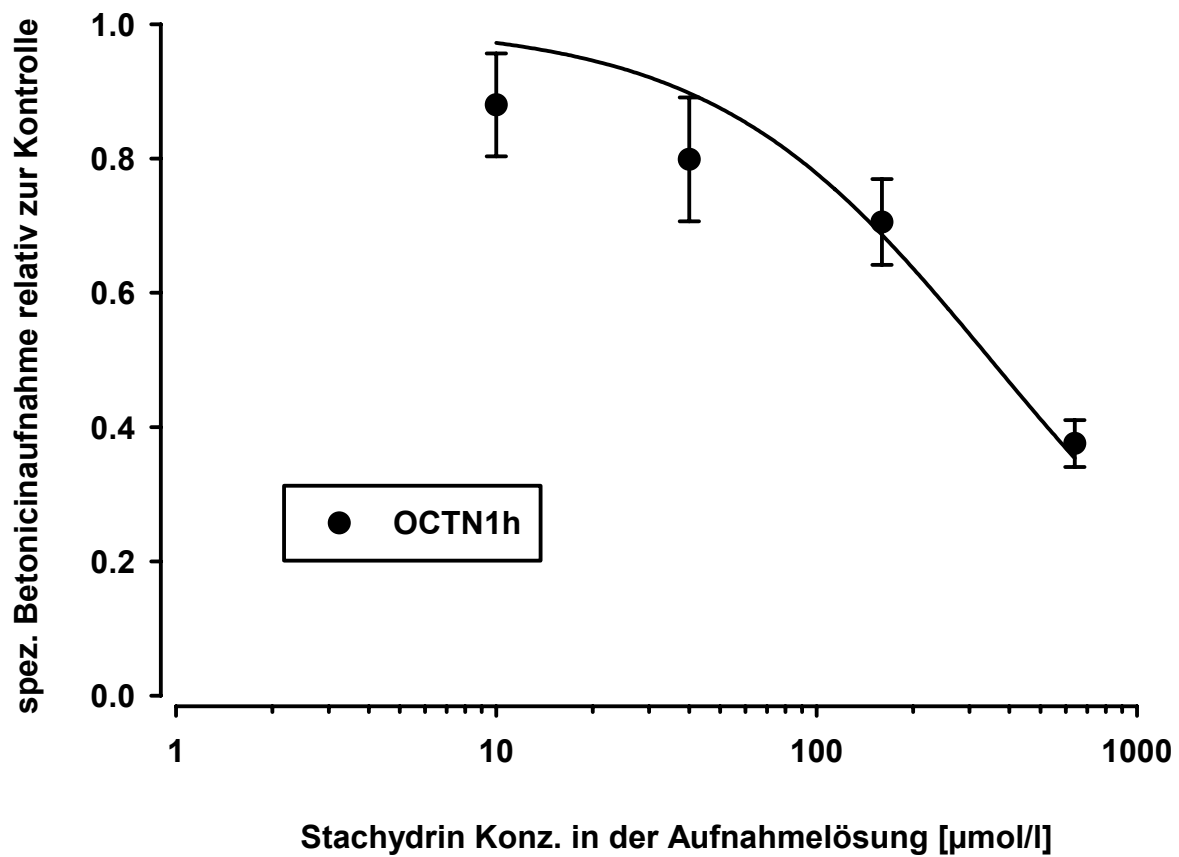


Abb. 26

Aufnahmebedingungen: 1 min, 37° C, Betonicinkonzentration in der Aufnahmelösung 100 µmol/l. Die spezifischen Aufnahmeraten des Betonicins sind relativ zur Kontrolle ohne Stachydrin aufgetragen. Als Modell für die kompetitive Hemmung wurde eine Hill-Funktion (logistische Funktion mit drei Parametern: $y = a/(1+(x/x_0)^b)$, a und b (Hillkoeffizient) = 1) eingesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n = 3.

Bei der Betrachtung des Zeitverlaufes der spezifischen Aufnahmen von Ergothionein und Stachydrin über OCTN1h wird der erhebliche Unterschied im Transport beider Substanzen noch einmal besonders deutlich (Abb. 27). Mit einer extrazellulären Ergothioneinkonzentration von 10 µmol/l wurde nach 60-minütiger Inkubation im Gleichgewicht eine intrazelluläre Konzentration von 790 ± 14 µmol/l erreicht (berechnet mit einem intrazellulären Wasservolumen von 6.7 µl/mg Protein der HEK-293-Zellen) (Martel et al., 1996). Dies entspricht einer Anreicherung in den Zellen um den Faktor 80 gegenüber dem Außenmedium, während bei Stachydrin nur der Faktor 8 erreicht wird (82 ± 1 µmol/l). Zellen, die OCTN1h nicht exprimieren, sind praktisch impermeabel für Ergothionein mit einer intrazellulären Konzentration von 2.3 ± 0.03

µmol/l nach 60 Minuten. Darüber hinaus zeigt der Zeitverlauf, dass die bisher eingesetzte Aufnahmezeit von 1 min zur Erfassung initialer Aufnahmezeiten geeignet ist, da die Kurven für Ergothionein bis 5 min und für Stachydrin bis 3 min annähernd linear verlaufen (Abb. 28).

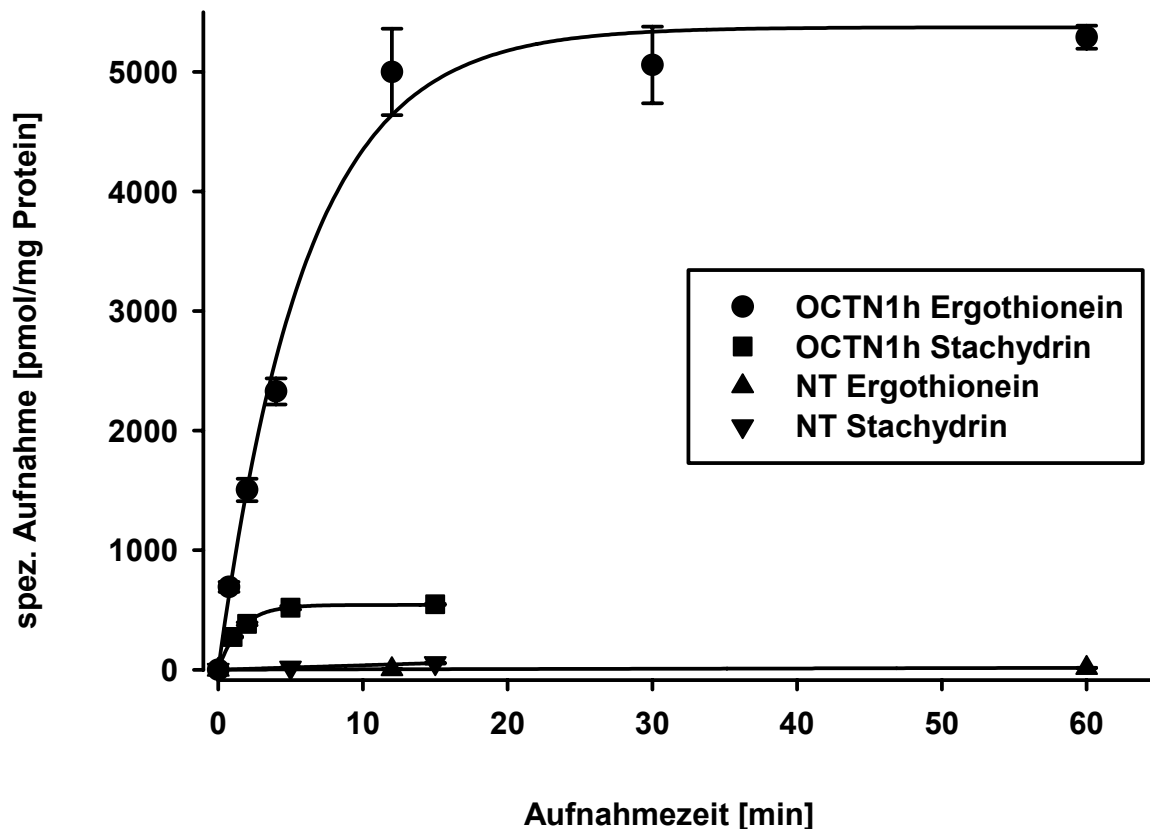


Abb. 27

Zeitverlauf der spezifischen Aufnahme von Ergothionein und Stachydrin über OCTN1h. Aufnahmebedingungen: je 10 µmol/ Substratkonzentration, 37° C, über die angegebenen Zeiträume. Zur Bestimmung der unspezifischen Aufnahme wurden FIT-NT Zellen eingesetzt, sie wurde anschließend subtrahiert. Für Ergothionein wurde auch der endogene Gehalt ermittelt und abgezogen. Eine Exponentialfunktion basierend auf einem Ein-Kompartiment-Modell wurde für den Zeitverlauf der Aufnahmen angewandt, um die experimentellen Daten für die spezifische und die unspezifische Aufnahme zu beschreiben: $y = a * (1 - e^{-bx})$ hierbei entspricht a dem Quotienten der Geschwindigkeitskonstanten k_{in}/k_{out} und b entspricht k_{out} (Russ et al., 1992). Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n = 3.

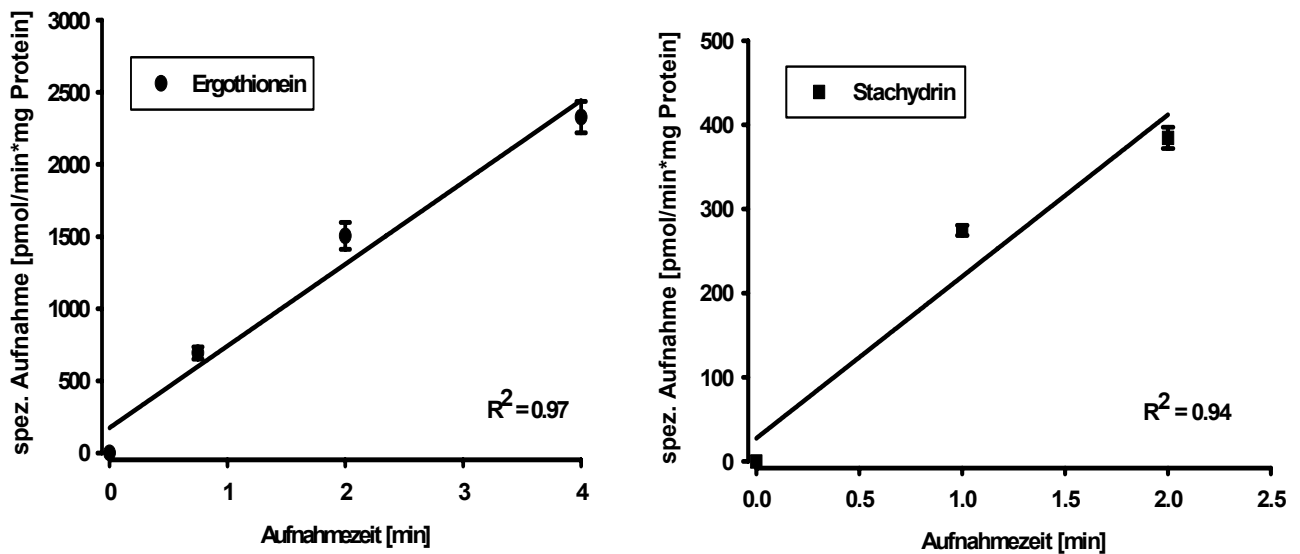


Abb. 28

Initiale Aufnahmen der Zeitverläufe für Ergothionein und Stachydrin über OCTN1h. Anhand der Steigungen dieser Geraden wird der Unterschied in der initialen Aufnahmegeschwindigkeit des Ergothioneins (567 pmol/min*mg Protein) und des Stachydrins (192 pmol/min*mg Protein) über OCTN1h deutlich. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n = 3.

Während der Zeitverlauf unterstrich wie schnell und effizient das Ergothionein in den Zellen angereichert wird, konnte mit einem Effluxexperiment an OCTN1h gezeigt werden, dass die Substanz die Zellen auch praktisch nicht mehr verlässt. Hierfür wurden die Zellen über einen gewissen Zeitraum mit dem Substrat vorinkubiert. Anschließend wurde das überstehende Medium durch substratfreien Puffer ersetzt und der Efflux über bestimmte Zeiträume untersucht. Quantifiziert wurde der verbleibende intrazelluläre Gehalt (Abb. 29). Beim Stachydrin sank die intrazelluläre Konzentration in zehn Minuten auf weniger als 20% des Ausgangswertes ab, die Substanz verlässt die Zellen also sehr schnell wieder. Es gehört zu den charakteristischen Eigenschaften von Transportern, nicht nur der SLC22 Familie, dass sie in der Lage sind, ihre Substrate in beide Richtungen zu transportieren (Busch et al., 1996; Kekuda et al., 1998). Auch für OCTN1h ist ein bidirektionaler Transport von TEA gezeigt worden (Tamai et al., 1997; Yabuuchi et al., 1999). Was für das Stachydrin bei OCTN1h augenscheinlich auch so zutrifft, kann beim Ergothionein kaum beobachtet werden. Es wird in den Zellen stark zurückgehalten.

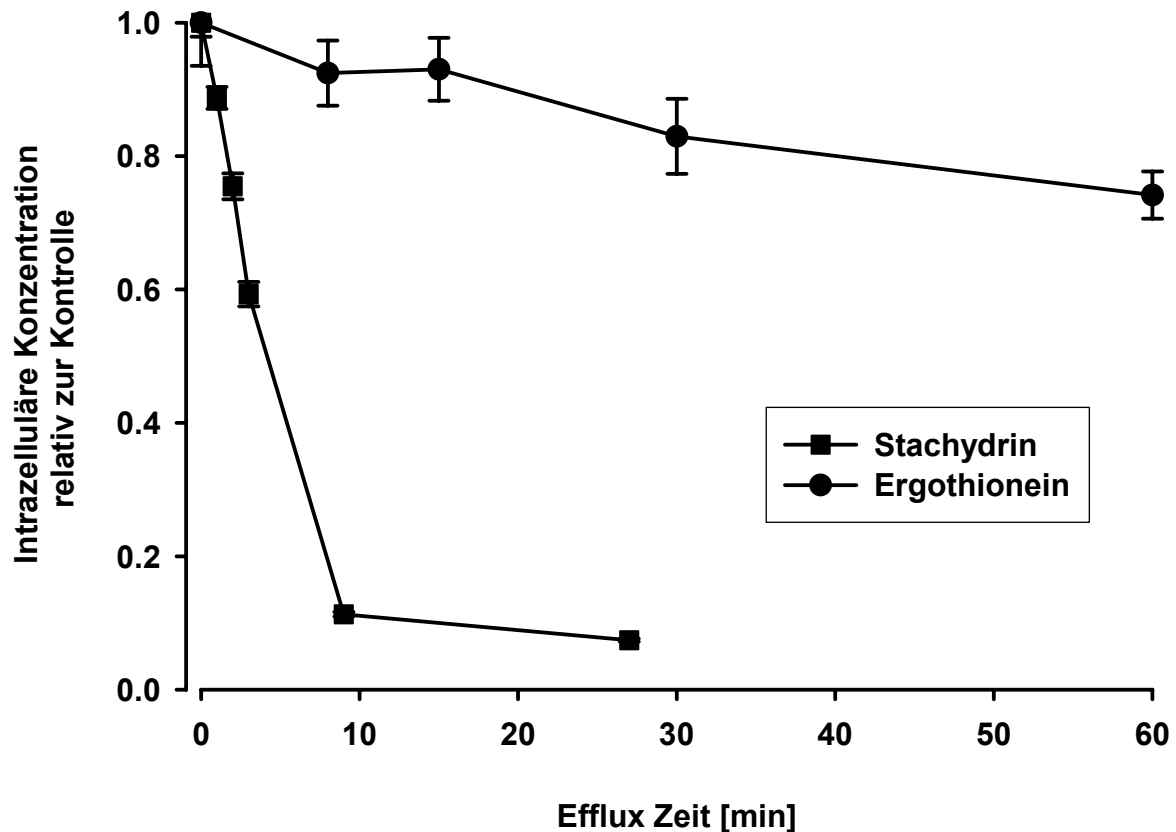


Abb. 29

Vorinkubation der FIT-OCTN1h Zellen: 10 $\mu\text{mol/l}$ Ergothionein bzw. Stachydrin, 60 min., 37° C. Efflux in physiologischen Puffer (KRH) bei 37° C über die angegebenen Zeiträume. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n = 3.

Auf der Suche nach Erklärungen für diese unterschiedlichen Eigenschaften des Substrattransportes von OCTN1h wurde untersucht, welche Parameter den Transport des Ergothioneins beeinflussen. Dabei stellte sich heraus, dass eine Abhängigkeit dieses Transportes von der Natriumionenkonzentration besteht (Abb. 30). Werden die Chloridionen des physiologischen Aufnahme-puffers durch Glukonat ersetzt, hat dies keinen negativen Einfluss auf die Transportleistung. Sie nimmt allerdings erheblich ab, wenn die Natriumionen im Puffer durch andere Kationen ersetzt werden. Der Ergothioneintransport von OCTN1h wird durch den physiologischen Natriumionengradienten angetrieben. Gemeinsam mit dem Ergothionein wird auch Na^+ mitgeschleust. Der Transport ist vermutlich elektrogen. Lithiumkationen scheinen noch zu einem gewissen Ausmaß dazu in der Lage zu sein, die Natriumkationen beim Transport zu ersetzen, während dies bei Kaliumkationen und N-Methyl-D-Glukosamin (NMDG) nicht der Fall ist. Der TEA-

Transport über OCTN1h zeigte keine Abhängigkeit von der Na^+ Konzentration (Tamai et al., 1997; Yabuuchi et al., 1999). Analog zum Ergothioneintransport von OCTN1 dient der Natriumionengradient auch beim Carnitintransport über OCTN2 als Triebkraft (Tamai et al., 1998).

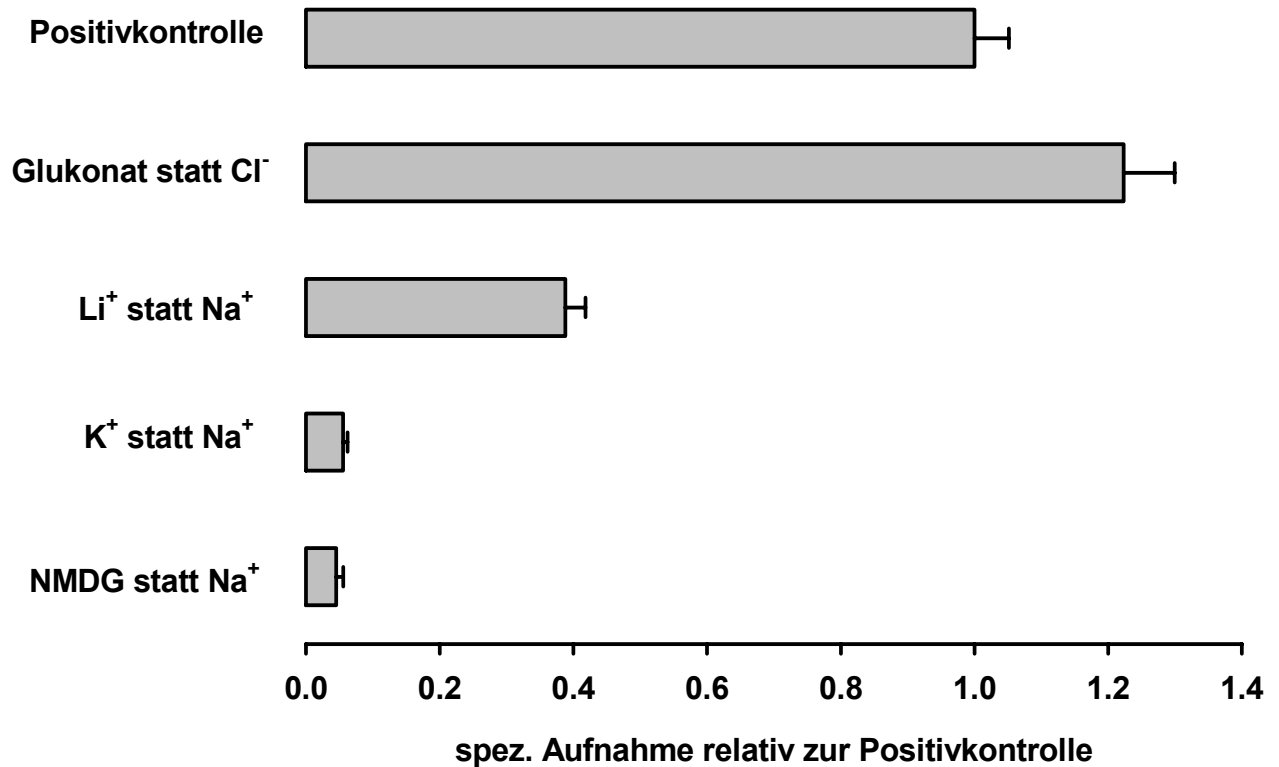


Abb. 30

Aufnahmebedingungen für FIT-OCTN1h-Zellen: 10 $\mu\text{mol/l}$ Ergothionein, 1 min, 37° C. Die Positivkontrolle wurde unter physiologischen Pufferbedingungen ermittelt (125 mM Na^+ , 6 mM K^+ , 132 mM Cl^-), daran anschließend wurden die angegebenen Ionen unter Beibehaltung der Osmolarität im Puffer entsprechend ersetzt. NMDG = N-Methy-D-Glukosamin. Die endogene zelluläre Ergothioneinkonzentration wurde unter den jeweiligen Bedingungen parallel bestimmt und subtrahiert, um die spezifische Aufnahme zu erhalten. Dargestellt sind Mittelwerte mit SEM, n = 3.

Der Einfluss der Natriumionenkonzentration auf den spezifischen Transport von Ergothionein über OCTN1h wurde darüber hinaus quantitativ untersucht. Der Verlauf der experimentellen Daten folgt in umgekehrter Weise einer Hill-Funktion mit einer Steigung von 1. Dies legt nahe, dass Ergothionein und das Natriumkation an derselben Bindungsstelle interagieren. (Abb. 31).

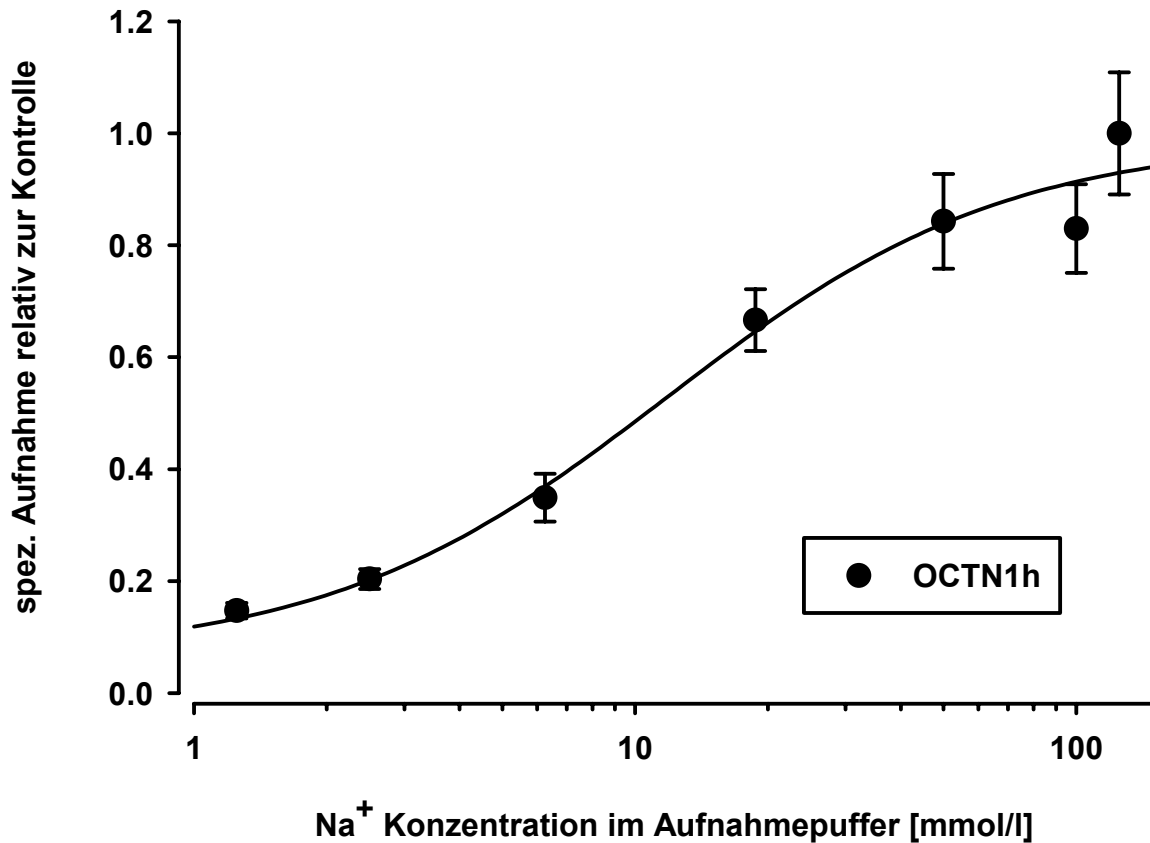


Abb. 31

Aufnahmebedingungen für FIT-OCTN1h : 10 $\mu\text{mol/l}$ Ergothionein in Aufnahmebuffern mit unterschiedlichen Na^+ Gehalten, 1 min, 37° C .Vor der Aufnahme wurden die Zellen mit einer substratfreien Lösung umgepuffert, bei der, wie in den Aufnahmelösungen selbst, entsprechende Anteile der Natriumionenkonzentration isoosmotisch durch NMDG substituiert worden waren. Endogene zelluläre Ergothioneingehalte wurden parallel mitbestimmt und subtrahiert. Die Aufnahmen wurden relativ zur Kontrolle mit physiologischer Na^+ Konzentration aufgetragen. Die experimentellen Daten wurden mit einer modifizierten Hill-Funktion beschrieben (logistische Funktion mit vier Parametern: $y = y_0 + a / (1 + (x/x_0)^b)$). Der resultierende Hillkoeffizient (b) betrug für OCTN1h -1.13. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n = 3.

Überraschenderweise zeigte sich beim Stachydrin ein entgegengesetzter Einfluss der Natriumionenkonzentration auf den spezifischen Transport über OCTN1h (Abb. 32). Werden in diesem Fall die Na^+ Ionen in der Aufnahmelösung ersetzt, so verdoppelt sich das Ausmaß des Stachydrintransportes nahezu.

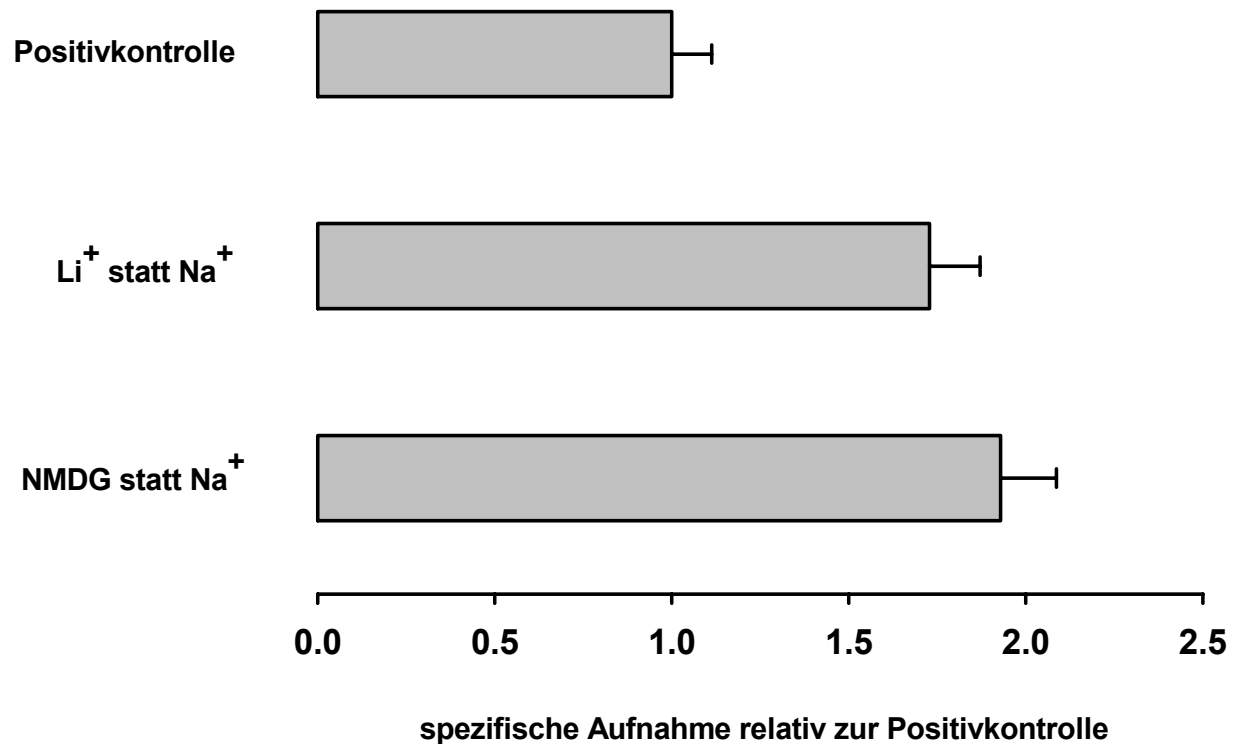


Abb. 32

Aufnahmebedingungen für FIT-OCTN1h-Zellen: 10 µmol/l Stachydrin, 1 min, 37° C. Die Positivkontrolle wurde unter physiologischen Pufferbedingungen ermittelt (125 mM Na⁺), daran anschließend wurden die Na⁺ Ionen unter Beibehaltung der Osmolarität im Puffer entsprechend mit NMDG (N-Methy-D-Glukosamin) und Li⁺ ersetzt. Endogen kommt das Stachydrin in den Zellen nicht vor. Dargestellt sind Mittelwerte mit SEM, n = 3.

Je höher die extrazelluläre Konzentration der Natriumkationen ist, desto geringer ist die Transporteffizienz von Stachydrin über OCTN1 (Abb. 33). Am humanen Transporter verhält sich das Natrium wie ein kompetitiver Hemmstoff der spezifischen Stachydrinaufnahme. Der Verlauf der experimentellen Daten ist mit einer Hill-Funktion gut zu beschreiben, der Hillkoeffizient liegt bei 0.84 und es wird ein K_i-Wert von 88.5 mmol/l ermittelt.

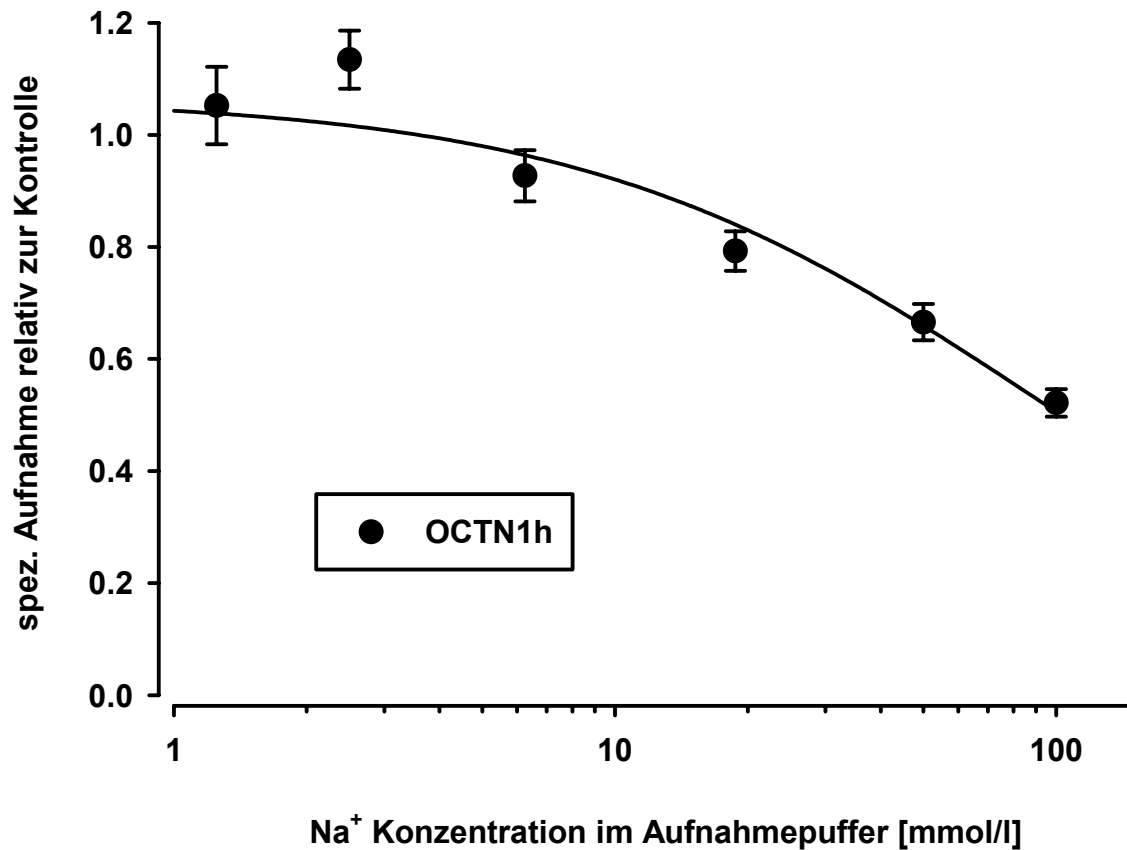


Abb. 33

Aufnahmebedingungen für FIT-OCTN1h : 10 $\mu\text{mol/l}$ Stachydrin in Aufnahmebuffern mit unterschiedlichen Na^+ Gehalten, 1 min, 37° C. Vor der Aufnahme wurden die Zellen mit einer substratfreien Lösung umgepuffert, bei der, wie in den Aufnahmelösungen selbst, entsprechende Anteile der Natriumionenkonzentration isoosmotisch durch NMDG substituiert worden waren. Die Aufnahmen wurden relativ zur Kontrolle ohne Natriumionen aufgetragen. Die experimentellen Daten wurden mit einer Hill-Funktion beschrieben (logistische Funktion mit drei Parametern: $y = a/(1+(x/x_0)^b)$). Der resultierende Hillkoeffizient (b) betrug für OCTN1h 0.84. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, $n = 3$.

Prinzipiell kann man festhalten, dass der Ergothioneintransport über OCTN1h unter physiologischen Bedingungen maximal effizient verläuft. Der Transport des Stachydrins weist sein Optimum unter unphysiologisch niedrigen Na^+ Konzentrationen auf. Betrachtet man zusätzlich die Effizienz und die Spezifität des Ergothioneintransportes widersprechen diese Ergebnisse der bisherigen Vermutung zur Funktion von OCTN1, nach der es sich um einen unspezifischen Transporter organischer Kationen, z. B. in der apikalen Membran der Niere, handelt, dem kein spezifisches Substrat zugrunde liegt (Ohashi et al., 1999; Tamai et al., 2004). In den Untersuchungen, die zur Bildung dieser Hypothese führten, wurde die pH-

Abhängigkeit des TEA-Transportes beschrieben. Für den Ergothioneintransport konnte keine Abhängigkeit vom pH-Wert der Aufnahmelösung nachgewiesen werden (Abb. 34). Die spezifische Aufnahme des Ergothioneins über OCTN1h erfährt keine signifikante Veränderung, wenn die Protonenkonzentration vom physiologischen Wert aus betrachtet eine Zehnerpotenz erhöht oder erniedrigt wird. Beim Vorliegen eines Protonenantiportes wäre es zu erwarten, dass die Transporteffizienz mit fallendem pH-Wert ebenfalls abnimmt, die zu beobachtende Entwicklung ist aber eher gegenläufig.

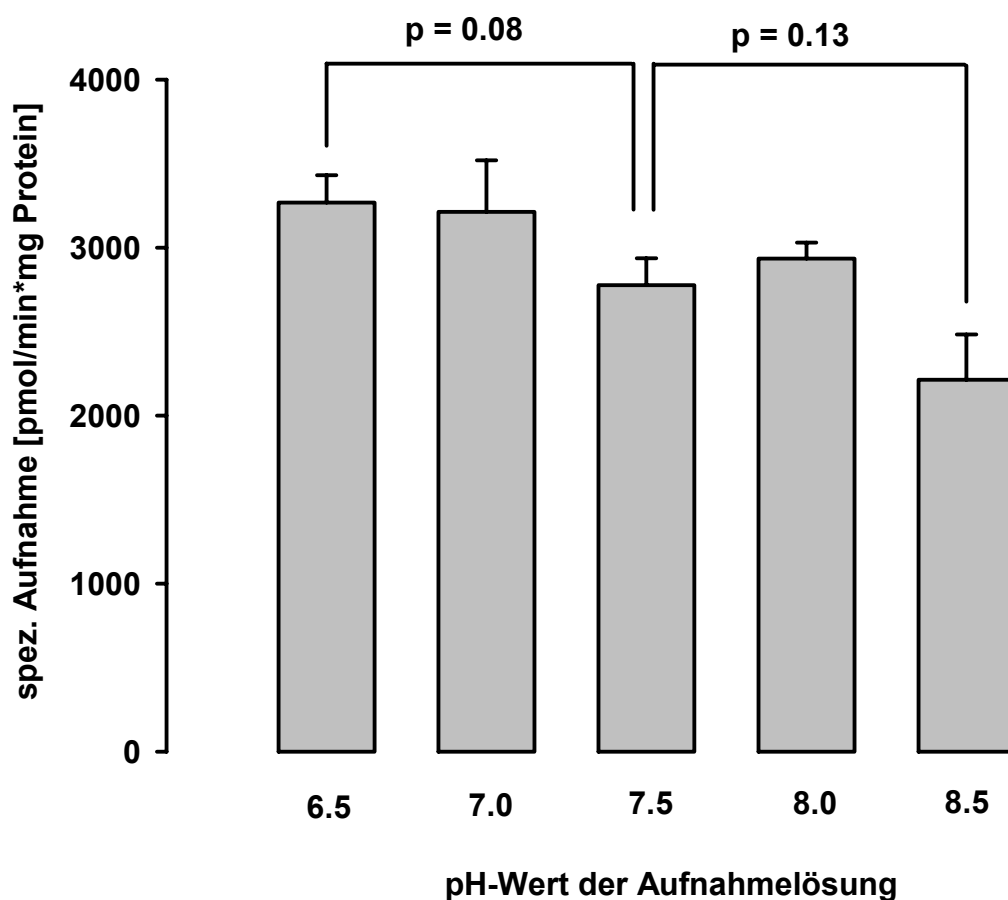


Abb. 34

Aufnahmebedingungen für die FIT-OCTN1h Zellen: 10 $\mu\text{mol/l}$ Ergothionein in Aufnahme puffern des jeweiligen pH-Wertes, 1 min, 37° C. Zuvor wurden die Zellen mit substratfreiem Aufnahme puffern des entsprechenden pH-Wertes gewaschen. Der endogene zelluläre Ergothioneingehalt wurde parallel mitbestimmt und subtrahiert. Die statistische Auswertung erfolgte mit einer one-way-ANOVA (Analysis of Variance), Tests auf Normalverteilung und gleicher Varianz waren positiv, $\alpha = 0,05$. Dargestellt sind Mittelwerte mit SEM, $n = 3$.

3.5.3 Hemmstoffe von OCTN1h

Inhibitoren stellen wichtige Werkzeuge bei der funktionellen Charakterisierung von Transportern dar und zwar umso mehr, wenn sie nicht nur in-vitro, zur Untersuchung von Transportkinetiken, sondern auch in-vivo, zur Untersuchung physiologischer Auswirkungen der Hemmung des Transporters, zur Anwendung gebracht werden können. So war es für den extraneuronalen Monoamintransporter (EMT) ein großer Fortschritt als potente und spezifische Hemmstoffe entwickelt wurden (Russ et al., 1993b). Die Hemmwirkung mehrerer strukturverschiedener Substanzen auf OCTN1h wurde anhand der Aufnahme von Ergothionein untersucht (Abb. 35).

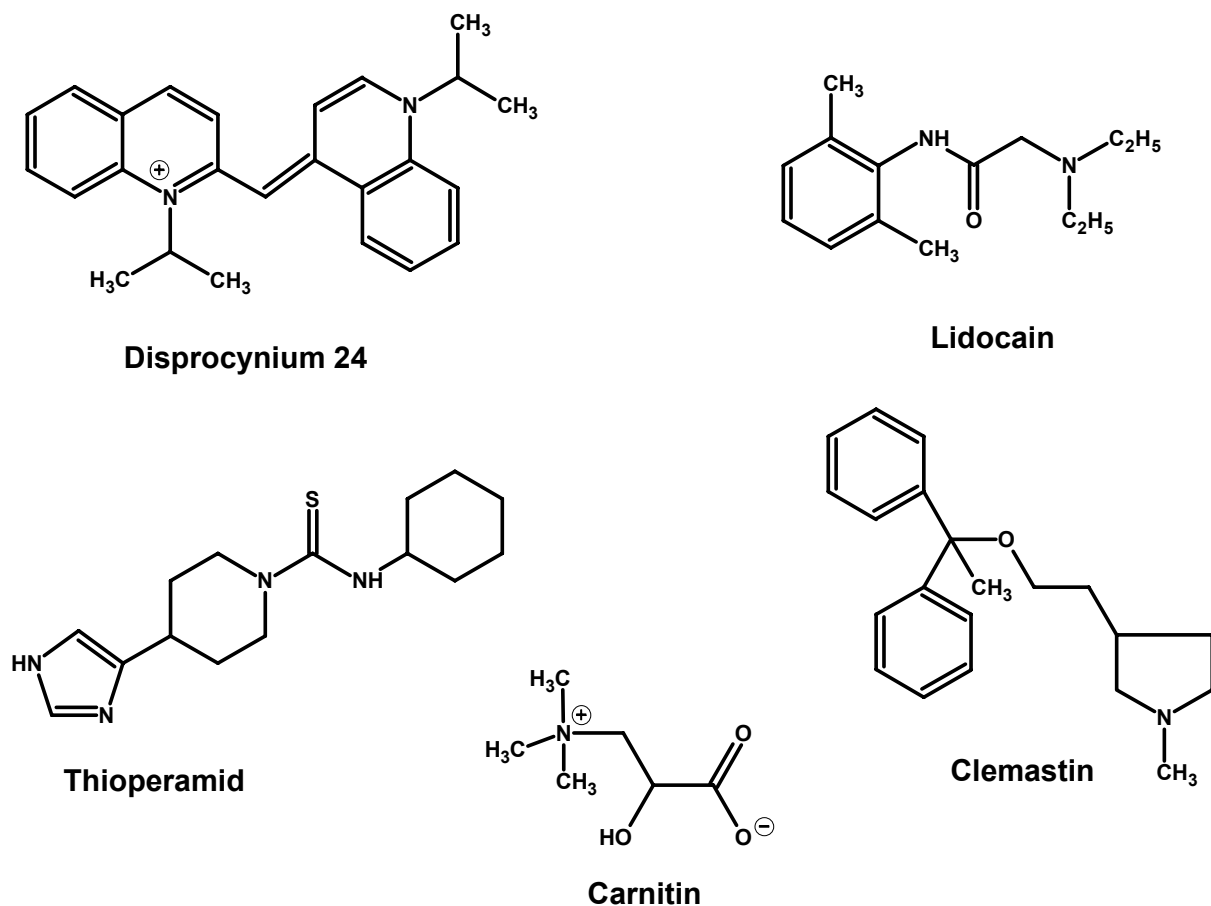


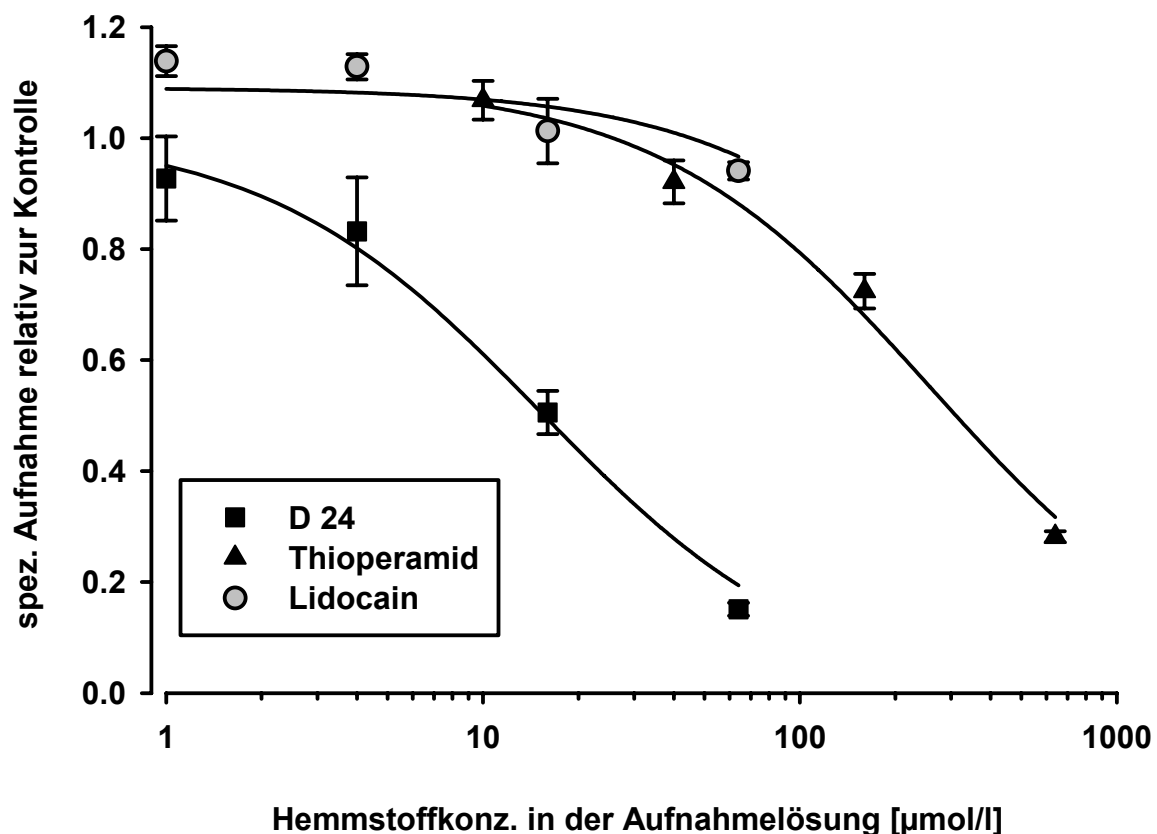
Abb. 35

Strukturformeln der potentiellen Hemmstoffe.

Bei dem Isocyanin Disprocynium24 handelt es sich um einen potenten und spezifischen Inhibitor der nicht-neuronalen Monoamintransporter (OCT1, OCT2 und EMT) (Russ et al., 1993a; Russ et al., 1993b). Lidocain wurde eingesetzt, da es

Hinweise auf eine Hemmung des TEA-Transportes durch diesen Wirkstoff gab. Peltekova und Mitarbeiter ermittelten einen K_i -Wert von $0.8 \mu\text{mol/l}$ für die nicht kompetitive Hemmung der TEA-Aufnahme durch Lidocain an OCTN1h (Peltekova et al., 2004). Es sollte nun gezeigt werden, ob auch eine Hemmpotenz für den Ergothioneintransport besteht. Thioperamid ist ein H_3 -Histaminrezeptorantagonist und weist in seinen Heterozyklen und funktionellen Gruppen gewisse Übereinstimmungen zu Ergothionein auf. Der H_1 -Histaminrezeptorantagonist Clemastin ist nicht strukturverwandt. Untersucht werden sollte, ob diese beiden Substanzen eine Affinität zu OCTN1 besitzen und den Transport beeinträchtigen können. Obwohl gezeigt werden konnte, dass Carnitin kein effizientes Substrat für OCTN1 ist (3.5.1), wurde die auch Hemmpotenz dieses spezifischen Substrates für OCTN2 untersucht. Für die Hemmung der TEA-Aufnahme durch Carnitin war ein K_i -Wert von $24 \mu\text{mol/l}$ beschrieben worden (Peltekova et al., 2004).

Von den untersuchten Verbindungen hat sich keine als potenter Inhibitor des Ergothioneintransportes über OCTN1h herausgestellt (Abb. 36).



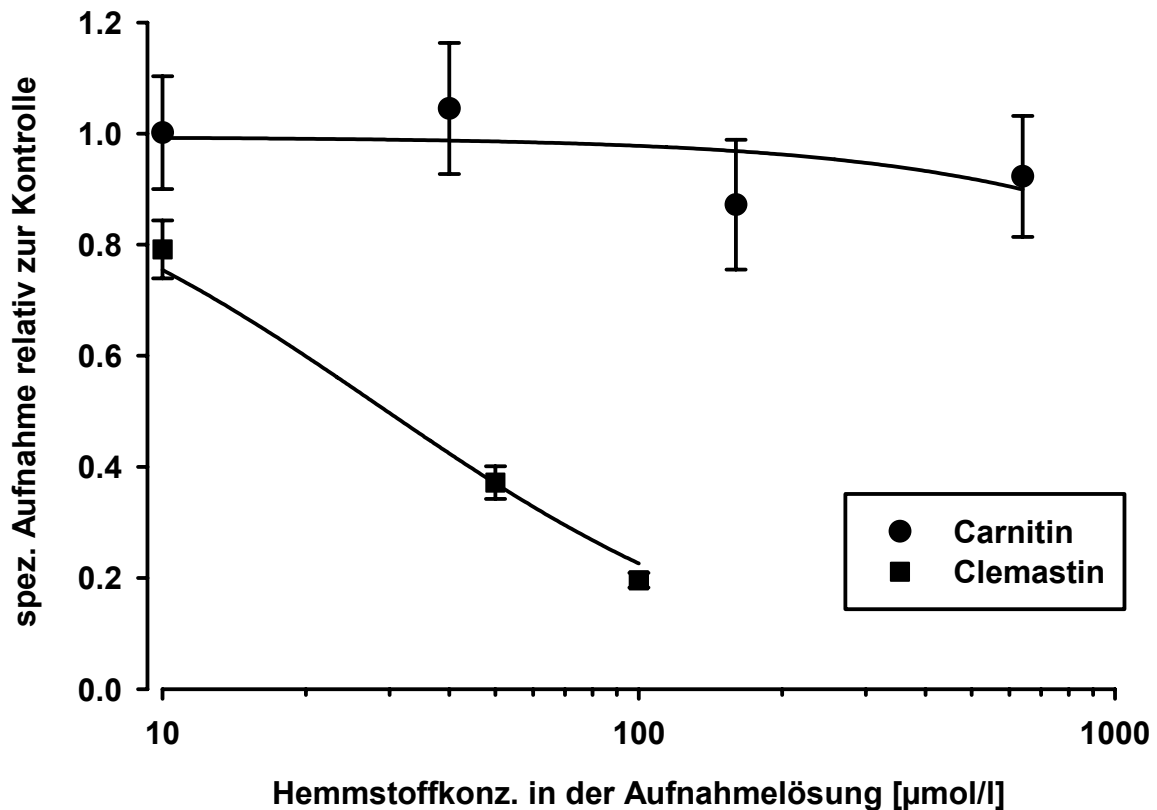


Abb. 36

Die Aufnahmebedingungen in den verschiedenen Hemmversuchen waren für die FIT-OCTN1h-Zellen identisch: 10 $\mu\text{mol/l}$ Ergothionein, 1 min, 37° C, zusätzlich unterschiedliche Konzentrationen der verschiedenen Substanzen, deren Hemmpotenz an OCTN1h untersucht werden sollte. Aufgetragen wurde die spezifische Aufnahme relativ zur Positivkontrolle ohne Hemmstoff. Als Modell für die kompetitive Hemmung wurde eine Hill-Funktion (logistische Funktion mit drei Parametern: $y = a/(1+(x/x_0)^b)$, b (Hillkoeffizient) = 1) eingesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n = 3.

Disprocynium24 (D24) weist den geringsten K_i -Wert mit 15 $\mu\text{mol/l}$ auf und zeigt somit eine moderate Affinität zu OCTN1h. Seine Hemmpotenz für den humanen Extraneuronalen Monoamintransporter EMTh ist um drei Zehnerpotenzen größer (Gründemann et al., 1998b). Der K_i -Wert des Lidocains liegt mit 499 $\mu\text{mol/l}$ fast doppelt so hoch wie der für Thioperamid mit 259 $\mu\text{mol/l}$. Trotz des Vorhandenseins ähnlicher funktioneller Gruppen im Thioperamid (Imidazolrest und doppelt gebundener Schwefel in einer Thioharnstofffunktion), unterscheidet sich die Anordnung derselben und somit die Struktur des Moleküls doch erheblich von Ergothionein und führt zu einer um den Faktor 10 verminderten Affinität.

Das Lidocain weist keine strukturelle Ähnlichkeit zum Ergothionein auf. Als kationisch-amphiphile Substanz kann es sich auf Grund seiner lipophilen Eigenschaften in die Zellmembran einlagern. Es kommt zu einer Membranexpansion, bei der integrale Membranproteine beeinflusst werden können. Die geringfügige Hemmung des Ergothioneintransportes über OCTN1h ist daher vermutlich auf eine unspezifische Membranmodifikation zurückzuführen.

Das H₁-Antihistaminikum Clemastin besitzt einen am Stickstoff methylierten Pyrrolidinring und ist über eine Ethylgruppe mit einem Dibenzylrest verethert. Eine strukturelle Ähnlichkeit zum Ergothionein liegt praktisch nicht vor. Die moderate Hemmpotenz von Clemastin für OCTN1h liegt mit 29 µmol/l in demselben Bereich wie für das Dysprocynium²⁴. Sollte über den Heterozyklus eine Affinität zum Transporter vermittelt werden, so stört der sperrige Dibenzylrest unter Umständen die Bindung des eigentlichen Substrates.

Der hier rechnerisch zu ermittelnde K_i-Wert für Carnitin liegt bei 6.1 mmol/l. Dies ist ein weiterer Beleg dafür, dass OCTN1h mit dem physiologischen Substrat des nächstverwandten Transporters OCTN2h praktisch nicht interagiert und es hier zwei distinkte Substratspezifitäten gibt. Zu dieser Zeit liegen keine potenten und spezifischen Inhibitoren für OCTN1 vor.

3.5.4 Thiamazol ist kein Substrat von OCTN1h

Das therapeutisch häufig eingesetzte Thyreostatikum Thiamazol entspricht in seiner Struktur dem 2-Thiolimidazolrest des Ergothioneins bis auf eine zusätzliche Methylgruppe an einem Stickstoff des Heterozyklus (Abb. 37). Wie das Ergothionein liegt auch das Thiamazol in einem tautomeren Gleichgewicht der Thiol- und Thionform vor.

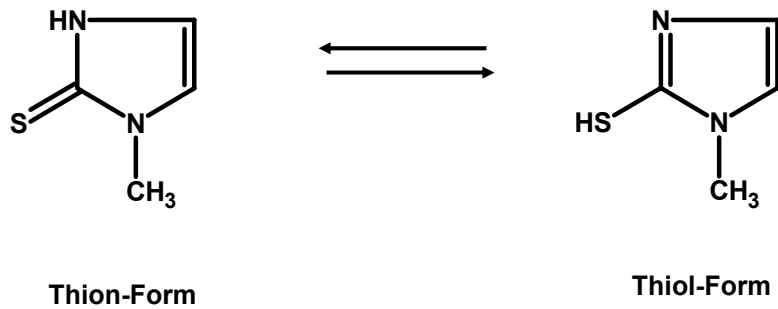


Abb. 37

Tautomere Strukturen des Thiamazols.

Eine derartige Strukturverwandschaft warf die Frage auf, ob OCTN1 am Eintritt dieses Arzneistoffs in Zellen, die den Transporter exprimieren, beteiligt sein könnte. Entsprechende Aufnahmeexperimente mit FIT-OCTN1h Zellen wurden durchgeführt, bei denen die Zellen für eine Minute bei 37° C mit 100 µmol/l Thiamazol inkubiert wurden. Im Zelllysate wurde Thiamazol mittels LC-MS/MS quantifiziert. Gegenüber den FIT-NT Zellen mit 125 ± 8 pmol/min*mg Protein war die Aufnahme in die FIT-OCTN1h Zellen nur geringfügig höher mit 167 ± 14 pmol/min*mg Protein ($n = 3$). Dies entspricht bei 100 µmol/l Thiamazol im Aufnahmepuffer einer Clearance von 0.4 ± 0.2 µl/min*mg Protein bzw. bei 20 µmol/l Thiamazol 0.1 ± 0.1 µl/min*mg Protein. Der spezifische Transport von Thiamazol über OCTN1h ist somit zu vernachlässigen. Bei der Verteilung des Wirkstoffs im Organismus spielt OCTN1h keine Rolle. Auf Grund des fehlenden Transportes ist aber eine Interaktion des Thiamazols mit OCTN1h nicht ausgeschlossen, daher wurde auch die Hemmpotenz der Substanz anhand des Ergothioneintransportes untersucht (Abb. 38). Mit einem K_i -Wert von 5.8 mmol/l ist das Thiamazol ein ebenso schlechter Inhibitor von OCTN1h wie das Carnitin (vgl. 3.5.3, Abb. 36).

Trotz der strukturellen Ähnlichkeit zwischen dem Ergothioneinrest und Thiamazol interagiert die letztgenannte Substanz praktisch nicht mit dem Transporter. Dies legt den Schluss nahe, dass die Betainstruktur im Ergothionein für Erkennung der Bindungsstelle an OCTN1 essentiell ist. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass auch andere Betaine transportiert werden (Stachydrin, Betonicin), während das für eine Substanz, die nur mit dem Thiolimidazolrest strukturverwandt ist, nicht der Fall ist. Auf der anderen Seite wird die große Transporteffizienz und Spezifität erst durch das Vorhandensein beider Strukturen erreicht (vgl. 3.5.1, Abb. 23).

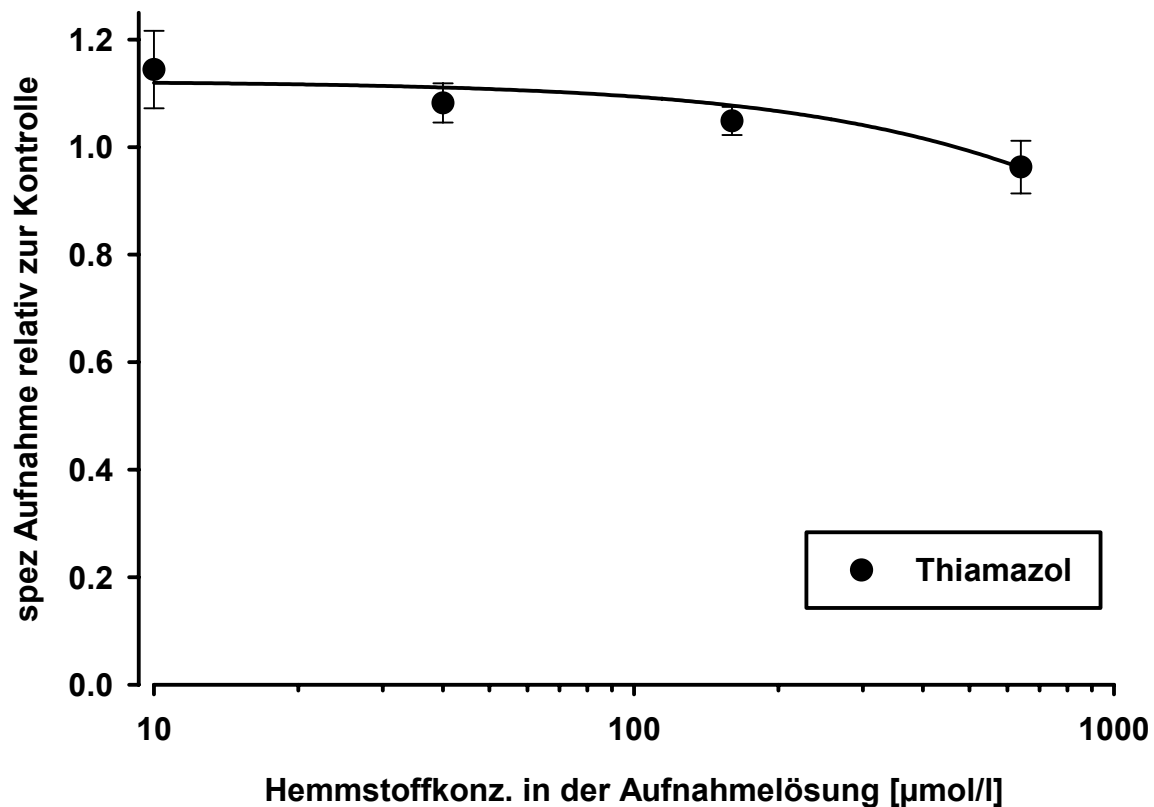


Abb. 38

Die Aufnahmebedingungen für die FIT-OCTN1h-Zellen: 10 µmol/l Ergothionein, 1 min, 37° C, zusätzlich unterschiedliche Konzentrationen des Thiamazols. Aufgetragen wurde die spezifische Aufnahme relativ zur Positivkontrolle ohne Hemmstoff. Als Modell für die kompetitive Hemmung wurde eine Hill-Funktion (logistische Funktion mit drei Parametern: $y = a/1+(x/x_0)^b$, b (Hillkoeffizient) = 1) eingesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n = 3.

3.6 Funktionelle Charakterisierung von OCTN1m

3.6.1 Konditionelles Expressionssystem für OCTN1m

Für eine genauere Untersuchung des OCTN1 der Maus wurde dieser Transporter im Zuge der funktionellen Charakterisierung im so genannten Epstein-Barr Expressionssystem etabliert (siehe 2.4.6). Obwohl es sich hierbei um eine stabile Transfektion handelt, verbleibt die Transporter DNA extrachromosomal in einem viralen Plasmidsystem, das auf das Epstein-Barr Virus zurückgeht. Vektoren aus

Bestandteilen eukaryontischer Viren können prinzipiell eingesetzt werden, um fremde DNA in Säugerzelllinien zur Expression zu bringen (Goff and Berg, 1976; Sarver et al., 1981). Für die konditionelle Expression von OCTN1m wurde als EBV-Vektor (Epstein-Barr) pCEP-Pu/TO eingesetzt (Abb. 39). Initial geht pCEP-PU/TO auf den Vektor pCEP4 der Fa. Invitrogen zurück (Kohfeldt et al., 1997). Zusätzlich zum Replikationsursprung OriP und dem EBNA-1 Gen enthält das Plasmid die genetische Information für eine Puromycinresistenz. Außerdem liegen zwei Tet-Operatoren unter der Kontrolle eines CMV-Promotors (Cytomegalie Virus) vor der Einbaustelle für das zu exprimierende Gen. Die Steuerung der Expression wird wie beim FIT-System über ein Tet-Repressor/Tet-Operator Zusammenspiel vermittelt. Das Gen für den Tet-Repressor ist in einem zweiten Vektor enthalten (pcDNA6/TR/OP) (Abb. 39). Sollte man kein induzierbares Expressionssystem wünschen, so kann man auf die Transfektion dieses Vektors verzichten.

Bei der Konstruktion von pCEP-Pu/TO/OCTN1m (Abb. 39) wurde der offene Leserahmen von OCTN1m gerichtet über Schnittstellen der Restriktionsenzyme HindIII und XhoI hinter den beiden Tet-Operatoren eingebaut. Die dafür benötigte cDNA wurde durch Restriktion (HindIII, XhoI) aus einem bereits vorhandenen Vektor pcDNA3OCTN1m isoliert. Ebenso war der offene Leserahmen für das OCTN1h Gen aus dem bereits existierenden System pCEP-Pu/TO/OCTN1h entfernt worden, um den leeren, linearen Expressionsvektor zu erhalten. An die Extraktion dieser beiden DNA-Moleküle aus einem präparativen Agarosegel schloss sich die Ligation an. Die Klonierung des neuen Vektors erfolgte nach Elektroporation in DH10B-Zellen (*E. coli*). Der korrekte Einbau wurde durch eine Restriktionsanalyse mit KpnI, PstI und EcoRV überprüft (Abb. 40). Bei den beiden untersuchten Klonen (Nr. 1 und Nr. 2) wurden die Banden der erwarteten Länge detektiert. Fehler im Transporterbauplan wurden durch eine DNA-Sequenzierung ausgeschlossen. Das entsprechende Konstrukt wurde nach der Präparation der Plasmid-DNA aus *E. coli* per Lipofektion in HEK-293-Zellen transfiziert (Sambrook and Russell, 2001). Neben dem Expressionsvektor wurde für die Steuerbarkeit parallel das Plasmid mit dem Tet-Repressor transfiziert (pcDNA6/TR/OP), das eine Blasticidinresistenzkassette enthält (Abb. 39). Zellen, die beide Plasmide aufgenommen haben und die Gene funktionell exprimieren, erhalten eine Puromycin- und eine Blasticidinresistenz, über die sie selektiert werden können.

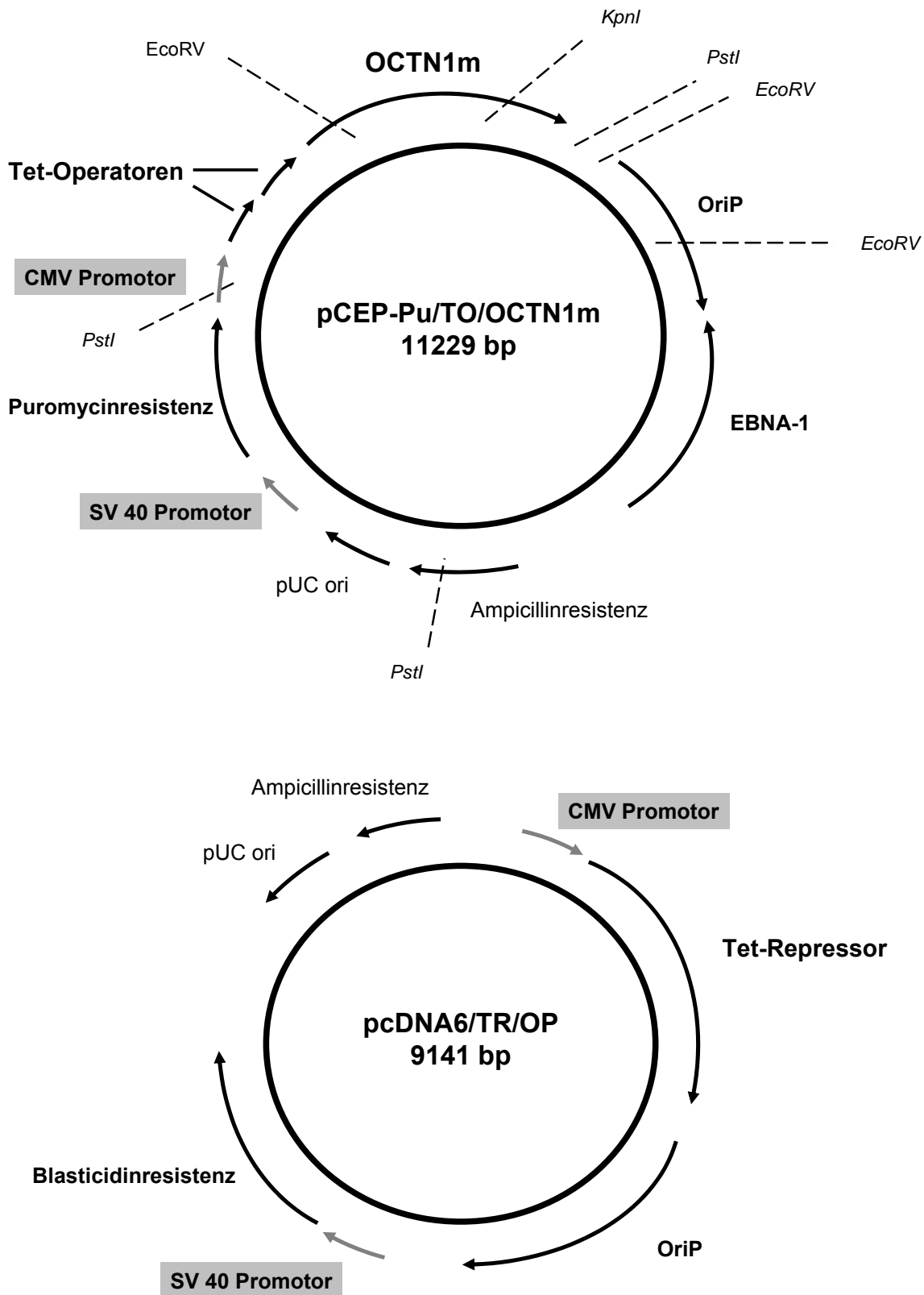


Abb. 39

Oben: EPV-Expressionsvektor pCEP-PU/TO/OCTN1m. Schematische Darstellung der wichtigsten Strukturen des Konstruktes und Schnittstellen der zur Analyse eingesetzten Restriktionsenzyme.

Unten: Schematische Darstellung der wichtigsten Strukturen des zweiten Vektors für das Epstein-Barr Expressionssystem: pcDNA6/TR/OP.

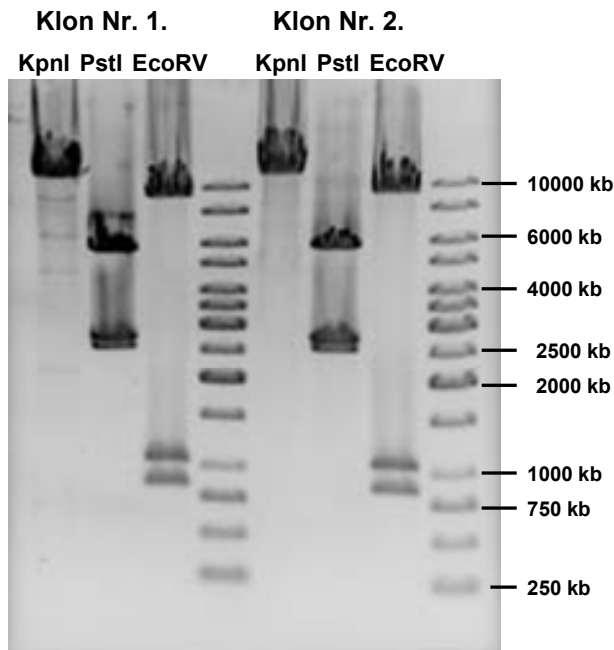


Abb. 40

Analytisches Gel der Restriktionsanalyse des Konstruktes: pCEP-PU/TO/OCTN1m. Die DNA-Fragmente wurde mit Ethidiumbromid angefärbt und das Bild anschließend zur besseren Darstellung invertiert. Banden erwarteter Länge: **KpnI**: 11229 bp **PstI**: 5908 bp, 2759 bp, 2562 bp **EcoRV**: 9327 bp, 1054 bp, 848 bp.

Die Überprüfung der Transportfunktion der transfizierten Zelllinie konnte dann mit den neu identifizierten Substraten für OCTN1 erfolgen (siehe 3.6.2, Abb. 41).

3.6.2 Substratspektrum von OCTN1m und OCTN1r

Es sollte nun untersucht werden, ob sich die Substratspezifitäten von OCTN1 speziesübergreifend gleich verhielten. Hierfür wurden zusätzlich zum humanen die orthologen Transporter von Maus und Ratte in entsprechenden Aufnahmeexperimenten getestet (Abb. 41). Für OCTN1m war ein konditionelles Expressionssystem etabliert worden (siehe 3.6.1) und für OCTN1r wurde eine transiente Transfektion in FIT-NT-Zellen durchgeführt (siehe 2.4.4). Es stellte sich heraus, dass sich die Abfolge der Transporteffizienzen für die neuen Substrate von OCTN1 jeweils entsprach. Ergothionein bestätigt sich als Substrat mit der größten Transporteffizienz bei den drei untersuchten Spezies.

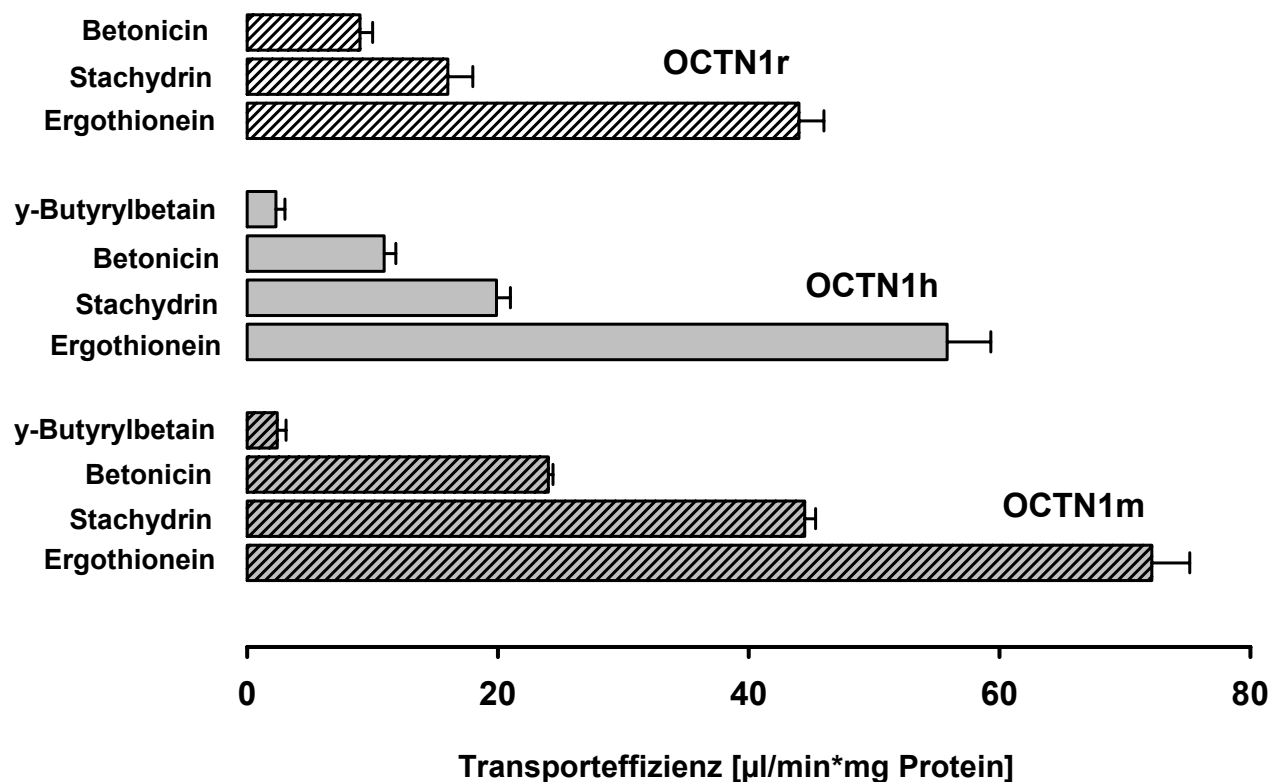


Abb. 41

Die Aufnahmebedingungen für die verschiedenen Zelllinien waren für die eingesetzten Substrate jeweils identisch: 10 $\mu\text{mol/l}$, 1 min, 37°C. Die unspezifische Aufnahme bzw. endogene Gehalte der Substrate wurden parallel ermittelt und subtrahiert, um die spezifische Aufnahme zu erhalten. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n = 3.

3.6.3 Vergleich der Transportcharakteristika von OCTN1h und OCTN1m

Die funktionelle Charakterisierung von OCTN1h wies spezifische Charakteristika im Transport des Stachydrins und des Ergothioneins auf. Es sollte nunmehr untersucht werden inwiefern der orthologe OCTN1 der Maus dieselben Transporteigenschaften zeigt. Zum Vergleich sind die Daten von OCTN1h zum Teil ebenfalls noch einmal dargestellt.

Zunächst wurde die Affinität des OCTN1m für Ergothionein (Abb. 42) und Stachydrin (Abb. 44) ermittelt. Der K_m -Wert von OCTN1m für Ergothionein beträgt 50 $\mu\text{mol/l}$ (95% Konfidenzintervall: 30 – 71 $\mu\text{mol/l}$). Damit liegt er rund Faktor zwei über dem des humanen Transporters mit einem K_m -Wert von rund 21 $\mu\text{mol/l}$ für Ergothionein.

Die Affinität für das Stachydrin war bei OCTN1h über ein Hemmexperiment abgeleitet worden ($K_i = 270 \mu\text{mol/l}$, siehe 3.5.2). Für OCTN1m wurde die Stachydrinaufnahme direkt untersucht. Der K_m -Wert von OCTN1m für Stachydrin beträgt $118 \mu\text{mol/l}$ (95% Konfidenzintervall: $87 - 149 \mu\text{mol/l}$). Damit ist die Affinität von OCTN1m für Ergothionein doppelt so groß wie die für Stachydrin. OCTN1 des Menschen ist hingegen um den Faktor zehn affiner für Ergothionein als für Stachydrin. Zur Bestätigung sind jeweils die Linearisierungen der Michaelis-Menten-Funktionen nach Eadie-Hofstee dargestellt (Abb. 43 und 45).

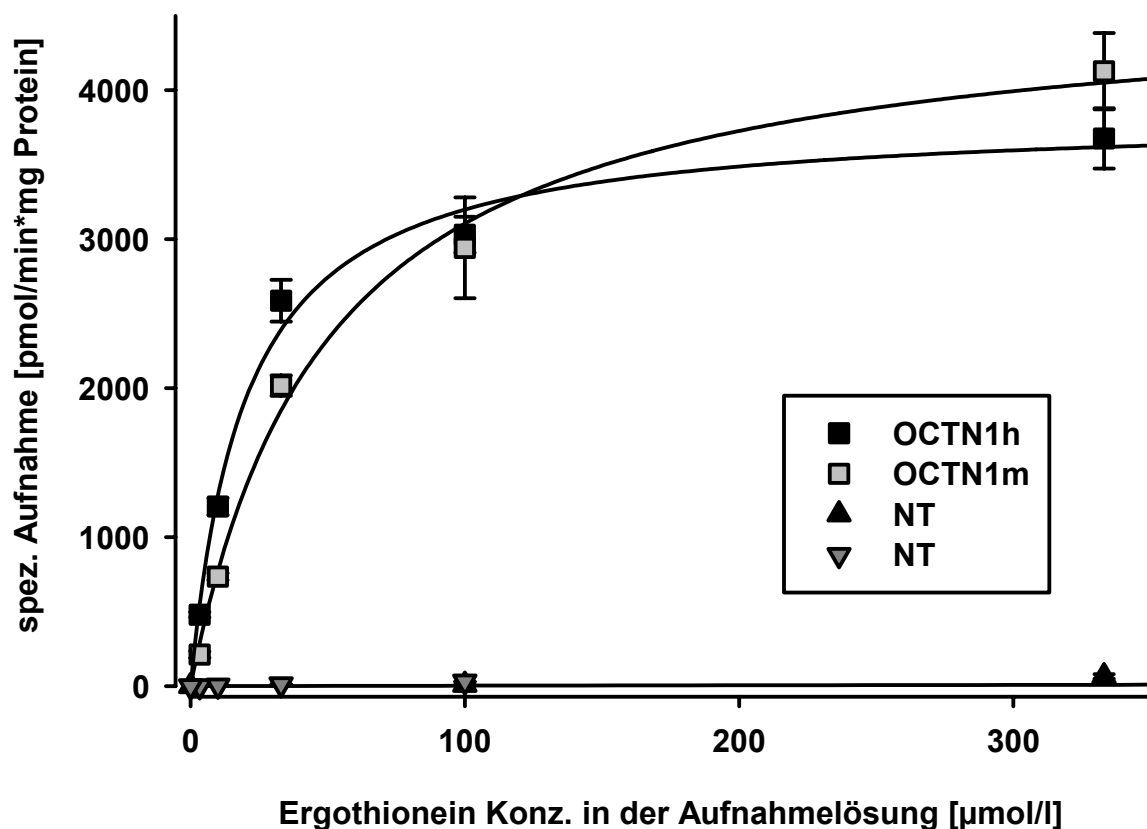


Abb. 42

Sättigungskurven für die Ergothioneinaufnahme (1 min, 37°C) durch OCTN1h und OCTN1m im Vergleich. Parallel wurde der endogene zelluläre Gehalt des Ergothioneins in den Transporterzellen mitbestimmt und subtrahiert. Die unspezifischen Aufnahmen (NT = nicht transfizierte Zellen) nehmen linear mit der Substratkonzentration zu (Steigung der Geraden: $0.3 \text{ pmol/min*mg Protein}$, $R^2 = 0.99$) und sind ebenfalls subtrahiert worden. V_{max} beträgt für OCTN1m $4.1 \pm 0.3 \text{ nmol/min*mg Protein}$ und für OCTN1h $3.7 \pm 0.2 \text{ nmol/min*mg Protein}$. Dargestellt und angegeben sind Mittelwerte und SEM, $n = 3$.

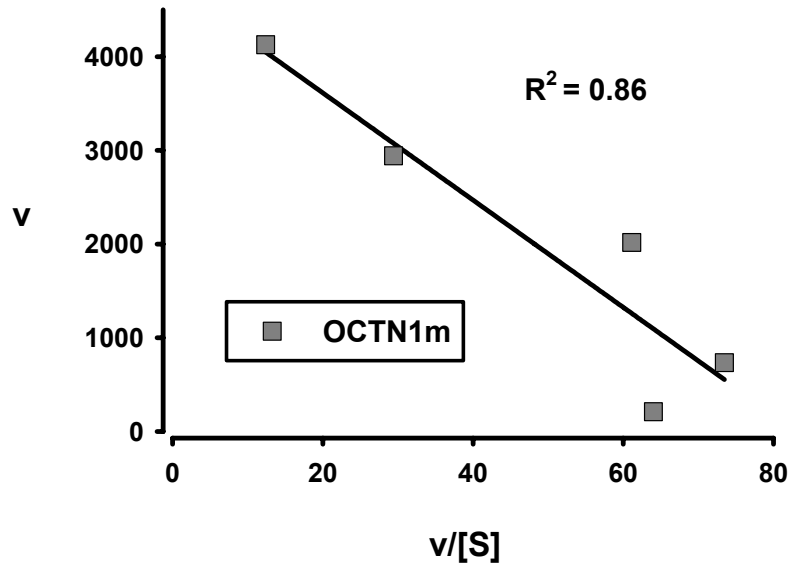


Abb. 43

Eadie-Hofstee-Linearisierung der Michaelis-Menten-Funktion für die Sättigungskinetik von Ergothionein an OCTN1m durch das Auftragen von $v =$ Aufnahmegeschwindigkeit (pmol/min*mg Protein) gegen $v/[S]$, $[S]$ = Substratkonzentration ($\mu\text{mol/l}$). Dargestellt sind Mittelwerte, $n = 3$.

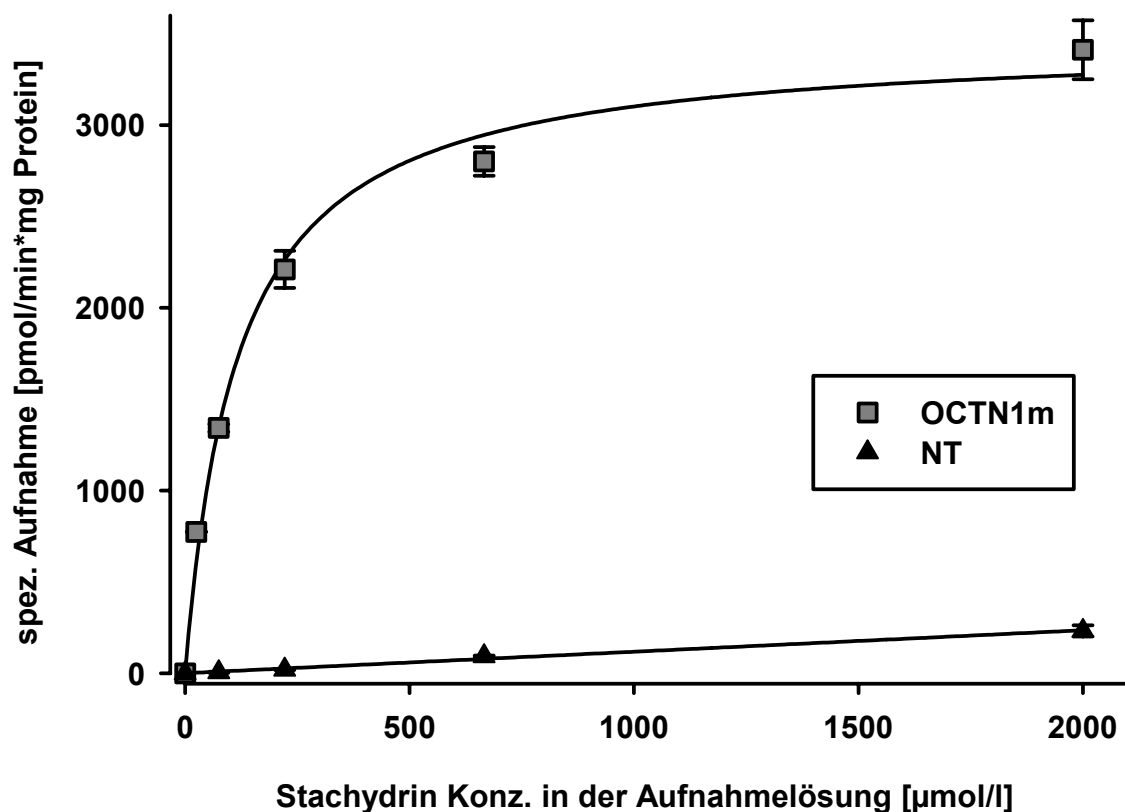


Abb. 44

Sättigungskurve für die Stachydrinaufnahme (1 min, 37°C) durch OCTN1m. Die unspezifische Aufnahme (NT = nicht transfizierte Zellen) nimmt linear mit der Substratkonzentration zu (Steigung der Geraden: $0.1 \text{ pmol/min*mg Protein}$, $R^2 = 0.94$) und ist subtrahiert worden, um die spezifische Aufnahme zu erhalten. V_{max} beträgt für OCTN1m $3.4 \pm 0.2 \text{ nmol/min*mg Protein}$. Dargestellt und angegeben sind Mittelwerte und SEM, $n = 3$.

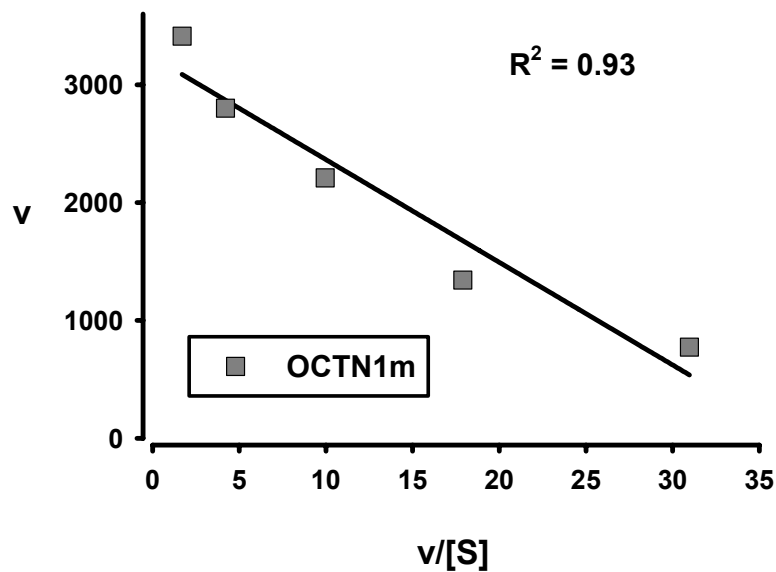


Abb. 45

Eadie-Hofstee-Linearisierung der Michaelis-Menten-Funktion für die Sättigungskinetik von Stachydrin an OCTN1m. v = Aufnahmegeschwindigkeit (pmol/min*mg Protein) gegen $v/[S]$, $[S]$ = Substratkonzentration ($\mu\text{mol/l}$). Dargestellt sind Mittelwerte, $n = 3$.

Im Verlauf der funktionellen Charakterisierung von OCTN1h hatte sich gezeigt, dass Ergothionein in Abhängigkeit des nach innen gerichteten Natriumionengradienten transportiert wird (siehe 3.5.2). Der Einfluss der Natriumionenkonzentration auf den spezifischen Transport von Ergothionein über OCTN1m wurde ebenfalls untersucht. Dabei konnte dieses Ergebnis reproduziert und somit bestätigt werden (Abb. 46). Die experimentellen Daten folgen auch bei OCTN1m in umgekehrter Weise einer Hill-Funktion mit einer Steigung von 1. Dies unterstützt die Hypothese, dass Ergothionein und Natrium an derselben Bindungsstelle interagieren.

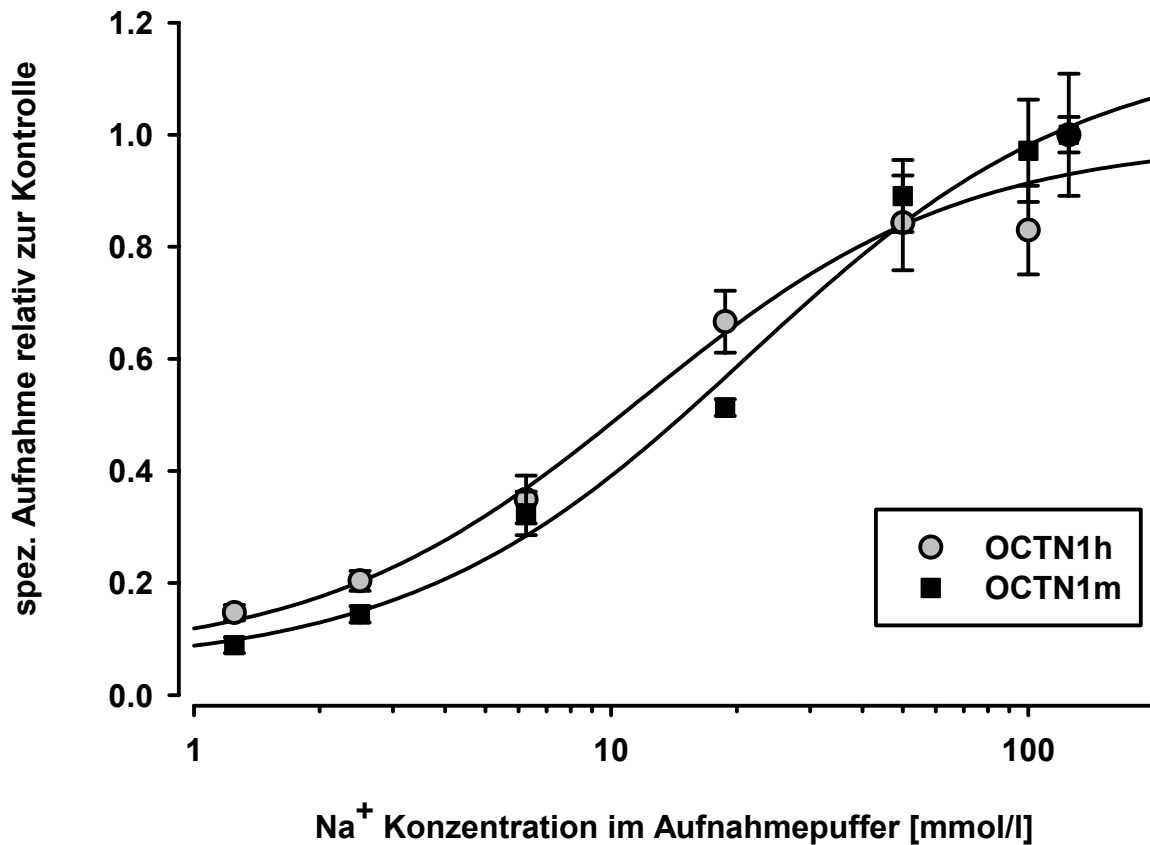


Abb. 46

Die Aufnahmebedingungen (10 $\mu\text{mol/l}$ Ergothionein in Aufnahme puffern mit unterschiedlichen Na^+ Gehalten, 1 min, 37° C) waren für beide Zelllinien (FIT-OCTN1h und OCTN1m im Epstein-Barr Expressionssystem) identisch. Vor der Aufnahme wurden die Zellen mit einer substratfreien Lösung umgepuffert, bei der, wie in den Aufnahmelösungen selbst, entsprechende Anteile der Natriumionenkonzentration isoosmotisch durch NMDG substituiert worden waren. Die Aufnahmen wurden relativ zur Kontrolle mit physiologischer Na^+ Konzentration aufgetragen. Die experimentellen Daten wurden mit einer modifizierten Hill-Funktion beschrieben (logistische Funktion mit vier Parametern: $y = y_0 + a / (1 + (x/x_0)^b)$). Der resultierende Hillkoeffizient (b) betrug für OCTN1h -1.13 und für OCTN1m -1.07 Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und SEM, n = 3.

Charakteristisch für OCTN1h war der negative Einfluss der Natriumionen auf den Stachydrintransport. Je höher die extrazelluläre Na^+ Konzentration war, desto geringer war die Transporteffizienz von Stachydrin über OCTN1h (siehe 3.5.2, Abb. 33). Für OCTN1m wurde ein identisches Aufnahmeexperiment durchgeführt, um den Einfluss der Na^+ Konzentration auf den Stachydrintransport quantitativ zu untersuchen. Auch der Stachydrintransport über OCTN1m ist umso effizienter, je geringer die extrazelluläre Na^+ Konzentration ist, allerdings kann an diese Daten nicht dasselbe Modell der kompetitiven Hemmung wie bei OCTN1h angepasst

werden (Hillkoeffizient $\gg 1$) (Abb. 47). Die Einflussnahme von Na^+ auf diesen Transportvorgang von OCTN1m scheint einem komplizierteren Mechanismus zu folgen als bei OCTN1h. Qualitativ wird der Transport des Stachydrins aber bei beiden Spezies durch die extrazelluläre Na^+ Konzentration gehemmt.

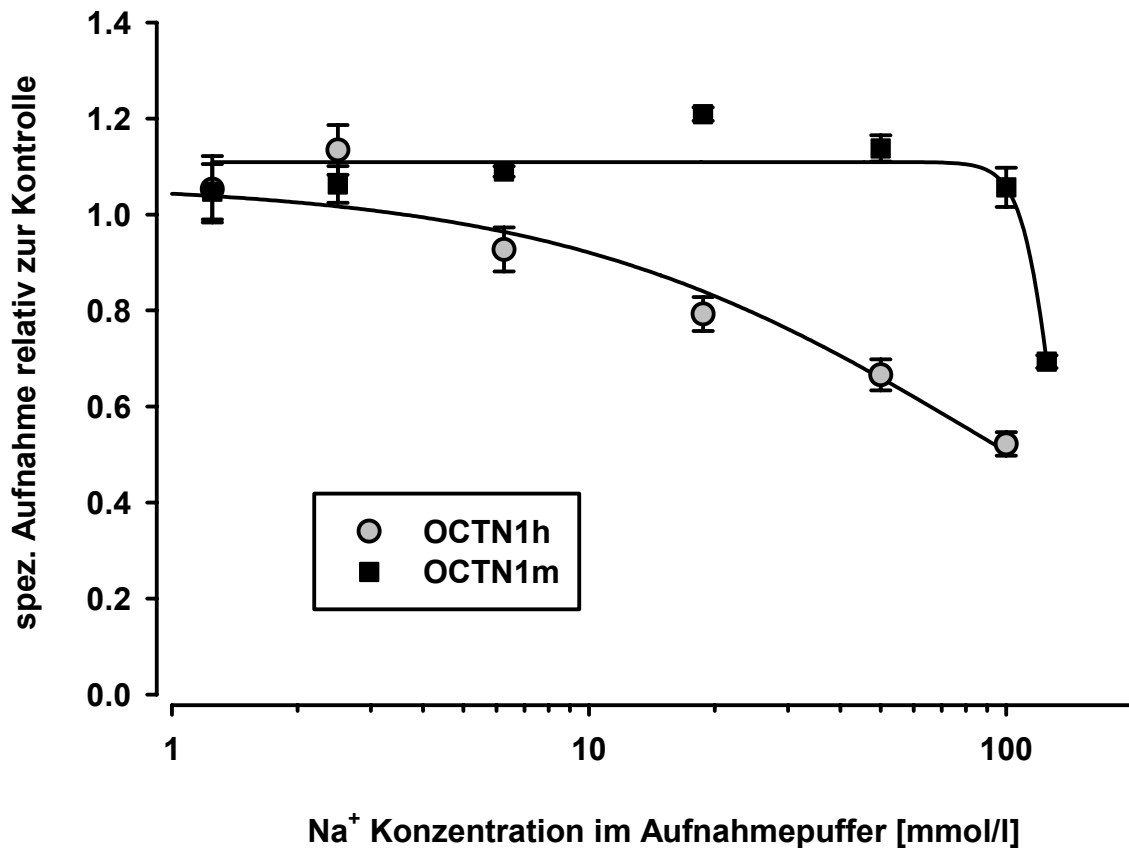


Abb. 47

Die Aufnahmebedingungen (10 $\mu\text{mol/l}$ Stachydrin in Aufnahmepuffern mit unterschiedlichen Na^+ Gehalten, 1 min, 37° C) waren für beide Zelllinien (FIT-OCTN1h und OCTN1m im Epstein-Barr Expressionssystem) identisch. Vor der Aufnahme wurden die Zellen mit einer substratfreien Lösung umgelpuffert, bei der, wie in den Aufnahmelösungen selbst, entsprechende Anteile der Natriumionenkonzentration isoosmotisch durch NMDG substituiert worden waren. Die Aufnahmen wurden relativ zur Kontrolle ohne Natriumionen aufgetragen. Die experimentellen Daten wurden mit einer Hill-Funktion beschrieben (logistische Funktion mit drei Parametern: $y = a/(1+(x/x_0)^b)$). Der resultierende Hillkoeffizient (b) betrug für OCTN1h 0.84 und für OCTN1m 11.15. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und SEM, $n = 3$.

3.7 Steuerbarkeit der eingesetzten Expressionssysteme

Innerhalb dieser Arbeit wurden zur funktionellen Untersuchung der Transporter zwei unterschiedliche konditionelle Expressionssysteme (Flp-In™ T-Rex™ System Fa. Invitrogen, Epstein-Barr Expressionssystem) eingesetzt. Die Möglichkeit zur induzierbaren Expression des Proteins sollte theoretisch den Vorteil bieten, dass im ausgeschalteten Zustand praktisch keine mRNA und somit keine Transportermoleküle produziert werden. In einem solchen Zustand wäre die Zelllinie optimal dafür geeignet als Negativkontrolle zur Untersuchung von Substrattransport zu dienen, da sie den exprimierenden Zellen genetisch identisch ist. Dies würde zu einer maximalen Vereinheitlichung des Hintergrundes führen, was vor allem für die „Difference Shading“ Analyse, die ja auf einem direkten Vergleich von zwei Zelllinien beruht, wünschenswert ist. Es hatte sich allerdings herausgestellt, dass die Steuerbarkeit der Expression nicht so absolut war, wie es für einen solchen Einsatz notwendig gewesen wäre (siehe 3.5.1). Daher wurden zur funktionellen Charakterisierung des OCTN1 weiterhin nicht transfizierte HEK-293-Zellen bzw. FIT-NT Zellen als Negativkontrolle eingesetzt.

Nach Aufdeckung des Substratspektrums von OCTN1 wurde in einem entsprechenden Aufnahmeversuch die spezifische Ergothioneinaufnahme in ein- und ausgeschaltetem Zustand der beiden Expressionssysteme direkt miteinander verglichen (Abb. 48). Im Epstein-Barr System ging die Ergothioneinaufnahme ohne Doxycyclin im Wachstumsmedium nur auf 56% der Positivkontrolle mit dem Antibiotikum zurück. Im Flp-In™ T-Rex™-System konnte ein Rückgang auf 3% beobachtet werden. Die parallel bestimmte unspezifische Aufnahme der nicht transfizierten Zellen lag in jedem Fall unterhalb der Quantifizierungsgrenze der LC-MS/MS-Analytik. Die Steuerbarkeit des Flp-In™ T-Rex™ Systems für OCTN1h war bei dieser Untersuchung sehr gut und nicht zu vergleichen mit den Ergebnissen, die in Aufnahmeversuchen für andere Transporter erzielt worden waren (EMTh, EMTr, OCTN2r, siehe 3.5.1).

Genauere Untersuchungen, warum die Steuerbarkeit für die anderen Transporter im FIT-System deutlich schlechter als für OCTN1h war, sind noch nicht durchgeführt worden. Die schlechte Steuerbarkeit der Expression für OCTN1m im Epstein-Barr

System könnte auf eine unzureichende Produktion des Tet-Repressors, der die Transkription des Transportergens verhindert, zurückzuführen sein. Die Tet-Repressorkassette befindet sich nicht im Expressionsvektor, sondern in einem separaten Plasmid (siehe 3.6). Unterschiede in der Anzahl der jeweiligen Plasmide in den Zellen könnten ein Grund für unterschiedliche Transkriptionseffizienzen sein. Wenn der Expressionsvektor in höherer Kopienzahl in der Zelle vorliegt, kann unter Umständen nicht genügend Tet-Repressor für eine komplette Hemmung der Transkription gebildet werden. Im Flp-In™ T-Rex™-System (siehe 2.4.5) wird der Tet-Repressor und das Transportergen nur einmalig stabil in das Genom der Ausgangszelllinie integriert, es gibt dort für den Tet-Repressor nur eine Bindungsstelle.

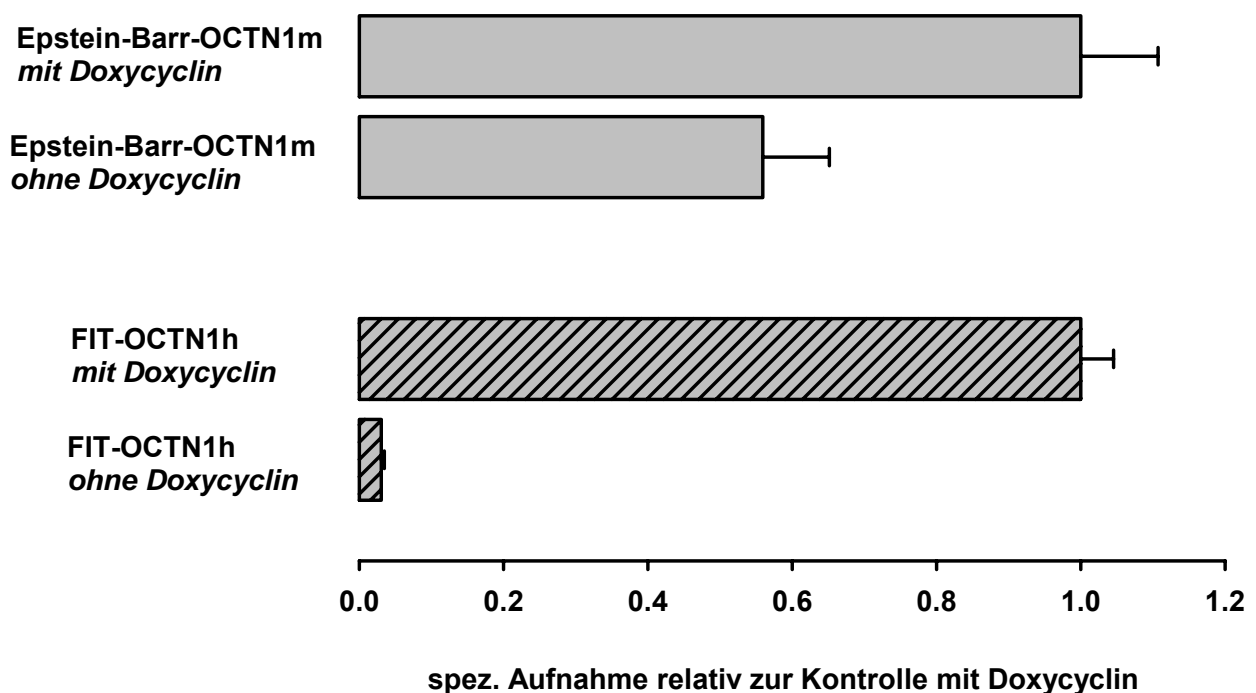


Abb. 48

Die Aufnahmebedingungen waren für beide Expressionssysteme identisch: 10 µmol/l Ergothionein, 1 min, 37° C. Bei der Positivkontrolle wurde die Expression des Transporters 20 h vor dem Aufnahmeversuch durch die Zugabe von 0.1 µg/ml Doxycyclin zum Wachstumsmedium eingeschaltet. Der endogene zelluläre Ergothioneingehalt wurde parallel mitbestimmt und subtrahiert, um die spezifische Aufnahme zu erhalten. Dargestellt sind Mittelwerte mit SEM, n = 3.

4. Diskussion

4.1 Methodischen Aspekte

Der Einsatz der Massenspektrometrie (MS) als Analysetechnik ermöglichte es, neuen Boden auf dem Gebiet der Substratforschung zu erschließen. Wir konnten mit Hilfe dieser Detektion eine Methode entwickeln, die wir auch als LC-MS Screening bezeichnen, und mit der neue Substrate für Transporter identifiziert werden können. Die Beantwortung der Frage nach der physiologischen Bedeutung eines Transporters fußt immer in den Erkenntnissen, die man zur funktionellen Charakterisierung und zur Lokalisation des Transporters im Organismus hat. Auf Grund der genetisch bedingten Verwandtschaftsgrade von Transportern werden sie in Familien eingeteilt. Über die Zugehörigkeit zu einer solchen Gruppe ist auch das initial zu testende Substratspektrum festgelegt, nämlich die bekannten Substrate der Transporter in der jeweiligen Familie. Dies ist in den meisten Fällen der einzige Anhaltspunkt, den man für einen neuen Transporter hat, vor allem wenn über die Lokalisation keine spezifischeren Erkenntnisse gewonnen werden. Auf diese Weise ist es nicht möglich, neue Substratspektren aufzudecken. Vielmehr arbeitet man immer mit demselben Kollektiv an Substanzen.

Die bisher vorherrschende Methode zur Untersuchung von Transportaktivitäten ist der Einsatz radioaktiv markierter Substrate in so genannten Radio Tracer Assays. Die Notwendigkeit einer meist teuren Markierung und der damit verbundene Sicherheits- bzw. Entsorgungsaufwand tragen zur Unflexibilität in dieser Fragestellung bei. Unser Ziel war es, einen möglichst unvoreingenommenen analytischen Ansatz zu entwickeln, um physiologische Substrate von Transportern zu identifizieren. Prinzipiell kann man Transporter in zellulären Systemen funktionell zur Expression bringen, Substrate müssen diesen Transportern dann in Lösung angeboten werden. Als Substratlösungen haben wir biologische Materialien (Plasma, Organhomogenate, Zelllysate) eingesetzt, in der Hoffnung, dass sich in einem solchen komplexen Gemisch eine Substanz befindet, die vom Transporter als Substrat akzeptiert wird. Das Substrat sollte sich im Inneren der den Transporter exprimierenden Zellen anreichern. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die den

Transporter nicht exprimierten und derselben Inkubation unterzogen wurden. Die MS Detektion wurde dann eingesetzt, um die Lysate beider Zelllinien zu untersuchen. Der Vergleich der generierten Massenspektren von Transporter- und Kontrollzellen wurde mit einer von Dr. D. Gründemann dafür entwickelten Software (Difference Shading) vollzogen. Treten reproduzierbar Unterschiede in den Massenspektren auf, schließt sich eine Strukturaufklärung des Signals mit Hilfe der MS bzw. MS/MS Analytik an. Die identifizierte Substanz wird dann in einem spezifischen Aufnahmeexperiment bezüglich des Transportes untersucht. Wir haben zeigen können, dass es auf diese Art und Weise möglich ist, Substrate für Transporter zu identifizieren, ohne dass man im Vorfeld ein genaues Bild von der molekularen Struktur des Substrates hat.

Darüber hinaus können neben Radio Tracer Assays LC-MS/MS Methoden zur Quantifizierung der spezifischen Aufnahme von Substraten eingesetzt werden. So werden keine radioaktiv markierten Substanzen für diese Versuche benötigt. Es ist bisher gängig Konkurrenzexperimente durchzuführen, wobei versucht wird, die Aufnahme eines bekannten radioaktiv markierten Substrates mit anderen unmarkierten Substanzen kompetitiv zu hemmen, um möglichst viele Stoffe zumindest auf eine Interaktion am Transporter zu untersuchen. In solchen Fällen können nun Aufnahmeexperimente durchgeführt werden, die eine direkte Aussage über einen möglichen Transport der Substanz machen. Eine hohe Flexibilität in der Auswahl der Stoffe und eine schnelle Versuchsdurchführung sind die Folge. Geht es allerdings um Substrate, die selbst in hohen Konzentrationen im Stoffwechsel der Expressionszelllinie vorkommen, ist die MS Detektion von einem Nachteil geprägt. Der Hintergrund in den Zellen ist dann häufig zu hoch, um exakte Aufnahmeeraten zu bestimmen. Hier setzt sich der Vorteil der selektiven Markierung der radioaktiven Substrate durch. Aus diesem Grund wurde bei der Darstellung des Substratspektrums von OCTN1 in Abgrenzung zu OCTN2 auch die Flüssigszintillationszählung für einige Substrate eingesetzt (siehe Ergebnisse, Abb. 23). Die gesamte funktionelle Charakterisierung des Ergothioneins als physiologisches Substrat von OCTN1 wurde per LC-MS/MS Analytik durchgeführt. Die innerhalb dieses Projektes entwickelten analytischen Verfahren werden auch weiterführend zur funktionellen Charakterisierung von Transportern zum Einsatz kommen.

Es bietet Vorteile, die zu untersuchenden Transporter in konditionellen Expressionssystemen für die beschriebene Substratidentifizierung zu etablieren. Hierbei ist vor allem die Vereinheitlichung des unspezifischen Hintergrundes durch den Einsatz von nur einer Zelllinie in den Inkubationsexperimenten zu nennen. Dieser Vorteil wurde im Grunde genommen bei der Substratsuche für OCTN1 noch nicht genutzt, da die Steuerbarkeit des Expressionssystems im Vorfeld nicht ausreichend erschien. Daher waren weiterhin zwei verschiedene Zelllinien, die allerdings vom gleichen genetischen Hintergrund abstammten, für die Substratsuche eingesetzt worden.

4.2 Der Ergothioneintransporter OCTN1 (ETT)

Erstmals angewandt wurde die beschriebene Methode für den organischen Kationentransporter OCTN1 mit dem Ziel neue Hinweise auf sein Substratspektrum zu erhalten, das bis dato ausschließlich aus Substraten anderer bekannten Transporter bestand (Gründemann et al., 2005). OCTN1 wurde in einem konditionellen Expressionssystem etabliert. Diese Zelllinie wurde einem Inkubationsexperiment unterzogen, in dem humanes Plasma als biologische Matrix eingesetzt wurde. Im Zelllysat konnte per LC-MS Analytik ein Signal identifiziert werden, das nur in den OCTN1 exprimierenden Zellen auftrat. Es führte letztendlich zu einem neuen Substrat dieses Transporters, zum Stachydrin, dem Betain der Aminosäure Prolin. Dies ermöglichte als Leitstruktur die Aufdeckung des Substratspektrums von OCTN1 und die klare Abgrenzung zum eng verwandten Transporter OCTN2. Im Zuge dieser Untersuchung konnte das führende Substrat des OCTN1, das Ergothionein, identifiziert werden. Zwar wurde deutlich, dass sich die Substratspektren von OCTN1 und OCTN2 prinzipiell überlappen und es eine Reihe von organischen Kationen gibt, die von beiden Transportern als Substrate akzeptiert werden, allerdings werden diese Substanzen mit vergleichsweise geringer Effizienz transportiert. Es ist nun unbestritten, dass beide Transporter trotz der Ähnlichkeit ihrer Aminosäuresequenzen (Tamai et al., 1998) unterschiedliche Substratspezifitäten haben.

Bekannt war bereits, dass die Affinität von OCTN1 für Carnitin nicht mit der von OCTN2 zu vergleichen ist. Trotzdem wurde OCTN1, vor allem in Ermangelung anderer Substrate, auch als „low-affinity“ Carnitintransporter bezeichnet (Xuan et al., 2003). Unsere Ergebnisse zeigen erneut, dass OCTN1 für Carnitin sowie für Acetylcarnitin nur eine geringe Transporteffizienz aufweist. Ebenfalls auf Grund seiner geringen Transporteffizienz ist das prototypische organische Kation TEA (Tetraethylammonium) für OCTN1 und OCTN2, vor allem gegenüber den beiden spezifischen Substraten dieser Transporter, praktisch von wenig Bedeutung. Im Substratspektrum der nicht-neuronalen Monoamintransporter nimmt es, z. B. bei OCT2r, hingegen eine wichtige Stellung ein (Gründemann et al., 1999). Für Verbindungen ohne zwitterionische Struktur wie 4-Hydroxyprolin, N-Methylprolin und Prolin ist die Transporteffizienz von OCTN1 gering. Wird allerdings die Aminofunktion dieser Moleküle vollständig methyliert, steigt die Transporteffizienz beträchtlich an. Die Betainstruktur kann sicherlich als eine Voraussetzung der besseren Substrate von OCTN1 gelten. Stachydrin und Betonicin liegen noch in einem Bereich, in dem sich die beiden Substratspektren überschneiden. Denn sie werden zwar von OCTN1 effizienter transportiert, sind aber nicht spezifisch für den Transporter, so wie das bei Ergothionein deutlich wird, da auch OCTN2 sie als Substrate akzeptiert.

Ergothionein wird nur von OCTN1 mit hoher Effizienz und Spezifität transportiert. Dieser initiale Befund aus dem Vergleich der Transporteffizienzen und alle nachfolgenden Ergebnisse untermauern die Tatsache, dass es sich bei dieser Substanz um das spezifische physiologische Substrat von OCTN1 handelt (Gründemann et al., 2005). Dies zeigt letztendlich auch, dass man mit der Untersuchung eines vorherbestimmten Substratkollektivs an einem Transporter am tatsächlichen Substrat vorbeigehen kann, so wie es bei den Anfangsbefunden zum Substratspektrum von OCTN1 der Fall war (Tamai et al., 1997; Yabuuchi et al., 1999).

Der K_m -Wert von OCTN1h für Ergothionein liegt bei rund 21 $\mu\text{mol/l}$, damit weist der Transporter eine hohe Affinität für dieses Substrat auf. Sie liegt um den Faktor 20 über den beschriebenen Affinitäten für Carnitin und TEA (Xuan et al., 2003). Für die nicht-neuronalen Monoamintransporter OCT1h und OCT2h ist MPP⁺ (1-Methyl-4-Phenylpyridinium), jedenfalls so weit bekannt, das Substrat für das die Transporter

die höchste Affinität aufweisen. Diese K_m -Werte liegen mit respektive 15 und 19 $\mu\text{mol/l}$ im selben Bereich (Zhang et al., 1997; Zhang et al., 1998; Gründemann et al., 1999). K_m -Werte für Transporter sind in diesem Zusammenhang beispielsweise nicht zu vergleichen mit K_D -Werten von einigen Rezeptoren für ihre Liganden (z. B. die Serotoninrezeptoren), die häufig im nanomolaren Bereich liegen (Vizi, 2000; Lanfumey and Hamon, 2004). Die Bindung eines Substrates an einen Transporter muss so geschaffen sein, dass der Transporter sein Substrat nach dem Transport durch die Membran wieder entlassen kann, je höher die Affinität ist, desto langsamer ist auch die Abdissoziation. Die Affinität von OCTN1h für Stachydrin ist mit einem K_m -Wert von 270 $\mu\text{mol/l}$ viel geringer als die für Ergothionein. Daraus folgte ferner, dass die Transporteffizienz von OCTN1h für Ergothionein zehnfach die des Stachydrins übersteigt. Für OCTN1m fiel der Vergleich der K_m -Werte mit 50 $\mu\text{mol/l}$ für Ergothionein und 118 $\mu\text{mol/l}$ für Stachydrin nicht ganz so deutlich aus.

Da es sich beim Stachydrin zu dieser Zeit um das zweitbeste bekannte Substrat von OCTN1 handelt, wurde die weitere Charakterisierung des Ergothioneintransportes meist im Vergleich zu Stachydrin dargestellt. Der Zeitverlauf der Aufnahme beider Substrate unterstrich erneut die Ausnahmestellung des Ergothioneins, dies wird vor allem im Ausmaß der Akkumulation in den Zellen und an der initialen Aufnahmegeschwindigkeit deutlich, wohingegen Zellen, die den Transporter nicht exprimieren, praktisch impermeabel für Ergothionein sind. Es stellte sich dann heraus, dass der Transport des Ergothioneins über OCTN1h von der Natriumionenkonzentration abhängig ist. Die Natriumionen waren im Aufnahmebuffer durch verschiedene andere Kationen ersetzt worden (K^+ , Li^+ , N-Methyl-D-Glukosamin = NMDG). Dabei schien Li^+ in der Lage zu sein, das Na^+ teilweise zu ersetzen, da die Transporteffizienz gegenüber der Positivkontrolle nur auf rund 40% zurückging, während bei den beiden anderen Kationen ein Rückgang auf ca. 10% zu verzeichnen war. Unter Umständen spielt hier die Größe der Ionen eine Rolle. Betrachtet man die Ionenradien, so liegt Na^+ mit 102 pm zwischen Li^+ mit 76 pm und K^+ mit 138 pm. Das Kaliumkation könnte so vielleicht zu groß sein, um mit der Bindungsstelle am Transporter zu interagieren, während das Lithiumkation zwar deutlich kleiner ist als Na^+ aber trotzdem Zugang zur Bindungsstelle erhalten könnte. Als positiv geladenes Molekül ist NMDG nicht zur entsprechenden Interaktion in der Lage. Eine ähnliche Untersuchung für OCTN2h zeigt dasselbe Bild. Durch den

Ersatz von Na^+ gegen Li^+ im Aufnahmebuffer geht der Carnitintransport auf knapp 40% der Positivkontrolle zurück, während bei einer Substitution durch K^+ und NMDG der Rückgang deutlich stärker ausgeprägt ist (Tamai et al., 1998).

Die Tatsache, dass der Transporter den ins Zellinnere gerichteten Natriumionengradienten für den Ergothioneintransport nutzt, war für die funktionelle Charakterisierung von OCTN1 ein wichtiges Resultat. Ist der Transport eines Substrates an die physiologischen Bedingungen in besonderer Weise angepasst, so ist dies ein Hinweis darauf, dass es sich um ein spezifisches Substrat des Transporters handelt und eine solche Anpassung evolutionär stattgefunden hat. Erhärtet wird diese Annahme dadurch, dass der Stachydrintransport über OCTN1h unter physiologischen Natriumkonzentrationen gehemmt wird und sein Optimum bei unphysiologisch niedrigen Natriumkonzentrationen aufweist. Dieses Phänomen konnte am orthologen Transporter der Maus bestätigt werden. Auch der Carnitintransport über OCTN2h wird durch den Natriumionengradienten angetrieben (Tamai et al., 1998). Die Analogie zwischen beiden Transportern auf diesem Gebiet wird noch deutlicher, wenn man bedenkt, dass die übrigen für OCTN2 postulierten Substrate, weitere organischen Kationen, nicht in Abhängigkeit von der Natriumionenkonzentration transportiert werden (Wu et al., 1999; Ohashi et al., 2001). Wir haben zeigen können, dass intrazelluläres Stachydrin die Zellen über OCTN1h schnell wieder verlassen kann, da dies durch niedrige intrazelluläre Natriumionenkonzentration begünstigt wird. Aus demselben Grund wird der Transport des Ergothioneins in diese Richtung gehemmt.

Ebenso kann der Natriumionengradient als Triebkraft des Transportes für eine intrazelluläre Akkumulation um den Faktor 10 verantwortlich gemacht werden, was in der Regel dem Konzentrationsunterschied zwischen intra- und extrazellulärer Na^+ Konzentration entspricht. Da aber beim Ergothionein im Zeitverlauf der spezifischen Aufnahme eine Akkumulation um einen Faktor 80 gegenüber dem Außenmedium ermittelt worden ist, spielen noch weitere Prozesse eine Rolle, die das Ergothionein z. B. intrazellulär aus dem Gleichgewicht entfernen. Dies gilt auch für das Stachydrin, dessen Transportantrieb noch nicht geklärt ist. Eine Hypothese zur Erklärung des unterschiedlichen Einflusses der Na^+ Konzentration auf die beiden untersuchten Substrate von OCTN1h bieten deren Molekülstrukturen. Unter physiologischen pH-

Bedingungen liegen beide Substanzen überwiegend ungeladen vor. Während das Ergothionein im Thiolimidazolrest funktionelle Gruppen mit Heteroatomen aufweist, die eine negative Partialladung ausbilden können, fehlt ein solcher Rest im Stachydrin. Das Natriumkation könnte mit diesen partial negativen Strukturen interagieren und so den Transportvorgang beschleunigen. OCTN1 ist auf eine Akkumulation des Ergothioneins in den Zellen ausgerichtet.

Die Untersuchungsergebnisse bezüglich der Transporteffizienz, Spezifität und Transportcharakteristika vor allem mit der Einbeziehung natürlicher Ionengradienten als Triebkraft sprechen dafür, dass es sich beim Ergothionein um das physiologische Substrat für OCTN1 handelt (Gründemann et al., 2005). Innerhalb der organischen Kationentransporter der SLC22 Familie war OCTN2 der erste Vertreter für den allgemein akzeptiert wurde, dass ein spezifisches Substrat, das Carnitin, existiert (Tamai et al., 1998). Die ansonsten vorherrschende Meinung bezeichnet die OCTs und OCTNs als poly- oder multispezifische Transporter (Koepsell and Endou, 2004). Dies bedeutet, dass sie prinzipiell für den Transport einer Vielzahl organischer Kationen zuständig sind. Obwohl die physiologische und die pathophysiologische Bedeutung des OCTN2 klar mit dem Carnitintransport verbunden ist (Nezu et al., 1999; Tang et al., 1999), wird allgemein Wert darauf gelegt, auch die Transportleistung für andere Kationen miteinzubeziehen und ihn sowohl als Carnitin- als auch als polyspezifischen Kationentransporter zu bezeichnen (Ohashi et al., 2001; Koepsell and Endou, 2004).

Mit OCTN1 gibt es nun ein weiteres Protein in SLC22 dessen Transport für ein selektives Substrat optimiert ist. Auch wenn noch andere strukturverwandte organische Kationen transportiert werden, so unterscheidet sich dieser Transport doch erheblich in Effizienz, Spezifität und den Parametern, die den Transport beeinflussen. Die Annahme der Polyspezifität der Transporter von SLC22 wird damit weiter in Frage gestellt. Ihm gegenüber steht eine Vorstellung, die an das pharmakologische Profil von Rezeptoren angelehnt ist, das sich durch selektive Agonisten und Antagonisten auszeichnet. Analog hätten Transporter somit selektive Substrate und Inhibitoren, die ihre physiologische Rolle definieren (Gründemann et al., 1999). Auch für die nicht-neuronalen Monomamintransporter lassen sich trotz überlappender Substratspektren spezifische Unterschiede in der Transporteffizienz

für einzelne organische Kationen mit unterschiedlicher physiologischer Bedeutung herausarbeiten (Gründemann et al., 1999). Das selektive Substrat für OCTN1 konnte identifiziert werden, selektive Inhibitoren für diesen Transporter, die die Analogie zu den Rezeptoren weiter unterstützen würden, stehen noch aus. Nur für eine geringe Anzahl von Substanzen wurde bisher die Hemmpotenz für den Ergothioneintransport über OCTN1h untersucht, ohne dass ein potenter Inhibitor entdeckt wurde. Weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet erscheinen sinnvoll. Auch für OCTN2 sind noch keine spezifischen Hemmstoffe bekannt.

Die Ergebnisse zur funktionellen Charakterisierung von OCTN1h entkräften im Grunde genommen die im Vorfeld aufgestellten Hypothesen zu seiner Funktion im Organismus. Danach hätte es sich um einen multispezifischen Transporter gehandelt, der organische Kationen in Abhängigkeit vom pH-Wert transportiert (Tamai et al., 1997). Da die Transportmechanismen in renalen Epithelien für die Elimination von Xenobiotika und endogenen Stoffwechselprodukten eine wichtige Rolle spielen und die Existenz eines Protonenantiporters für organische Kationen in der apikalen Membran der Niere gezeigt worden ist (Takano et al., 1984; Pritchard and Miller, 1993), wurde OCTN1h als molekulare Grundlage dieses Transportes gehandelt, vor allem auch, da er in der apikalen Membran der Mausniere lokalisiert worden war (Tamai et al., 2004).

Diese Interpretationen beruhen auf Erkenntnissen, die man mit dem organischen Kation TEA als Substrat gewonnen hatte. Wir haben zeigen können, dass der TEA-Transport über OCTN1h aber praktisch nicht von großer Bedeutung sein kann, da die Transporteffizienz im Vergleich zum selektiven Substrat Ergothionein vernachlässigbar ist. OCTN1h ist ferner kein Protonenantiporter, der Ergothioneintransport wird nicht signifikant vom pH-Wert beeinflusst. Demzufolge ist OCTN1h nicht identisch mit dem Protonenantiporter für organische Kationen in der apikalen Membran der Niere. Die Vermutung, er sei funktionell gesehen ein multispezifischer, pH-sensitiver Kationentransporter, trifft nicht zu. Er ist ein selektiver Ergothioneintransporter (Gründemann et al., 2005). Seine Expression in der Bürstensaummembran der Niere dient daher vielmehr dem Zweck der Wiederaufnahme des Ergothioneins aus dem Primärharn, so wie seine Expression im Ileum der Resorption des Ergothioneins aus der Nahrung dienen dürfte.

Ergothionein wird im Organismus nicht metabolisiert, was auch erklärt, warum OCTN1 in der adulten Leber nicht exprimiert wird.

Da das Substratspektrum von OCTN1 und vor allem seine Transportselektivität für Ergothionein nun beschrieben sind, gilt es in Erwägung zu ziehen, den Namen des Transporters zu spezifizieren. Wir gehen davon aus, dass es sich beim Ergothionein um das physiologische Substrat des Transporters handelt. Unter dieser Annahme sollte Ergothionein im Organismus auch eine wichtige physiologische Rolle, vergleichbar der des Carnitins, zukommen. Aus diesem Grunde empfänden wir **Ergothionein Transporter (ETT)** als passende Bezeichnung, die nun nachfolgend in dieser Arbeit auch verwendet werden wird (Gründemann et al., 2005).

4.3 Lokalisation des ETT beim Menschen

Ein sehr genaues Bild der Expressionsorte von ETT konnte die Untersuchung einer Vielzahl von humanen Zellen und Geweben mittels quantitativer Real-Time PCR zeichnen (Abb. 49). Diese Ergebnisse wurden von einem Kooperationspartner bei der Bayer Healthcare AG im Bereich Pharma Research – Molecular Screening Technology erarbeitet und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Hierbei bestätigt sich die hohe Expression des Transporters in der Niere, der Luftröhre und im Knochenmark (vgl. Einleitung 1.1). Letzteres ist sicherlich eine sehr interessante Lokalisation, sie konnte vornehmlich auf die CD71+ Zellen im Knochenmark spezifiziert werden. CD71 ist ein zur Zelldifferenzierung herangezogenes Oberflächenantigen und entspricht molekular dem Transferrinrezeptor. Er wird in der Erythropoese für die Eisenaufnahme in die Zellen exprimiert und spielt somit eine maßgebliche Rolle während der Hämoglobinsynthese (Okumura et al., 1992). In Abgrenzung dazu wurde kaum ETT mRNA in anderen Stammzellen des Knochenmarks detektiert. Die Oberflächenantigene CD33 und CD34 markieren sehr frühe Vorläuferzellen der Granulozytopoese, so genannte Promyelozyten und Myeloblasten bzw. hämatopöetische Blasten, CD15 markiert Neutrophile und Eosinophile (Okumura et al., 1992). Die Expression von ETT in Leukozyten ist erheblich, während Erythrozyten, Thrombozyten, Thymus und lymphatische Gewebe den Transporter augenscheinlich nicht exprimieren.

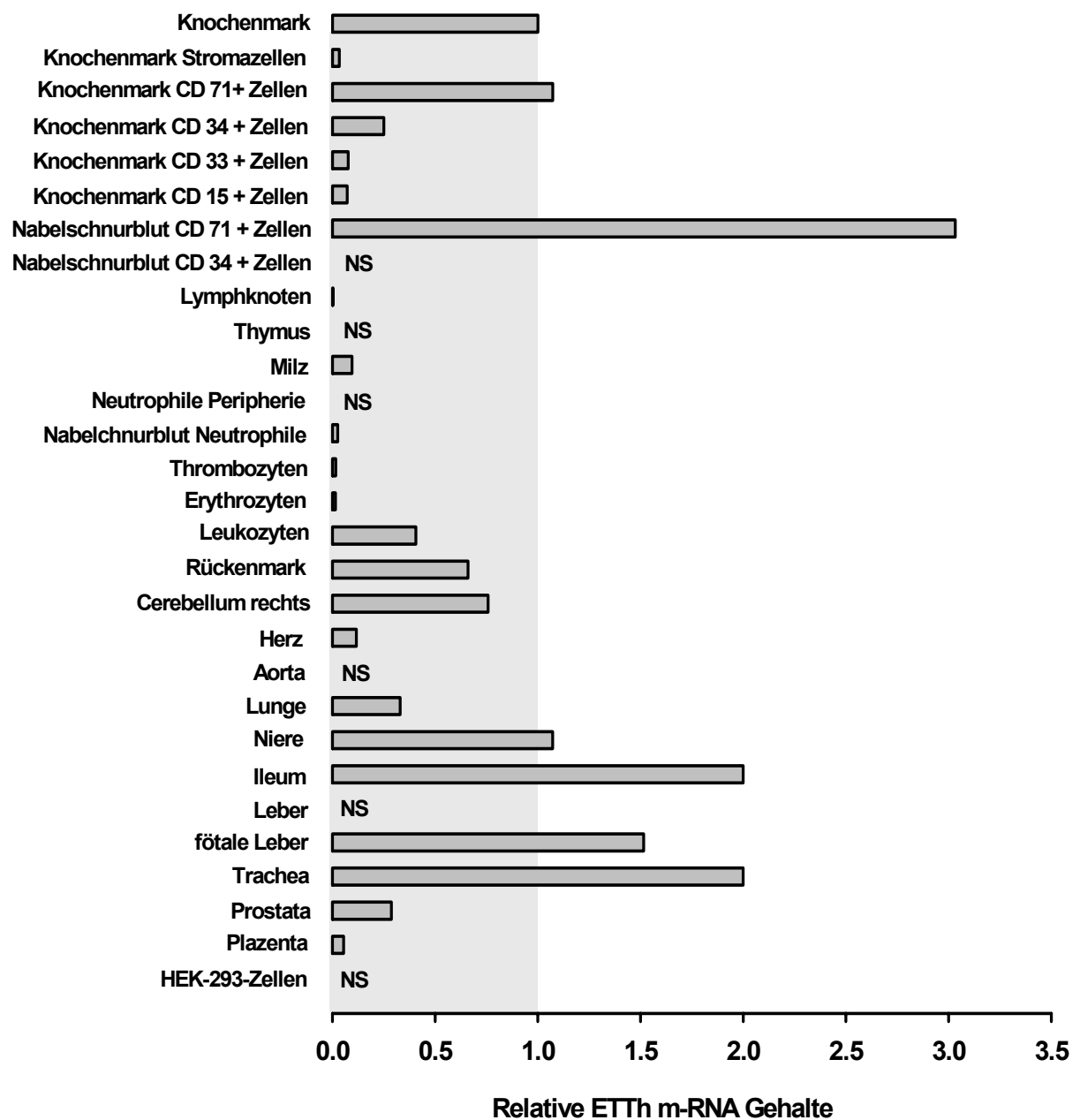


Abb. 49

Gewebeverteilung von ETTh analysiert mittels Real-Time PCR nach dem TaqMan™ Verfahren bei der Bayer Healthcare AG im Bereich Pharma Research – Molecular Screening Technology. Freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Dr. S. Golz und Dr. A. Geerts. Die Ergebnisse sind relativ zum ETTh m-RNA Gehalt des Knochenmarks dargestellt.

Eine vergleichsweise geringe Expression ist in einigen Organen wie Lunge, Herz, Plazenta und Prostata zu verzeichnen. Darüber hinaus wurde kein Signal für die adulte Leber erhalten, wohingegen ETTh in der fötalen Leber stark exprimiert wird. Neben der Niere als Eliminationsorgan exprimiert auch das Ileum als Ort der Resorption ETTh. Daneben weist die Leber, wo vornehmlich die enzymatische

Biotransformation von Substanzen stattfindet, beim Erwachsenen den Transporter nicht auf. Die Ergebnisse bestätigen, dass ETTh durch ein spezifisches Expressionsmuster gekennzeichnet ist. Zusammen mit dem führenden Substrat des ETT werden diese charakteristischen Lokalisationsorte essentiell zur Aufdeckung der physiologischen Funktion des Transporters beitragen.

4.4 Ergothionein

Ergothionein ist das Betain des 2-Thiolhistidins. Im weiteren Sinne ist es ein Derivat der Aminosäure Histidin, beim dem der Stickstoff zur zwitterionischen Betainstruktur aufmethyliert worden ist und der Imidazolring einen Schwefelsubstituenten trägt. Es wurde erstmals zu Beginn des 20. Jahrhunderts aus dem Mutterkorn (*Claviceps purpurea*) isoliert (Melville, 1958). Heute weiß man, dass die Substanz nur von Pilzen (z. B. *Aspergillus*- und *Alternaria*-, sowie *Neurospora*- und *Penicillium*-Arten) und einigen Mycobakterien synthetisiert wird, hierzu zählen sowohl pflanzenpathogene als auch saprophytische Pilze (Melville, 1958). Die Untersuchungen zur Bedeutung des Ergothioneins für den Pilzstoffwechsel blieben ohne Ergebnis. Allerdings sind für die entsprechenden Pilzarten keine Mutanten bekannt, die auf die Ergothioneinbiosynthese verzichten. Die Synthese erfolgt aus der Aminosäure Histidin, während das Schwefelatom von Cystein beigetragen wird, ist Methionin an der Ausbildung der Betainstruktur beteiligt. Bekannte Zwischenstufen sind das 2-Thiolhistidin und das Betain des Histidins das so genannte Herzynin (Melville, 1958).

Pflanzen nehmen Ergothionein nur über ihre Wurzeln auf, betreiben also keine Eigensynthese, und auf diese Weise gelangt die Substanz letztendlich in die Nahrungskette (Melville, 1958). Säugetiere resorbieren Ergothionein effizient aus der Nahrung, speichern es praktisch ohne Metabolisierung und sind auch nicht zur Eigensynthese fähig (Melville, 1958; Mayumi et al., 1978). Da also weder Tiere noch Pflanzen Ergothionein biosynthetisieren, sind die Gehalte entsprechenden Fluktuationen in Abhängigkeit von der Aufnahme unterworfen. Die höchsten Ergothioneingehalte wurden in Pilzen gefunden (0.1 – 1 mg pro g Trockenmasse) (Melville, 1958). Bei höheren Säugetieren und dem Menschen ist Ergothionein in

einer Vielzahl von Organen und Geweben nachgewiesen worden. Dazu gehören beispielsweise Leber, Niere, Herz und Gehirn (Melville, 1958; Briggs, 1972; Kawano et al., 1982), aber auch Milch oder Eiweiß (Melville, 1958). Interessanter Weise wurden hohe Ergothioneinspiegel in Geweben detektiert, die bekanntermaßen hohem oxidativem Stress ausgesetzt sind, wie Samenflüssigkeit (Mann and Leone, 1953), Augenlinsen (Shukla et al., 1981; Shires et al., 1997) und Erythrozyten (Melville, 1958). Allgemein hat man zeigen können, dass Ergothioneingehalte stark variieren, sowohl zwischen den Spezies als auch zwischen einzelnen Individuen (Melville, 1958). Darüber hinaus sind die Ergothioneinkonzentrationen abhängig von der Aufnahme der Substanz mit der Nahrung (Melville, 1958). Im Gegensatz zum Menschen exprimieren Ratten ETT stark in der Leber (Wu et al., 2000). Werden Ratten einer ergothioneinfreien Diät unterzogen, so sinkt der Ergothioneinspiegel in der Leber zwar ab, unterschreitet aber auch bei andauernder Diät nicht ein bestimmtes Niveau, was für eine physiologische Signifikanz spricht (Kawano et al., 1982). Die Fähigkeit des Organismus, Ergothionein effizient zu speichern, zeigt sich auch in der kurzen Plasma- oder Vollbluthalbwertszeit bei Ratten von 10 respektive 18 min (Melville, 1958; Mayumi et al., 1978). Dann jedoch, nach der Verteilung bzw. Akkumulation in speichernden Organen, beträgt die Halbwertszeit des Ergothioneins bezogen auf den gesamten Organismus bei Ratten einen Monat (Mayumi et al., 1978). Ergothionein wird kaum renal ausgeschieden und praktisch nicht hepatisch metabolisiert (Lawson et al., 1950; Melville, 1958; Mayumi et al., 1978). Selbst nach einer Woche ohne Nahrungsaufnahme wurde kein Rückgang der Ergothioneingehalte in Leber und Blut bei Ratten beobachtet (Mayumi et al., 1978).

Die Funktionen des Organismus sind augenscheinlich darauf ausgerichtet, Ergothionein zu speichern und zurückzuhalten. Auf der anderen Seite konnten aber bei Ratten, die länger ergothioneinfrei ernährt wurden, keine Mangelercheinungen festgestellt werden. Auch die Reproduktion dieser Tiere verlief normal. Symptome eines Ergothioneindefizits sind nicht bekannt (Kawano et al., 1982). Die physiologische Bedeutung des Ergothioneins für Pflanzen, Tiere und somit auch für den Menschen ist nicht geklärt. Frühe Hypothesen zu einer thyreostatischen Wirkung oder zur Funktion als Neurotransmitter im ZNS bestätigten sich nicht (Heath et al., 1952; Briggs, 1972).

4.5 Mögliche Funktion des Ergothioneins in Erythrozyten

4.5.1 Spezifische ETT Expression auf den Vorläuferzellen der Erythrozyten

Wir haben zeigen können, dass der Organismus mit ETT ein spezifisches Transportsystem für Ergothionein besitzt. Dieses Ergebnis unterstreicht die wichtige physiologische Rolle, die das Ergothionein fast zwingend spielen muss. In das Zentrum wissenschaftlicher Aufmerksamkeit gelangte Ergothionein erstmals, nachdem Konzentrationen im hohen mikromolaren Bereich in Erythrozyten detektiert worden waren (Melville, 1958; Hartman, 1990). Daran schloss sich schnell die Erkenntnis an, dass Ergothionein hauptsächlich während der Erythropoese im Knochenmark in die Erythrozyten gelangt (Heath et al., 1952; Melville, 1958). Betrachtet man das Expressionsmuster von ETT beim Menschen (Abb. 49), so wird sehr schnell ein Zusammenhang mit der hohen Expression des Transporters im Knochenmark, spezifischer auf den CD71+ Zellen, deutlich. CD71 entspricht als Oberflächenantigen dem Transferrinrezeptor, der für einen bestimmten Zeitraum auf den Erythrozytenvorläuferzellen exprimiert wird und für die Eisenaufnahme im Zuge der Hämoglobinsynthese maßgeblich verantwortlich ist (Okumura et al., 1992). Transferrin selbst ist ein in der Leber gebildetes Transportprotein für Eisen im Plasma. Somit ist offensichtlich, dass die Erythrozyten während ihrer Reifung im Knochenmark zeitgleich mit Eisen auch Ergothionein in großer Menge aufnehmen. Damit stellt sich die Frage, welche physiologische Aufgabe das Ergothionein in den Erythrozyten erfüllen könnte und ob sie im Zusammenhang mit dem Hämoglobin steht. Vor allem auch, da zirkulierende Erythrozyten ETT praktisch nicht exprimieren (Abb. 49) und kein Ergothionein mehr aufnehmen können (Melville, 1958). Der Ergothioneingehalt der Erythrozyten nimmt mit der Lebensdauer allerdings nur geringfügig ab (Hartman, 1990).

Eine spezifische Expression des ETT auf Erythrozytenvorläuferzellen wurde mittlerweile neben dem Menschen auch für die Maus bestätigt (Kobayashi et al., 2004). Die Daten zur Expression auf den myeloischen Zellen (Abb. 49) zeigen darüber hinaus, dass ETT auf anderen Stammzellen des Knochenmarks, z. B.

solchen beteiligt an der Granulozytopoese (CD33, CD34, CD15), deutlich geringer exprimiert wird als auf den CD71+ Erythrozytenvorläuferzellen. Auch Kobayashi et al. teilen in ihrer Veröffentlichung die Auffassung, dass dies auf eine entsprechende physiologische Funktion hindeutet (Kobayashi et al., 2004). Ohne Kenntnis des eigentlichen Substrates von ETT wird auf den Transport von für die Erythropoese essentiellen Bestandteilen spekuliert (Kobayashi et al., 2004). ETT ist nicht der erste Transporter, der mit der Hämatopoese in Zusammenhang gebracht wird, Knock-out Mäuse des Thiamintransporters der SLC19 Familie zeigen Anomalitäten in der myeloischen Reihe (Oishi et al., 2002).

4.5.2 Antioxidative Eigenschaften des Ergothioneins

Auf Grund seiner chemischen Struktur sind vor allem antioxidative Eigenschaften des Ergothioneins untersucht worden. Die Reaktivität des Schwefelatoms im Ergothionein zeigt markante Unterschiede, z. B. zu dem des Glutathions oder Cysteins. Dazu zählt seine hohe Stabilität gegenüber alkalischen Bedingungen. Während der Schwefel aus Glutathion und Cystein als Sulfid abgespalten wird, bleibt der Thiolimidazolrest des Ergothioneins intakt. Auf der anderen Seite kann der Schwefel leicht oxidativ (z. B. durch Halogene) aus dem Ergothionein entfernt werden. Dies sind Eigenschaften, die auf das Vorwiegen der Thionstruktur zurückzuführen sind und bei den aliphatischen Sulfhydrylgruppen des Glutathions und des Cysteins so nicht auftreten. Unter oxidativen Bedingungen bilden sie Disulfide, die beim Ergothionein in vitro schwierig zu generieren sind (Melville, 1958). Aufgrund des tautomeren Gleichgewichts ist Ergothionein vergleichsweise wenig reaktiv und reagiert nicht mit vielen Sulfhydrylreagentien (Hartman, 1990). Das Ergothioneindisulfid ist in wässriger Lösung nur wenig stabil. Die basalen chemischen Eigenschaften des Ergothioneins unterscheiden sich also zunächst von bekannten Antioxidantien im Organismus. Interessanterweise kann das Ergothioneindisulfid durch Cystein oder auch Glutathion wieder reduziert werden, während Ergothionein selbst nicht mit den Disulfiden des Glutathions oder des Cysteins reagiert (Hartman, 1990; Shires et al., 1997). Das Standardredoxpotential (E_0') bei pH 7 ist für das Thiol-Disulfid Paar des Ergothioneins deutlich weniger negativ als für andere natürliche Thiole (Hartman, 1990).

Über diese grundlegenden Ergebnisse zur chemischen Charakterisierung von Ergothionein hinaus, gibt es eine Reihe von spezifischeren Untersuchungen zu möglichen antioxidativen Eigenschaften der Substanz gegenüber biologisch relevanten, reaktiven Sauerstoffspezies. Hierzu zählen vor allem Superoxidradikale (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hypochlorige Säure (HOCl), Hydroxylradikale ($\cdot OH$), Lipidperoxide, Singulett Sauerstoff (1O_2), Peroxynitrit ($ONOO^-$) und Hämproteine in Anwesenheit von H_2O_2 (Halliwell and Gutteridge, 1989; Akanmu et al., 1991). In wässriger Lösung reagiert Ergothionein nicht in signifikanter Weise mit Singulett Sauerstoff und Superoxid (Hartman, 1990; Akanmu et al., 1991). Auch für ein direktes Abfangen von H_2O_2 gibt es keine Hinweise, so ist Ergothionein z. B. nicht in der Lage die Überlebensrate von mit Wasserstoffperoxid behandelten Zellen zu erhöhen (Aruoma et al., 1999). Auf der anderen Seite konnte man zeigen, dass die Generierung von Singulett Sauerstoff durch Anregung photosensitiver Moleküle in vitro von Ergothionein vermindert wird (Hartman, 1990). Von den untersuchten Thiolen (N-Acetylcystein, Glutathion, 2-Mercaptoethanol) erwies sich Ergothionein als das mit der größten Kapazität, die Entstehung des Singulett Sauerstoffs zu unterdrücken (Rougee et al., 1987).

Ferner weiß man, dass Ergothionein sehr effizient Hydroxylradikale inaktivieren kann, wobei dies allerdings keine spezifische Eigenschaft ist, vielmehr können viele in vivo relevante Moleküle Hydroxylradikale mit ähnlich hohen Geschwindigkeiten abfangen (Akanmu et al., 1991). Ein wichtiger Befund auf diesem Gebiet war aber, dass Ergothionein in der Lage ist, die Bildung der Hydroxylradikale aus Metallkationen und H_2O_2 zu unterbinden (Akanmu et al., 1991). Diese Fähigkeit des Ergothioneins ist auf seine Eigenschaft zurückzuführen, zweiwertige Metallkationen zu komplexieren (Hartman, 1990). In diesem Zusammenhang gibt es eine Untersuchung der Komplexbildungskonstanten von Ergothionein mit zweiwertigen Metallkationen. Hierbei wiesen Komplexe mit Cu^{2+} gefolgt von Zn^{2+} die höchste Stabilität auf, Eisen war nicht in die Untersuchung eingeschlossen (Hanlon, 1971). Dies findet Bestätigung in der Fähigkeit des Ergothioneins Cu^{2+} induzierte Hämoglobinoxidation zu verhindern (Akanmu et al., 1991). Im Gegensatz zu anderen Metallkationen (z. B. Zn^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+}) katalysiert einzig Cu^{2+} die Oxidation des Hämoglobins in den Erythrozyten schon in sehr niedrigen Konzentrationen, komplexierende Agentien können dem entgegenwirken (Rifkind, 1974). Die Chelatkomplexbildung des

Ergothioneins führte dazu, seinen Effekt auf die Aktivität einiger Metalloenzyme zu untersuchen. Bei den eingesetzten Enzymen mit Zn^{2+} als Zentralatom gab es keine Interaktionen mit Ergothionein. Bei den Cu-Metalloenzymen wurde lediglich eines, die Polyphenoloxidase, gehemmt. Hier liegt das Kupferatom aber nur einfach geladen vor (Hanlon, 1971).

Hypochlorige Säure (HOCl) greift in vivo z. B. die α_1 -Antiproteinase an. Dieses Protein hemmt im Gewebe vorkommende Proteinase wie die Serinproteinase oder Elastase. Untersuchungen in vitro konnten zeigen, dass die durch HOCl induzierte Inaktivierung der α_1 -Antiproteinase durch physiologische Konzentrationen des Ergothioneins unterbunden wird. Ergothionein fängt HOCl mit Reaktionsgeschwindigkeiten ab, die auch in vivo von Bedeutung wären (Akanmu et al., 1991). Gleiches gilt für die Hemmung der durch Peroxynitrit induzierten Inaktivierung der α_1 -Antiproteinase durch Ergothionein. Peroxynitrit ($ONOO^-$) bildet sich im Organismus aus dem Superoxidradikal (O_2^-) und überschüssigem Stickstoffmonoxid (NO). Es gilt als eine gewebeschädigende, reaktive Stickstoffspezies und wird mit der Pathophysiologie einiger chronischer Erkrankungen (z. B. rheumatoider Arthritis, Atherosklerose, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen) in Zusammenhang gebracht (Aruoma et al., 1999). Wenn Tyrosinreste Peroxynitrit ausgesetzt werden, so führt das in vivo zur Nitrierung. Ergothionein ist unter dem Einsatz physiologischer Konzentrationen in der Lage, diese Nitrierung zu verhindern und zwar effektiver als das Glutathion oder Trolox C, ein Vitamin E Derivat, vermögen (Aruoma et al., 1997). Peroxynitrit bewirkt ferner Veränderungen an den Purin- und Pyrimidinbasen der DNA. Ergothionein kann die DNA vor Peroxynitrit-induzierter oxidativer Modifikation schützen (Aruoma et al., 1999).

Ergothionein war auf der anderen Seite nicht in der Lage, eine durch Fe^{2+} oder Fe^{3+} mit Ascorbat ausgelöste Lipidoxidation zu unterdrücken (Akanmu et al., 1991). Es führt aber zu einer verminderten Lipidperoxidbildung, wenn diese durch Hämproteine und H_2O_2 verursacht wird (Akanmu et al., 1991). In vivo spielt Hämoglobin eine wichtige Rolle in der durch H_2O_2 ausgelösten Lipidperoxidation in Erythrozyten.

In einem In-Vivo-Modell hat man an Ratten zeigen können, dass Ergothionein die Retina vor oxidativer Schädigung schützen kann. Der N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) Subtyp des Glutamatrezeptors führt bei Überstimulation zur vermehrten Bildung freier Radikale, die man versuchen kann mit Antioxidantien abzufangen. Die Administration von Ergothionein schützte die Neurone vor einer Degeneration durch NMDA Applikation, so dass für Ergothionein eine neuroprotektive antioxidative Wirkung postuliert wurde (Moncaster et al., 2002).

Die bisher dargestellten Befunde und das Vorkommen des Ergothioneins in Geweben, die einem besonders hohen oxidativen Stress ausgesetzt sind (Erythrozyten, Samenflüssigkeit, Augenlinsen), führen allgemein zu der Annahme, dass Ergothionein im Organismus als Antioxidans fungiert.

4.5.3 Ergothionein und Ferrylhämoglobin

Die Darstellung antioxidativer Eigenschaften in vitro muss immer der Frage unterworfen werden, wie relevant sie in vivo sein können. Zu den intrazellulären Antioxidantien zählen auf der einen Seite kleine hydrophile und lipophile Moleküle und auf der anderen Seite Proteine (Dismutasen, Katalasen, Peroxidasen), die enzymatisch Superoxide oder Peroxide degenerieren, bevor sie in der Zelle Schäden anrichten können (Chaudiere and Ferrari-Iliou, 1999). Auch bei den nicht enzymatischen Radikalfängern muss die Reaktionsgeschwindigkeit höher sein als für die anderen biologischen Ziele, um die Initiation unkontrollierter Kettenreaktionen zu verhindern. Die meisten freien Radikale (Superoxidation, Hydroxylradikal) sind so reaktiv, dass ihre Reaktionsgeschwindigkeit mit biologischen Molekülen im Grunde nur diffusionsabhängig ist. Dies führt zur Notwendigkeit hoher Konzentrationen der Radikalfänger, um biologische Strukturen zu schützen.

Hydrophobe Moleküle, die als Radikalfänger agieren, befinden sich zumeist in Biomembranen oder sind assoziiert mit Lipoproteinen. Hierzu gehören vor allem Vitamin E (α -Tocopherol) und Carotinoide. Sie zerstören Peroxidradikale ($\text{ROO}\cdot$), verhindern die Bildung von Hydroperoxiden und unterbrechen die Lipidperoxidation. So genannte hydrophile Fänger kommen vor allem in wässrigen Kompartimenten wie

Zytosol, Mitochondrien und Nukleus vor. Ascorbinsäure und Glutathion sind die wichtigsten Fänger freier Radikale im Organismus. Sie arbeiten in diesem Zusammenhang als Ein-Elektron-Donatoren. Das Glutathionradikal kann durch Ascorbat regeneriert werden, wobei das entstehende Ascorbatradikal durch Delokalisierung des Elektrons besonders stabilisiert ist. Ihre intrazelluläre Konzentration schwankt in der Regel zwischen 1 - 10 mmol/l und liegt damit höher als die aller anderen nukleophilen oder reduzierenden Biomoleküle auch höher als die des Ergothioneins, die allgemein mit 0.1 – 1 mmol/l angegeben wird. Ergothionein zählt ebenfalls zu den hydrophilen Antioxidantien, allerdings wird seine Aufgabe vor allem im Abfangen oxidativer Spezies gesehen, die selbst keine freien Radikale sind (HOCl, ONOO⁻, Metallkationen). Ergothionein ist auch in der Lage, als Ein-Elektron-Donator zu fungieren und so z. B. Hydroxylradikale abzufangen. Dabei entsteht intermediär ein Ergothioneinradikal, das durch Ascorbat regeneriert werden kann (Asmus et al., 1996). Die biologische Signifikanz einer solchen Reaktion in einem Medium, das höhere Konzentrationen an Glutathion und Ascorbat enthält, ist jedoch fragwürdig (Chaudiere and Ferrari-Iliou, 1999).

ETT ist der erste molekulare Marker für die Ergothioneinaktivität. Hohe ETT Expression auf kernhaltigen Erythrozytenvorläuferzellen (CD71+) im Knochenmark und der fötalen Leber, die ebenfalls ein Ort der Erythropoese ist, und die bekanntermaßen hohen Ergothioneinkonzentrationen in Erythrozyten lassen eine spezifische Aufgabe dort vermuten. Antioxidative Vorgänge in Erythrozyten laufen auf einen Oxidationsschutz des Hämoglobins hinaus. Fraglich ist weiterhin, in welchem Zusammenhang das Ergothionein den anderen hydrophilen Antioxidantien überlegen sein könnte. Seine Affinität zu Metallkationen führte in vitro zu einem Schutz des Hämoglobins vor Kupfer induzierter Oxidation, allerdings bindet Ergothionein Cu²⁺ nicht stärker als z. B. Histidin oder als andere physiologische Thiole wie Cystein (Motohashi et al., 1974). Eine für die Funktion des Ergothioneins wichtige Eigenschaft könnte in diesem Zusammenhang seine Interaktion mit hypervalenten Eisenkomplexen sein. Höhere Oxidationsstufen des Hämoglobins gelten prinzipiell als zell- und gewebeschädigend, bekanntermaßen zählt hierzu das Methämoglobin, in dem das Eisen dreiwertig ist und keinen Sauerstoff mehr koordinieren kann. Allerdings können Hämoglobin und Myoglobin auch zu ihren so genannten Ferrylformen mit Fe⁴⁺ als Zentralatom oxidiert werden (Everse and Hsia,

1997). Das Ferrylhämoglobin entsteht in vivo z. B. durch die Reaktion von Hämoglobin, sowohl Oxy- als auch Desoxyhämoglobin, oder Methämoglobin mit Wasserstoffperoxid (Svistunenko et al., 1997; Nagababu and Rifkind, 2000).

Schon seit geraumer Zeit ist bekannt, dass Hämoglobin eine pseudoenzymatische Peroxidaseaktivität besitzt und somit die Oxidation einer Reihe von Substanzen katalysieren kann (Mieyal, 1978; Everse and Hsia, 1997). Peroxidasen sind Häminenzyme, die Wasserstoffperoxid als Akzeptor zur Katalyse von Oxidationen verwenden, wobei in einem ersten Reaktionsschritt durch Bindung von H_2O_2 der so genannte Compound I, eine Ferrylspezies, entsteht. Analog findet die Bildung eines solchen Compound I bei der Reaktion von H_2O_2 mit Methämoglobin statt. Während dieser Reaktion werden zwei Elektronen abstrahiert: Eines von Fe^{3+} , das in Fe^{4+} übergeht, und eines von einem Aminosäurerest, so dass Compound I ein radikalisches Ferrylintermediat ist (McArthur and Davies, 1993). Bei Peroxidasen geht es durch die Aufnahme eines Elektrons von einem zu oxidierenden Substrat zuerst spontan in den Compound II über. Durch Aufnahme eines weiteren Elektrons wird dieser wieder zum nativen Enzym regeneriert und zusätzlich entsteht H_2O . Betrachtet man die Reaktion von Hämoglobin mit H_2O_2 aus dem Blickwinkel einer Peroxidasereaktion, so entspricht das entstehende Ferrylhämoglobin dem Compound II. Es stellt ein hoch reaktives, nicht radikalisches, oxidierendes Intermediat dar (Everse and Hsia, 1997).

Physiologisch wird Wasserstoffperoxid in Erythrozyten im Zuge der langsamen Autoxidation von Oxyhämoglobin zu Methämoglobin generiert (Everse and Hsia, 1997). Hierbei entsteht zunächst das Superoxidradikal, das durch die Superoxiddismutase in Sauerstoff und H_2O_2 gespalten wird. Methämoglobin wird durch die Methämoglobinreduktase wieder konvertiert. Wasserstoffperoxidkonzentrationen in Erythrozyten unterliegen der Kontrolle durch die Katalase und die Glutathionperoxidase und werden intrazellulär mit 0.2 nmol/l angegeben (Nagababu and Rifkind, 2000). Die autokatalytische Oxidation des Hämoglobins zu Methämoglobin wird aber darüber hinaus von vielen Xenobiotika ausgelöst. Diese werden auch als Methämoglobinbildner bezeichnet, dazu gehören: Oxidationsmittel wie Chlorate und Bromate, aromatische Nitro- und Aminoverbindungen wie Anilin, Stickoxide, Nitrit, Sulfonamide, Phenacetin, p-

Aminosalicylsäure und Kupfer (Smith et al., 1993; French et al., 1995). Methämoglobinämie führt zunächst zu Übelkeit, Schwindel und Kopfschmerz, darüber hinaus folgen Hypoxie, Zyanose und Hämolyse. Methämoglobinurie führt zu Nierenversagen. Prolongiert ist die Methämoglobinämie letal.

Das Auftreten des Ferrylhämoglobins in der autokatalytischen Oxidation, die auf die Reaktion des Hämoglobins mit einem Methämoglobinbildner, z. B. Nitrit, folgt, gilt als sicher (Kosaka and Tyuma, 1987; Lissi, 1998). Sind Erythrozyten oxidativem Stress ausgesetzt spielt das Ferrylhämoglobin also eine zentrale Rolle. Die autokatalytische Oxidation des Hämoglobins kann Methämoglobin in Geschwindigkeiten generieren, bei denen die zellulären antioxidativen Schutzmechanismen, basierend auf Ascorbinsäure, Glutathion, Methämoglobinreduktase und weiteren Enzymen, nicht mehr ausreichend greifen können. Ferrylhämoglobin gilt als Ausgangspunkt für Kettenreaktionen, die z. B. das Superoxidradikal, Stickstoffmonoxid und Peroxynitrit involvieren (Everse and Hsia, 1997). Speziell hat man zeigen können, dass ein kompletter Zerfall der Hämgruppe mit seinem Auftreten in Zusammenhang steht. Bei der Behandlung von Hämproteinen mit H_2O_2 in vitro beobachtet man die Bildung des Ferrylhämoglobins, das selbst in einer weiteren Reaktion, analog zum Compound II bei Peroxidasen, wieder mit Wasserstoffperoxid Methämoglobin und das Superoxidradikalanion ($O_2^{\cdot-}$) generiert. Letzteres entsteht in der so genannten Hämtasche und führt zum Zerfall der Hämgruppe. Zerfallsprodukte des Hämoglobins und freies Eisen gelten als zytotoxisch (Everse and Hsia, 1997; Nagababu and Rifkind, 2000).

Es gibt Hinweise auf eine Interaktion des Ergothioneins mit intermediär in der autokatalytischen Oxidation von Hämoglobin entstehendem Ferrylhämoglobin. Ergothionein ist in der Lage, Ferrylhämoglobin zu Methämoglobin zu reduzieren, vermutlich unter Ausbildung des Disulfids, das selbst durch Glutathion oder Cystein wieder reduziert werden kann (Arduini et al., 1992; Chaudiere and Ferrari-Iliou, 1999). Man hat zeigen können, dass Ergothionein so der Nitrit-induzierten Oxidation des Hämoglobins entgegenwirken kann. Vergleichbare Ergebnisse konnten auch mit Ferrylmyoglobin erzielt werden. Durch die Zugabe von H_2O_2 zu Myoglobin erzeugtes Ferrylmyoglobin kann durch Zusatz von Ergothionein wieder reduziert werden. Die dabei entstandene oxidierte Form des Ergothioneins konnte durch Glutathion oder

Cystein regeneriert werden (Arduini et al., 1990). Ergothionein wird daher als Fänger nicht-radikalischer Ferrylspezies bezeichnet. Zwar sind auch Glutathion und Ascorbinsäure dazu in der Lage, mit Ferrylhämoglobin zu reagieren. Allerdings könnte Ergothionein auf Grund seiner chemischen Charakteristika, seiner Metallaffinität und der gezeigten antioxidativen Eigenschaften gegenüber nicht-radikalischen oxidierenden Verbindungen, spezifischer dafür geeignet sein. Auf diese Weise würde Ergothionein zur Protektion gegenüber den durch Ferrylhämoglobin verursachten Schäden in den Erythrozyten beitragen, es würde einen Sicherheitsmechanismus vermitteln (Gründemann et al., 2005).

Für eine solche Funktion sprechen auch einige weitere bisher gemachte Beobachtungen. Für Ratten und Kaninchen hat man in vivo zeigen können, dass die Nitrit-induzierte Methämoglobinbildung in Abhängigkeit von der Ergothioneinaufnahme mit der Nahrung reduziert werden kann (Spicer et al., 1951; Mortensen, 1953). Bisher sind keine phänotypischen Anzeichen eines Ergothioneindefizits, z. B. durch ergothioneinfreie Ernährung, bekannt (Kawano et al., 1982). Weshalb die Substanz auch keinen Vitaminstatus besitzt, obwohl wir sie nicht selbst synthetisieren können. Die postulierte Funktion vorausgesetzt, würden Mangelsymptome vielleicht erst evident, wenn der Organismus einem starken Methämoglobinbildner ausgesetzt wird. Die Ergothioneinkonzentration in Erythrozyten fällt über die gesamte Lebensdauer nur sehr langsam, was gegen einen Verbrauch des Stoffes spricht. Die Untersuchungen deuten vielmehr darauf hin, dass mögliche Oxidationsprodukte über Redoxzyklen regeneriert werden können. Ergothionein reagiert seinerseits nicht mit Hämproteinen, die Eisen in niedrigeren Oxidationsstufen (Fe^{2+} , Fe^{3+}) enthalten (Arduini et al., 1990). Es zeigt eine spezifische Reaktion nur mit Fe^{4+} .

Eine solche Präferenz einer bestimmten Oxidationsstufe ist auch noch aus einem anderen Wirkmechanismus bekannt. Thiamazol (im englischen Sprachgebrauch Methimazol) ist ein häufig therapeutisch eingesetztes Thyreostatikum. Es hemmt in der Schilddrüse die so genannte Thyreoperoxidase und somit den Einbau des Iods in Thyrosinreste während der Synthese der Schilddrüsenhormone. Thiamazol weist eine hohe Strukturähnlichkeit zum Imidazolrest des Ergothioneins auf, lediglich ein Stickstoff ist beim Thiamazol zusätzlich methyliert. Auf Grund dieser

Strukturähnlichkeit spielte Thiamazol in der funktionellen Charakterisierung von ETTh eine Rolle als mögliches Substrat oder Hemmstoff des Transporters. Die Untersuchungen zeigten aber, dass die Substanz nicht in nennenswerter Weise mit ETTh interagiert. Weder ist ETTh an der Verteilung dieses Arzneistoffs im Organismus beteiligt noch inhibiert er den Transporter. Sie haben biologisch nichts miteinander zu tun. Dennoch ist es möglich, auf einem anderen Gebiet Parallelen zu ziehen. Der thyreostatische Wirkmechanismus der Mercaptoimidazole beinhaltet die Bindung an und dadurch die Inaktivierung der Thyreoperoxidase. In diesem Zusammenhang hat man zeigen können, dass Thiamazol nur dann eine Affinität zum Enzym aufweist, wenn sich die Hämingruppe der Peroxidase in einem oxidierten Zustand befindet (Engler et al., 1982). Der spezifische Mechanismus der enzymatischen Reaktion von Peroxidasen involviert im allgemeinen H_2O_2 und anschließend die Ausbildung zweier Übergangszustände Compound I und Compound II. Aus diesen entsteht durch die Elektronenübertragung vom Substrat wieder das native Enzym (Everse and Hsia, 1997). Thiamazol hemmt die Thyreoidperoxidase durch spezifische Bindung an den Compound II Zustand des Enzyms (Ohtaki et al., 1982). Dabei wird das Thyreostatikum selbst oxidiert und es wird vermutet, dass das Oxidationsprodukt kovalent an der Hämingruppe gebunden bleibt, was zu einer irreversiblen Hemmung des Enzyms führt (Engler et al., 1982). Compound II entspricht einer Ferrylspezies mit einem vierwertigen Eisen als Zentralatom. Thiamazol interagiert nicht mit dem reduzierten Enzym (Fe^{3+}) und zeigt somit in seinem Wirkmechanismus eine spezifische Affinität zu einer bestimmten Oxidationsstufe der Peroxidase (Engler et al., 1982). Glutathion auf der anderen Seite, war nicht in der Lage die Thyreoidperoxidase zu inaktivieren (Engler et al., 1982).

Auf Grund der pseudoenzymatischen Eigenschaften des Hämoglobins entspricht das Ferrylhämoglobin einem Compound II der Peroxidasen. Die beschriebene Funktion des Ergothioneins in Erythrozyten postuliert die Affinität zu einer bestimmten Oxidationsstufe des Hämoglobins analog zur Inaktivierung der Thyreoidperoxidase durch Thiamazol. So haben sich auf der einen Seite auf Grund der Lokalisationsdaten und der Substratspezifität von ETT und auf der anderen Seite beruhend auf den älteren Befunde zur Verteilung und Bedeutung des Ergothioneins im Organismus, die Erythrozyten als Wirkort der Substanz herausgestellt. Unter

Berücksichtigung der Reaktionseigenschaften des Ergothioneins stellt das Ferrylhämoglobin eine mögliche Zielstruktur in den Erythrozyten dar.

4.6 ETT und chronisch entzündliche Erkrankungen

4.6.1 ETT Expression auf immunologischen Zellen

Im Gegensatz zu den Nagern, vor allem Ratte und Maus (Mayumi et al., 1978; Tamai et al., 2000; Wu et al., 2000), wird ETT beim erwachsenen Menschen nicht in der Leber exprimiert (Abb. 49). Wir können heute mit großer Sicherheit sagen, dass in der Niere eine effiziente Rückresorption des Ergothioneins stattfindet und der Darm den Transporter zur Aufnahme aus der Nahrung exprimiert. Bei anderen Expressionsorten, z. B. in der Trachea oder dem ZNS (Cerebellum, Rückenmark), gibt es noch keine Vorstellung von der Aufgabe des Transporters respektive des Ergothioneins. Die ETT Expression auf Vorläufern der Erythrozyten ist bisher sowohl für den Menschen als auch für die Maus gezeigt worden (Kobayashi et al., 2004). Im Gegensatz zu diesen zeigen lymphatische Gewebe (Lymphknoten, Milz, Thymus) bei der Maus wie beim Menschen nur eine sehr geringe Expression von ETT (Kobayashi et al., 2004). Von den peripheren Blutzellen weisen einzig die Leukozyten eine beachtenswerte Expression von ETT auf (Abb. 49).

Bei genaueren Untersuchungen zeigte sich, dass die Expression bei den mononuklearen Blutzellen in erster Linie auf die CD14+ Monozyten zurückzuführen ist (Tokuhiro et al., 2003). Granulozyten und B- bzw. T-Lymphozyten (CD4+ bzw. CD8+ Zellen) exprimieren den Transporter nicht (Tokuhiro et al., 2003). Eigene Untersuchungen bestätigten, dass ETT auf CD14+ Zellen nicht aber auf CD8+ und CD4+ Zellen vorkommt. Das Ausmaß der Expression spiegelte sich auch hier im intrazellulären Ergothioneingehalt dieser Zellkollektive wieder. Ergothionein war in den CD4+ bzw. CD8+ Zellen praktisch nicht nachweisbar, während in den Monozyten große Mengen detektiert wurden (Daten hier nicht gezeigt). Monozyten nehmen als größte mononukleare Blutzellen unter den Leukozyten eine Sonderstellung ein, sie sind zur Migration und zur Phagozytose befähigt und aus

ihnen gehen die langlebigen Makrophagen hervor. Keine Kenntnis existiert darüber, was mit der Expression von ETTh bzw. mit der intrazellulären Ergothioneinkonzentration geschieht, wenn die Monozyten zu gewebeständigen Makrophagen werden, die ebenfalls noch den CD14 Oberflächenmarker tragen und an Entzündungsreaktionen teilnehmen. Tatsache ist aber, dass ETTh auch auf den immunologischen Zellen ein sehr spezifisches Expressionsmuster aufweist, das in die Richtung einer ebensolchen Funktion deutet.

4.6.2 Ergothionein und die Myeloperoxidase

An einer akuten Entzündung sowie an der Pathophysiologie der chronischen Entzündungsreaktionen sind sowohl die Mechanismen der humoralen als auch der zellulären Immunantwort beteiligt. Als antigenpräsentierende Zellen nehmen Makrophagen eine Schlüsselstellung in der humoralen Immunantwort ein. Sie sind reichlich ausgestattet mit Lysosomen und besitzen die Fähigkeit zur Phagozytose, Pinozytose und zur Speicherung kleiner Fremdkörper und Zelltrümmer. Primär oder erst nach Verstoffwechslung als Fragment können sie auf ihrer Membran Antigene exponieren. So stimulieren sie die Proliferation und Differenzierung von B-Lymphozyten zu Plasmazellen und T-Helferzellen zur Ausschüttung von Mediatoren. Sie selbst setzen eine Reihe von Sekretionsprodukten frei, z. B. Interleukin 1, Prostaglandine, Komponenten des Komplementsystems, Lysozym, Plasminogenaktivator, Elastase und Kollagenase.

Gesichert ist, dass die zirkulierenden Vorläufer der Makrophagen, die Monozyten, sowohl ETTh exprimieren als auch hohe intrazelluläre Ergothioneingehalte aufweisen. Wie für die Erythrozyten stellt sich auch hier die Frage nach einer Zielstruktur der Substanz in den Zellen, die die bisher festgehaltenen Charakteristika des Ergothioneins berücksichtigt. Die Myeloperoxidase ist ein in Granulozyten und ihren reiferen Vorstufen nachweisbares Hämprotein. Wie für Peroxidasen üblich reagiert sie mit Wasserstoffperoxid zum Compound I und nachfolgend zum Compound II. Sie katalysiert vor allem die Oxidation von Halogenen (Cl^- , I^- , Br^-) und Pseudohalogenen (SCN^-), dabei entstehen hypohalogene Säuren (Klebanoff, 1991; Furtmüller et al., 1998). Die physiologische Bedeutung der Myeloperoxidase wird in der Bereitstellung bakterizider hypochloriger Säure (HOCl) in den Phagosomen vor

allem der neutrophilen Granulozyten gesehen (Winterbourn et al., 2000). In den Neutrophilen wird das Enzym, das während der Reifung der Zellen im Knochenmark synthetisiert wird, in der azurophilen Granula gespeichert und während der Phagozytose freigesetzt. So werden dort oxidativ Mikroorganismen wie Bakterien und Pilze abgetötet und die Myeloperoxidase trägt in vivo zur Infektabwehr bei (Hampton et al., 1996). Darüber hinaus sind die oxidativen Spezies, die von diesem Enzym generiert werden, aber potentiell dazu in der Lage, Zellen und Gewebe des Organismus zu schädigen. Neben dem Entstehen der hypochlorigen Säure kann z. B. auch Nitrit oxidiert und in Tyrosinreste eingeführt werden (Nitrierung). Die Myeloperoxidase und ihre Produkte werden daher mit inflammatorischen Krankheitsbildern vor allem dem der Atherosklerose aber auch der rheumatoiden Arthritis in Verbindung gebracht (Heinecke, 1999; Winterbourn et al., 2000). In atherosklerotischen Läsionen ist das aktive Enzym vermutlich aus eingewanderten Monozyten nachgewiesen worden und man nimmt an, dass seine oxidativen Produkte für die dort stattfindende Oxidation des LDL (Low Density Lipoproteine) mitverantwortlich sind (Daugherty et al., 1994). Betrachtet man in diesem Zusammenhang die nachgewiesene Interaktion des Ergothioneins mit Ferrylspezies (Compound II), so wäre es denkbar, dass die Substanz auch eine Affinität zur oxidierten Hämingruppe der Myeloperoxidase aufweist. Somit würde sie einen Schutz vor einer unphysiologischen Aktivität des Enzyms und vor seinen reaktiven Produkten bieten.

Für diese Vermutung gibt es aber, anders als beim Ferrylhämoglobin, keine weiteren Belege. Dagegen spricht auch die Tatsache, dass sich das Expressionsmuster von ETTh (Abb. 49) und das zelluläre Vorkommen der Myeloperoxidase nicht so offensichtlich überschneiden, wie das beim Ferrylhämoglobin und den Erythrozyten der Fall war. Denn es handelt sich um eine Peroxidase, die nicht vorwiegend in den Monozyten, sondern in neutrophilen Granulozyten präsent ist. Unter der Annahme, dass Ergothionein die Myeloperoxidase inaktiviert und so einen Gewebeschutz vermittelt, wäre es eine Voraussetzung, dass der spezifische Ergothioneintransporter auch und vor allem auf den Zellen exprimiert wird, die große Mengen des Enzyms enthalten. Analog zu den Verhältnissen zwischen ETT Expression, intrazellulärem Ergothioneingehalt und Bildung der Ferrylspezies in Erythrozyten. In diesem Fall zeigen die Expressiondaten für ETT beim Menschen aber sehr deutlich, dass der

Transporter weder auf Granulozytenvorläuferzellen (CD33, CD34, CD15) noch auf den Neutrophilen in der Peripherie exprimiert wird. So kann der Argumentationskreis hier nicht geschlossen werden und die Funktion des Ergothioneins in den Monozyten bleibt offen.

4.6.3 Genetische Variationen von ETTh sind assoziiert mit rheumatoider Arthritis und Morbus Crohn

Der wichtigste Umstand, der ETTh mit immunologischen bzw. inflammatorischen Abläufen in Zusammenhang bringt, sind die beschriebenen genetischen Assoziationen des Transporters mit chronisch entzündlichen Erkrankungen (Tokuhiro et al., 2003; Peltekova et al., 2004; Yamada et al., 2004). Während die rheumatoide Arthritis eine chronisch entzündliche Systemerkrankung des Bindegewebes ist, sind bei Morbus Crohn bestimmte Darmabschnitte befallen. Erstere ist gekennzeichnet durch eine gravierende Degeneration der betroffenen Gelenke, letzteres durch schwere schubweise auftretende Entzündungen der Darmwand. Die Ätiologie beider Erkrankungen ist unbekannt, eine Autoimmunpathogenese gilt als gesichert. Rheumatoide Arthritis ist daher mit 0.5 – 1% die in der Weltbevölkerung am häufigsten vorkommende systemische Autoimmunerkrankung (Yamada et al., 2004).

Genetisch betrachtet liegt ETTh (OCTN1h bzw. SLC22A4) in einer chromosomalen Region (5q31), in der neben dem Gen für den Carnitintransporter OCTN2h (SLC22A5) vor allem noch Gene liegen, die in der Immunantwort eine Rolle spielen, z. B. mehrere Interleukine, Interferonregulationsfaktor 1 (IRF1), Transkriptionsfaktoren für T-Zellen. Die Region ist ein so genanntes Zytokin-Gencluster und daher von Interesse bei der Suche nach genetischen Varianten, die mit chronisch entzündlichen Erkrankungen assoziiert sind (Rioux, 2001; Lee et al., 2002). Der beschriebene Nukleotidaustausch, der mit rheumatoider Arthritis assoziiert sein soll, liegt intronisch in der Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor RUNX1. Gezeigt wurde dies an japanischen Probanden und somit bisher nur an einer ethnischen Bevölkerungsgruppe (Yamada et al., 2004). Der heterodimere Transkriptionsfaktor RUNX1 wird in allen hämatopoetischen Reihen exprimiert und reguliert, sowohl inhibitorisch als auch aktivierend spezifische Gene, die für die

Hämatopoese und die Differenzierung der Stammzellen verantwortlich sind (z. B. den Rezeptor des Kolonie-Stimulierenden-Faktors, Interleukin 3, Myeloperoxidase). Abnormalitäten des RUNX1 Gens werden vor allem bei Leukämien beobachtet. Es ist selbst assoziiert mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen, darunter wiederum auch die rheumatoide Arthritis (Coffmann, 2003). Der Nukleotidaustausch in der RUNX1 Bindungsstelle im ersten Intron des ETTh Gens soll zu einer stärkeren Bindung des in diesem Fall inhibitorischen Transkriptionsfaktors führen. Demzufolge sinkt die Expression von ETTh und die Prävalenz für rheumatoide Arthritis steigt. Assoziiert mit der Erkrankung ist also eine verstärkte Suppression der ETTh Expression (Tokuhiro et al., 2003; Yamada et al., 2004).

Trifft diese Hypothese zu, so würde ein Mangel an Ergothionein an einer bestimmten Stelle zur Pathophysiologie der rheumatoiden Arthritis beitragen. In Anbetracht des Expressionsmusters kommen im Bereich der Immunzellen hierfür vor allem die Monozyten bzw. Makrophagen in Frage. Tokuhiro et al. zeigten aber auch eine Expression von ETTh im Synovialgewebe von Patienten mit rheumatoider Arthritis (Tokuhiro et al., 2003). In Gewebekulturen aus Synovialfibroblasten dieser Patienten konnte die Expression von ETTh durch Stimulation mit dem proinflammatorischen Zytokin Tumornekrosefaktor α (TNF α) um den Faktor zwei gesteigert werden, während eine solche Stimulation für OCTN2h nicht beobachtet wurde. Darüber hinaus war bei Mäusen mit so genannter Kollagen induzierter Arthritis, einem Mausmodell für die humane Arthritis, der orthologe ETTm (OCTN1m) in den entzündeten Gelenken exprimiert, nicht aber in den Gelenken gesunder Mäuse (Tokuhiro et al., 2003). Diese Daten erheben zumindest den Anschein, dass die Expression von ETT in entzündetem Gewebe hochreguliert sein könnte. Allerdings gibt es bisher keine Bestätigung dieser Expression im Synovialgewebe und ob sie in einem spezifischen Zusammenhang mit der rheumatoiden Arthritis steht.

Neben der Quantifizierung der mRNA Menge zur Bestimmung des Expressionsausmaßes von ETT in bestimmten Geweben, besteht nach der Identifizierung des physiologischen Substrates auch die Möglichkeit zur Quantifizierung der Ergothioneingehalte, um Schlüsse auf die Aktivität des Transporters zu ziehen. Besser zugänglich als direkt erkranktes Gewebe sind in diesem Zusammenhang die Erythrozyten. Es wäre aufschlussreich, erythrozytäre

Ergothioneinspiegel von Rheumatikern mit entsprechenden Kontrollen zu vergleichen. Wäre die Expression des ETTh Gens durch den hämatopoetischen Transkriptionsfaktor RUNX1 alteriert, so sollte sich dies in den Ergothioneingehalten der Erythrozyten widerspiegeln.

Die Wahrscheinlichkeit, dass ETTh tatsächlich mit immunologischen bzw. inflammatorischen Vorgängen im Körper in Zusammenhang steht, wird erhöht durch die Beschreibung eines weiteren Polymorphismus im SLC22A4 Gen, der mit Morbus Crohn assoziiert ist. Eine exonisch gelegene Substitution führt in diesem Fall zu einem Aminosäureaustausch im Protein. Ein Isoleucin in der 11. Transmembranregion des Transporters wird dadurch zu einem Phenylalanin (Peltekova et al., 2004). Bei der Untersuchung funktioneller Auswirkungen sind die Transportfähigkeiten beider Varianten von ETTh für Carnitin und TEA verglichen worden. Dabei wurde gezeigt, dass beide Carnitin in Abhängigkeit der Natriumionenkonzentration transportieren, aber dass die Phenylalaninvariante hierbei eine geringere Affinität aufweist. Den TEA-Transport betreffend, waren die Verhältnisse umgekehrt. Der Wildtyp transportierte es im direkten Vergleich rund um den Faktor 4 schlechter und zeigte einen höheren K_m -Wert. Eine substantielle Alteration der Transporteigenschaften wurde daraus gefolgert. Man nahm an, dass bei der Phenylalaninvariante die Affinität zu kationischen Xenobiotika gestiegen sei und die Affinität zu endogenen Substraten wie Carnitin abgenommen habe (Peltekova et al., 2004).

In Anbetracht der neuen Erkenntnisse zur Substratspezifität von ETT können diese Folgerungen keinen Bestand haben. Vielmehr muss man den Ergothioneintransport für beide Varianten des Transporters untersuchen, um Aussagen über funktionelle Auswirkungen des Aminosäureaustauschs machen zu können. Die diskutierten Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die Expression bzw. die Aktivität von ETTh in der Pathophysiologie chronisch entzündlicher Erkrankungen eine Rolle spielen. Die dargestellte funktionelle Charakterisierung des ETT hat zur Identifizierung des physiologischen Substrats geführt, das demzufolge auch an einer spezifischen Stelle dieser Pathophysiologie von Bedeutung sein sollte.

4.7 Ausblick

Ergothionein ist eine Substanz deren Vorkommen im menschlichen Organismus schon seit etlichen Jahrzehnten bekannt ist. Ihre Herkunft, Biosynthese und Verteilung sowie ihre Reaktionseigenschaften sind ausführlich untersucht und dargestellt worden, allerdings ohne ihre genauen Funktionen im Stoffwechsel aufzudecken. Es war bereits im Vorfeld evident, dass Ergothionein im Organismus speziell verteilt und effizient gespeichert wird, nun steht auch fest, dass hierfür mit ETT (OCTN1) ein spezifisches Transportsystem existiert. Diese Erkenntnis bringt die Möglichkeit, den Transporter und seine spezifische Verteilung sowie das Substrat und dessen Verteilung gemeinsam zu betrachten, um neue Schlüsse auf die Funktion zu ziehen bzw. aus diesen Schlüssen weitere Untersuchungsstrategien abzuleiten.

Letztere werden vermutlich vor allem in die Richtung der mit dem Transporter bereits assoziierten inflammatorischen Erkrankungen gehen. Dafür spricht auch der chromosomale Genort des Transporters. Die Hinweise sprechen dafür, dass ETT prinzipiell in chronische entzündliche Krankheitsprozesse involviert sein könnte, so dass neben der rheumatoiden Arthritis und Morbus Crohn noch eine Reihe anderer Erkrankungen als Untersuchungsfelder in Frage kommen (z. B. atopische Dermatitis, Psoriasis). Vor allem die Erythrozyten bieten sich als verhältnismäßig leicht zugängliches Untersuchungsmaterial an. An ihren Ergothioneingehalten könnten genetische Veränderungen der ETT Expressionsstärke oder der Transporteraktivität deutlich werden. Im Vergleich zu einer entsprechenden Kontrollgruppe könnte man versuchen, den Ergothioneingehalt in Erythrozyten oder darüber hinaus in verschiedenen anderen Geweben (z. B. Monozyten oder falls möglich direkt erkranktes Gewebe) mit einer Erkrankung in Zusammenhang zu bringen. Sollte dies gelingen und entsprechende Zusammenhänge gezeigt werden, so würde man nicht nur in der Aufdeckung der Pathophysiologie der Erkrankung voranschreiten, sondern könnte im besten Fall das Ergothionein auch therapeutisch, z. B. substituierend bei einem Mangel, einsetzen. Vergleichbar ist das bei der primären systemischen Carnitin Defizienz der Fall, bei der Carnitin supplementiert wird. Ferner wäre ein diagnostischer Einsatz als zu beeinflussenden Parameter denkbar.

Leider konnte für das Ergothionein bisher noch kein zweifelsfrei belegter, molekularer Wirkmechanismus, ähnlich dem des Carnitins, dargelegt werden. Die bisherigen Befunde sprechen aber für einen solchen und daher bleibt die Beantwortung dieser Frage auch ein primäres Ziel. Auf Grund des speziellen Umgangs des Organismus mit Ergothionein, ist es im Tiermodell bislang noch nicht gelungen, Defizitsituationen bzw. Mangelsymptome zu beobachten. Darüber hinaus gibt es bislang keinen potenten und spezifischen Inhibitor des ETT mit dem man auch in vivo die Auswirkungen einer Transporterblockade auf den Organismus untersuchen könnte. Dies würde zu weiteren aufschlussreichen Erkenntnissen darüber führen, in welchen Geweben und an welchen Stellen im Stoffwechsel Ergothionein von Bedeutung ist. Die Generierung einer Knock-out Maus für ETTm wäre nach dem heutigen Stand der Technik die ultimative Methode, um diese Frage zu beantworten. An einem solchen Modell ließen sich nahezu perfekt die Auswirkungen des Ergothioneinmangels für den Organismus studieren.

5. Zusammenfassung

In nahezu allen Organen und Geweben des Organismus kommt Transportsystemen eine wichtige physiologische Bedeutung zu. Auf Grund der Kompartimentierung ist es für den Stoffwechsel essentiell, dass es schlecht oder nicht permeablen Substanzen ermöglicht werden kann, Biomembranen zu überwinden. Der organische Kationentransporter OCTN1 (Novel Organic Cation Transporter) gehört zur so genannten SLC22 Genfamilie. Variationen des OCTN1h Gens (SLC22A4) sind unlängst mit chronisch entzündlichen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis und Morbus Crohn assoziiert worden. Die funktionelle Charakterisierung von OCTN1 weist ihn als polyspezifischen pH-sensitiven Transporter organischer Kationen (z. B. TEA = Tetraethylammonium) aus, dem bislang kein spezifisches Substrat zu Grunde liegt.

Das Ziel dieser Arbeit war es, das Substratspektrum von OCTN1 genauer zu untersuchen, um mit der Kenntnis des führenden Substrates physiologische und pathophysiologische Zusammenhänge erkennen zu können. Für die Substratsuche wurde eine neue Strategie eingesetzt. Hierfür wurde OCTN1h in einem konditionellen Expressionssystem in HEK-293-Zellen funktionell zur Expression gebracht. Diese Zellen wurden dann mit einer biologischen Matrix (z. B. Plasma, Organhomogenate) in der Hoffnung inkubiert, dass sich in diesem komplexen Stoffgemisch eine Substanz befindet, die vom Transporter als Substrat akzeptiert wird und sich in den Zellen anreichert. Als Negativkontrolle wurden Zellen eingesetzt, die OCTN1 nicht exprimieren. Eine Screening-Technik mittels LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) wurde entwickelt, um biologische Substrate im Zelllysat zu identifizieren. Auf diese Weise ist es gelungen, das Substratspektrum von OCTN1 aufzudecken. Zunächst wurde das Betain der Aminosäure Prolin (Stachydrin) als neues Substrat des OCTN1h entdeckt, das dann als Leitstruktur fungierte. Analysen der Transporteffizienzen anderer Aminosäurebetainderivate führten letztendlich zur Identifizierung des physiologischen Substrates. OCTN1 ist ein selektiver und effizienter Ergothioneintransporter. Ergothionein wird von OCTN1h mehr als hundertfach effizienter transportiert ($176 \mu\text{l}/\text{min} \cdot \text{mg}$ Protein) als die bisher postulierten Substrate TEA und Carnitin und hat eine um den Faktor 20 höhere Affinität ($21 \mu\text{mol/l}$). Auf der anderen Seite akzeptiert der nächstverwandte

Transporter OCTN2 Ergothionein praktisch nicht als Substrat. Die Charakterisierung des Ergothioneintransportes über OCTN1 zeigte, dass er den ins Zellinnere gerichteten Natriumionengradienten als Triebkraft ausnutzt. Zellen, die OCTN1 exprimieren, sind darauf ausgerichtet, Ergothionein in großen Mengen zu akkumulieren. Ein Efflux der Substanz aus den Zellen konnte nicht nachgewiesen werden. Ein spezifischerer Name für OCTN1 wäre daher ETT = Ergothionein Transporter.

Ergothionein ist das Betain des 2-Thiolhistidins. Es wurde erstmals aus *Claviceps purpurea* isoliert und wird ausschließlich von Pilzen und einigen Mykobakterien gebildet. Schon lange ist sein Vorkommen im menschlichen Organismus bekannt sowie die Tatsache, dass es nur über die Nahrung aufgenommen und nicht endogen synthetisiert werden kann. Die eigentliche Funktion des Ergothioneins im Organismus ist bislang ungeklärt. Dass es eine solche aber geben muss, wird von der Tatsache der Existenz eines spezifischen Transportsystems für diese Substanz unterstützt.

ETT zeigt im menschlichen Organismus ein spezifisches Verteilungsmuster. Eine hohe Expression wird auf CD71+ Erythrozytenvorläuferzellen im Knochenmark detektiert, während zirkulierende Erythrozyten ETTh kaum noch exprimieren. Auf der anderen Seite ist bekannt, dass auch die Ergothioneinkonzentration in Erythrozyten erheblich ist. Dies führt zu der Annahme, dass Ergothionein eine bestimmte Aufgabe in den Erythrozyten erfüllt, da sie während ihrer Reifung mit der Substanz beladen werden. Bisherige Hypothesen zur Bedeutung des Ergothioneins für den Organismus fußen in seinen erwiesenen antioxidativen Eigenschaften und in seiner Affinität zu Metallkationen. Es gilt als Fänger nicht radikalischer oxidierender Spezies. Erythrozyten sind Zellen in denen ein vergleichsweise hoher oxidativer Stress herrscht. Eine mögliche Zielstruktur für das Ergothionein in den Erythrozyten ist daher das intermediär in der autokatalytischen Oxidation des Hämoglobins entstehende hoch reaktive Ferrylhämoglobin mit einem Fe^{4+} als Zentralatom.

Das ETTh Gen (SLC22A4) befindet sich in einer chromosomalen Region, die als Zytokin-Gencluster bezeichnet wird, da dort ansonsten viele Gene für Regulationselemente des Immunsystems liegen. Von den immunologischen Zellen

wird ETTh vor allem auf Monozyten exprimiert, die auch vergleichsweise hohe Ergothioneingehalte aufweisen. Da genetische Polymorphismen des Transporters, die seine Aktivität oder Expressionseffizienz beeinflussen sollen, mit chronisch entzündlichen Erkrankungen assoziiert worden sind, liegt ein Zusammenhang des Pathomechanismus dieser Erkrankungen mit der Funktion des Ergothioneins nahe. Bisher ist allerdings noch nicht geklärt, welche Rolle das Ergothionein in den Monozyten bzw. auch in den daraus entstehenden Makrophagen genau spielt und wie es an immunologischen Prozessen beteiligt sein könnte.

6. Abkürzungen

BCA	Bichinolin-4-carbonsäure
Bq	Kernzerfälle pro Sekunde (Bequerel)
BSA	Rinderserumalbumin
CD	Cluster of Differentiation
DMSO	Dimethylsulfoxid
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	Extraneuronaler Monoamintransporter
FIT	Flp-In™ T-Rex™ Expressionssystem
g	Vielfaches der Erdbeschleunigung (9.81 m/sec)
h	human
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethylen)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, Hochleistungsflüssigchromatographie
KRH	modifizierter Krebs-Ringer-Henseleit Puffer
LC	Liquid Chromatography
m	mouse, Maus
MPP+	N-Methyl-4-phenylpyridinium
MS	Mass Spectrometry, Massenspektrometrie
m/z	Quotient aus Masse durch Ladung
NT	nicht transfiziert
Ori	Replikationsursprung
OAT	Organic Anion Transporter
OCT	Organic Cation Transporter
OCTN	Novel Organic Cation Transporter
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerasekettenreaktion
r	rat, Ratte
SLC	Solute Carrier
SEM	Standard Error of Mean, Standardfehler des arithmetischen Mittels
TEA	Tetraethylammonium
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-methylamin

U	Unit, Einheit der Enzymaktivität (definiert für den jeweiligen Zusammenhang)
UpM	Umdrehungen pro Minute
UST	Unspecified Substrate Transporter
V	Volumen

7. Literaturverzeichnis

- Akanmu D, Cecchini R, Aruoma OI and Halliwell B (1991) The antioxidant action of ergothioneine. *Arch Biochem Biophys* **288**:10-16.
- Arduini A, Eddy L and Hochstein P (1990) The reduction of ferryl myoglobin by ergothioneine: a novel function for ergothioneine. *Arch Biochem Biophys* **281**:41-43.
- Arduini A, Mancinelli G, Radatti GL, Hochstein P and Cadenas E (1992) Possible mechanism of inhibition of nitrite-induced oxidation of oxyhemoglobin by ergothioneine and uric acid. *Arch Biochem Biophys* **294**:398-402.
- Aruoma OI, Spencer JP and Mahmood N (1999) Protection against oxidative damage and cell death by the natural antioxidant ergothioneine. *Food Chem Toxicol* **37**:1043-1053.
- Aruoma OI, Whiteman M, England TG and Halliwell B (1997) Antioxidant action of ergothioneine: assessment of its ability to scavenge peroxynitrite. *Biochem Biophys Res Commun* **231**:389-391.
- Asmus KD, Bensasson RV, Bernier JL, Houssin R and Land EJ (1996) One-electron oxidation of ergothioneine and analogues investigated by pulse radiolysis: redox reaction involving ergothioneine and vitamin C. *Biochem J* **315 (Pt 2)**:625-629.
- Birnboim HC and Doly J (1979) A rapid alkaline extraction method for the screening of recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**:1513-1523.
- Bremer J (1983) Carnitine metabolism and function. *Physiol Rev* **63**:1420-1480.
- Briggs I (1972) Ergothioneine in the central nervous system. *J Neurochem* **19**:27-35.
- Budzikiewicz H (1998) *Massenspektrometrie. Eine Einführung*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Burckhardt BC and Burckhardt G (2003) Transport of organic anions across the basolateral membrane of the proximal tubule cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **146**:95-158.
- Burckhardt G and Wolf N (2000) Structure of renal organic anion and cation transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* **278**:F853-F866.
- Busch AE, Quester S, Ulzheimer JC, Gorboulev V, Akhoundova A, Waldegger S, Lang F, Arndt P and Koepsell H (1996) Electrogenic properties and substrate

- specificity of the polyspecific rat cation transporter rOCT1. *J Biol Chem* **271**:32599-32604.
- Chaudiere J and Ferrari-Iliou R (1999) Intrazellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanism. *Food Chem Toxicol* **37**:949-962.
- Cheng YC and Prusoff WH (1973) Relationship between the inhibition constant (Ki) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (IC 50) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* **22**:3099-3108.
- Coffmann JA (2003) Runx transcription factors and the developmental balance between cell proliferation and differentiation. *Cell Biol Int* **27**:315-324.
- Dambaugh T, Hennessy K, Chamnankit L and Kieff E (1984) U2 region of Epstein-Barr virus DNA may encode Epstein-Barr nuclear antigen 2. *Nat Acad Sci USA* **81**:7632-7636.
- Daugherty A, Dunn JL, Rateri DL and Heinecke JW (1994) Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* **94**:437-444.
- Engel AG, Rebouche CJ, Wilson DM, Glasgow AM, Romshe CA and Cruse RP (1981) Primary systemic carnitine deficiency. II. Renal handling of carnitine. *Neurology* **31**:819-825.
- Engler H, Taurog A and Nakashima T (1982) Mechanism of inactivation of thyroid peroxidase by thioureyline drugs. *Biochem Pharmacol* **31**:3801-3806.
- Enomoto A, Kimura H, Chairoungdua A, Shigeta Y, Jutabha P, Cha SH, M. H, Takeda M, Sekine T, Igarashi T, Matsuo H, Kikuchi Y, Oda T, Ichida K, Hosoya T, Shimokata K, Niwa T, Kanai Y and Endou H (2002) Molecular identification of a renal-urate anion exchanger that regulates blood urate levels. *Nature* **417**:447-452.
- Epstein MA, Achong AG and Barr YM (1964) Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* **1**:702-703.
- Everse J and Hsia N (1997) The toxicities of native and modified hemoglobins. *Free Rad Biol Med* **22**:1075-1099.
- French CL, Yaun SS, Baldwin LA, Leonard DA, Zhao XQ and Calabrese EJ (1995) Potency ranking of methemoglobin-forming agents. *J Appl Toxicol* **15**:167-174.
- Furtmüller PG, Burner U and Obinger C (1998) Reaction of myeloperoxidase compound I with chloride, bromide, iodide, and thiocyanate. *Biochemistry* **37**:17923-17930.

- Goff SP and Berg P (1976) Construction of hybrid viruses containing SV40 and lambda phage DNA segments and their propagation in cultured monkey cells. *Cell* **9**:695-705.
- Gorboulev V, Ulzheimer JC, Akhoundova A, Ulzheimer-Teubner I, Karbach U, Quester S, Baumbach C, Lang F, Busch AE and Koepsell H (1997) Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters. *DNA Cell Biol* **16**:871-881.
- Gründemann D, Babin-Ebell J, Martel F, Ording N, Schmidt A and Schomig E (1997) Primary structure and functional expression of the apical organic cation transporter from kidney epithelial LLC-PK1 cells. *J Biol Chem* **272**:10408-10413.
- Gründemann D, Gorboulev V, Gambaryan S, Veyhl M and Koepsell H (1994) Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. *Nature* **372**:549-552.
- Gründemann D, Harlfinger S, Golz S, Geerts A, Lazar A, Jung N, Rubbert A and Schömig E (2005) Discovery of the ergothioneine transporter. *PNAS* **102**:5256-5261.
- Gründemann D, Koster S, Kiefer N, Breidert T, Engelhardt M, Spitzenberger F, Obermuller N and Schomig E (1998a) Transport of monoamine transmitters by the organic cation transporter type 2, OCT2. *J Biol Chem* **273**:30915-30920.
- Gründemann D, Liebich G, Kiefer N, Köster S and Schömig E (1999) Selective substrates for non-neuronal monoamine transporters. *Mol Pharmacol* **56**:1-10.
- Gründemann D, Schechinger B, Rappold GA and Schömig E (1998b) Molecular identification of the corticosterone-sensitive extraneuronal monoamine transporter. *Nature Neurosci* **1**:349-351.
- Gründemann D and Schömig E (1996) Protection of DNA during preparative agarose gel electrophoresis. *Anal Biochem* **216**:459-461.
- Halliwell B and Gutteridge JM (1989) *Free radicals in biology and medicine*. Clarendon Press, Oxford.
- Hampton MB, Kettle AJ and Winterbourn CC (1996) The involvement of superoxide and myeloperoxidase in oxygen-dependent bacterial killing. *Infect Immun* **64**:3512-3517.
- Hanlon DP (1971) Interaction of ergothioneine with metal ions and metalloenzymes. *J Med Chem* **14**:1084-1087.

- Hartman PE (1990) Ergothioneine as antioxidant. *Methods Enzymol* **186**:310-318.
- Heath C, Rimington C and Searle CE (1952) Some effects of administering ergothioneine to rats. *Biochem J* **50**:530-533.
- Heinecke JW (1999) Mechanisms of oxidative damage by myeloperoxidase in atherosclerosis and other inflammatory disorders. *J Lab Clin Med* **133**:321-325.
- Iversen LL (1965) The uptake of catecholamines at high perfusion concentrations in the rat isolated heart: a novel catecholamine uptake process. *Br J Pharmacol* **25**:18-33.
- Iversen LL and Salt PJ (1970) Inhibition of catecholamine uptake by steroids in the isolated rat heart. *Br J Pharmacol* **40**:528-530.
- Karpati G, Carpenter S, Engel AG, Watters G, Allen J, Rothman S, Klassen G and Mamer OA (1975) The syndrom of systemic carnitine deficiency. Clinical, morphologic, biochemical and pathophysiological features. *Neurology* **25**:16-24.
- Kawano H, Otani M, Takeyama K, Kawai Y, Mayumi T and Hama T (1982) Studies on ergothioneine. VI. Distribution and fluctuations of ergothioneine in rats. *Chem Pharm Bull* **30**:1760-1765.
- Kebarle P and Ho Y (1997) On the mechanism of electrospray mass spectrometry, in *Electrospray ionization mass spectrometry. Fundamentals, instrumentation, applications* (Cole RB ed) pp 3-65, John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Kekuda R, Prasad PD, Wu X, Wang H, Fei YJ, Laeibach FH and Ganapathy V (1998) Cloning and functional characterization of a potential-sensitive, polyspecific organic cation transporter (OCT3) most abundantly expressed in placenta. *J Biol Chem* **273**:15971-15979.
- Klebanoff SJ (1991) Myeloperoxidase: occurrence and biological function, in *Peroxidases in Chemistry and Biology* (Everse J, Everse KE and Grisham MB eds) pp 1-35, CRC Press.
- Kobayashi D, Aizawa S, Maeda T, Tsuboi I, Yabuuchi H, Nezu J, Tsuji A and Tamai I (2004) Expression of organic cation transporter OCTN1 in hematopoietic cells during erythroid differentiation. *Exp Hematol* **32**:1156-1162.
- Koepsell H (1998) Organic cation transporters in intestine, kidney, liver and brain. *Annu Rev Physiol* **60**:243-266.

- Koepsell H and Endou H (2004) The SLC22 drug transporter family. *Pflugers Arch* **447**:666-676.
- Koepsell H, Schmitt BM and Gorboulev V (2003) Organic cation transporters. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **150**:36-90.
- Kohfeldt E, Maurer P, Vannahme C and Timpl R (1997) Properties of the extracellular calcium binding module of the proteoglycan testican. *FEBS Lett* **414**:557-561.
- Kosaka H and Tyuma I (1987) Mechanism of autocatalytic oxidation of oxyhemoglobin by nitrite. *Environ Health Perspect* **73**:147-151.
- Kyte J and Doolittle RF (1982) A simple method for displaying hydrophobic character on a protein. *J Mol Biol* **157**:105-132.
- Lanfumeey L and Hamon M (2004) 5-HT₁ receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **3**:1-10.
- Lawson A, Moorley HV and Woolf LI (1950) The determination of ergothioneine. The non-occurrence of ergothioneine in urine. *Biochem J* **47**:513-518.
- Lee JK, Park C, Kimm K and Rutherford MS (2002) Genome-wide multilocus analysis for immune-mediated complex diseases. *Biochem Biophys Res Commun* **295**:771-773.
- Lever M, Sizeland PC, Bason LM, Hayman CM and Chambers ST (1994) Glycine betaine and proline betaine in human blood and urine. *Biochim Biophys Acta* **1200**:259-264.
- Lissi E (1998) Autocatalytic oxidation of hemoglobin by nitrite: a possible mechanism. *Free Rad Biol Med* **24**:1535-1536.
- Mann T and Leone E (1953) Studies on the metabolism of semen. VIII. Ergothioneine as a normal constituent of boar seminal plasma. Purification and crystallization, site of formation and function. *Biochem J* **53**:140-148.
- Marger MD and Saier MH (1993) A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyze uniport, symport and antiport. *Trends Biochem Sci* **18**:13-20.
- Martel F, Vetter T, Russ H, Grundemann D, Azevedo I, Koepsell H and Schomig E (1996) Transport of small organic cations in the rat liver. The role of the organic cation transporter OCT1. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **354**:320-326.
- Mayumi T, Kawano H, Sakamoto Y, Suehisa E, Kawai Y and Hama T (1978) Studies on ergothioneine V. Determination by high performance liquid chromatography and application to metabolic research. *Chem Pharm Bull* **26**:3772-3778.

- McArthur KM and Davies MJ (1993) Detection and reactions of the globin radical in hemoglobin. *Biochim Biophys Acta* **1202**:173-181.
- Melville DB (1958) Ergothioneine. *Vitamines and Hormones* **17**:155-204.
- Mieyal JJ (1978) Mechanism of enzyme-like reactions involving human hemoglobin, in *Bioorganic Chemistry* pp 315-348, Academic Press, New York.
- Mitchell P (1967) Translocation through natural membranes. *Adv Enzymol* **29**:33-87.
- Moncaster JA, Walsh DT, Gentleman SM, Jen LS and Aruoma OI (2002) Ergothioneine treatment protects neurons against N-methyl-D-aspartate excitotoxicity in an in vivo rat retinal model. *Neurosci Lett* **328**:55-59.
- Mortensen RA (1953) The effect of diet on methemoglobin levels of nitrite-injected rats. *Arch Biochem Biophys* **46**:241-243.
- Motohashi N, Mori I, Sugiura Y and Tanaka H (1974) Metal complexes of ergothioneine. *Chem Pharm Bull* **22**:654-657.
- Nagababu E and Rifkind JM (2000) Reaction of hydrogen peroxide with ferrylhemoglobin: superoxid production and heme degradation. *Biochemistry* **39**:12503-12511.
- Neumann E, Schaefer-Riddler M, Wang Y and Hofschneider PH (1982) Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation high electric fields. *EMBO J* **1**:841-845.
- Nezu J, Tamai I, Oku A, Ohashi R, Yabuuchi H, Hashimoto N, Nikaido H, Sai Y, Koizumi A, Shoji Y, Takada G, Matsuishi T, Yoshino M, Kato H, Ohura T, Tsujimoto G, Hayakawa J, Shimane M and Tsuji A (1999) Primary systemic carnitine deficiency is caused by mutations in a gene encoding sodium ion-dependent carnitine transporter. *Nat Genet* **21**:91-94.
- Ohashi R, Tamai I, Nezu Ji J, Nikaido H, Hashimoto N, Oku A, Sai Y, Shimane M and Tsuji A (2001) Molecular and physiological evidence for multifunctionality of carnitine/organic cation transporter OCTN2. *Mol Pharmacol* **59**:358-366.
- Ohashi R, Tamai I, Yabuuchi H, Nezu J, Oku A, Sai Y, Shimane M and Tsuji A (1999) Na(+)-dependent carnitine transport by organic cation transporter (OCTN2): its pharmacological and toxicological relevance. *J Pharmacol Exp Ther* **291**:778-784.
- Ohtaki S, Nakagawa H, Nakamura M and Yamazaki I (1982) Reaction of purified hog thyroid peroxidase with H₂O₂, Tyrosin, and methylmercaptoimidazol

- (goitrogen) in comparison with bovine lactoperoxidase. *J Biol Chem* **257**:761-766.
- Oishi K, Hofmann S and Diaz GA (2002) Targeted disruption of SLC19A2, the gene encoding the high affinity thiamine transporter Thtr-1, causes diabetes mellitus, sensorineural deafness and megaloblastosis in mice. *Hum Mol Genet* **11**:2951-2960.
- Okumura N, Tsuji K and Nakahata T (1992) Changes in cell surface antigen expression during proliferation and differentiation of human erythroid progenitors. *Blood* **80**:642-650.
- Pacholsky T, Blakely RD and Amara SG (1991) Expression cloning of a cocaine- and antidepressant-sensitive human noradrenaline transporter. *Nature* **350**:350-354.
- Pao SS, Paulsen IT and Saier MH (1998) Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:1-34.
- Pelteková VD, Wintle RF, Rubin LA, Amos CI, Huang Q, Gu X, Newman B, Van Oene M, Cescon D, Greenberg G, Griffiths AM, St George-Hyslop PH and Siminovich KA (2004) Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat Genet* **36**:471-475.
- Pritchard J-B and Miller DS (1993) Mechanisms mediating renal secretion of organic anions and cations. *Physiol Rev* **73**:765-796.
- Rifkind JM (1974) Copper and the autoxidation of hemoglobin. *Biochemistry* **13**:2475-2481.
- Rioux JD (2001) Genetic variation in the 5q31 cytokine gene cluster confers susceptibility to Crohn disease. *Nat Genet* **29**:223-228.
- Roch-Ramel F, Besseghir K and Murer H (1992) Renal excretion and tubular transport of organic anions and cations, in *Handbook of physiology. Renal Physiology* pp 2189-2262, Bethesda, MD: Am Physiol Soc.
- Rougee M, Benasson V, Land EJ and Pariente R (1987) Deactivation of singlet molecular oxygen by thiols and related compounds, possible protectors against skin photosensitivity. *Photochem Photobiol* **47**:485-489.
- Russ H, Engel W and Schömig E (1993a) Isocyanines and pseudoisocyanines as a novel class of potent noradrenaline transport inhibitors: synthesis, detection and biological activity. *J Med Chem* **36**:4208-4213.

- Russ H, Gliese M, Sonna J and Schömig E (1992) The extraneuronal transport mechanism for noradrenaline (uptake 2) avidly transports 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+). *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **346**:158-165.
- Russ H, Sonna J, Keppler K, Baunach S and Schömig E (1993b) Cyanine-related compounds: a novel class of potent inhibitors of extraneuronal noradrenaline transport. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **348**:458-465.
- Sambrook J and Russell DW (2001) Chapter 16: Introducing cloned genes into cultured mammalian cells, in *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Sarver N, Gruss P, Law MF, Khoury G and Howley PM (1981) Bovine papilloma virus DNA - a novel eukaryotic cloning vector. *Mol Cell Biol* **1**:486-496.
- Schömig E, Spitzenberger F, Engelhardt M, Martel F, Örding N and Gründemann D (1998) Molecular cloning and characterization of two novel transport proteins from rat kidney. *FEBS Lett* **425**:79-86.
- Shires TK, Brummel MC, Pulido JS and Stegink LD (1997) Ergothioneine distribution in bovine and porcine ocular tissues. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* **117**:117-120.
- Shukla Y, Kulshrestha OP and Khuteta KP (1981) Ergothioneine content in normal and senil human cataractous lenses. *Indian J Med Res* **73**:472-473.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ and Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**:76-85.
- Smith RC, Reed VD and Webb TR (1993) Reversal of copper(II) induced methemoglobin formation by thiols. *J Inorg Biochem* **52**:173-182.
- Spicer SS, Wooley JG and Kessler V (1951) Ergothioneine depletion in rabbit erythrocytes and its effect on methemoglobin formation and reversion. *Proc Soc Exp Biol Med* **77**:418-420.
- Strimmer K and Von Haessler A (1996) Quartet puzzling: a quartet maximum-likelihood method for reconstructing tree topologies. *Mol Biol Evol* **13**:964-969.
- Svistunenko DA, Patel RP, Voloshchenko SV and Wilson MT (1997) The globin-based free radical of ferryl hemoglobin is detected in normal human blood. *J Biol Chem* **272**:7114-7121.

- Takano M, Inui KI, Okano T, Saito H and Hori R (1984) Carrier-mediated transport systems of tetraethylammonium in rat renal brush-border and basolateral membran vesicles. *Biochim Biophys Acta* **773**:113-124.
- Tamai I, China K, Sai Y, Kobayashi D, Nezu J, Kawahara E and Tsuji A (2001) Na(+)-coupled transport of L-carnitine via high-affinity carnitine transporter OCTN2 and its subcellular localization in kidney. *Biochim Biophys Acta* **1512**:273-284.
- Tamai I, Nakanishi T, Kobayashi D, China K, Kosugi Y, Nezu J, Sai Y and Tsuji A (2004) Involvement of OCTN1 (SLC22A4) in pH-dependent transport of organic cations. *Mol Pharm* **1**:57-66.
- Tamai I, Ohashi R, Nezu J, Yabuuchi H, Oku A, Shimane M, Sai Y and Tsuji A (1998) Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2. *J. Biol. Chem.* **273**:20378-20382.
- Tamai I, Ohashi R, Nezu J, Sai Y, Kobayashi D, Oku A, Shimane M and Tsuji A (2000) Molecular and functional characterization of organic cation/carnitine transporter family in mice. *J Biol Chem* **275**:40064-40072.
- Tamai I, Yabuuchi H, Nezu J, Sai Y, Oku A, Shimane M and Tsuji A (1997) Cloning and characterization of a novel human pH-dependent organic cation transporter, OCTN1. *FEBS Lett* **419**:107-111.
- Tang NL, Ganapathy V, Wu X, Hui J, Seth P, Yuen PM, Wanders RJ, Fok TF and Hjelm NM (1999) Mutations of OCTN2, an organic cation/carnitine transporter, lead to deficient cellular carnitine uptake in primary carnitine deficiency. *Hum Mol Genet* **8**:655-660.
- Tokuhiro S, Yamada R, Chang X, Suzuki A, Kochi Y, Sawada T, Suzuki M, Nagasaki M, Ohtsuki M, Ono M, Furukawa H, Nagashima M, Yoshino S, Mabuchi A, Sekine A, Saito S, Takahashi A, Tsunoda T, Nakamura Y and Yamamoto K (2003) An intronic SNP in a RUNX1 binding site of SLC22A4, encoding an organic cation transporter, is associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet* **35**:341-348.
- Vizi ES (2000) Role of high-affinity receptors and membrane transporters in nonsynaptic communication and drug action in the central nervous system. *Pharmacol Rev* **51**:63-89.
- Vogelstein B and Gillespie D (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Nat Ac Sci* **76**:615-619.

- Winterbourn CC, Vissers MC and Kettle AJ (2000) Myeloperoxidase. *Curr Opin Hematol* **7**:53-58.
- Wu X, George RL, Huang W, Haiping W, Conway SJ, Leibach FH and Ganapathy V (2000) Structural and functional characteristics and tissue distribution pattern of rat OCTN1, an organic cation transporter, cloned from placenta. *Biochim Biophys Acta* **1466**:315-327.
- Wu X, Huang W, Prasad PD, Seth P, Rajan DP, Leibach FH, Chen J, Conway SJ and Ganapathy V (1999) Functional characteristics and tissue distribution pattern of organic cation transporter 2 (OCTN2), an organic cation/carnitine transporter. *J Pharmacol Exp Ther* **290**:1482-1492.
- Wu X, Prasad PD, Leibach FH and Ganapathy V (1998) cDNA sequence, transport function, and genomic organization of human OCTN2, a new member of the organic cation transporter family. *Biochem Biophys Res Commun* **246**:589-595.
- Xuan W, Lamhonwah A, Librach C, Jarvi K and Tein I (2003) Characterization of organic cation/carnitine transporter family in human sperm. *Biochem Biophys Res Commun* **306**:121-128.
- Yabuuchi H, Tamai I, Nezu J, Sakamoto K, Oku A, Shimane M, Sai Y and Tsuji A (1999) Novel membrane transporter OCTN1 mediates multispecific, bidirectional, and pH-dependent transport of organic cations. *J Pharmacol Exp Ther* **289**:768-773.
- Yamada R, Tokuhiko S, Chang X and Yamamoto K (2004) SLC22A4 and RUNX1: identification of RA susceptible genes. *J Mol Med* **82**:558-564.
- Yates JL, Warren H and Sugden B (1985) Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature* **313**:812-815.
- Zhang L, Dresser MJ, Gray AT, Yost SC, Terashita S and Giacomini KM (1997) Cloning and functional expression of a human liver organic cation transporter. *Mol Pharmacol* **51**:913-921.
- Zhang L, Schaner ME and Giacomini KM (1998) Functional characterization of an organic cation transporter (hOCT1) in a transiently transfected human cell line (HeLa). *J Pharmacol Exp Ther* **286**:354-361.
- Zimmermann U (1982) Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena. *Biochim Biophys Acta* **694**:227-277.