

Struktur-Funktionsanalysen am L-Typ Aminosäuretransporter 2

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Katrin Manuela Hinz
aus Berlin

Berlin, 2017

Diese Arbeit wurde am Leibniz-Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie (FMP) unter der Leitung von Dr. Gerd Krause im Zeitraum vom 01. November 2013 - 27. Juli 2017 im Bereich Bioinformatik und Proteindesign angefertigt.

1. Gutachter: Dr. Gerd Krause
2. Gutachter: Prof. Dr. Hartmut Otschkinat

Disputation am 23. März 2018

Danksagung

Dr. Gerd Krause danke ich für das interessante Promotionsthema und für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Außerdem möchte ich mich für seine hervorragende Betreuung während meiner Zeit in der Strukturbiologie am Forschungsinstitut für molekulare Pharmakologie bedanken, was für mich nicht selbstverständlich ist.

Bei Prof. Dr. Hartmut Oschkinat bedanke ich mich für die hilfsbereite und wissenschaftliche Betreuung als Zweitgutachter.

Ferner danke ich Dr. Anita Kinne für die Einarbeitung in das Thema. Mein besonderer Dank gilt auch den Master-Absolventinnen Melanie Wittner, Katja Meyer und dem Absolventen Dominik Neef, die alle in sehr guter Zusammenarbeit dem Promotionsthema einen besonderen Schliff gegeben haben.

Weiterhin möchte ich Prof. Dr. Ralf Schüle in danken, dass er mir mit Hilfestellungen und Diskussionen zur Seite stand. Nicht zu vergessen, möchte ich auch Dr. Jens Furkert für seine große Hilfsbereitschaft und Geduld danken und auch Dr. Claudia Rutz, die mir beide stets mit Rat und Tat bei der Durchführung und Auswertung der Experimente zur Seite standen.

Meinen besonderen Dank möchte ich meinen lieben Arbeitskollegen Annika Kreuchwig, Franziska Kreuchwig, Inna Hoyer, Jonas Protze, Anna Piontek, Cathrine Sargent, Wolfgang Klein, Arthur Gibert und nicht zu vergessen Patrick Marcinkowski aussprechen. Ob experimentelle Unterstützung, Hilfestellungen von PC-Arbeit, anregende Diskussionen oder amüsante Arbeitstage, ich konnte mich immer auf sie verlassen. Ohne euch hätte ich die Achterbahnfahrt nicht durchgestanden.

Mein größter Dank geht an meine Eltern Maria und Marian, an meine Frau Ricarda, an meine Schwester Patrizia und an meine gesamte Familie mit Freunden, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt, ermutigt und in manchem Augenblick auch ertragen haben. Ohne sie wäre diese Arbeit so nicht möglich gewesen.

Zusammenfassung

Schilddrüsenhormone (SDH) sind für das Zellwachstum, den Metabolismus und die Entwicklung essentiell. Über transmembranäre Transporterproteine (TT) gelangen die SDH durch die Plasmamembran in die Zielzellen. Im Zellkern bindet das biologisch aktive SDH an den *thyroid hormone receptor* (THR) und initiiert die Bindung des Komplexes an die DNA. Bislang wurden unterschiedliche Subfamilien von SDH-TT identifiziert. Dazu gehören unter anderem der SDH-spezifische Monocarboxylattransporter (MCT) und die L-Typ Aminosäuretransporter (LAT). Eine wichtige Rolle in der ontogenetischen Entwicklung spielt der MCT8. Pathologische MCT8-Mutationen verhindern den SDH-Transport und verursachen das Allan-Herndon-Dudley-Syndrom (AHDS), welches durch starke neurologische Defekte gekennzeichnet ist. Im Gegensatz dazu ist kein neurologisch defizienter Phänotyp bei *Mct8*-Knockout-Mäusen zu erkennen. Daraus entwickelte sich die Hypothese der sekundären SDH-TT, die einen Funktionsverlust von MCT8 ausgleichen könnten. Der LAT2 ist ein potentieller Kandidat, um SDH zu transportieren. Seine SDH-Transportfähigkeit ist allerdings noch unzureichend erforscht. Die molekulare Struktur sowie der Transportmechanismus von LAT2 waren bislang ebenfalls nicht bekannt.

Das Ziel dieser Arbeit war, die Substratspezifität von LAT2 zu charakterisieren und dessen Rolle beim SDH-Transport zu klären. LAT2 wird nur zur Plasmamembran transportiert, wenn das Eskortprotein CD98 (*Cluster of differentiation 98*) vorhanden ist. Daher wurden beide Proteine in *Xenopus laevis* Oozyten koexprimiert und die LAT2-vermittelte Aufnahme von verschiedenen radioaktiv markierten SDH untersucht. Interessanterweise konnten nur die Natrium-unabhängige Aufnahme von T_2 und eine geringe Aufnahme von T_3 gezeigt werden, dagegen war kein Import von rT_3 oder T_4 messbar.

Die Aufklärung der Struktur-Funktionsbeziehung des SDH-Transports durch LAT2 erfolgte zum einen durch spezifische LAT2 Mutationen, zum anderen war aber auch eine Auswahl von Substratvarianten Gegenstand dieser Untersuchung. Hierfür wurde erstmals ein Homologie-modell des murinen LAT2 generiert. Mit dessen Hilfe wurden Aminosäurepositionen (Asn⁵¹,

Tyr¹³⁰, Thr¹³², Asn¹³³, Gln¹³⁴, Ile¹³⁷, Thr¹⁴⁰, Tyr¹⁴⁴, Lys¹⁹³, Phe²⁴², Asn²⁴⁸, Phe²⁴⁹) ausgewählt, die im Inneren des Transportkanals lokalisiert sind und damit am Substrattransport beteiligt sein könnten. Mutationen, die nach dem Homologiemodell den Transportkanal vergrößern (N51S, Y130A, N133S, N248S), zeigten eine starke Erhöhung des 3,3'-T₂-Transports. Hervorzuheben ist, dass bereits nach einer Substitution von Tyr¹³⁰ durch Alanin die Aufnahme des voluminösen T₄ ermöglicht wurde, obwohl dessen Transport über den Wildtyp (WT) nicht möglich war. Seitenkettenverlängerungen führten hingegen zu einem verschlechterten SDH-Transport (Y130R, I137M, T140F). Eine Ausnahme ist F242W, welches nach Seitenkettenvergrößerung einen gesteigerten SDH-Transport zeigte. Diese spezifische Position 242 benötigt eine aromatische Seitenkette, um SDH zu transportieren, denn eine konservativ hydrophobe Substitution von Phe²⁴² zu Valin zeigte keinen SDH-Transport.

Für den zweiten Teil der Substratcharakterisierung wurden chemische Substanzen ausgewählt, die in Teilen dem Molekülgerüst von Schilddrüsenhormonen oder dem spezifischen LAT-Inhibitor (BCH) ähnlich sind. Diese Inhibitionsuntersuchungen trugen dazu bei, erste charakteristische Merkmale für den Substrattransport durch LAT2 abzuleiten. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass für den Transport sowohl die Amino- als auch die Carboxylgruppe der Substrate notwendig sind. Somit ist die vollständige Aminosäurefunktion wichtig und spielt wahrscheinlich eine Rolle in der Substraterkennung. Sperrige hydrophobe oder hydrophile Substitutionen am Phenol- oder Tyrosyl-Ring sind limitierend, denn die Flexibilität der beiden aromatischen Ringe muss erhalten bleiben. Deshalb wird T₄ nicht transportiert, denn es besitzt an beiden Ringen zwei Iodatome, welche die sterische Hinderung verursachen. Eine bestimmte räumliche Dimension sowie die Flexibilität des gesamten Moleküls zur Anpassung an die Bindungstasche sind hoch relevant. Inhibitionsstudien mit Iod-substituierten Substraten zeigten, wie vermutet, eine hohe Affinität zur Bindungstasche von LAT2.

Erstmalig wurde in dieser Arbeit neben dem Import auch der Export von SDH über LAT2 untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass LAT2 keinen SDH-Export ermöglicht. Lediglich die verkürzten Mutationen Y130A und N133S befähigten den modifizierten Transporter zur 3,3'-T₂-Abgabe, jedoch nicht zu einem Export von T₃ oder T₄. Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass LAT2 aufgrund seiner Fähigkeit T₃ aufzunehmen, tatsächlich als Kompensator beim MCT8-Funktionsverlust dienen könnte. Welche Rolle LAT2 allerdings beim 3,3'-T₂-Transport im physiologischen Zusammenhang spielt, bleibt noch zu klären. Die Resultate dieser Arbeit geben erstmals einen Einblick in die Rolle des murinen LAT2 beim SDH-Transport und in dessen Transportmechanismus.

Abstract

Thyroid hormones (THs) are essential for cell growth, metabolism and development. THs pass through the plasma membrane into the target cells via transporter proteins. In the cell nucleus, only the biologically active TH bind to the thyroid hormone receptor and initiate binding of the complex to the DNA. Several subfamilies of thyroid hormone transporters have been identified until now. These include the TH specific monocarboxylate transporter (MCT) and the L-type amino acid transporter (LAT). MCT8 plays an important role in ontogenetic development. Pathologic MCT8 mutations cause the Allan-Herndon-Dudley syndrome (AHDS), which is characterized by severe neurological defects. In contrast, no neurologically deficient phenotype is seen in *Mct8* knockout mice. Consequently, the hypothesis of secondary TH transporters was developed, which could compensate MCT8's loss of function. LAT2 is a potential candidate for TH transport, but its TH transport capability is insufficiently explored. The molecular structure and the transport mechanism of LAT2 are not yet known.

The aim of this work was to characterize the substrate specificity of LAT2 and to clarify its role in TH transport. LAT2 is only transported to the plasma membrane when the escort protein CD98 (cluster of differentiation 98) is present. Therefore, both proteins were co-expressed in *Xenopus laevis* oocytes and it was investigated in LAT2 mediated uptake of various radiolabeled THs. Interestingly, only the sodium-independent uptake of 3,3'-T₂ and a low uptake of T₃ could be shown. Furthermore, no import of rT₃ or T₄ was measurable.

The elucidation of the structure-function relationship of LAT2 was carried out by specific LAT2 mutations as well as substrate variants. For this purpose, a homology model of the murine LAT2 was generated for the first time. With the help of the model, amino acid positions (Asn⁵¹, Tyr¹³⁰, Thr¹³², Asn¹³³, Gln¹³⁴, Ile¹³⁷, Thr¹⁴⁰, Tyr¹⁴⁴, Lys¹⁹³, Phe²⁴², Asn²⁴⁸, Phe²⁴⁹) were predicted to potentially interact with the substrate 3,3'-T₂. Results of the modified LAT2 protein with an enlarged transport channel (N51S, Y130A, N133S, N248S) showed a strong increase in the 3,3'-T₂ transport. It is important to note, that T₄ uptake was enabled by one substitution of Tyr¹³⁰ to alanine, whereas T₄ is not transported by LAT2-WT. Most side

chain extensions lead to a worsened TH import (Y130R, I137M, T140F). Only F242W showed an increased TH transport after side chain enlargement. This specific position 242 requires an aromatic side chain to transport TH since substitution of Phe²⁴² to valine did not show any TH transport.

For the second part of the substrate characterization, chemical substances were selected which are partly similar to the molecular skeleton of thyroid hormones or to the LAT specific inhibitor (BCH). Competitive inhibition studies were carried out with these substrates on the 3,3'-T₂ transport. These inhibition studies helped to derive first characteristic features for the substrate transport by LAT2. The results indicate that both, the amino and carboxyl groups of the substrates, are necessary for transport. This amino acid function probably plays a crucial role in substrate recognition. Bulky hydrophobic or hydrophilic substitutions on the phenol or tyrosyl ring are limiting the competition, since the flexibility of the two aromatic rings must be maintained. However, a certain spatial dimension and the flexibility of the entire molecule to adapt to the binding pocket are nevertheless relevant. Inhibition studies with iodine substituted substrates showed a high affinity for the binding pocket of LAT2.

For the first time, it was investigated in the export of TH by LAT2. It was shown that LAT2 does not allow TH export. Only the mutations Y130A and N133S enabled the modified transporter to yield the 3,3'-T₂ export, but not the export of T₃ or T₄. In summary, it was shown that LAT2 could presumably be used as a compensator for the loss of function mutations of MCT8. The role of LAT2 in the 3,3'-T₂ import in the physiological context should still be clarified. The results of this work provide an insight into the role of murine LAT2 in TH transport and its transport mechanism.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Zusammenfassung	III
Abstract	V
Abkürzungsverzeichnis	XIII
Abbildungsverzeichnis	XVII
Tabellenverzeichnis	XXI
1 Einleitung	1
1.1 Die humane <i>Solute Carrier</i> -Transporterfamilie	1
1.2 Membranproteine in Lebewesen	3
1.2.1 APC-Superfamilie	3
1.2.2 Bekannte Kristallstrukturen der APC-Familie	4
1.2.3 Die <i>Major-Facilitator</i> -Superfamilie	7
1.3 Identifizierung der unterschiedlichen SDH-Transporter	7
1.3.1 Der Monocarboxylattransporter 8 und seine pathologischen Mutationen	9
1.3.2 Aufbau der heteromeren Aminosäuretransporter	11
1.3.3 Die L-Typ Aminosäuretransporter 1 und 2	12
1.3.4 Die Charakterisierung von LAT	14
1.4 Schilddrüsenhormone	14
1.4.1 SDH und ihre physiologische Rolle	14
1.4.2 Die Biosynthese der SDH	15
1.4.3 Die chemische Struktur der SDH	16
1.4.4 Die Regulation der SDH T ₄ und T ₃	16
1.4.5 Die physiologische Rolle der SDH-Derivate	17

1.5	<i>Xenopus laevis</i> Oozyten als Expressionssystem	19
1.6	Zielstellung	20
2	Materialien	21
2.1	Chemikalien	21
2.1.1	Substrate für Transportstudien	22
2.1.2	Radioaktiv markierte Substrate	22
2.2	Reagenzien	22
2.2.1	Verwendete Kits	22
2.2.2	Enzyme	23
2.2.3	Oligonukleotide	23
2.2.4	Antikörper	26
2.2.5	Verwendete Plasmid-DNA	26
2.2.6	Verwendete Zellsysteme	27
2.3	Geräte, Zubehör und Verbrauchsmaterialien	27
2.3.1	Geräte	27
2.3.2	Verbrauchsmittel	28
2.4	Programme & Software	29
3	Methoden	31
3.1	Zellbiologische Arbeiten	31
3.1.1	<i>In vitro</i> -Arbeiten mit der Hek293-Zelllinie	31
3.1.2	<i>In vitro</i> -Arbeiten mit <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	33
3.2	Molekularbiologische Arbeiten	35
3.2.1	Ortsspezifische Mutagenese	35
3.2.2	Plasmid-Isolierung	36
3.2.3	Einführen von Restriktionsschnittstellen über die PCR	36
3.2.4	Restriktionsspaltungen durch Endonukleasen	36
3.2.5	Plasmidauftrennung, -aufreinigung und -Ligation	37
3.2.6	Sequenzierung	37
3.2.7	cRNA-Synthese	39
3.3	Mikrobiologisches Arbeiten	39
3.3.1	Anzucht von Bakterien in Lösung	39
3.3.2	Anzucht von Bakterien auf Agarplatten	40
3.3.3	Herstellung von Glycerinkulturen	41

3.3.4	Präparation von chemisch kompetenten Bakterien	41
3.3.5	Amplifikation von Plasmid-DNA durch Transformation in <i>E. coli</i> Dh5 α	42
3.4	Proteinbiochemische Arbeiten	42
3.4.1	Isolierung des Gesamtproteins aus den Oozyten	42
3.4.2	Auftrennung von Proteinen durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	43
3.5	Durchflusszytometrische Messungen zur Untersuchung der Proteinexpression	46
3.6	Konfokale <i>Laser-Scanning-Mikroskopie</i> (LSM) von Hek293-Zellen	47
3.6.1	Kolokalisationsstudien mit LAT2-exprimierenden Hek293-Zellen	47
3.6.2	Proteinexpressionsanalyse auf der Plasmamembran	47
3.7	Transportmessungen von radioaktiv markierten Substraten	48
3.7.1	Bestimmung der Substrataufnahme bei Hek293-Zellen	48
3.7.2	Bestimmung der Substrataufnahme bei Oozyten	49
3.7.3	Zeitabhängige Aufnahmestudien	50
3.7.4	Konzentrationsabhängige Aufnahmestudien	50
3.7.5	Aufnahmemessungen durch kompetitive Inhibition	51
3.7.6	Etablierung einer Abgabemessung	52
3.7.7	Bestimmung der Substratabgabe bei Oozyten	52
3.7.8	Präparation zur Flüssigszintillationsmessung	52
3.8	Statistische Auswertungen	53
3.9	Bioinformatische Arbeiten	53
3.9.1	Modellierung von Proteinstrukturen	53
3.9.2	Suche nach homologen Proteinen	55
3.9.3	Sekundärstruktur- und Topologie-Vorhersage	55
3.9.4	Multiples Sequenzalignment	56
3.9.5	Molekulare Modellierung des Transmembranproteins LAT2	56
3.9.6	Docking-Analyse von Liganden	57
4	Ergebnisse	59
4.1	Die <i>in vitro</i> Charakterisierung des murinen LAT2	59
4.1.1	Aufnahmestudien mit L-[³ H]-AS über LAT2 in Oozyten	59
4.1.2	LAT2-Membranexpression nur als Heterodimer mit CD98 in Hek293-Zellen	61
4.1.3	Koexpression von LAT2 und CD98 induziert Natrium-unabhängigen SDH-Transport in Oozyten	61

4.1.4	Identifizierung von SDH als Substrat für den LAT2 in Oozyten	63
4.2	Modellierung einer ersten dreidimensionalen Struktur für LAT2	65
4.2.1	Generierung der LAT2-Sekundärstruktur aus zwei Kristallstrukturen	65
4.2.2	Potentielle zentrale Substrat-Erkennungsstelle im LAT2-Modell	67
4.2.3	Transportkanal auskleidende Aminosäuren zur Auswahl für die gezielte Mutation	67
4.3	Charakterisierung der Substrataufnahme über LAT2-Varianten zur Herleitung von Struktur-Funktionsbeziehungen	70
4.3.1	Etablierung einer Quantifizierungsmethode der Expressionsuntersuchung in Hek293-Zellen	70
4.3.2	Aufnahmestudien mit [¹²⁵ I]-SDH über LAT2-Mutanten in Hek293-Zellen	72
4.3.3	Einfluss der LAT2-Mutanten auf die 3,3'-T ₂ -Aufnahme in Korrelation zur Transporterexpression	75
4.3.4	Seitenkettenverkürzung ermöglicht die T ₄ und verbessert die T ₂ und T ₃ -Aufnahme	78
4.3.5	Nur die Seitenkettenvergrößerung von F242 ermöglicht eine verbesserte T ₂ -Aufnahme	81
4.3.6	LAT2-Mutationen zeigen im Vergleich zur Aufnahme der SDH ein unterschiedliches Aufnahmeprofil für Aminosäuren	84
4.4	Inhibitionsuntersuchungen: Substratvariationen ermitteln putative Substrateigenschaften für LAT2	85
4.4.1	NH ₂ und COO ⁻ der Aminosäurefunktion sind essentiell für den Substrattransport	85
4.4.2	Keine Inhibition von Substraten mit räumlich großen, hydrophoben Erweiterungen	85
4.4.3	Große Substituenten am Tyrosin-Ring erlaubt	87
4.4.4	Iod-Substitution essentiell für SDH-ähnliche Substrate	87
4.5	Inhibitionsuntersuchungen von Substratvarianten kombiniert mit LAT2-Varianten	88
4.5.1	Substrat-Flexibilität und Iod-Substitution inhibieren die 3,3'-T ₂ -Aufnahme kompetitiv bei LAT2-Varianten	88
4.5.2	3,3'-T ₂ -Inhibition bei LAT2-Varianten durch BCH verringert und durch BCH-ähnliche Substrate erhöht	90
4.6	Charakterisierung der Substratabgabe über den LAT2	92
4.6.1	Abgabestudien mit L-[³ H]-AS über LAT2 in Oozyten	92
4.6.2	Keine SDH-Abgabe (Efflux) über den LAT2 möglich	94

4.7	Charakterisierung der Substratabgabe an LAT2-Varianten	94
4.7.1	LAT2-Varianten zeigen unterschiedliche Aufnahme- und Abgabepprofile	95
4.7.2	3,3'-T ₂ Abgabe über LAT2-Varianten erlaubt	96
5	Diskussion	97
5.1	Ist das Heterodimer LAT2/CD98 an der Plasmamembran lokalisiert und transportiert es SDH?	98
5.1.1	LAT2-vermittelte Substrataufnahme nur durch Koexpression mit dem Eskortprotein CD98 induziert	98
5.1.2	Der natriumunabhängige Transport von 3,3'-T ₂ durch LAT2	99
5.1.3	Identifizierung der SDH-Substratspezifität von LAT2	99
5.1.4	Ermittlung der kinetischen Parameter für die SDH-Aufnahme	100
5.2	LSM-Analyse als optimale Methode zur Bestimmung der Zellmembranexpression von LAT2	101
5.3	Oozyten als optimales System für Transportstudien	103
5.3.1	<i>Xenopus laevis</i> Oozyten als Expressionssystem	103
5.3.2	Vergleich zwischen zwei Expressionssystemen: Oozyten und Hek293	104
5.4	Verifizierung des chimären LAT2-Strukturmodells	105
5.5	Gezielte Mutationen am LAT2 klären essentielle Eigenschaften des SDH-Imports auf	106
5.5.1	Charakterisierung des LAT2-Transportkanals durch den systematischen Aminosäureaustausch	107
5.6	Iodsubstitution beeinflusst die T ₂ -Aufnahme	108
5.7	Substrat-Varianten von SDH und BCH decken spezifische Substrat-Merkmale für LAT2 auf	110
5.7.1	Zwei notwendige funktionelle Gruppen am Substrat	111
5.7.2	Cyclische Verbindungen hemmen T ₂ nur in definierter räumlicher Orientierung	112
5.7.3	Große Substituenten am Tyrosinring inhibieren die T ₂ -Aufnahme	114
5.7.4	Flexibilität von SDH-Derivaten muss zur Aufnahmeinhibition gegeben sein	116
5.8	LAT2 exportiert kein SDH	117
5.9	Die Bedeutung von T ₂ in der Zelle	118
6	Fazit und Ausblick	121

Literaturverzeichnis	123
Anhang	i
Ein multiples Sequenzalignment verschiedener Spezies	i
Eidesstattliche Erklärung	v
Publikationsliste	vii
Konferenzbeiträge	viii

Abkürzungsverzeichnis

4F2hc	<i>4F2 cell surface antigen heavy chain</i> / schwere Kette
AdiC	Aginin/Agmatin Transporter
AHDS	Allan-Herndon-Dudley Syndrom
AK	Antikörper
APC	Aminosäure-Polyamin-Organokation-Superfamilie
ApcT	Aminosäure-Polyamin-Organokation-Transporter
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
ASC	Asc-Typ Aminosäuretransporter
BCH	2-Amino-Bicycloheptan-2-Carbonsäure
CAT	kationischen Aminosäure-Transporter
CD98	<i>cluster of differentiation 98</i>
CI	Konfidenzintervall
cpm	<i>counts per minutes</i>
cRNA	kodierende RNA
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DIO	Deiodase
DIT	Diiodtyrosin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ECL	extrazellulärer Loop
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E.Coli	<i>Escherichia coli</i>
FCS	fötale Kälberserum
FMP	Leibniz-Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie
fwd	<i>forward</i>
GlpT	Glycerol-3-Phosphattransporter

Abkürzungsverzeichnis

GPCR	G-Protein gekoppelten Rezeptoren
HAT	heterodimere Aminosäuretransporter
Hek293	Nieren-Endothelienzelllinie (<i>human embryonic kidney</i>)
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
LAT	L-Typ Aminosäuretransporter
LeuT	Leucin-Transporter
MCT	Monocarboxylattransporter
MFS	<i>major facilitator</i> Superfamilie
min	Minuten
MIT	Monoiodtyrosin
NTCP	Natriumtaurocholate co-transportierende Polypeptide
OATP	Organo-Anion-Transporter
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB	Protein-Datenbank (RCSB)
PEI	Polyethylenimin
Pfam	Datenbanken für Proteinfamilien
PVDF	Polyvinylidendifluorid-Membran
P/S	Penicillin/Streptavidin
rBAT	neutrale Aminosäuretransporter
rev	<i>reverses</i>
rT ₃	reverses 3,3',5'-Triiodthyronin
RXR	Retinsäure-Rezeptor
SDH	Schilddrüsenhormon/e
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLC	<i>solute carrier</i>
T ₀	Thyronin
T ₁	Monoiodthyronin
T ₁ AM	Iodothyronamin
T ₂	Diodthyronin
T ₃	3,3',5'-Triiodthyronin
T ₄	3,3',5,5'-Tetraiodthyronin, Thyroxin
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TBS	Tris-Puffer
TBST	Tris-Puffer-Tween
TCDB	Transporter-Klassifikations-Datenbank

THR	<i>thyroid hormone receptor</i>
TMH	Transmembranhelix
TMHs	Transmembranhelices
TRE	<i>thyroid hormone response element</i>
TRH	Thyroliberin
TSH	Thyreidea stimulierendes Hormon
TT	transmembranäre Transporterproteine
T/E	Trypsin/EDTA
ÜN	über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
V_{max}	Maximalgeschwindigkeit einer Reaktion
WT	Wildtyp
xCT	Cystin/Glutamat-Transporter

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Repräsentative Übersicht der SDH-Transporter und ihre Einordnung in die SLC-Familie.	2
Abbildung 1.2:	Das typische Faltungsmuster der APC-Transporterfamilie	4
Abbildung 1.3:	Beziehungen zwischen Transporterfamilien mit Ähnlichkeit zur LeuT-Struktur	5
Abbildung 1.4:	Alternative Konformationsveränderung der LeuT ähnlichen Transporter	6
Abbildung 1.5:	Das typische Faltungsmuster der MFS-Transporter	7
Abbildung 1.6:	Skizze zum SDH-Transport im Gehirn der Maus	10
Abbildung 1.7:	Die Rekonstruktion und schematische Darstellung des Heterodimers LAT2/CD98	13
Abbildung 1.8:	Übersicht der SDH-Wirkung in der Zelle	15
Abbildung 1.9:	Die Struktur und der Regulationskreislauf der SDH	17
Abbildung 3.1:	Vektor-Karte der Plasmide	38
Abbildung 3.2:	Allgemeines Fließschema zur Generierung von dreidimensionalen Proteinstrukturen	54
Abbildung 4.1:	Expression und Aminosäuretransport in Oozyten	60
Abbildung 4.2:	Expressionsuntersuchungen des LAT2/CD98- Heterodimers in Hek293-Zellen mit den zwei konventionellen Methoden: LSM und Durchflusszytometrie	62
Abbildung 4.3:	Koexpression von LAT2 und CD98 in Oozyten induziert Natrium-unabhängigen SDH-Transport	64
Abbildung 4.4:	Identifizierung neuer Substrate für LAT2	65
Abbildung 4.5:	Zusammensetzung der TMHs des LAT2-Strukturmodells aus zwei Kristallstrukturen	66

Abbildung 4.6:	Multiples Sequenzalignment der Transporter LAT2 und LAT1 sowie der verwendeten Kristallstrukturen AdiC (PDB: 3L1L) und ApcT (PDB: 3GI8)	68
Abbildung 4.7:	Vorhersage einer potentiellen LAT2-Substrat-Erkennungsstelle	69
Abbildung 4.8:	Substrat-Erkennungsstelle im LAT2-Homologiemodell hilft zur Auswahl von interagierenden Aminosäuren	71
Abbildung 4.9:	Unterschiede der Gesamtproteinexpression von LAT2-Varianten im Vergleich zum WT	72
Abbildung 4.10:	Kein Unterschied in der Membranexpression zwischen den LAT2 Konstrukten	73
Abbildung 4.11:	3,3'-T ₂ -Aufnahmeuntersuchungen für verschiedene LAT2 und CD98 Konstrukte in Hek293-Zellen	74
Abbildung 4.12:	3,3'-T ₂ -Aufnahmeuntersuchungen für verschiedene LAT2-Konstrukte in Oozyten	76
Abbildung 4.13:	Immunfärbung des Lysats der LAT2/CD98 koinjizierten Oozyten . .	77
Abbildung 4.14:	LAT2-Mutationen innerhalb des Transportkanals erleichtern die SDH-Aufnahme	78
Abbildung 4.15:	Eine mögliche T ₄ Orientierung im Transportkanal vom LAT2-Modell	79
Abbildung 4.16:	LAT2-Y130A zeigt keine Sättigung nach 90 minütiger T ₂ -Aufnahme	80
Abbildung 4.17:	LAT2-Mutationen verbessern die Affinität und die Transportgeschwindigkeit	81
Abbildung 4.18:	Phe ²⁴² übernimmt eine mögliche <i>Gate</i> -Funktion.	82
Abbildung 4.19:	LAT2-F242W verbessert die Affinität und die Transportgeschwindigkeit	83
Abbildung 4.20:	LAT2-Mutationen innerhalb des Transportkanals zeigen eine unveränderte Aminosäureaufnahme	84
Abbildung 4.21:	Kompetitive Hemmung des 3,3'-T ₂ -Transports mit Substratvarianten	86
Abbildung 4.22:	Kompetitive Hemmung mit Substratvariationen an LAT2-Y130A . .	89
Abbildung 4.23:	Die kompetitiven Inhibitionsuntersuchungen mit unterschiedlichen Substratvariationen an LAT2-Varianten	91
Abbildung 4.24:	Freisetzung von radioaktiv-markiertem Leu wurde zeitabhängiger in LAT2/CD98 exprimierenden Oozyten bestimmt.	93
Abbildung 4.25:	Die Freisetzung von radioaktiv markiertem Phe wurde zeitabhängig in LAT2/CD98 exprimierenden Oozyten bestimmt	93
Abbildung 4.26:	Keine Freisetzung von radioaktiv markiertem 3,3'-T ₂ nach zeitabhängiger Bestimmung in LAT2/CD98 exprimierenden Oozyten	94

Abbildung 4.27:	Erhöhte Freisetzung von radioaktiv markierten AS durch LAT2-N133S exprimierende Oozyten	95
Abbildung 4.28:	Erhöhte Freisetzung von 3,3'-T ₂ über LAT2-Varianten, aber keine Freisetzung von T ₃ oder T ₄	96
Abbildung 5.1:	Zusammenfassung der essentiellen pharmakologischen Substratmerkmale am Schilddrüsenhormongerüst, die für den Import durch LAT2 notwendig sind.	111
Abbildung 5.2:	<i>In silico</i> -Docking von experimentell untersuchten Substraten im LAT2-WT.	113
Abbildung 5.3:	<i>In silico</i> -Docking von experimentell untersuchten Substraten in LAT2-N133S.	115
Abbildung 5.4:	Schematische Zusammenfassung von LAT2-WT und -Mutationen . .	119
Abbildung 6.1:	Ein multiples Sequenzalignment verschiedener Spezies (A)	i
Abbildung 6.2:	Ein multiples Sequenzalignment verschiedener Spezies (B)	ii
Abbildung 6.3:	Ein multiples Sequenzalignment verschiedener Spezies (C)	iii

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	Verwendete Chemikalien	21
Tabelle 2.3:	Radioaktiv markierte Substrate	22
Tabelle 2.4:	Verwendete Kits	22
Tabelle 2.4:	Verwendete Kits	23
Tabelle 2.5:	Verwendete Enzyme	23
Tabelle 2.2:	Substrate für die Inhibitionsstudien	24
Tabelle 2.6:	Oligonukleotide	25
Tabelle 2.7:	Primersequenzen	26
Tabelle 2.8:	Verwendete Antikörper	26
Tabelle 2.9:	Verwendete Plasmid-DNA	27
Tabelle 2.10:	Verwendete Zellsysteme	27
Tabelle 2.11:	Verwendete Geräte und Zubehör	27
Tabelle 2.11:	Verwendete Geräte und Zubehör	28
Tabelle 2.12:	Verbrauchsmittel	28
Tabelle 2.13:	Verwendete Software und Programme	29
Tabelle 3.1:	Zusammensetzung der Lösungen für die Hek293-Zellen	31
Tabelle 3.1:	Zusammensetzung der Lösungen für die Hek293-Zellen	32
Tabelle 3.2:	Transfektion von adhärenenten Hek293-Zellen	32
Tabelle 3.3:	Zusammensetzung der Lösung für das Arbeiten mit Oozyten	34
Tabelle 3.4:	PCR-Ansatz zur Plasmid-Amplifizierung	35
Tabelle 3.5:	Ermittelte, optimale Bedingungen zur Amplifizierung der Mutations- tragenden Plasmid-DNA	35
Tabelle 3.6:	Restriktionsansatz zum Verdau von Plasmid-DNA	37
Tabelle 3.7:	Zusammensetzung der verwendeten Puffer	37
Tabelle 3.8:	Zusammensetzung der Lösung für die Plasmidarbeiten	40
Tabelle 3.9:	Zusammensetzung der Lösung für die Plasmidarbeiten	41
Tabelle 3.10:	Zusammensetzung der Lösung für die Plasmidarbeiten	41

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.11:	Zusammensetzung der Lösung für Western Blots	43
Tabelle 3.12:	Zusammensetzung der Lösung für Western Blots	43
Tabelle 3.12:	Zusammensetzung der Lösung für Western Blots	44
Tabelle 3.13:	Zusammensetzung der Lösung für die Elektrophorese	44
Tabelle 3.14:	Zusammensetzung der Lösung für die <i>Tank</i> Blot-Methode	45
Tabelle 3.15:	Zusammensetzung der Lösung für die Antikörperfärbung	46
Tabelle 3.16:	Zusammensetzung der Lösung für die Substrataufnahme bei Hek293- Zellen	49
Tabelle 3.17:	Zusammensetzung der Lösung für das Arbeiten mit Oozyten	49
Tabelle 3.17:	Zusammensetzung der Lösung für das Arbeiten mit Oozyten	50
Tabelle 3.18:	Verdünnungsreihe des Transportpuffers zur konzentrationsabhängigen Transportmessung	51
Tabelle 5.1:	Übersicht der K_m -Werte (in $[\mu\text{M}]$ angegeben) von SDH bestimmt für die primären und sekundären SDH-Transporter.	101

1 Einleitung

1.1 Die humane *Solute Carrier*-Transporterfamilie

Die *solute carrier* (SLC) sind Integralproteine in der Zellmembran und vermitteln den Transport von gelösten Molekülen über die Membran. Dies erfolgt entweder sekundär aktiv oder durch erleichterte Diffusion, das heißt ATP-unabhängig entlang eines Konzentrationsgradienten (Hediger et al., 2004). Zu Substraten dieser Transportproteine zählen geladene und ungeladene endogene Moleküle sowie anorganische Ionen. Transporter allgemein werden zunehmend dafür genutzt, Pharmaka und Xenobiotika über die Zellmembranen zum Wirkort zu schleusen (Lin et al., 2015). Im humanen Genom sind SLC nach den G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) die zweitgrößte Familie der membranständigen Proteine (Hediger et al., 2013). Nach heutigem Erkenntnisstand besteht die SLC-Familie aus 456 humanen Transportern, die in 52 verschiedene humane Genfamilien eingeteilt (Hediger et al., 2013) und in Datenbanken für Proteinfamilien (Pfam) gruppiert werden (Höglund et al., 2011). Die Rolle von Transportern in der Pathophysiologie humaner Erkrankungen wächst stetig mit den Erkenntnissen über ihre Funktion, Gewebeexpression und ihrem physiologischen Zusammenspiel mit anderen Transportern. Bislang wurde die Forschung im Bereich der SLC-Proteine vernachlässigt. Allerdings gewinnen sie derzeit immer mehr an Bedeutung aufgrund ihrer ubiquitären Expression und ihrem umfassenden Spektrum an Substraten (César-Razquin et al., 2015). Ferner sind diverse Kristallstrukturen und molekulare Modelle der SLC-Transporter vorhanden, die zur schnellen Aufschlüsselung des Transporters beitragen können (Hediger et al., 2013). Vorwiegend konnte hier eine gemeinsame Grundstruktur der SLC-Proteine festgestellt werden. Sie durchspannen meistens die Membran mit zwölf α -Helix-Bereichen. Aufgrund der simplen Diffusion von Substraten über die Membran mithilfe eines Konzentrationsgradienten versucht man Strategien aufzubauen, um neue Inhibitoren, Pharmaka oder neue Substrate zu finden, die den spezifischen Transporter passieren können (César-Razquin et al., 2015). Generell werden die SLC-Transporter wie folgt klassifiziert (Abbildung 1.1). Mit Hilfe der Pfam, Datenbank einer umfassenden Sammlung von Proteindomänen und Proteinfamilien,

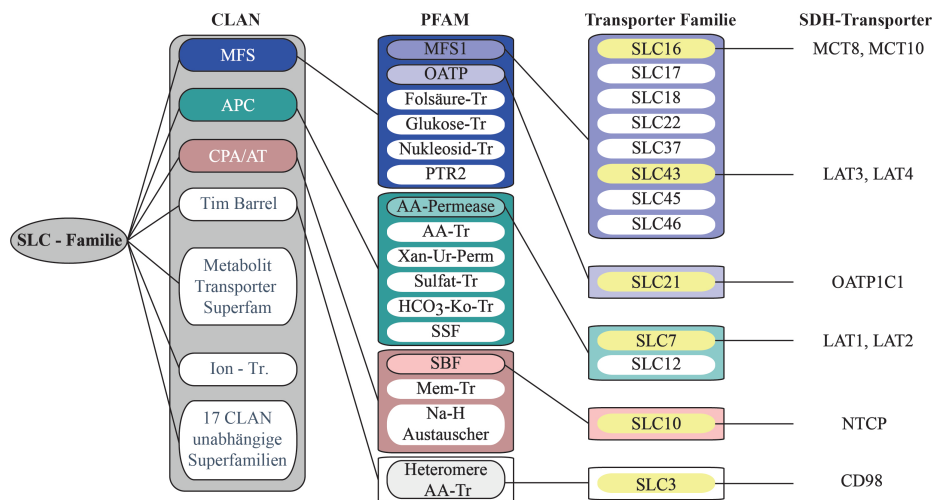


Abbildung 1.1: Repräsentative Übersicht der SDH-Transporter und ihre Einordnung in die SLC-Familie. Dargestellt ist die SLC-Familie, die sich in 23 Superfamilien einteilt. Davon sind 17 Transporter Pfam-Clan unabhängig. Es gibt drei große wichtige Pfam-Clans, die den größten Teil der SLC abdecken. Dazu gehören die Transporterproteine der MFS-, APC- und der CPA/AT-Familien. Der MFS-Clan (blau) setzt sich aus sechs Pfam zusammen (u.a. die MFS1- und die OATP-Familie). Der APC-Clan (grün) setzt sich ebenfalls aus sechs Pfam zusammen, während der CPA/AT-Pfam-Clan nur aus drei Gruppen besteht. An die jeweiligen Pfam gliedern sich die unterschiedlichen Transporterfamilien ein. Die gelb markierten Transporterfamilien enthalten spezifische Transporter, die SDH transportieren können.

wird ein *Clan* gruppiert, für den eine Homologie aus unterschiedlichen Quellen manuell ermittelt wurde (Höglund et al., 2011). Die SLC-Familie wird in sechs *Clan*-Familien gegliedert und besteht aus 17 *Clan* unabhängigen Gruppen. Die Abbildung 1.1 zeigt detailliert die Eingliederung von SLC-Transporterfamilien in die *major facilitator* Superfamilie (MFS)- und die Aminosäure-Polyamin-Organokation-Superfamilie (APC). Die MFS formt den größten *Clan* (Iacobuzio-Donahue et al., 2003). Sie bilden mit 25 %, die wohl größte Gruppe von SLC-Transportern (Pao et al., 1998). Der zweitgrößte Teil der SLC-Familie besteht aus der APC-Superfamilie (Jack et al., 2000), die im Unterkapitel 1.2.1 näher erläutert wird. Die Schilddrüsenhormon/e (SDH)-Transporter gehören alle zur SLC-Familie. Sie werden allerdings anderen Pfams und dementsprechend auch anderen Pfam-Clans zugeordnet. Der gelb markierten Transporterfamilien werden einzelne SLC-Transporter zugeordnet, die fähig sind SDH zu transportieren, obwohl sie anderen Pfam zugeordnet sind (siehe Abbildung 1.1). Dazu gehören u.a. die Transporterfamilien SLC16 (z.B. Monocarboxylattransporter (MCT) 8) und SLC43 (z.B. der L-Typ Aminosäuretransporter (LAT) 3), die beide zur MFS1-Pfam zugeteilt werden. Stattdessen wird die SLC7-Familie (z.B. LAT2) im APC-Clan eingruppiert, der sich wiederum in die Aminosäure-Permease-Pfam-Gruppe eingliedert. Die SLC7-Familie unterscheidet sich

strukturell zwar sehr stark von der SLC43-Familie, da sie einem anderen Pfam-*Clan* zugeordnet ist. Sie weisen jedoch ein ähnliches Substratspektrum auf, weshalb sie u.a. als L-Typ Aminosäuretransporter bezeichnet werden. Strukturell unterschiedlich sind die Tim Barrel-Transporterproteine, dazu gehören die Proteine der SLC3-Transporterfamilie. Sie bilden einen heteromeren Aminosäuretransporter (z.B. *cluster of differentiation 98* (CD98)/LAT) und dienen u.a. als Eskortprotein für die SLC7-Familie. Die SLC10-Familie (Natriumtaurocholate co-transportierende Polypeptide (NTCP)) zeichnet sich durch weniger als zwölf α -Helices aus. Sie besitzen dennoch die Eigenschaften der SLC-Transporter und transportieren ebenso SDH.

1.2 Membranproteine in Lebewesen

1.2.1 APC-Superfamilie

In der vorliegenden Arbeit steht LAT2 als Mitglied der APC-Superfamilie im Vordergrund. Transporter dieser Familie sind sekundär aktive Proteine und spielen eine essentielle Rolle in der Aufnahme von Nährstoffen, für das Recycling von Neurotransmittern, in der Homöostase von Ionen und in der Regulation des Zellvolumens. Eine Subfamilie, die APC-Familie mit der Transporter-Klassifikations-Datenbank (TCDB) (www.tcdb.org) TC-ID # 2.A.3. umfasst - wie oben beschrieben - einen großen Teil der SLC-Transporter (beim Menschen 6 Pfam) und setzt sich bei allen Lebewesen aus 15 Proteinfamilien zusammen. Die SLC7-Familie gehört u.a. zu dieser APC-Familie (siehe Abbildung 1.1). Für die APC-Transporter bestehen mehrere Möglichkeiten der kinetischen Transportmechanismen. Der Antiport vermittelt den Austausch von endogenen Substraten und exogenen Substanzen in Zellen und transportiert hierbei zwei Substrate in entgegengesetzter Richtung über die Membran. Die typische Poren-Grundstruktur der zwölf α -Helices dieser Transporter setzt sich charakteristisch aus zwei invertierten Bündeln, die jeweils aus fünf sich wiederholenden α -Helices bestehen, und zwei weiteren außenstehenden Helices zusammen. Die Helix-Bündel-Aufteilung ist schematisch in Abbildung 1.2 dargestellt. Typisch für die APC ist auch die variable Domäne zwischen Helix 2 und 3 bzw. 7 und 8 mit einem kurzen, in die Membran eintauchenden α -helikalen Bereich (Gasol et al., 2004). Als Transportverlauf wird ein Kippmechanismus (*rocking bundle*) vermutet (Rudnick, 2011), der aus einer dreidimensionalen Struktur abgeleitet wird. In dieser Arbeit wird im Detail auf die APC-Antiporter eingegangen, für die sich folgende Transportreaktion im Rahmen des Antiports von Substraten (Sub) ergibt:

$$Sub_1(raus) + Sub_2(rein) \rightleftharpoons Sub_1(rein) + Sub_2(raus)$$

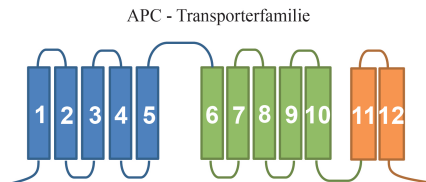


Abbildung 1.2: Das typische Faltungsmuster der APC-Transporter. Die typische Grundstruktur der zwölf α -Helices dieser Transporter setzt sich charakteristisch aus zwei invertierten Bündeln zusammen, die jeweils aus fünf sich wiederholenden α -Helices bestehen (blau/grün). Zudem besitzen die APC-Transporter zwei außenstehende Helices (orange), die wahrscheinlich als Anker dienen und zumindest unabhängig vom Transportdurchgang sind.

1.2.2 Bekannte Kristallstrukturen der APC-Familie

Kristallstrukturen, die eine Auflösung von mindestens 3,0 Å aufweisen, bieten eine gute Voraussetzung, um sie als Strukturtemplate für ähnliche Transporter zu verwenden. Mit Hilfe der daraus generierten Homologiemodelle können unter anderem die APC-Transporter ohne molekularer Struktur charakterisiert werden. Es gibt bereits sieben gelösten Kristallstrukturen die eine Leucin-Transporter (LeuT) ähnliche Faltung aufweisen (siehe Abbildung 1.3, in Rot dargestellt). Zwei dieser kristallisierten Transporter besitzen eine hohe Sequenzhomologie zu SLC7-Transportern und stellen das strukturelle Paradigma für heterodimere Aminosäuretransporter (HAT) dar. Auf der Grundlage dieser zwei Kristallstrukturen wird im Zuge dieser Arbeit ein LAT2-Strukturmodell aufgebaut und aufgrund dessen hier näher erläutert. Der Aminosäure-Polyamin-Organokation-Transporter (ApcT), Subtyp (PDB: 3GI9) von der Spezies *Methanocaldococcus jannaschii*, transportiert ein breites Spektrum an Aminosäuren (AS). Dieser Transport ist an Protonen gekoppelt. Der ApcT ist phylogenetisch in Bezug auf LeuT ähnliche Strukturen den SLC7-Transportern sehr ähnlich (graue Ellipse in Abbildung 1.3). Die Kristallstruktur mit einer Auflösung von 2,35 Å liegt im Apo-Zustand vor (siehe Abbildung 1.4) (Shaffer et al., 2009). Sie zeigt eine Interaktion von Protonen mit der Aminosäure Lysin (Lys) an der Position 158. Die gleiche Interaktion ist auch in der LeuT-Struktur (PDB: 3tt3) vorhanden. Im LeuT ist das Lys für den Natriumsymport essentiell (Shaffer et al., 2009). Bekannt sind drei weitere Kristallstrukturen des Aginin/Agmatin Transporter (AdiC)-Proteins aus dem *Escherichia coli* Bakterium (PDB: 3L1L, 3NCY, 3OB6) (Fang et al., 2009; Kowalczyk et al., 2011). Diese liegen in zwei unterschiedlichen Zuständen vor und sind in der Darstel-

lung 1.4 abgebildet. Das Substrat Arginin (Arg) bindet an die nach außen gerichtet geöffnete Struktur. Durch eine Konformationsänderung verschließt sich der Kanal mit einer dünnen Barriere, gefolgt von einer weiteren Konformationsänderung, die den vollständig verschlossenen Zustand beschreibt. Der Transporter öffnet sich schließlich nach innen und gibt das Arg intra-

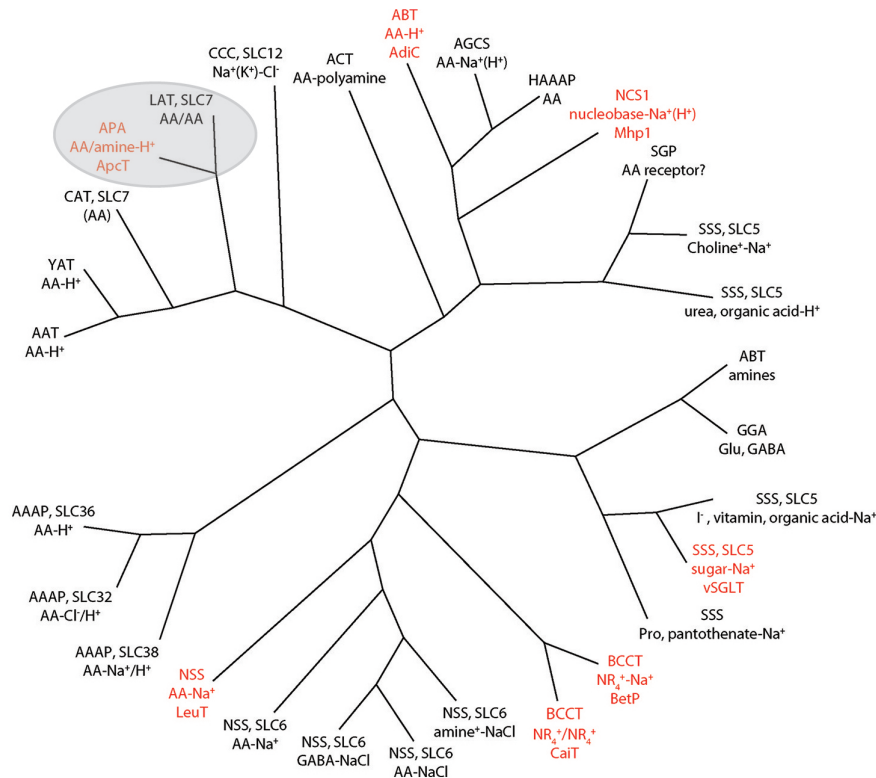


Abbildung 1.3: Beziehungen zwischen Transporterfamilien mit Ähnlichkeit zur LeuT-Struktur. Identifizierung der Transporterfamilien mit homologen Sequenzen, die strukturell ähnlichen zu LeuT sind und der TCDB entnommen sind. Die Relation zwischen den jeweiligen Familien wurden von einem multiplen Sequenzalignment mittels ClustalW abgeleitet. Die Bezeichnungen der Familien setzen sich aus den SLC-Nummern, den transportierten Substraten und für Antiport mit Schrägstrich oder Symport mit Bindestrich getrennt zusammen. Die in rot hervorgehobenen Transporterfamilien sind Familien, in denen es Kristallstrukturen gibt.

zellulär frei. Dies ist eine mögliche Konformationsveränderung des APC-Transporters, diese Veränderungen sind vermutlich der LeuT-Struktur ähnlich. Die verschlossene Konformation, die Arg im Transportkanal gebunden hat, ist eine Kristallstruktur mit 3 Å (PDB: 3L1L mit zwei Mutationen N22A, L123W) (Gao et al., 2010). Sie zeigt das positiv geladene Arg in einer sauren Bindungstasche. Die Amino- und Carboxylgruppe von Arg interagiert über je

eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen zwei α -Helices (TMH1 und TMH6) jeweils mit dem Rückgrat. Damit dient das Aminosäure-Motif als Erkennungsstelle für die Interaktion mit dem Transporter. Der aliphatische Teil von Arg wird über konservierte hydrophobe Seitenketten eingeschlossen. Die aromatischen Reste und das Glu208 spielen womöglich eine entscheidende Rolle für die Aufnahme und Freisetzung von Arg und Agmatin (Gao et al., 2010). Asn²² ist in der unmittelbaren Nähe der Aminosäure-Wechselwirkungsstelle lokalisiert. Durch die N22A Mutation erhöht sich die Bindungsaffinität für Arg um das Sechsfache bei ähnlicher Transportaktivität. Dies ermöglicht erst die Kristallisation des Transporters mit gebundenem Substrat. Besonders interessant ist, dass in der Kristallstruktur auch das Substrat Arg gebunden ist. Zur Generierung eines LAT2-Interaktionsmodells ist das von großem Vorteil und kann für Bindungsuntersuchungen genutzt werden, da auch das SDH eine Aminosäurefunktion besitzt.

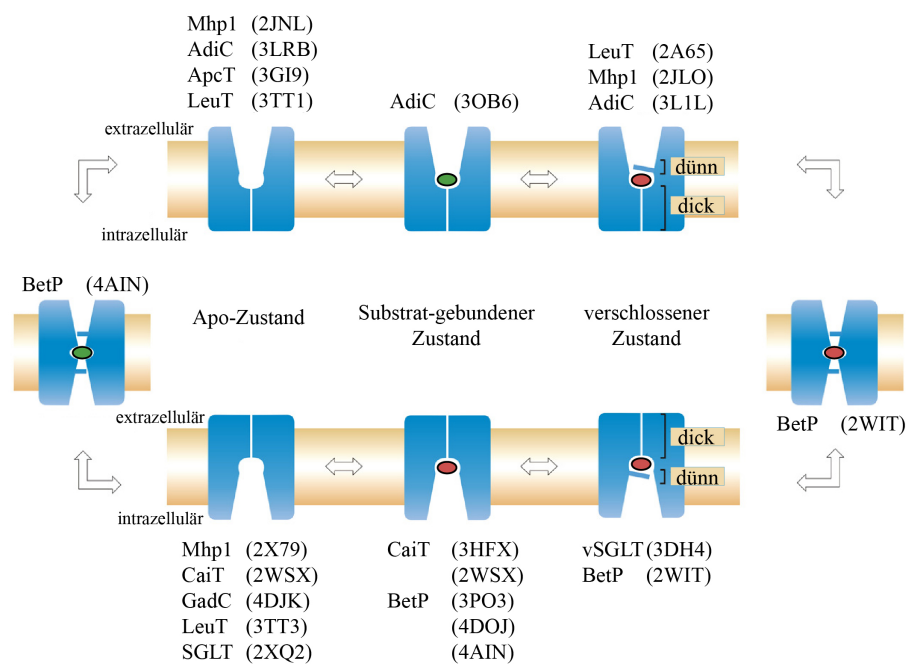


Abbildung 1.4: Alternative Konformationsveränderung der LeuT ähnlichen Transporter. Das Substrat (grün, rot) bindet an die nach außen oder nach innen offene Struktur im Apo-Zustand. Der Substrat gebundene Zustand verschließt den Kanal mit einer dicken und einer dünnen Barriere, die eine Diffusion der Substrate über die Membran verhindern. Der Zustand zwischen der nach innen oder nach außen gerichteten Konformation wird als vorübergehend vollständig verschlossen bezeichnet. Dargestellt sind Kristallstrukturen (PDB Code in Klammern), die für die jeweilige Konformation gelöst sind. Die Abbildung wurde nach Kowalczyk et al. (Kowalczyk et al., 2011) modifiziert.

1.2.3 Die *Major-Facilitator-Superfamilie*

Die MFS ist die größte Proteinfamilie der sekundär aktiven Transporter. Analog zu den APC-Transportern passieren niedermolekulare Substanzen mittels MFS-Proteinen die Zellmembran. Es wurden dabei drei verschiedene Transportmechanismen beobachtet: Der Uniport, bei dem das Substrat in eine Richtung transportiert wird; der Symport, wobei zwei oder mehr Substrate gleichzeitig durch die treibende Kraft des elektrochemischen Gradienten in eine Richtung übermitteln und der Antiport, der nach dem gleichen Prinzip wie bei der APC-Familie funktioniert. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind mehr als 1000 Transporterfamilien mit über 10 000 redundanzfreien Proteinen aller Organismen bekannt (www.tcdb.org) (Saier et al., 2016). Sie besitzen alle die gleiche dreidimensionale Struktur, die sich von der APC-Superfamilie unterscheidet. MFS-Transporter bestehen aus zwei Domänen mit je sechs α -Helices, die den Transportkanal umgeben. Dies ist in der Abbildung 1.5 schematisch dargestellt. Desweiteren zeichnen sie sich durch den *rocker switch*-Mechanismus aus, bei dem sich

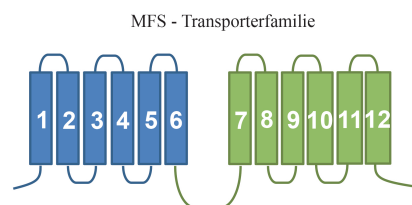


Abbildung 1.5: Das typische Faltungsmuster der MFS-Transporter. Die typische Porengrundstruktur der zwölf α -Helices dieser Transporter setzt sich charakteristisch aus zwei Helix-Bündel (blau und grün) zusammen. Ein Bündel besteht aus sechs einzelnen α -Helices, die einen Transportkanal formen.

die Helix-Bündel zueinander bewegen und dabei das Substrat durch den Kanal schleusen (Law et al., 2009). Für die MFS-Transporter sind viele Kristallstrukturen in unterschiedlichen Konformationen bekannt, mit deren Hilfe u.a. 2011 (Glycerol-3-Phosphattransporter (GlpT)) das erste Strukturmodell für den SDH-Transporter MCT8 generiert wurde (Kinne et al., 2010).

1.3 Identifizierung der unterschiedlichen SDH-Transporter

Die Geschichte der SDH-Transporter ist noch sehr jung. Die ersten Vermutungen, dass SDH nicht einfach passiv über die Zellmembran diffundieren können, wurden bereits 1970 postuliert, jedoch fehlten sehr lange die Beweise für die Existenz von SDH-Transportern (Hennemann et al., 2001). Studien zeigten, dass die Permeabilität von ungeladenen Molekülen stark abhängig von der Größe ist. Sogar Moleküle mit einem Molekulargewicht kleiner als 100 Da haben

eine sehr niedrige Permeabilität (Stein and Litman, 2015). Daraufhin intensivierten Forscher ihre Suche nach potentiellen SDH-Transportern und wurden Ende der 90er Jahre fündig. Der erste Transporter, der beschrieben wurde, ist der Organo-Anion-Transporter (OATP). Eine japanische Forschergruppe deutete an, dass OATP2 und OATP3 möglicherweise multifunktionale Transporter sein könnten und sich am Transport von Schilddrüsenhormonen in das Gewebe von Gehirn, Netzhaut, Leber und Niere beteiligen würden (Abe et al., 1998). Dies wurde 1999 von Friesema und anderen bestätigt und um den NTCP (SLC10) erweitert (Friesema et al., 1999) (Familienzuordnung in Abbildung 1.1). Sie fanden schließlich 2003 den spezifischen Schilddrüsenhormontransporter MCT8 (Friesema et al., 2003). Somit konnte bewiesen werden, dass SDH nicht passiv über die Plasmamembran diffundieren. Obwohl in der Veröffentlichung von Zhou et al. (Zhou et al., 1990, 1992) bereits erste SDH-Transporte in Erythrozyten gezeigt werden konnten, dauerte es fast zwei Jahrzehnte bis MCT10 eindeutig als SDH-Transporter identifiziert werden konnten (Friesema et al., 2008). Die physiologische Relevanz des SDH-Transports verdeutlichte sich 2004, als eine Mutation im Gen *mct8* mit einem pathophysiologischen Phänotyp identifiziert wurde (Friesema et al., 2004). Auch die Mitglieder der Familie des L-Typ Aminosäuretransporters (LAT) wurden als SDH-Transporter charakterisiert (Ritchie et al., 1999). Einige Arbeitsgruppen befassten sich mit dem SDH-Transport über LAT, wobei sie entweder nur den LAT1 alleine betrachteten oder nicht zwischen LAT1 und LAT2 differenzierten (Ritchie et al., 1999; Friesema et al., 2001; Uchino et al., 2002). Bisher ist nur wenig über LAT2 bekannt, weder über seine Struktur-Funktionsbeziehung noch über seine Transportmechanismen. Es ist daher von großem Interesse, weitere Kenntnisse über LAT2 zu gewinnen und seinen SDH-Transport aufzuklären. Es gibt unterschiedliche Proteine mit spezifischen Eigenschaften, die überlappende Fähigkeiten besitzen. Somit wird der Transport von SDH über die Zellmembran nicht ausschließlich den spezifischen MCTs zugeschrieben, sondern auch den OATPs und NTCPs, aber ebenso den LATs. Sie werden als sekundäre SDH-Transporter bezeichnet und rücken immer mehr in den Vordergrund, obwohl die physiologische Rolle des Zusammenspiels der Transporter noch lange nicht verstanden ist. So wächst das Verständnis der Transportmechanismen jedes einzelnen Transporters stetig und dadurch können u.a. genetische Defekte aufgeschlüsselt werden. Die meisten SDH-Transporter sind ubiquitär exprimiert (Bernal et al., 2015; Nakada et al., 2014; Halestrap, 2013; Wirth et al., 2014). In der Abbildung 1.6 ist die Expression der unterschiedlichen SDH-Transporter im Mausgehirn dargestellt. Der NTCP-Transporter ist bisher ein Einzelgänger und weist einen Natrium-abhängigen Substrattransport als Homo- oder Heterodimer auf. Er ist in den Lebersinuszellen exprimiert und unterscheidet sich strukturell stark von den anderen SDH-Transportern. Während für den NTCP nur sieben oder neun

putative Transmembranhelices (TMHs) vorhergesagt sind (Bijsmans et al., 2012; Mareninova et al., 2005), wird die Struktur der drei anderen Transporterfamilien MCT, OATP und LAT mit zwölf putativen TMHs angegeben. Trotz der ähnlichen Topologie zeigen Studien, dass die verschiedenen Transporter unterschiedliche Substratspezifitäten besitzen. Dies liegt darin begründet, dass sie zwei unterschiedlichen Transporterklassen angehören, denen ein anderes Faltungsmuster und damit auch ein anderer Transportmechanismus zugrunde liegen (wie oben beschrieben). Experimentelle Kristallstrukturen in atomarer Auflösung sind derzeit für die SDH-Transportproteine nicht verfügbar. Um schneller neue Erkenntnisse zu erzielen, wird immer häufiger die Homologiemodellierung verwendet. Zu Beginn dieser Arbeit waren bereits Modelle für den MCT8 und den OATP1C1 bekannt, jedoch gab es noch kein Modell für LAT1 oder LAT2. Das Generieren eines LAT2-Strukturmodells wurde als ein Ziel der vorliegenden Arbeit definiert.

1.3.1 Der Monocarboxylattransporter 8 und seine pathologischen Mutationen

Der MCT8 und der MCT10 unterscheiden sich von den anderen Mitgliedern der SLC16-Familie. Während beide SDH transportieren und der MCT10 zusätzlich aromatische AS, sind MCT1-4 für den Austausch von Monocarboxylate wie Pyruvat oder Lactat zuständig (Halestrap and Meredith, 2004). Der MCT8 vermittelt den Import und Export von T_3 (Visser et al., 2008; Friesema et al., 2008), T_4 , reverses 3,3',5'-Triiodthyronin (rT_3) und Diiodthyronin (T_2), aber keinen Transport von aromatischen AS oder Lactat (Friesema et al., 2003). Wie bereits erwähnt, wurden für den MCT8 unterschiedliche pathologische Mutationen gefunden, welche im Menschen zu einem schwer defizienten neurologischen Phänotyp führen (Allan-Herndon-Dudley Syndrom (AHDS)). Die Erkrankung wird X-chromosomal-rezessiv vererbt. Da das *Mct8* Gen *Slc16A2* auf dem X-Chromosom lokalisiert ist, sind Männer am häufigsten betroffen, während Frauen meist nur Überträgerinnen ohne Merkmalsausprägung sind. Um einen Defekt dieser Art besser beleuchten zu können, wurde zur pathophysiologischen Untersuchung des Syndroms ein Mausmodell mit einem abgeschalteten *Mct8* Gen entwickelt. Das überraschende Resultat zeigte, dass eine normale Gehirnentwicklung möglich war, obwohl der endokrinologische Phänotyp dem des pathologischen bei Menschen, die am AHDS erkrankt sind, entsprach (Dumitrescu et al., 2006; Trajkovic et al., 2007). Offensichtlich übernahmen in dem Mausmodell nach Ausfall von MCT8 andere Proteine den Transport der SDH. Somit könnten u.a. Familienmitglieder der OATPs (SLC21) oder der LATs (SLC7/SLC3 und SLC43)

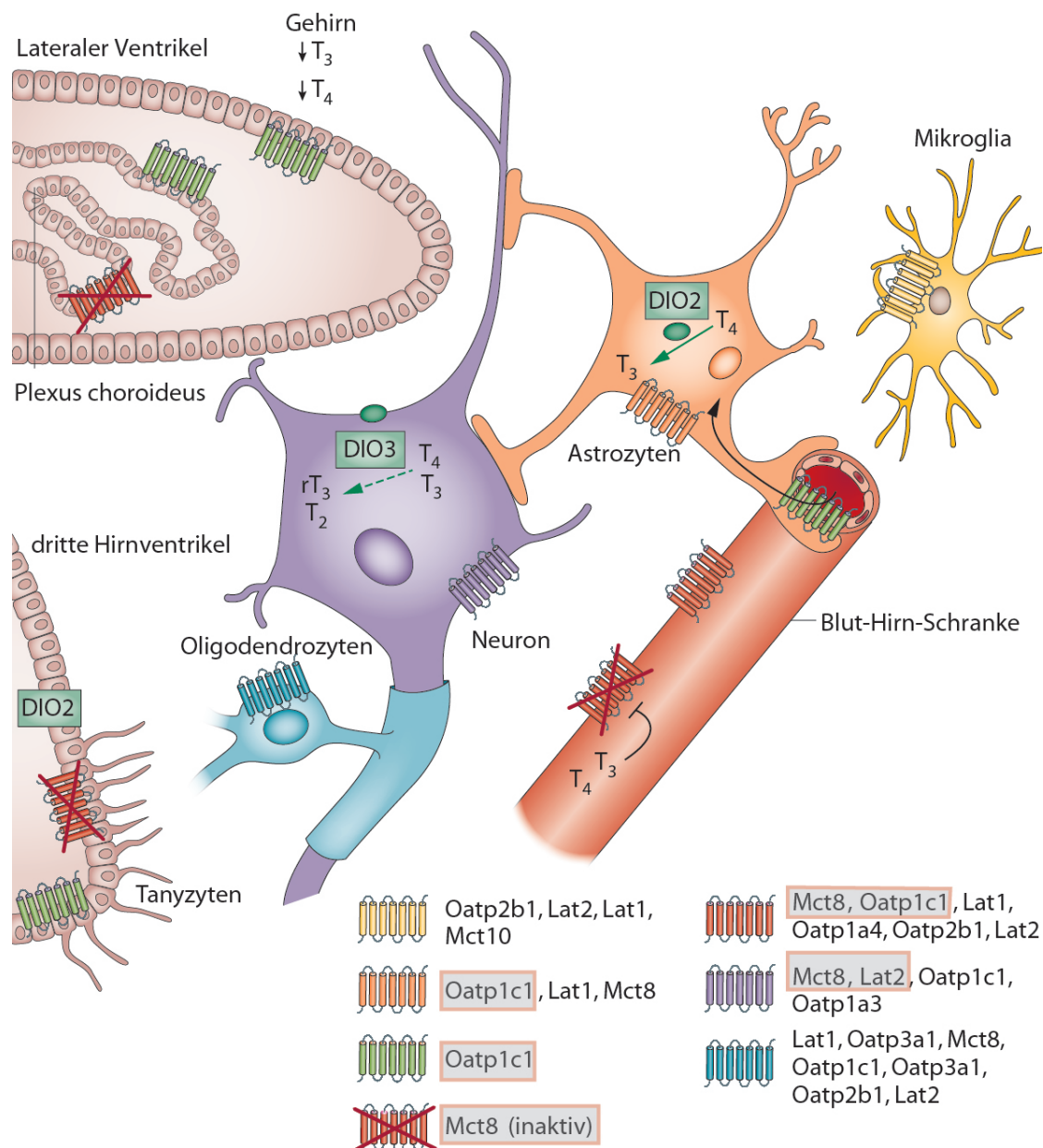


Abbildung 1.6: Skizze zum SDH-Transport im Gehirn der Maus. Experimentelle Untersuchungen sind grau hinterlegt. In der Blut-Hirn-Schranke enthalten Endothelzellen MCT8 und OATP1C1. In Abwesenheit von MCT8 wird der T_3 Transport beeinträchtigt, aber T_4 noch über OATP1C1 transportiert. Das Gleiche gilt für die Astrozyten, die im Kontakt mit Endothelzellen sind. In Astrozyten ist T_4 ein Substrat für DIO2, die T_4 zu T_3 deiodiniert. So können sie das Gehirn mit ausreichend T_3 versorgen und dadurch den fehlenden T_3 Transport kompensieren. Ein potentieller Transporter (z.B. LAT2), der T_3 vermitteln kann, ist noch nicht identifiziert. Der Abbau von T_4 und T_3 erfolgt in Neuronen durch DIO3, die in der Membran lokalisiert sind. Bei inaktivem *MCT8* Gen ist die DIO3-Aktivität aufgrund der reduzierten Zufuhr von T_3 niedrig. Die Tanyzyten exprimieren MCT8, OATP1C1, aber auch DIO2. Sie könnten möglicherweise bei der T_3 Zufuhr beteiligt sein und folglich das SDH an den Hypothalamus vermitteln. Die Abbildung wurde nach Bernal et al. (Bernal et al., 2015) modifiziert.

als Kompensatoren vermutet werden. Daraus ist die Hypothese der kompensierenden SDH-Transporter entstanden, die nach dem Ausfall des MCT8-Proteins eine Rolle spielen könnten. Die Darstellung 1.6 zeigt im Detail die SDH-Transporterexpression in den unterschiedlichen Zellen. Neurone sind auf die Zufuhr von T_3 angewiesen, da sie ausschließlich die DIO3, die T_4 zu rT_3 und T_3 zu T_2 abbaut, besitzen. Bei einem *Mct8* Defekt ist der T_3 Transport jedoch beeinträchtigt. Trotzdem gelangt T_4 über OATP1C1 in die Astrozyten, wo T_4 durch Deiodase 2 (DIO2) in T_3 abgebaut wird. Außerdem konnte bei MCT8 defizienten Mäusen in der embryonalen Entwicklung gezeigt werden, dass ihre isolierten Neurone wider den Erwartungen einen T_3 Transport aufweisen (Wirth et al., 2009). Daraufhin wurde der Expressionsstatus in der Entwicklungsphase ermittelt, sodass schließlich verschiedene kompensierende Transporter in den Neuronen identifiziert werden konnten. Dies ist in der Abbildung 1.6 ausführlich dargestellt (Bernal et al., 2015). Ein potentieller Transporter, der den T_3 Transport vermittelt, ist noch nicht identifiziert. Der OATP1C1 scheint eine wichtige Rolle im Mausgehirn zu spielen, da Proteinuntersuchungen eine hohe OATP1C1 Expression während der Entwicklung zeigten (siehe Abbildung 1.6). Tatsächlich wurde für OATP1C1 defiziente Mäuse eine Herunterregulierung der SDH-aktivierenden Gene festgestellt. Neueste Erkenntnisse über die *Mct8* und *Oatp1c1* defizienten Mäuse belegen den neurologisch eingeschränkten Phänotyp und weisen einen hypothyreoten Status auf (Mayerl et al., 2014). Weitere Kandidaten für die Kompensation des SDH-Transports sind darüber hinaus die murinen LAT1 und LAT2. Vor allem für LAT2 konnte in den Mausneuronen eine hohe Expression gemessen werden. In der humanen embryonalen Hirnentwicklung konnte dies jedoch nicht nachgewiesen werden (Wirth et al., 2009). Tatsächlich wurden für *Mct8/Lat2* defiziente Mäuse gleichbleibende endokrinologische Level, sowie keine Veränderung der Genexpressionslevel im Vergleich zu *Mct8* defizienten Mäusen nachgewiesen (Núñez et al., 2014). Das lässt vermuten, dass die T_3 -Aufnahme in der perinatalen Phase im zerebralen Cortex über den LAT2 gesteuert wird.

1.3.2 Aufbau der heteromeren Aminosäuretransporter

In der vorliegenden Arbeit liegt der Fokus auf dem SLC7-Transporter LAT2 (SLC7A8), der sehr homolog zu LAT1 (SLC7A5) ist (Bassi et al., 1999). Die SLC7-Familie wird in zwei Gruppen unterteilt: die kationischen Aminosäure-Transporter (CAT) und die LATs. Sie durchspannen die Membran mit zwölf α -Helices, wobei der N- und C-Terminus intrazellulär lokalisiert sind. LAT ist die leichte Kette und eine HAT-Untereinheit, die durch eine Disulfidbrücke mit der schweren Kette, dem CD98 (SLC3A2) oder einer neutralen Aminosäuretransporter (rBAT)-Untereinheit, verbunden ist. Die CD98 Untereinheit ist ein Glykoprotein, welches eine N-

terminale Transmembranhelix (TMH) und eine C-terminale, extrazelluläre Ektodomäne mit vier möglichen Glykolysierungsstellen besitzt. Bisher ist eine gut aufgelöste Kristallstruktur (PDB: 2DH2) nur für die Ektodomäne bekannt. Die neuesten Ergebnisse einer spanischen Arbeitsgruppe zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen, die das gesamte Heterodimer umfassen (Abbildung 1.7 (A)) (Rosell et al., 2014; Meury et al., 2014). Das Eskortprotein CD98 (Synonym: *4F2 cell surface antigen heavy chain*/ schwere Kette (4F2hc)) und der rBAT sind Mitglieder der SLC3-Familie (siehe auch Abbildung 1.1). Sie interagieren mit sechs Transportern der SLC7-Familie: LAT1, LAT2, y+LAT1 (SLC7A7), y+LAT2 (SLC7A6), Asc-Typ Aminosäuretransporter (ASC)1 (SLC7A10) und Cystin/Glutamat-Transporter (xCT) (SLC7A11). Nur bei Heterodimeren ist ein Transport von AS nachweisbar, da das CD98 als Eskortprotein dient, um u.a. den LAT in die Membran zu integrieren. Nur die leichten Ketten sind für die Transporteraktivität verantwortlich (Fotiadis et al., 2013). In Abbildung 1.7 (B) ist schematisch der Heterodimer LAT2/CD98 dargestellt. Seine Expression ist hauptsächlich basolateral gelegen. Er ist vor allem in der Niere für die renale Reabsorption und im Dünndarm zur Resorption der AS von großer Bedeutung. Der Transporter ist aber auch in Geweben wie Plazenta und Gehirn nachgewiesen. Außerdem wird er in der Leber, im Skelettmuskel, der Prostata, den Eierstöcken und im Herz exprimiert (Pineda et al., 1999; Rossier et al., 1999; Segawa et al., 1999). Das Protein ist etwa 120 kDA groß; dabei nimmt der LAT2 etwa 40 kDA und das CD98 etwa 80 kDA ein.

1.3.3 Die L-Typ Aminosäuretransporter 1 und 2

Die Aminosäuretransporter LAT1 und LAT2 sind sehr homolog. Die humanen Transporter besitzen eine Sequenzidentität von 50 %. LAT1 transportiert nur große neutrale AS, wohingegen LAT2 ein breiteres Spektrum an AS transportiert. So gelangen sowohl große als auch kleine neutrale AS über die Membran (Segawa et al., 1999). Der Austausch von AS in und aus der Zelle ist Natrium-unabhängig (Pineda et al., 1999). Der Aminosäuretransport über LAT2 wurde zum ersten Mal 1999 bekannt (Bassi et al., 1999). Unabhängig davon führten andere Arbeitsgruppen bereits Transportassays mit injizierten Oozyten des afrikanischen Krallenfroschs durch (Rossier et al., 1999) und bestätigten den Influx und den Efflux von L-AS über LAT2 (Pineda et al., 1999; Segawa et al., 1999). Die intrazelluläre Selektivität des Transporters ist ähnlich der extrazellulären Selektivität. Die Affinität scheint für intrazelluläre Substrate jedoch geringer zu sein als für Substrate auf extrazellulärer Seite des Transporters (Verrey, 2003). Sehr früh wurde die Hypothese von LAT als SDH-Transporter aufgestellt, als eine amerikanische Gruppe in der T₃ abhängigen Oozyten-Entwicklung herausfand, dass das

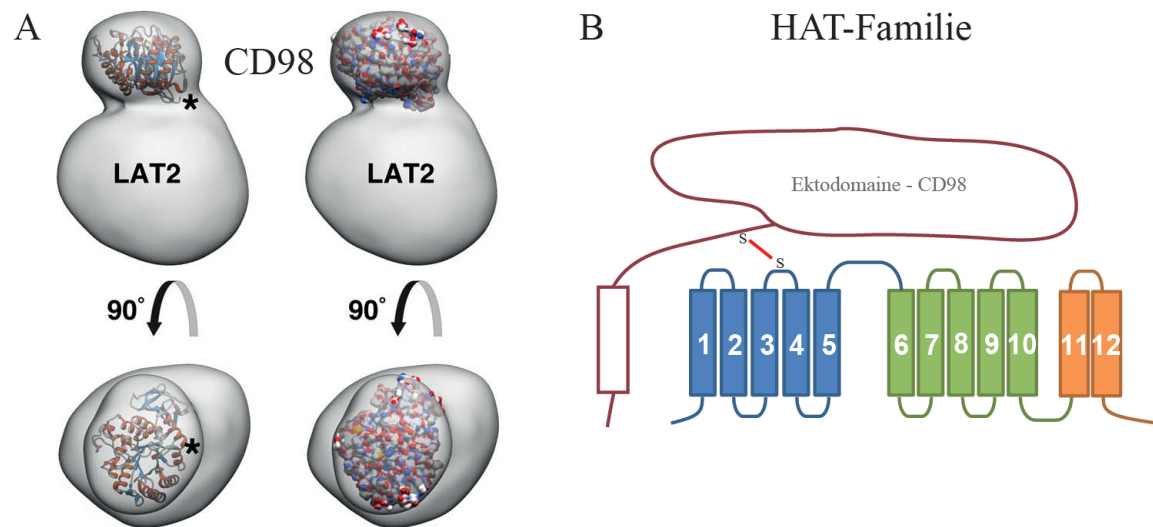


Abbildung 1.7: Die Rekonstruktion und schematische Darstellung des Heterodimers LAT2/CD98. A, Eine 3D-Rekonstruktion des menschlichen Heterodimers LAT2/CD98. Die zweilappige elektronenmikroskopische Struktur entspricht einem Maßstab von 50 Å. Die Kristallstruktur der Ektodomäne wurde manuell in der Struktur ausgerichtet (Rosell et al., 2014). B, Die schematische Darstellung des Dimers LAT2/CD98 mit einer Disulfidbindung.

Gen für den IU12 (LAT1) hochreguliert war (Liang et al., 1997). Die ersten Studien zum SDH-Transport erfolgten schon 1999: Die Arbeitsgruppe von P. Taylor zeigte einen CD98 abhängigen T_3 und sogar T_4 Import in die *Xenopus* Oozyten (Ritchie et al., 1999). Diese Ergebnisse von LAT1 wurden von der Arbeitsgruppe von T. Visser bestätigt und um die SDH-Transporterspezifität erweitert: Sie zeigten nämlich, dass $3,3'$ - T_2 am stärksten transportiert wird, gefolgt von T_3 , gleichgesetzt mit rT_3 und dann T_4 . In deren Veröffentlichung wird zudem über LAT2 als SDH-Transporter berichtet, jedoch sind dazu keine genaueren Daten zur Unterstützung dieser Aussage hinterlegt (Friesema et al., 2001). Um die physiologische Bedeutung des Transporters herauszustellen, wurden LAT2-defiziente Mäuse generiert (Braun et al., 2011a). Diese zeigten hingegen weder Veränderungen im Serum-SDH, noch wiesen sie neurologische Defekte auf. Es konnte lediglich ein etwas erhöhtes Level von kleinen AS im Urin nachgewiesen werden (Chillarón et al., 2010). Der Ausfall des Gens konnte vermutlich durch andere Transporter kompensiert werden. Wie oben bereits beschrieben, gibt es immer mehr Hinweise darauf, dass LAT2 ein SDH-Transporter ist, jedoch wurde der Import bzw. Export noch nie im Detail untersucht. Die Koexpression von MCT8 und LAT2 in Neuronen und Astrozyten bietet zumindest die Möglichkeit überlappende Fähigkeiten auszuspielen (Wirth et al., 2009) und den MCT8-Defekt zu kompensieren (siehe Abschnitt 1.3.1). Um die

Rolle von LAT2 im SDH-Transport zu verstehen, sind Transportuntersuchungen von SDH über LAT2 Gegenstand dieser Arbeit.

1.3.4 Die Charakterisierung von LAT

Die 2-Amino-Bicycloheptan-2-Carbonsäure (BCH), ein spezifischer kompetitiver Inhibitor für LAT, dient der Definition der L-Typ Aminosäuretransporter, die sich folglich aus der Spezifität im Aminosäuretransport ableiten lässt. Alle LAT zeigen die gleichen Transporteigenschaften: Sie sind Natrium-unabhängig und für den Austausch von großen neutralen AS zuständig. Eine weitere Einteilung entsteht über die Sensitivität zum BCH. Darüber werden sie schließlich als LAT charakterisiert (Taylor and Ritchie, 2007). LAT3 und LAT4 sind ebenfalls L-Typ Aminosäuretransporter von großen neutralen AS. Allerdings benötigen sie keine schwere Kette, um an die Plasmamembran zu gelangen. Der Austausch von Substraten ist sowohl Natrium- als auch Energie-unabhängig. LAT1 (SLC7A5) und LAT2 (SLC7A8) unterscheiden sich strukturell von LAT3 (SLC43A1) und 4 (SLC43A2). Obwohl sie alle ein ähnliches Substratspektrum transportieren, sind die Transportmechanismen aufgrund ihrer Familienzuordnungen wahrscheinlich unterschiedlich (siehe Abbildung 1.1). LAT3 und LAT4 sind Mitglieder des MFS-*Clans* und haben eine stärkere Ähnlichkeit zu MCT8 als zu LAT2, der der APC-Superfamilie zugeordnet ist. Neueste Studien, die während dieser Arbeit in Kooperation mit unserer Arbeitsgruppe entstanden sind, identifizierten zwei LAT-Mitglieder als SDH-Transporter (Zevenbergen et al., 2015): Sie zeigten, dass LAT3 und LAT4 am Efflux von T_2 beteiligt sind, jedoch keine SDH-Aufnahme aufweisen.

1.4 Schilddrüsenhormone

1.4.1 SDH und ihre physiologische Rolle

Im Fokus dieser Arbeit stehen außerdem die SDH und ihre Derivate. Die Wirkung der SDH ist komplex. Sie haben wichtige Auswirkungen auf die Entwicklung des Zentralen Nervensystems, auf das Wachstum und den Stoffwechsel (Yen, 2001). Sie werden über die unterschiedlichen SDH-Transporter in die Zielzellen transportiert. Das inaktive T_4 wird lokal durch zytoplasmatische Deiodasen zum aktiven T_3 umgewandelt, welches nur im Zellkern an den THR binden kann. Der THR bildet mit dem Retinsäure-Rezeptor (RXR) einen Dimer, welcher wiederum

an das genomische *thyroid hormone response element* (TRE) bindet und dadurch die T_3 spezifische Gentranskription reguliert. Neugeborene mit einer kongenitalen Hypothyreose wurden erstmals 1890 als kleinwüchsig, mental retardiert, lethargisch und adipös beschrieben. Durch eine frühzeitige Substitutionstherapie mit T_4 kann eine normale körperliche und geistige Entwicklung ermöglicht werden. Allerdings konnte auch in Studien gezeigt werden, dass bei einer schweren mentalen Retardierung die T_4 Behandlung keine Verbesserung der neurokognitiven Reifung bewirkte (Krude et al., 2015). Die Erklärung dafür könnte eine fehlende Deiodierung von T_4 zu T_3 (Abbildung 1.8 (1)), mangelnde Bindung von T_3 an den Schilddrüsenhormonrezeptor (1.8 (2)) oder eine gestörte SDH-Transportfunktion (1.8 (3)) sein (Krude et al., 2015).

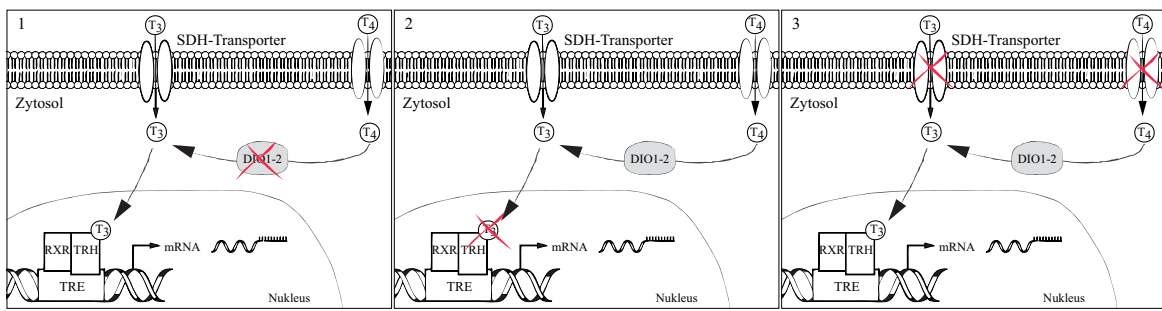


Abbildung 1.8: Übersicht der SDH-Wirkung in der Zelle. SDH (T_4/T_3) gelangen über SDH-Transporter in die Zielzelle, wo die lokale Umwandlung von inaktivem T_4 zum aktiven T_3 durch zytoplasmatische Deiodasen erfolgt. Im Zellkern bindet nur das aktive T_3 am TRH und bildet mit dem RXR einen Dimer, der gebunden an das genomische TRE die Gentranskription reguliert. Die SDH-Funktion kann unterschiedlich beeinflusst sein: 1, Keine Umwandlung durch z.B. inaktive Deiodasen. 2, Keine Bindung am TRH durch z.B. Fehlfaltung des Rezeptors. 3, Kein Transport von T_3 und T_4 über SDH-Transporter in die Zielzelle hervorgerufen durch u.a. Transporterdefekt aufgrund von pathogenen Mutationen (z.B. MCT8).

1.4.2 Die Biosynthese der SDH

Iod ist für die Biosynthese der SDH von entscheidender Bedeutung. Damit es zu keiner Mangelkrankung kommen kann, sollte Iod täglich mit der Nahrung zugeführt werden, sodass es sich zur Hormonproduktion in der Schilddrüse ansammeln kann. Die SDH werden in den Follikeln der Schilddrüse synthetisiert. Dabei werden das Prohormon T_4 und das stoffwechselaktive T_3 im Verhältnis 10:1 gebildet. Im biochemischen Prozess erfolgt die Iodierung von Thyreoglobulin (Tg) gebundenen Tyrosinen, die dann als Monoiodtyrosin (MIT) oder als Diiodtyrosin (DIT) bezeichnet werden. Anschließend werden die iodierten Tyrosine gekoppelt, wodurch T_4 , T_3 und rT_3 als Glied einer Molekülkette entstehen und im Lumen der

Follikel als Tg gespeichert werden. Thyreoidea stimulierendes Hormon (TSH) abhängig wird das Tg-Molekül pinozytiert und mit Lysosomen verschmolzen. Über Proteasen werden T_4 und T_3 nach Bedarf freigesetzt. Der folgende Transport in den Blutkreislauf ist noch nicht abschließend aufgeklärt (Jung, 1970). Es ließ sich bereits zeigen, dass vor allem der MCT8 eine entscheidende Rolle in der Sekretion von T_4 und T_3 aus den Thyreozyten spielt (Di Cosmo et al., 2010). In die Zielzellen gelangt das T_4 mithilfe von SDH-Transportproteinen durch die Plasmamembran und wird mittels Deiodinasen durch Abspaltung eines Iodatoms zum aktiven T_3 umgewandelt. Die Deiodierung des Phenol-Rings (5'- oder Außenring- Deiodierung) bewirkt die Aktivierung von T_4 zu T_3 , während die Deiodierung des Tyrosyl-Rings (5- oder Innenring- Deiodierung) die Deaktivierung von T_4 zu rT_3 hervorruft (siehe Abbildung 1.9 (A)).

1.4.3 Die chemische Struktur der SDH

Die klassischen SDH sind nicht-proteinogene α -AS. Ihre Struktur ist in der Abbildung 1.9 (A) dargestellt. Wie AS besitzen auch SDH jeweils eine Carboxyl- und eine Aminogruppe. Sie bestehen aus zwei aromatischen Thyrosin-AS und weisen damit zwei Ringsysteme auf. Sowohl am aromatischen Tyrosin-Ring (innen), als auch am aromatischen Phenyl-Ring (außen) können die Positionen 3 und 5 zwei- (T_2), drei- (T_3) oder viermal (T_4) iodiert sein. Das aktive T_3 unterscheidet sich demnach nur in der Anzahl eines Iodatoms vom inaktiven T_4 . Am äußeren Ring befindet sich zusätzlich eine Hydroxylgruppe in para-Stellung. Durch das Iod sind die SDH stark hydrophob und deshalb gering in Wasser löslich. Die wichtigsten SDH sind T_4 und T_3 , wobei aktuelle Erkenntnisse zeigen, dass T_2 auch ein schwach aktives SDH sein kann (Pietzner et al., 2015; Padron et al., 2014; Orozco et al., 2014).

1.4.4 Die Regulation der SDH T_4 und T_3

Die Ausschüttung der SDH in den Blutkreislauf ist in eine negative Rückkopplung integriert. Das Thyroliberin (TRH) wird im Hypothalamus produziert und gelangt in hoher Konzentration zum Hypophysenvorderlappen. Das TRH stimuliert die Hypophyse zur Produktion und Ausschüttung von TSH aus den thyreotropen Zellen. Das TSH bewirkt in den Schilddrüsenzellen eine gesteigerte Bildung der SDH (T_4 und T_3). Bei hoher T_4 und T_3 Blutkonzentration wird durch einen negativen Feedback-Mechanismus die SDH-Synthese inhibiert. Die Hormonsynthese steht im thyreotropen Regelkreislauf, der in der Darstellung 1.9 (B) skizziert ist.

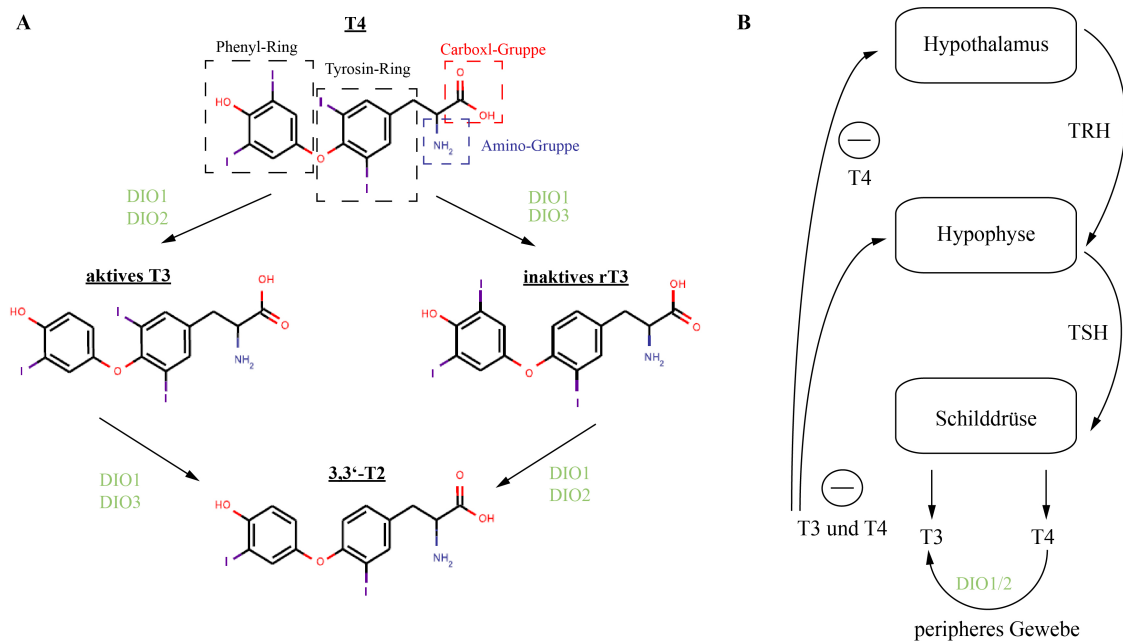


Abbildung 1.9: Die Struktur und der Regulationskreislauf der SDH. A, Chemische Strukturen der klassischen SDH. Das von der Schilddrüse hauptsächlich produzierte T_4 , das metabolisch aktive T_3 , das durch Deiodasen umgewandelte rT_3 und $3,3'$ - T_2 . B, Schematische Darstellung des Schilddrüsenhormon-Regelkreises. Das vom Hypothalamus gebildete TRH führt in der Hypophyse zur Freisetzung von TSH. Durch TSH wird die Bildung der SDH T_4 und T_3 stimuliert. Die SDH hemmen über einen negativen *Feedback*-Mechanismus ihre eigene Produktion.

Er wird indirekt durch die Hormone selbst zur höheren Synthese angeregt oder durch eine negative Rückkopplung in der Hypophyse und im Hypothalamus gehemmt.

1.4.5 Die physiologische Rolle der SDH-Derivate

Neben den SDH T_4 , T_3 , rT_3 und $3,3'$ - T_2 gibt es weitere endogene Metabolite, wie Thyronin (T_0), Monoiodthyronin (T_1) und $3,5$ - T_2 Derivate. Sie wurden bislang als inert betrachtet, da sie nicht am SDH-Rezeptor binden. Die Rolle der SDH-Derivate im humanen Stoffwechsel wurde lange Zeit als nebensächlich eingestuft. Erst kürzlich begannen Forschungsgruppen, sich mit der Funktion und Wirkungsweise des T_2 -Derivats $3,5'$ - T_2 auseinander zu setzen. Seine Herkunft ist noch nicht geklärt. Die beste Erklärung für die Entstehung von $3,5$ - T_2 ist die Außenringdeiodierung von T_3 durch DIO3. In ersten Versuchsmodellen mit Ratten zeigte sich, dass die Gabe von $3,5$ - T_2 den metabolischen Ruheumsatz erhöht. Die Ratten hatten ein geringeres Körpergewicht. Die Leberfettanteile, die Triglyceride und das Cholesterol waren

ebenfalls reduziert. Daher wird vermutet, dass T_2 einen direkten Einfluss auf den Leberstoffwechsel hat und durch die erhöhte Stoffwechselrate keine überschüssigen Blutfette anfallen (Lanni et al., 1996). Durch die Gabe von T_2 konnte die abdominale Fettmasse erheblich vermindert werden und die Gewichtszunahme unter einer Überernährung um 30 % reduziert werden (Padron et al., 2014). Die Untersuchungen zeigten aber auch, dass der TSH-Wert durch die T_2 Substitution sinkt, wodurch eine Verringerung der Synthese von T_4 hervorgerufen wird und konsekutiv zu wenig T_3 zur Verfügung steht (Accorroni et al., 2016). Darüber hinaus entstand eine weitere Hypothese: Da ein Überschuss an TSH das Schilddrüsenwachstum fördert und damit das Risiko für Schilddrüsenmalignome erhöht, wurde die Vermutung aufgestellt, dass sich durch die Gabe von T_2 , das ein Sinken der TSH-Konzentration im Blut bewirkt, das Wachstum von Malignomen einschränken lassen könnte. Diese Annahme könnte man sich außerdem therapeutisch im Kontext der Schilddrüsenvergrößerungen (Struma) bei Autoimmunerkrankungen, wie z.B. Morbus Basedow, von Nutzen machen. Dahingegen zeigte sich allerdings auch, dass durch unphysiologisch hohe T_2 Konzentrationen Nebenwirkungen wie eine Herzmuskelhypertrophie hervorgerufen werden können (Jonas et al., 2015). Des Weiteren ist unklar, ob die Antwort auf T_2 durch spezifische Rezeptoren, die noch nicht identifiziert wurden, vermittelt wird, oder ob eine thyreomimetische Wirkung zugrunde liegt. Es gibt Hinweise darauf, dass T_2 eine Vorstufe von Iodothyronamin (T_1AM) und die Auswirkung von exogener T_2 Gabe eine erhöhte T_1AM Produktion sein könnte, wodurch die kardiovaskulären Effekte dann auf das T_1AM zurückzuführen wären. Welche Rolle T_1AM im Physiologischen spielt, wurde durch die Gabe von T_1AM in isolierten Rattenherzen ermittelt. Es zeigt sich, dass T_1AM innerhalb weniger Sekunden eine signifikante, negativ inotrope Wirkung in Form von reduziertem Aortenfluss, reduziertem Herzminutenvolumen und reduziertem Blutdruck auf die isolierten Rattenherzen hat (Frascarelli et al., 2011).

1.5 *Xenopus laevis* Oozyten als Expressionssystem

In der Wissenschaft gibt es viele Anwendungsmöglichkeiten für Amphibien-Oozyten. Im Jahre 1971 wurden erstmalig die Oozyten von *Xenopus laevis* als Expressionssystem von fremder, injizierter mRNA entdeckt (Gurdon et al., 1971). Das Expressionssystem ist ein *in vitro* Translationssystem aus intakten Oozyten im Reifestadium V bis VI des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* (Dumont, 1972). In diesem Stadium besitzen die Oozyten eine Größe von etwa 1,2 mm. Der vegetative Teil der Oozyte beinhaltet hauptsächlich Dottersack-Proteine und dient als Energiespeicher. In der animalen Seite der Oozyte befindet sich der Zellkern, in dem die Proteinbiosynthese stattfindet. Der hohe Anteil gespeicherter Proteine und Nährstoffe versorgt die Oozyten, sodass sie auf keine externe Versorgung durch die Umwelt angewiesen sind. Der Membranproteinanteil ist bei Oozyten deshalb sehr niedrig. Sie besitzen stattdessen einen hohen Anteil an Ribosomen und demnach eine hohe Kapazität für die Translation. Bei Injektion einer gewünschten Menge exogener cRNA in die Oozyten wird im Gegensatz zu endogenen mRNAs, die unter Translationskontrolle stehen, bei exogener cRNA mit hoher Effizienz translatiert. Die Gene von Membranproteinen für u.a. Transporter sind endogen in den Oozyten sehr niedrig exprimiert (Van Winkle, 1993). Dadurch bietet sich die Möglichkeit, kleine Unterschiede des normalen Transporterproteins im Vergleich zu einem mutierten Transporterprotein zu charakterisieren (Gasol et al., 2004). So können Fragestellungen bezüglich intrazellulärer Signalkaskaden, biochemischer Signalwege, der Entwicklungsbiologie oder des Stofftransports über die Plasmamembran untersucht werden (Weber, 1999). Für Untersuchungen dieser Art haben sich Oozyten von *Xenopus laevis* bewährt. Das Ovar ist operativ einfach frei zu präparieren. Die anschließende Vereinzelung der Oozyten ist mit etwas Aufwand durchzuführen: Dazu werden die Oozyten mit Kollagenasen behandelt, sodass die umgebenden Follikelepithelzellen entfernt werden können und schließlich die Oozyte freigelegt ist. Vorher wird die spezifische mRNA der zu untersuchenden Transporterproteine in ausreichender Menge *in vitro* in einem zellfreien System hergestellt und danach in die Oozyten mikroinjiziert. Die Eigenschaften des Transportproteins können in einem weiteren Schritt über Aufnahme- und Abgabeuntersuchungen von radioaktiv markierten Substraten analysiert werden. In diesem System können die Eigenschaften des Wildtyp-Proteins untersucht und die Veränderungen der mutierten Transporterproteine herausgefiltert werden. Auf diese Weise lassen sich einzelne Mutationen des Transporterproteins bestimmten Funktionen zuordnen. In dieser Arbeit sollen Transporter in Oozyten überexprimiert werden, um sie für Aufnahmeuntersuchungen von radioaktiv markierten Substraten zu verwenden. Dazu werden neben der Analyse des Transporter-WTs auch Transporter mit Mutationen im Detail charakterisiert.

1.6 Zielstellung

In der vorliegenden Promotionsarbeit soll der LAT2-vermittelte SDH-Transport auf molekularer Ebene aufgeklärt werden. Die Motivation dieser Arbeit basiert auf der bislang unzureichend erforschten molekularen Struktur des LAT2. Es gibt Hinweise darauf, dass der murine LAT2 das Potential zum SDH-Transport hat.

Hierzu sollen die spezifische SDH-Erkennung und mögliche Unterschiede zum Aminosäuretransport mit Hilfe von Sequenz-Struktur-Funktionsbeziehungen untersucht werden. Betrachtet werden sowohl die LAT2-vermittelte Aufnahme als auch die Abgabe von SDH über die Zellmembran. Zur Aufklärung des Transportmechanismus sollen Aminosäureseitenketten identifiziert werden, die an der SDH-Translokation beteiligt sind. Mithilfe einer generierten dreidimensionalen LAT2-Homologiestruktur sollen intra- und intermolekulare Interaktionen des Transporters mit seinen Substraten analysiert werden. Abgeleitet von dem generierten LAT2-Homologiemodell sollen Aminosäureseitenketten ausgewählt werden, um diese mittels ortsgerichteten Mutagenesen auf funktionelle Eigenschaften zu untersuchen.

Gleichermaßen ist das Ziel dieser Arbeit die Charakterisierung spezifischer Substratmerkmale von LAT2 aufzuklären, um potentielle Substrate zu identifizieren. Außerdem soll untersucht werden, unter welchen Bedingungen diese Substrate durch LAT2 transportiert werden. Dafür werden die SDH- und BCH-ähnlichen Substrate aus der hausinternen Bibliothek verwendet.

Mit LAT2 und LAT2-Varianten überexprimierenden *Xenopus laevis* Oozyten sowie Hek293-Zellen, werden Transportstudien durchgeführt, um die SDH-Aufnahme bzw. -Abgabe über diese Transportervarianten zu charakterisieren. Ergänzend dazu sollen verschiedene SDH-ähnliche Substrate analysiert werden. Diese Varianten werden nach ihren funktionellen Gruppen systematisch ausgewählt, um sie für die LAT2-Transportstudien zur kompetitiven Hemmung des SDH-Transports zu verwenden.

Durch die Kombination beider Ansätze sollen die molekularen Eigenschaften des SDH-Transports aus Sicht des Transporters LAT2 sowie potentielle Substratinteraktionen aus Sicht des Substrates ermittelt werden. Aus diesen Studien gewonnene Struktur-Funktionszusammenhänge ermöglichen Rückschlüsse auf den molekularen Mechanismen des Imports sowie des Exports spezifischer SDH über LAT2. Das molekulare Verständnis über den LAT2-Transportmechanismus sowie deren SDH-Charakteristika könnte im Hinblick auf Defizite im SDH-Transport gezielte Therapiemöglichkeiten über LAT2 eröffnen.

2 Materialien

2.1 Chemikalien

Wenn nicht gesondert vermerkt (Tab. 2.1), wurden alle verwendeten Reagenzien von Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland bezogen.

Tabelle 2.1: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller, Niederlassung
Albumin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Amikacin	Alfa Aesar, Karlsruhe, D
Ammoniumperoxodisulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Aquasafe 300 Plus	Zinsser Analytic, Frankfurt am M., D
Ciprofloxacin	Enzo Life Sciences, Lörrach, D
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
DMEM + Glutamax, Gibco [®]	ThermoFisher Scientific, Schwerte, D
DNA-Marker	New England Biolabs, Frankfurt am Main, D
DPBS 10x Gibco [®]	ThermoFisher Scientific, Schwerte, D
Enhanced Chemiluminescence (ECL)	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
FBS Superior (FCS)	Biochrom, Berlin, D
Kanamycin	Appli Chem, Darmstadt, D
L-Aminosäuren	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Mineralöl	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Nuklease-freies Wasser	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Penicillin/ Streptomycin (P/S)	Biochrom, Berlin, D
Ponceau-S Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Proteinstandard, Precision Plus Protein	BioRAD, München, D
Reinst Ethanol	Appli Chem, Darmstadt, D
RNase Away	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Saccharose	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
TEMED	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Tricain MS-222	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Trypanblau	Seromed GmbH, Wien, A
Trypsin/EDTA Solution 10x (T/E)	Biochrom, Berlin, D

2.1.1 Substrate für Transportstudien

Die verwendeten Substrate wurden in den Transportstudien mit Laufnummern bezeichnet (Tab. 2.2). Alle Substrate wurden mit einer Reinheit von > 90 % geliefert. Die nicht markierten SDH sowie AS wurden von der Firma Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland bezogen. Stark hydrophobe Substrate wurden vor der Verwendung in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Hingegen erfolgte das Solubilisieren der hydrophilen Substrate entweder in bidestilliertem und entionisiertem Wasser oder direkt im Puffer.

2.1.2 Radioaktiv markierte Substrate

Alle radioaktiv markierten Substrate wurden von der Firma Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, Deutschland bezogen (Tab. 2.3). Die AS wurden in einem Ethanol-Wasser-Gemisch (2:98) und die SDH in einem Propanol-Wasser-Gemisch (1:1) geliefert. Die Substrate wurden bei 4 °C gelagert.

Tabelle 2.3: Radioaktiv markierte Substrate

Bezeichnung	Name	Aktivität	Verwendung
³ H-Leu	Leucin, L-[4,5- ³ H(N)]	37 [MBq/ml]	10 nM
³ H-Phe	Phenylalanin, L-[3,4,5- ³ H]	37 [MBq/ml]	10 nM
¹²⁵ I-T ₂	L-3,3'-[₂ - ¹²⁵ I]-Diiodothyronin	9,25 [MBq/ml]	0,1 nM
¹²⁵ I-T ₃	L-3,5,3'-[T3- ¹²⁵ I]-Triiodothyronin	7,4 [MBq/ml]	0,1 nM
¹²⁵ I-T ₄	L-[T4- ¹²⁵ I]-Thyroxin	7,4 [MBq/ml]	2,7 nM

2.2 Reagenzien

2.2.1 Verwendete Kits

Bei der Verwendung von Kits wurde stets nach dem Herstellerprotokoll verfahren (Tab. 2.4). Kleine Protokollabweichungen wurden im Kapitel Methoden detailliert beschrieben.

Tabelle 2.4: Verwendete Kits

Name	Firma, Herkunft
NucleoBond [®] Xtra Midi	MACHEREY-NAGEL, Düren, D
NucleoSpin [®] Plasmid	MACHEREY-NAGEL, Düren, D
NucleoSpin [®] Gel and PCR Clean-up	MACHEREY-NAGEL, Düren, D

Tabelle 2.4: Verwendete Kits

Name	Firma, Herkunft
mMessage mMachin SP6	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Heidelberg, D

2.2.2 Enzyme

Die verwendeten Enzyme hatten unterschiedliche Enzymaktivitäten. Sie wurden für die Versuchsreihen unabhängig ihrer Aktivität mit einer Menge von 0,5 oder 1 μL eingesetzt (Tab. 2.5).

Tabelle 2.5: Verwendete Enzyme

Bezeichnung	Aktivität	Firma, Herkunft
BamHI-HF	20000 [U/mL]	New England Biolabs, Frankfurt am Main, D
XbaI	20000 [U/mL]	New England Biolabs, Frankfurt am Main, D
BspI	10000 [U/mL]	New England Biolabs, Frankfurt am Main, D
SmaI	20000 [U/mL]	New England Biolabs, Frankfurt am Main, D
DpnI	20000 [U/mL]	New England Biolabs, Frankfurt am Main, D
MluI	10000 [U/mL]	New England Biolabs, Frankfurt am Main, D
T4 DNA Ligase	200 [U/ μL]	New England Biolabs, Frankfurt am Main, D
Collagenase A	-	Roche, Berlin, D
Plasmid DNA 1 $\mu\text{g}/20 \mu\text{L}$	Volumen	Firma, Herkunft
BamHI FastDigest	1 μL	ThermoFisher Scientific, Schwerte, D
HindIII FastDigest	1 μL	ThermoFisher Scientific, Schwerte, D

2.2.3 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma BioTez, Berlin, Deutschland bezogen (Tab. 2.7, 2.6). Alle Primer hatten eine Stockkonzentration von 50 pmol/ μL . Bei der Erstellung von Primern wurden drei allgemeine Kriterien berücksichtigt: Es sollte keine Doppelstranghybridisierung vorliegen, Cystein oder Guanin sollten das jeweilige Strangende belegen und die Schmelztemperatur sollte möglichst bei 60 °C liegen. Zur Sequenzierung der unterschiedlichen Plasmidvektoren wurden Primer (*forward* (fwd), *revers* (rev)) generiert (BioTez) oder Stockprimer der Sequenzierungsfirma verwendet.

Tabelle 2.2: Substrate für die Inhibitionsstudien

Laufnr.	Name	Firma, Niederlassung
3-T1	L-Tyrosin	Henning Berlin GmbH, Berlin, D
3-T1Ac	3-Iodothyroacetate	Henning Berlin GmbH, Berlin, D
3-T1AM	3-Iodothyronamin	ABX advanced biochemical compounds, Radeberg, D
BCH	2-Aminobicyclo-(2,2,1)-Heptan-2-CarbSre	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
S1	3,5-Bis(Trifluoromethyl)L-Phenylalanin	Apollo Scientific, Cheshire, UK
S2	3-Amino-L-tyrosin Dihydrochloridmonohydrat	InterBioScreen, Chemogolovka, RUS
S3	3,4-Dihydroxy-L-Phenylalanin	Sigma-Aldrich GmbH, Schnelldorf, D
S4	4-(3,5-Diido-4-Methoxyphenoxy)3,5-Diido-phenylalanin	
S5	2-Amino-3-(3,5-Dibromo-4-Hydroxyphenyl)essigsäure	Key Organics Ltd, Cornwall, UK
S6	2-Amino-2-Cyclopropyl-essigsäure	Labotest KG, Niederschoena, D
S7	3,5-Diiod-L-Tyrosin	Torsy Ltd., Riga, LVA
S9	1-Amino-3-Methylcyclohexan-1-CarbSre	
S10	1-Amino-5-Methyl-2-(Propan-2-yl)Cyclohexan-1-CarbSre	
S11	1-Amino-2-Methylcyclohexan-1-CarbSre	
S12	2-[1-(Aminomethyl)Cyclohexan]-Essigsäure	
S13	3-Fluoro-4-(2-Hydroxyphenoxy)-Benzamid	
S14	4-(4-Hydroxyphenoxy)3-Methylbenzamid	
S17	3'-Iso-propyl-3,5-Dimethyl-L-Tyrosin	Josef Köhnle, Charite Berlin, D
S18	3'-Iso-propyl-3,5-Diiod-L-Tyrosin	
S19	3,5-Diiod-3',5'-Dimethyl-L-Tyrosin	

Tabelle 2.6: Oligonukleotide

Mutation	5'-3' WT	5'-3' Mutation	Primer
N51A fwd	<u>AAC</u>	<u>GCA</u>	CATTGTAGGG <u>GCA</u> ATCATTGGC
N51A rev	<u>AAC</u>	<u>GCA</u>	GCCAATGATT <u>GCCCC</u> TACAATG
N51S fwd	<u>AAC</u>	<u>TCA</u>	CATTGTAGGG <u>TCA</u> ATCATTGGC
N51S rev	<u>AAC</u>	<u>TCA</u>	GCCAATGATT <u>TGA</u> CCCTACAATG
Y130R fwd	<u>TAC</u>	<u>CGC</u>	GCTGGTGATC <u>CGCCCC</u> ACCAAG
Y130R rev	<u>TAC</u>	<u>CGC</u>	CTTGGTGGG <u>GCGG</u> ATCACCAGC
Y130A fwd	<u>TAC</u>	<u>GCC</u>	CTGGTGATC <u>GCCCC</u> ACCAAG
Y130A rev	<u>TAC</u>	<u>GCC</u>	CTTGGTGGG <u>GCGG</u> ATCACCAG
T132A fwd	<u>ACC</u>	<u>GCA</u>	GTGATCTACCCC <u>GCA</u> AACCAAGCTG
T132A rev	<u>ACC</u>	<u>GCA</u>	CAGCTTGGTT <u>TGCGGGG</u> TAGATCAC
N133A fwd	<u>AAC</u>	<u>AGT</u>	GATCTACCCCACC <u>AGT</u> CAAGCTGTCATC
N133A rev	<u>AAC</u>	<u>AGT</u>	GATGACAGCTT <u>GACT</u> GGTGGGGTAGATC
Q134T fwd	<u>CAA</u>	<u>ACA</u>	CCCACCAAC <u>ACAG</u> CTGTCATCG
Q134T rev	<u>CAA</u>	<u>ACA</u>	CGATGACAGCT <u>TGT</u> TGTTGGTGGG
I137M fwd	<u>ATC</u>	<u>ATG</u>	CAAGCTGTC <u>ATG</u> GCCCTCACC
I137M rev	<u>ATC</u>	<u>ATG</u>	GGTGAGGGCC <u>CAT</u> GACAGCTTG
T140F fwd	<u>ACC</u>	<u>TTC</u>	CGCCCTC <u>TTC</u> TTCTCCAAC
T140F rev	<u>ACC</u>	<u>TTC</u>	GTTGGAGA <u>AGA</u> AGAGGGCG
Y144A fwd	<u>TAC</u>	<u>GCA</u>	CTTCTCCAAC <u>GCA</u> GTGCTGCAGCC
Y144A rev	<u>TAC</u>	<u>GCA</u>	GGCTGCAGCACT <u>TGCG</u> TTGGAGAAG
K193A fwd	<u>AAG</u>	<u>GCA</u>	CTTCACAGCTGGG <u>GCA</u> CTCCTGGC
K193A rev	<u>AAG</u>	<u>GCA</u>	GCCAGGAGT <u>GCCCC</u> AGCTGTGAAG
F242V fwd	<u>TTT</u>	<u>GTT</u>	CAGGGCTCC <u>GTTG</u> CCTATGGTG
F242V rev	<u>TTT</u>	<u>GTT</u>	CACCATAGGC <u>ACCGG</u> AGCCCTG
F242W fwd	<u>TTT</u>	<u>TGG</u>	CAGGGCTCC <u>TGGG</u> CCTATGGTG
F242W rev	<u>TTT</u>	<u>TGG</u>	CACCATAGGC <u>CCAGG</u> AGCCCTG
N248S fwd	<u>AAC</u>	<u>AGC</u>	GGCTGG <u>AGC</u> TTCTTAATT
N248S rev	<u>AAC</u>	<u>AGC</u>	AATTAAGGA <u>AGCT</u> CCAGCC
F249A fwd	<u>TTC</u>	<u>CGC</u>	GTGGCTGGA <u>ACGCC</u> CTTAAT
F249A rev	<u>TTC</u>	<u>CGC</u>	ATTAAGGG <u>GCG</u> TTCCAGCCAC

Die nachstehenden Oligonukleotide wurden zum einen zur Sequenzanalyse und zum anderen zur Generierung von Schnittstellen verwendet. Die Gensequenzen, die im pTLB-Vektor integriert waren, wurden mit dem SP6 *forward*- oder dem generierten LAT2-fwd-2 (*forward*)-Primer und dem generierten pTLB-rev (*reverse*)-Primer sequenziert, sodass die gesamte Gensequenz zuverlässig ermittelt werden konnte. Zur Sequenzierung der Gensequenzen im pcDNA3-Vektor wurden der pCMVF-pCDNA3 (*forward*)- und der T7 (*reverse*)-Primer verwendet. Für die Analyse des pEGFP-N1- und des pmCherry-N1-Vektors kamen nur die Primer pCMVF-fwd (*forward*) und EGFP_Nrev (*reverse*) in Frage.

Tabelle 2.7: Primersequenzen

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Synthese
CMVF_pcDNA3	CAACGGGACTTTCCAAAATG	Source BioScience GmbH, Berlin, D (S BioSc GmbH, Ber, D)
EGFP_Nrev	CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG	S BioSc GmbH, Ber, D
LAT2-fwd-2	CTAAGTCTGGAGGTGATTAC	BioTez, Berlin, D
pCMVF-fwd	GAGCTCGTTTAGTGAACCGTC	S BioSc GmbH, Ber, D
pTLB-rev	GGAGCAGATACGAATGGCTAC	BioTez, Berlin, D
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG	S BioSc GmbH, Ber, D
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	S BioSc GmbH, Ber, D
LAT2-HindIII	GGGTGGTCGGAAAGCTTCGGAGAACC	S BioSc GmbH, Ber, D
LAT2-AgeI	GCCCTCTAGACCGGTGGCTGCTCCTCC	S BioSc GmbH, Ber, D
HC-HindIII	GGAGACCCAAAGCTTACCGTTTCTGC	S BioSc GmbH, Ber, D
HC-AgeI	GCATAGGAAGACCGGTGCCACAAAGG	S BioSc GmbH, Ber, D

2.2.4 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper (AK) sind in Tabelle 2.8 aufgelistet. Die AK wurden in 3 %igem Milchpulver angesetzt. Die primären AK wurden über Nacht (ÜN) bei 4 °C und die sekundären AK für eine Stunde bei RT inkubiert.

Tabelle 2.8: Verwendete Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller, Niederlassung
Primärantikörper			
LAT2/Slc7a8	Hase	1:200	immunoGlobe [®] , Himmelstadt, D
DYKDDDDK Tag (D6W5B)	Hase	1:1200	Cell Signaling, Leiden, NL
CD98/Slc3a2 (HPA017980)	Ziege	1:200	Atlas Antibodies, Stockholm, SWE
α-Tubulin	Maus	1:4000	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, D
Sekundärantikörper			
Anti-Ziege - POD	Esel	1:4000	Jackson ImmunoResearch, Newmarket, UK
Anti-Maus - POD	Ziege	1:2500	Jackson ImmunoResearch, Newmarket, UK
Anti-Hase - POD	Ziege	1:5000	Jackson ImmunoResearch, Newmarket, UK
Anti-Ziege - AlexaFluor647	Esel	1:200	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, D

2.2.5 Verwendete Plasmid-DNA

Die Expressionsvektoren wurden um die jeweilige Proteinsequenz erweitert und anschließend mit einem Flag-Tag, His-Tag oder einem Fluoreszenzlabel modifiziert. Sie sind in der Tabelle 2.9 aufgelistet. Der Expressionsvektor pTLB wurde von der Arbeitsgruppe T. J. Jentsch (FMP, Berlin, D) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 2.9: Verwendete Plasmid-DNA

Vektor	Gen	Modifikation	Firma, Herkunft
pTLB	LAT2	Flag	AG Jentsch, FMP, Berlin, D
pTLB	LAT2-Mutanten	Flag	
pTLB	CD98	His	AG Jentsch, FMP, Berlin, D
pmCherry-N1	CD98	mCherry	Clontech Laboratories, CA, USA
pcDNA3	CD98	His	Clontech Laboratories, CA, USA
pEGFP-N1	LAT2	GFP	Clontech Laboratories, CA, USA
pEGFP-N1	LAT2-Mutanten	GFP	

2.2.6 Verwendete Zellsysteme

Alle verwendeten Zellsysteme sind im Labor gut etabliert. Sie konnten erfolgreich in dieses Projekt integriert werden und sind in der Tabelle 2.10 aufgelistet.

Tabelle 2.10: Verwendete Zellsysteme

Zellsysteme	Bezugsquelle, Niederlassung
<i>E. coli</i> DH5 α	FMP, Berlin, D
NEB5 α	New England Biolabs, Frankfurt am Main, D
<i>Human Embryonic Kidney</i> (Hek)293	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
<i>Xenopus laevis</i> Oozyten	AG Jentsch, FMP, Berlin, D
<i>Xenopus laevis</i> Albino-Oozyten	AG Jentsch, FMP, Berlin, D
<i>Xenopus laevis</i> Oozyten	Ecocyte Bioscience, Castrop-Rauxel, D

2.3 Geräte, Zubehör und Verbrauchsmaterialien

2.3.1 Geräte

Alle hier verwendeten Geräte sind in der Tabelle 2.11 aufgelistet.

Tabelle 2.11: Verwendete Geräte und Zubehör

Bezeichnung	Hersteller, Niederlassung
1470 Wizard Gamma Counter	Wallac/Perkin Elmer Inc., Rodgau, D
Blotkammer, Mini Trans Blot	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Cell Counter, CASY	Roche, Berlin, D
Sterilbank	BDK, Luft und Reinraumtechnik, Sonnenbühl, D
Durchflusszytometer, LSM-Fortesa	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Elektrophoresekammern	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Geldokumentationssysteme	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Zentrifuge, Heraeus Bifuge Pico	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, D

Tabelle 2.11: Verwendete Geräte und Zubehör

Bezeichnung	Hersteller, Niederlassung
Imager Lumi Image F1	Boehringer Mannheim, Ingelheim am Rhein, D
Incubator Innova 4230	New Brunswick Scientific/Eppendorf Ag, Hamburg, D
Incubator	Binder, Tuttlingen, D
Inkubator Innova 4230	New Brunswick Scientific/Eppendorf AG, Hamburg, D
LSM 510 META ConfCor2	Carl Zeiss, Jena, D
LumiImager F1	Boehringer Mannheim, Ingelheim am Rhein, D
Zentrifuge, Mikro 22 R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, D
Mikroskope STEMI DV4	Carl Zeiss, Jena, D
Mikro-Zentrifuge	Biofuge pico Heraeus Instruments, Osterode, D
Mini Trans Blot	BioRAD, München, D
NanojectII	Drummond Scientific Company, Broomall, USA
Nanoliterpipette	Drummond Scientific Company, Broomall, USA
pH-Meter	KnickPortames, Berlin, D
Pipettenziehgerät	SUTTER, Novato, USA
PVDF-Membran, Immun-Blot [®]	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Stemi DV4	Zeiss, Oberkochen, D
Szintillationszähler	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, D
Zentrifuge 3K12	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Zellhomogenator	Braun Biotech Int. GmbH, Melsungen, D

2.3.2 Verbrauchsmittel

Die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmittel sind in der Tabelle 2.12 aufgelistet.

Tabelle 2.12: Verbrauchsmittel

Verbrauchsmittel	Firma, Herkunft
FASC-Röhrchen	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Filterspitzen	TipOne [®] Starlab GmbH, Hamburg, D
Gamma-Counter-Röhrchen	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Glas-Kapillaren	3,5'Drummond Scientific Company, Broomall, US
Latex-Handschuhe	Ninja [®] Black Amercare Inc, North Charleston, US
Parafilm	Laboratory Film, Chicago, US
Pasteur-Pipetten	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg, D
Reaktionsgefäße	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
RNase-freie Reaktionsgefäße	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Szintillationsmessflaschen	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
versch. Zellkulturplatten	TPP, Zürich, CH

2.4 Programme & Software

Die in dieser Arbeit verwendeten Programme sind in der Tabelle 2.13 aufgelistet.

Tabelle 2.13: Verwendete Software und Programme

Software	Entwickler, Niederlassung
Adobe Master Collection CS5	Adobe Systems GmbH, München, D
BioEdit	Ibis Biosciences, Carlsbad, CA
Marvin Sketch	ChemAxon, Budapest, HU
Clone Manager 8.04	Sci-Ed Software, Morrisville, USA
Geneious 5.4.6	Biomatters, Auckland, NZ
ImageJ software	NIH, Bethesda, Maryland
Prism5	GraphPad Prism Software, La Jolla, USA
PyMOL v1.7.2	Schrödinger LLC, New York, USA
Sybyl-X2	Certara Inc., St. Louis, MO
Zen2010 Software	Carl Zeiss, Jena, D
BLAST [®]	Basic Local Alignment Search Tool, USA

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Arbeiten

3.1.1 *In vitro*-Arbeiten mit der Hek293-Zelllinie

Die Kultivierung der mammalischen Zelllinie erfolgte stets in einem Inkubator bei einer Temperatur von 37 °C, einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer Luftfeuchtigkeit von 95 %. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde sowohl unter sterilen Bedingungen gearbeitet, als auch ein Antibiotikum eingesetzt. Die humane Nieren-Endothelienzelllinie (*human embryonic kidney*) (Hek293) wurde für verschiedene Experimente verwendet. Das Kulturmedium wurde, wie in Tabelle 3.1 aufgelistet, zusammengesetzt. Um die Zellen zu lösen und zu vereinzeln, wurden 5 mL Trypsin/EDTA (T/E) (1x) hinzugegeben und nach einem kurzen Moment wieder abgesaugt. Weiterhin wurden die Hek293-Zellen für 1-2 Minuten (min) bei 37 °C inkubiert und die Trypsin-Reaktion mit Kulturmedium wieder gestoppt. Die Aussaat der Zellen erfolgte abhängig von dem jeweiligen Experiment in Kulturplatten mit unterschiedlichem Durchmesser der Kavitäten.

Tabelle 3.1: Zusammensetzung der Lösungen für die Hek293-Zellen

Lösung	Konzentration	Menge
Kulturmedium		
DMEM + Glutamax mit 1 g/L Glucose und Pyruvat		500 mL
FCS (Cat.No. S0615; Lot.No. 0979 B)	10 %	50 mL
P/S 10000 U/mL / 10000 µg/mL	1 %	5 mL
DPBS 1x		
DPBS 10 x	CaCl ₂ u. MgCl ₂	10 mL
ddH ₂ O		90 mL
Trypsin/EDTA 1x		

Tabelle 3.1: Zusammensetzung der Lösungen für die Hek293-Zellen

Lösung	Konzentration	Menge
T/E 10 x	0,5 %/ 0,2 % in DPBS ohne Ca u. Mg	1 mL
ddH ₂ O		9 mL

Beschichtung mit Poly-L-Lysin

Die Kulturplatten wurden vor Zellaussaat mit dem positiv geladenen Poly-L-Lysin beschichtet, um eine verbesserte Haftung der Hek293-Zellen bzw. deren negativ geladener Zellmembran über elektrostatische Kräfte am Untergrund zu gewährleisten. Die Kavitäten wurden vollständig mit der Poly-L-Lysin-Lösung (0,1 mg/mL) benetzt und für 30 min inkubiert. Die Trocknung der Oberfläche erfolgte für eine Stunde bei RT unter sterilen Bedingungen. Bis zur Verwendung wurden die Platten im Kühlschrank gelagert und vor Zellaussaat auf RT gebracht.

Transiente Transfektionsmethode

Die transiente Transfektion der Hek293-Zellen erfolgte ein Tag nach Zellaussaat von 2×10^5 Zellen pro Kavität einer 35 mm Schale oder pro Kavität einer 12 *Well*-Platte. Die Kotransfektion wurde mit dem Transfektionsreagenz Polyethylenimin (PEI) durchgeführt, wobei von der LAT2-DNA und der CD98-DNA stets äquivalente Mengen verwendet wurden. Die Plasmid-DNA und das Transfektionsreagenz wurden für 5 min in jeweils DMEM inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze gemischt und für weitere 20 min bei RT inkubiert. Die dazu eingesetzten Reagenzmengen und -verhältnisse sind der Tabelle 3.2 zu entnehmen.

Tabelle 3.2: Transfektion von adhärenenten Hek293-Zellen

DNA-Konzentration [μg]	Transfektionsreagenz [μL]	Verhältnis	Medium [μL]
6- Well-Platte			
je 1,6	3,2	1:2	DMEM 200
12- Well-Platte			
je 0,8	1,6	1:2	DMEM 100

3.1.2 *In vitro*-Arbeiten mit *Xenopus laevis* Oozyten

Dass Oozyten fähig sind, eine injizierte RNA in Proteine zu translatieren, wurde bereits 1971 herausgefunden (Gurdon et al., 1971). Seither wurden Oozyten für die Expression von Rezeptoren, Ionenkanälen und Transporter etabliert. In der Arbeit wurden Oozyten des afrikanischen Krallenfroschs *Xenopus laevis* verwendet. Die Haltung der Oozyten vor und nach der Präparation erfolgte stets bei 16 °C im Inkubator. Um bakterielle Kontaminationen einzugrenzen und ein erfolgreiches Arbeiten mit den Oozyten zu gewährleisten, wurden unterschiedliche Antibiotika eingesetzt. Für die durchgeführten Experimente wurden sowohl pigmentierte Oozyten als auch Albino-Oozyten verwendet, die entweder von der AG Jentsch zur Verfügung gestellt oder von der Firma EcoCyte Bioscience bestellt wurden.

Oozytenentnahme

Mit einem kleinen operativen Eingriff wurden einem Frosch Oozyten entnommen. Dafür wurde er 5-10 min in eine 0,1 %ige Tricain-Methansulfonatlösung getaucht. Aufgrund des hautgängigen Anästhetikums war er für ca. 60 min analgosediert. Nach Eröffnung der Bauchhöhle wurde eine gewünschte Menge des Ovars entnommen und in ORII-Puffer überführt. Der 1-2 cm lange Schnitt durch die Bauchdecke wurde mit Nahtmaterial vernäht und die Frösche bis zum Nachlassen der Betäubung in einer Box mit etwas Leitungswasser gehalten.

Präparation von Oozyten

Das Ovar wurde in ORII-Puffer bis zur weiteren Präparation auf Eis gelagert. Zur Entfernung von Bindegewebe wurde das Ovar in kleine Teile gerissen und anschließend mit 2 mg/mL Kollagenase A in ORII-Puffer inkubiert. Der Verdau erfolgte für etwa 90 min bei RT. Alle 15-20 min wurde die Kollagenase-Lösung gewechselt und das Ovar mehrmalig mit ORII-Puffer gewaschen. Nach Vereinzeln wurden die Oozyten in ND96-Puffer überführt und optisch selektiert. Hierbei wurden lebende Oozyten mit einem Durchmesser von 1,0-1,3 mm (Stadium V-VI), einer gleichmäßig kugeligen Form und einem vitalen Aussehen ausgewählt. Die Oozyten wurden bis zur Injektion in einem Inkubationspuffer (siehe Tabelle 3.17) bei 17 °C inkubiert. Innerhalb der drei Versuchsjahre haben die Oozyten eine Antibiotikaresistenz entwickelt, weshalb das Antibiotikum im Inkubationspuffer zweimal gewechselt wurde (O'Connell et al., 2011).

Selektion und Mikroinjektion der membranfreien Oozyten

Vor der Injektion wurden die Oozyten nochmals optisch kontrolliert und ggf. nach oben genannten Kriterien selektiert. Zur Injektion der kodierende RNA (cRNA) wurden die Injektionsspitzen zunächst aus Glaskapillaren mit einem Pipettenziehgerät hergestellt. Anschließend wurden die Injektionsspitzen mit Mineralöl luftblasenfrei befüllt und in eine Nanoliterpipette eines Nanoinjektors eingespannt. Die ausgezogene Glasinjektionsspitze wurde mit einer Pinzette abgebrochen, um eine scharfe Glasnadel mit dem gewünschten Durchmesser zu erhalten. Die cRNA von LAT2 und CD98 wurden im Verhältnis 1:1 gemischt. Davon wurden 1-2 μL aufgezogen und schließlich 9,6-46 nL/Oozyte injiziert. Die Inkubation der Oozyten erfolgte bei 17 °C für 48 Stunden in einem Inkubationspuffer. Nach 24 Stunden fand ein Wechsel des Puffers und das Aussortieren von unbrauchbaren, avitalen Oozyten statt.

Tabelle 3.3: Zusammensetzung der Lösung für das Arbeiten mit Oozyten

Lösung	Chemikalie	Menge
ND96-Puffer (pH 7,5); 0,20 - 0,23 osm/kg		
	NaCl	96 mM
	KCl	2 mM
	CaCl ₂ (Dihydrat)	1,8 mM
	MgCl ₂ (Hexahydrat)	1 mM
	HEPES	5 mM
ORII-Puffer (pH 7,5); 0,20 - 0,23 osm/kg		
	NaCl	100 mM
	KCl	2 mM
	MgCl ₂ (Hexahydrat)	1 mM
	HEPES	5 mM
Kollagenase A-Puffer		
	in ORII	
	Kollagenase	1,5 mg/ml
Inkubationspuffer (pH 7,5); 0,20 - 0,23 osm/kg		
	in ND96	
	Gentamicin	50 mg/ml oder
	Amikacin	0,2 mg/ml oder
	Amikacin	0,2 mg/ml
	Ciprofloxacin	0,2 mg/ml

3.2 Molekularbiologische Arbeiten

3.2.1 Ortsspezifische Mutagenese

Das Prinzip der ortsspezifischen Mutagenese basiert auf einer Polymerasekettenreaktion (PCR) mit fehl-gepaarten Oligonukleotiden. Die Sequenzen der Primer sind im Bereich der geplanten Mutation komplementär zur Gensequenz mit Ausnahme der Nukleotide, die eine Mutation hervorbringen. Die Durchführung erfolgte äquivalent zum Protokoll des QuickChange[®] II *Site-Directed Mutagenesis* Kits. Die Plasmide, die zuvor aus Bakterien isoliert wurden (siehe Kapitel 3.2.2), dienten als Ausgangskonstrukte für den PCR-Ansatz. Dieser Ansatz (Tabelle 3.4) wurde zur optimalen Amplifizierung unter verschiedenen Bedingungen ausgetestet. Dabei variierte die Temperatur, die Zyklen und die Zyklenzahl. Die optimalen Bedingungen wurden für alle zu generierenden Konstrukte verwendet (Tabelle 3.5). Im Anschluss an die Amplifizierung wurde 1 μL des Restriktionsenzym DpnI zum Reaktionsmix gegeben und der Ansatz für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. DpnI schneidet lediglich die methylierten Ausgangsplasmide. Da die neu synthetisierten mutierten Plasmide nicht methyliert waren, blieben sie erhalten. Es folgte die Amplifikation von Plasmid-DNA durch Transformation in *Escherichia coli* (E.Coli) Dh5 α , welche im Abschnitt 3.3.5 beschrieben wird.

Tabelle 3.4: PCR-Ansatz zur Plasmid-Amplifizierung

Reagenz	Einheit	Volumen [μL]
Puffer	10 x	2
dNTPs	10 μM	1
Vorwärts-Primer	10 μM	1
Rückwärts-Primer	10 μM	1
Plasmid-DNA	100 ng/ μL	1
PFU Turbo Polymerase	500 U/mL	1
ddH ₂ O		13

Tabelle 3.5: Ermittelte, optimale Bedingungen zur Amplifizierung der Mutations-tragenden Plasmid-DNA

Zyklus	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95 °C	3 min
16 Zyklen		
Denaturierung	95 °C	30 sec
Anlagerung	55 °C	1 min
Elongation	68 °C	12 min
Kühlung	12 °C	

3.2.2 Plasmid-Isolierung

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte mit kommerziell erhältlichen Kits. Für die Sequenzierungen wurden nur kleine Mengen Plasmid-DNA benötigt, um die Mutation nachzuweisen. Die Isolierung dafür erfolgte mit dem NucleoSpin[®] Plasmid Kit. Zur Gewinnung größerer Mengen der Plasmid-DNA für die Transfektionen wurde das NucleoBond[®] Xtra Midi-Kit verwendet. Die Präparation erfolgte jeweils nach dem Protokoll des Herstellers. Die Elution erfolgte mit 20 μ l Elutionspuffer. Die Konzentration und die Reinheit der DNA wurde schließlich mittels spektrometrischer Absorptionsmessungen bei Wellenlängen von 260 und 280 nm am NanoDrop ermittelt. Die Plasmid-DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.2.3 Einführen von Restriktionsschnittstellen über die PCR

Die Proteinexpression erfordert eine Klonierungsstrategie. Insbesondere die Auswahl der Restriktionsenzyme und die damit zur Verfügung stehenden Restriktionsschnittstellen müssen genauestens geplant werden. Mit Hilfe der Software *Clone Manager* wurden die Klonierungen und die Einführung von Schnittstellen virtuell konstruiert. Zur Klonierung von LAT2 und CD98 wurden zwei Schnittstellen, HindIII und AgeI, über die PCR-Amplifizierung in den EGFP-N1-Vektor eingefügt. Die dazu verwendeten Oligonukleotide sind in der Tabelle 2.7 aufgelistet.

3.2.4 Restriktionsspaltungen durch Endonukleasen

Die Restriktionsspaltungen dienten den hier betrachteten Forschungsarbeiten zum einen zur Herstellung passender Verknüpfungsstellen zwischen Vektoren und unterschiedlichen cDNA-Fragmenten und zum anderen dienten sie der einfachen DNA-Kontrolle durch die Bestimmung von Fragmentlängen. Der Verdauungsansatz (Tabelle 3.6) wurde für ein bis zwei Stunden bei der vom Enzym vorgegebenen Temperatur inkubiert und der vom Hersteller vorgeschlagene Puffer wurde unter den vorgegebenen Restriktionsbedingungen verwendet. Die Aktivitäten der verwendeten Enzyme (U/ml) können dem Kapitel Material 2.2.2 entnommen werden. In der Vektor-Karte sind die Details der verwendeten Plasmide eingetragen (Abbildung 3.1). Hieraus kann entnommen werden, welche Enzyme für die Linearisierung oder Umklonierung verwendet wurden. Aus der Graphik geht ebenso die Orientierung der Mutanten in der Sequenz hervor.

Tabelle 3.6: Restriktionsansatz zum Verdau von Plasmid-DNA

Reagenz	Volumen
Plasmid-DNA (50 ng/ μ L)	1 μ L
Restriktionsenzym	1 μ L
10 x Puffer	2 μ L
ddH ₂ O	15 μ L
Ansatz	20 μ L

3.2.5 Plasmidauftrennung, -aufreinigung und -Ligation

Im Anschluss an den Restriktionsverdau erfolgte die Auftrennung mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese. Dazu wurden 5 μ L oder der gesamte, verdaute Ansatz mit einem Puffer vermengt und in einem 1 %igen TAE-Agarosegel, welches mit RedSafe, einem DNA-Farbstoff, 1:80000 verdünnt war, für 120 min bei 80 Volt aufgetrennt. Nach der Auftrennung wurden einzelne Gel-Banden unter einer UV-Lampe ausgeschnitten und in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Die Aufreinigung erfolgte mit dem NucleoSpin[®] *Gel- and PCR Clean-up* Kit nach den Angaben des Herstellers. Die Elution wurde mit 20 μ L Elutionspuffer durchgeführt. Im Falle einer Umklonierung von Fragmenten aus einem Vektor x in einen Vektor y schloss sich eine Ligation mit der T4-DNA-Ligase nach dem Protokoll des Herstellers an.

Tabelle 3.7: Zusammensetzung der verwendeten Puffer

Lösung	Chemikalie	Menge
Tris-Acetat-EDTA Puffer (TAE)	Tris-Acetat	400 mM
	EDTA	10 mM

3.2.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung der PCR-Produkte bzw. der Plasmide erfolgte nach der Sanger-Methode (Sanger et al., 1977). Diese wurde von der Firma SourceBioScience durchgeführt. Zur vollständigen Überprüfung der Sequenzen wurden sowohl ein *forward*- als auch ein *reverse*-Primer verwendet (siehe Tabelle 2.7). Die erhaltene Sequenz wurde mit der Originalsequenz verglichen, um auf Richtigkeit zu kontrollieren. Eine weitere Sequenz-Überprüfung erfolgte online durch die Generierung eines Sequenzalignments mit BLAST[®] und durch die Visualisierung

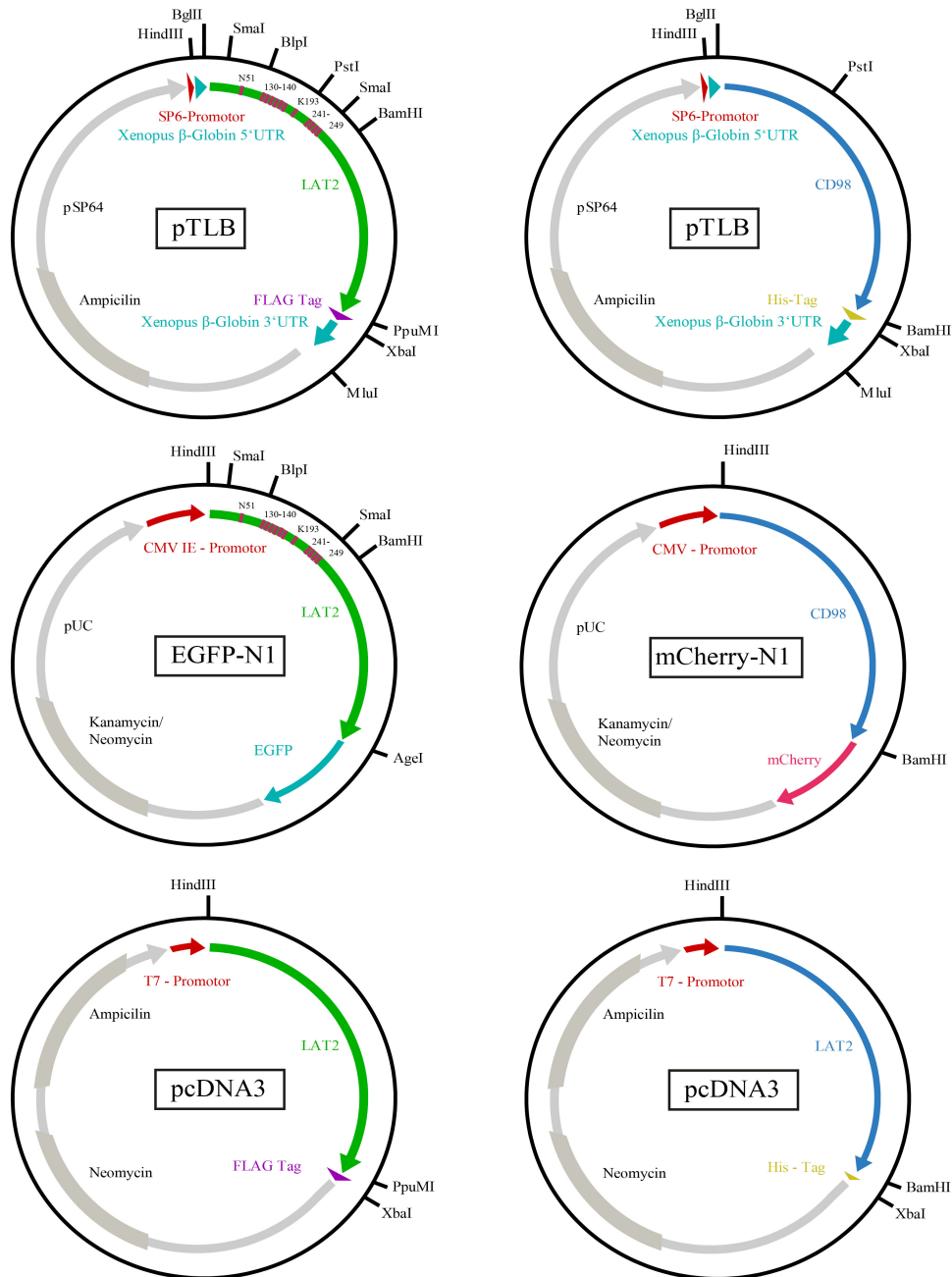


Abbildung 3.1: Vektor-Karte der Plasmide. Die Vektor-Karten skizzieren die sechs verwendeten Plasmide pTLB-LAT2-Flag, pTLB-CD98-His, pcDNA3-LAT2-His, pcDNA3-CD98-His, EGPF-LAT2-N1 und pmCherry-CD98-N1. Eingezeichnet sind zum einen die Positionen der Mutationen im LAT2-Vektor und zum anderen sind alle verwendeten Restriktionsstellen in der Karte aufgeführt.

der Ergebnisse mit Hilfe des Programmes *Clone Manager Professional Suite 8*.

3.2.7 cRNA-Synthese

Für die Expression der Proteine in Oozyten mussten die Plasmid verschlüsselten Genabschnitte in cRNA umgeschrieben werden. Die cRNA kann sehr schnell durch RNasen abgebaut werden. Deshalb war es wichtig, beim Arbeiten mit RNA einige Details zu beachten. Um Kontaminationen vorzubeugen, wurde stets mit sauberen Handschuhen gearbeitet. Zudem wurden alle Flächen sowie Arbeitsmaterialien mit einem Anti-RNase-Spray (RNaseAway) behandelt. Die verwendeten Verbrauchsmaterialien waren ausschließlich RNase und DNase-frei. Eine Voraussetzung für die *in vitro*-cRNA-Synthese war, das Plasmid am 3'-Ende des *Inserts* durch Restriktion mit der MluI-Endonuklease in der *MultipleCloningSite* zu linearisieren. Im Anschluss an die Restriktion (Ansatz wie in 3.2.4 und 3.2.5) erfolgte die DNA-Aufreinigung und die Konzentrationsbestimmung am NanoDrop, wie zuvor beschrieben. Die cRNA-Synthese erfolgte unter der Anwendung des mMESSAGE mMASCHINE[®] SP6 Ultra Kits. Es wurde entsprechend den Angaben des Herstellerprotokolls gearbeitet; jedoch wurde die Inkubationszeit auf 150 min verlängert. Die Menge und die Qualität der cRNA wurde im Photometer überprüft und auf eine äquivalente Konzentration von 1000 ng/ μ L für alle Konstrukte eingestellt. Zur Überprüfung der cRNA-Integrität wurde 1 μ l cRNA mit 4 μ l Probenpuffer vermengt und auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen. Nach Auftrennung für 20 min bei 100 Volt sollte eine klare Bande zu erkennen sein ohne Anzeichen von Degradation unterhalb der Bande. Die cRNA wurde aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.3 Mikrobiologisches Arbeiten

3.3.1 Anzucht von Bakterien in Lösung

Für die Herstellung einer Übernachtskultur (ÜNK) wurden 5 mL Medium mit einem Antibiotikum verwendet. Bakterien, transformiert mit dem pTLB-Vektor, wurden in TB-Medium kultiviert, da pTLB ein *low copy*-Plasmid ist und das TB-Medium eine bessere Wachstumsgrundlage als LB-Medium bietet. Die Wahl des Antibiotikums richtete sich nach dem jeweiligen Resistenzgen. Zum Animpfen einer Bakterienkultur wurden Pipettenspitzen verwendet, die entweder mit Bakterienmaterial direkt von der Agarplatte oder aus einer Glycerinkultur

versehen wurden. Die Kultur wurde anschließend ÜN bei 37 °C unter ständigem Schütteln inkubiert. Zum Erhalt einer hohen Proteinexpression wurden Flüssigkulturen von 200 mL Volumen angesetzt. Diese wurden in autoklavierten Kolben am Folgetag mit 100 µL der ÜNK angeimpft und bei gleichen Bedingungen ÜN inkubiert.

Tabelle 3.8: Zusammensetzung der Lösung für die Plasmidarbeiten

Lösung	Chemikalie	Menge
Antibiotika-Stammlösung		
	Ampicillin	100 mg/mL
	Kanamycin	30 mg/mL
LB-Medium (pH 7,5)		
	Peptone	10 g/L
	Hefeextrakt	5 g/L
	NaCl	5 g/L
	Ampicillin	100 µg/mL
	oder	
	Kanamycin	30 µg/mL
Kaliumphosphatpuffer (steril)		
	Kaliumhydrogen-phosphat	0,17 M
	Dikaliumhydrogen-phosphat	0,72 M
TB-Medium (pH 7,5)		
	Tryptone	12 g/L
	Hefeextrakt	24 g/L
	Glycerol	4 mL/L
	destilliertes Wasser	100 mL/L
	Kaliumphosphatpuffer	100 mL/L
	Ampicillin	100 µg/mL
	oder	
	Kanamycin	30 µg/mL

3.3.2 Anzucht von Bakterien auf Agarplatten

Mit Agar versetztes LB-Medium wurde vor Gebrauch in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlung auf etwa 42 °C wurde dem Medium je nach Resistenz ein Antibiotikum zugesetzt und danach auf sterile Petrischalen verteilt (Zusammensetzung siehe 3.10). Zur Kultivierung von kompetenten Bakterien wurden 20 µL einer bereits transformierten DNA und 1000 µL einer neu transformierten DNA auf den Platten mit einem sterilen Drygalski-Spatel gleichmäßig verteilt und ÜN bei 37 °C im Brutschrank kultiviert.

Tabelle 3.9: Zusammensetzung der Lösung für die Plasmidarbeiten

Lösung	Chemikalie	Menge
LB-Agarplatten (pH 7,5)	in LB-Medium	in 350 mL
	Agar	5 g
	Ampicillin	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$
	Kanamycin	30 $\mu\text{g}/\text{mL}$

3.3.3 Herstellung von Glycerinkulturen

Die Herstellung von Glycerinkulturen diente der Aufbewahrung und längeren Erhaltung von einzelnen Bakterienkolonien. Hierzu wurden 600 μL einer ÜNK mit 300 μL sterilem Glycerin vermischt und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren.

3.3.4 Präparation von chemisch kompetenten Bakterien

Eine Flüssigkultur von 100-200 mL wurde mit dem Bakterienstamm *E. coli* DH5 α angeimpft und bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ ÜN inkubiert. Am Folgetag wurde in einem 2 L Kolben 200 mL LB-Medium mit der Vorkultur angeimpft und bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ bis zum Erreichen einer OD600 von 0,2 inkubiert. Die Inkubation wurde auf Eis gestoppt und die Kultur bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ und 4000x g für 10 min pelletiert.

Tabelle 3.10: Zusammensetzung der Lösung für die Plasmidarbeiten

Lösung	Chemikalie	Menge
CK-Puffer	CaCl ₂ 1 M	1 mL/10 mL
	Glycerol 30 %	5 mL/10 mL
	ddH ₂ O	4 mL/10 mL

Das Bakterienpellet wurde zweimal in eiskaltem 0,1 M CaCl₂ resuspendiert und erneut pelletiert. Schließlich wurde das Pellet in CK-Puffer aufgenommen, in sterile 0,5 mL Reaktionsgefäße aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die chemisch kompetenten Bakterien wurden schließlich bis zur weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

3.3.5 Amplifikation von Plasmid-DNA durch Transformation in *E. coli* Dh5 α

Eine Transformation bezeichnet die Aufnahme von Fremd-DNA in ein Bakterium. Dabei muss die entsprechende DNA in Ringform (Plasmid-DNA) vorliegen, damit sie vom Bakterium nicht abgebaut werden kann. Zusätzlich muss ein Replikationsursprung in der DNA vorliegen, der vom jeweiligen Bakterium erkannt werden kann. Außerdem wird zur Selektion der Plasmid-DNA ein Gen für Antibiotika-Resistenz benötigt. Zur Transformation wurden 50 μL chemisch kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 50 ng DNA oder 4 μL eines Ligations-Ansatzes vermennt. Dieser Ansatz wurde für 30-60 min auf Eis inkubiert, sodass ein Anlagern der DNA an die Zellen möglich war. Ein anschließender Hitzeschock bei 42 °C für 2 min führte zur kurzzeitigen Permeabilität der Lipiddoppelschicht und damit zur Aufnahme der Plasmid-DNA in die Bakterien. Das Inkubieren auf Eis für 5 min schloss die Poren wieder. Die transformierten Bakterien wurden mit 1 mL LB-Medium versetzt und für 60 min bei 37 °C geschüttelt. Schließlich wurde der Ansatz auf Selektionsplatten ausplattiert und ÜN im Brutschrank bei 37 °C kultiviert.

3.4 Proteinbiochemische Arbeiten

3.4.1 Isolierung des Gesamtproteins aus den Oozyten

Zwei Tage nach der Expression des Transporterproteins wurden 30-40 Zellen in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und zunächst mit ND96 zweimal gespült. Anschließend wurde 8 μL Homogenisationspuffer pro Oozyte (Tabelle 3.15) hinzugegeben. Es wurde stets auf Eis gearbeitet, sodass die Proteine vor dem Abbau durch Proteasen geschützt waren. Zum Lysieren der Zellen und zum Aufschluss der Zellmembran wurde eine mechanische Methode gewählt. Mit einer Pipette wurden die Oozyten im Puffer homogenisiert und die Zellwand mit Ultraschall aufgeschlossen. Anschließend wurden die Zelltrümmer in einem Zentrifugationsschritt (10000x g, 20 min, 4°C) als Pellet vom Überstand, in dem das Gesamtprotein vorhanden war, abgetrennt. Die Proben wurden mit 2 μL /Oozyte eines 6x Probenpuffers (Tabelle 3.15) vermennt und bei 65 °C für 20 min inkubiert. Bis zur weiteren Analyse wurden die Proben bei -20 °C eingefroren.

Tabelle 3.11: Zusammensetzung der Lösung für Western Blots

Lösung	Chemikalie	Menge
Homogenisationspuffer (pH 7,4)		
	Saccharose	250 mM
	HEPES	20 mM
	EDTA	1 mM
	DTT	1 mM
Probenpuffer (6x)		
	Tris-HCl (pH 6.8)	352 mM
	Glycerol	3,3 %
	SDS	10 %
	DTT	603 mM
	Bromphenolblau	1 mg

3.4.2 Auftrennung von Proteinen durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Der Nachweis der spezifischen Proteine, LAT2 und CD98, wurde mittels Western-Blot-Analyse erbracht. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte aufgrund des unterschiedlichen Molekulargewichts der einzelnen Proteinkomponenten. Dazu wurden die Proteinproben zu Beginn mit dem Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) in Gegenwart von Dithiothreitol (DTT) als Reduktionsmittel denaturiert. Das SDS führt zur vollständigen Entfaltung des Proteins, um die Auftrennung der Polypeptidketten zu ermöglichen. Die Zusammensetzung der SDS-Gele, erfolgte wie in Tabelle 3.15 aufgeführt. Zunächst wurde das Trenngel zu 3/4 in die Kammer gegossen und sofort mit bidestilliertes Wasser (ddH₂O) überschichtet. Nach erfolgreicher Polymerisation wurde die Wasserschicht entfernt, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und ein Kamm mit 12 Zähnen in das noch nicht polymerisierte Sammelgel gesteckt.

Tabelle 3.12: Zusammensetzung der Lösung für Western Blots

Lösung	Chemikalie	Menge
Trenngel (x4)		
	Bis-Acrylamid	7,5 mL
	Tris-HCL (pH 8,8; 0,75 M)	11,25 mL
	SDS 20%ig	113 mL
	Wasser	3,5 mL
	TEMED	11,3 μ L
	Ammoniumpersulfat (APS)	158 μ L

Tabelle 3.12: Zusammensetzung der Lösung für Western Blots

Lösung	Chemikalie	Menge
Sammelgel (x4)		
	Bis-Acrylamid	1670 μL
	Tris-HCL (pH 6,8; 0,625 M)	1250 μL
	SDS 20%ig	50 μL
	Wasser	7 mL
	TEMED	10 μL
	APS	50 μL

Elektrophorese

Die Proteinproben wurden auf Eis aufgetaut. Währenddessen wurden die Gele in die Elektrophoresekammer eingespannt und mit Laufpuffer befüllt. Die Taschen wurden mit je 16 μL Probe beladen, wobei hier ein äquivalentes Proteinvolumen von je 2 Oozyten vorlag. Der Proteinstandard wurde zur Größenbestimmung der Banden aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Stromstärke von 30 mA für etwa 15 min im Sammelgel. Zur anschließenden Auftrennung im Trenngel wurde der Stromfluss für weitere 120 min auf 70 mA erhöht. Das Gel wurde schließlich kurz nach dem Austritt der Bromphenolblau-Lauffront gestoppt.

Tabelle 3.13: Zusammensetzung der Lösung für die Elektrophorese

Lösung	Chemikalie	Menge
Laufpuffer		
	Glycin	192 mM
	Tris-Base	25 mM
	SDS	0,1 %

Elektrotransfer mit Hilfe der *Tank Blot*-Methode

Im Anschluss an die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF) transferiert. Als Elektrotransfer wurde das *Tank Blot*-System verwendet. Die PVDF-Membran wurde 5 min in Blot-Puffer aktiviert und äquilibriert. Ein *Transfer-Sandwich* war aus folgenden Bestandteilen in einem Blot-Puffer-Bad zusammengesetzt: Anoden-Seite; Faser-*Pad*, dickes Filterpapier, PVDF-Membran, SDS-Gel, dickes Filterpapier, Faser-*Pad*; Kathoden-Seite. Dabei war es wichtig, mögliche Luftblasen

zwischen Membran und Gel zu beseitigen. Die Blot-Apparatur wurde mit eiskaltem Blot-Puffer befüllt und eine Kühleinheit zusätzlich hinzugelegt. Der Transfer erfolgte schließlich bei einer konstanten Stromstärke von 100 mA für 60 min.

Tabelle 3.14: Zusammensetzung der Lösung für die *Tank* Blot-Methode

Lösung	Chemikalie	Menge
Blot-Puffer	Glycin	192 mM
	Tris-Base	25 mM
	Methanol(frisch)	20 %

Spezifische Antikörperbindung und Detektion der LAT2-exprimierenden Zelllinien

Die Effizienz des Transfers wurde durch die Ponceau-Färbung der Proteine auf der PVDF-Membran visualisiert. Dadurch wurde außerdem eine quantitative Proteinbestimmung der unterschiedlich aufgetragenen Proben ermöglicht. Es folgten die immunologischen Analysen der PVDF-Membran. Sie wurde 60 min bei RT im Tris-Puffer-Tween (TBST) mit 3 % Magermilchpulver inkubiert, um freie Proteinbindungsstellen abzusättigen. Im Anschluss wurde die Membran mit dem primären AK unter ständigem Rotieren in einem 50 mL Reaktionsgefäß im Kühlraum inkubiert. Die verwendeten Verdünnungen der jeweiligen AK sind im Materialabschnitt 2.2.4 beschrieben. Zur Entfernung von nicht gebundenen AK wurde die Membran dreimal für fünf min mit TBST-Puffer gewaschen. Danach folgte die Inkubation des zweiten AKs bei RT für 60 min: Dieser war an Peroxidase gekoppelt, sodass ein Substratumsatz ermöglicht wurde. Im Anschluss an drei Waschschriffe wie oben beschrieben - wurde die Membran bis zur Analyse in Tris-Puffer (TBS) gelegt. Für die Western Blot-Analyse wurde das ECL-System verwendet. Dazu wurden äquivalente Volumina des Peroxidasesubstrats Luminol und des Co-Substrates H_2O_2 vermischt und unter Lichtausschluss auf die Membran gegeben (ca. 1 min). Die Membran wurde feucht in eine Klarsichtfolie gegeben und von der enzymatischen Umsetzung der Substrate wurden zu verschiedenen Expositionszeiten zunehmender Dauer am Lumineszenz-Gerät Bilder aufgenommen. Je nach Intensität waren Expositionszeiten von wenigen Sekunden bis zu einigen Minuten notwendig.

Tabelle 3.15: Zusammensetzung der Lösung für die Antikörperfärbung

Lösung	Chemikalie	Menge
TBS(T)-Puffer (pH 7,4)	Tris-Base	50 mM
	NaCl	150 mM
	TWEEN-20	0,1 %

Semiquantitative Auswertung der Immunfärbung

Die digital festgehaltenen Bilder der zuvor analysierten PVDF-Membran wurden mit Hilfe der Software ImageJ ausgewertet. Die jeweilige Signaldichte der angefärbten Areal wurde ermittelt. Die positiven Kontrollen mit GAPDH erfolgten jeweils zum Abgleich der Proteinbeladung und um den Vergleich verwendeter Gele durchführen zu können. Die Signaldichte (Bandenfläche) des LAT2-WTs wurde als relativer Bewertungsmaßstab bezüglich der Proteinexpression der Signaldichte der Mutanten verwendet.

3.5 Durchflusszytometrische Messungen zur Untersuchung der Proteinexpression

Um die Expression durchflusszytometrisch zu untersuchen, wurden die Fluoreszenz-markierten Proteine LAT2-GFP und CD98-mCherry verwendet. Für die Versuche wurden 4×10^5 Hek293-Zellen ausgesät und am Folgetag transient transfiziert (vgl. Abschnitt 3.1.1). Zwei Tage nach LAT2-GFP und CD98-mCherry Transfektion wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgespült und bei 4 °C durch sanftes Mischen mit PBS und 5 mM EDTA gewaschen. Nach dem dritten Waschschrift waren die Zellen bereit zur Messung der Fluoreszenz am BD LSRFortessa™ Zellanalysator. Die Daten wurden mit FCS Express 4 (De Novo Software) und Microsoft Excel analysiert. Ausgehend vom spezifischen Bereich (*Gate*) im FSC/SSC-Punkt-Diagramm wurden 20000 Zellen ausgewertet. Die GFP-Intensität wurde mit einem 488 nm Laser angeregt und innerhalb eines Bandpasses von 530/30 detektiert. Die mCherry-Intensität wurde durch Anregung mit einem 561 nm Laser erkannt und mit einem 610/20 Bandpassfilter detektiert. Die mittlere GFP- und mCherry-Expression von LAT2 oder Mutanten und CD98 wurde als quantitative Maß für die Gesamtproteinexpression von LAT2 (oder Mutanten) und CD98 berechnet.

3.6 Konfokale *Laser-Scanning-Mikroskopie* (LSM) von Hek293-Zellen

Für den mikroskopischen Bereich ermöglicht die Technik der konfokalen LSM die Darstellung von Proteinen. Hiermit eröffnen sich Visualisierungsoptionen gegenüber den anderen protein-biochemischen Methoden. Bei der konfokalen LSM tritt das Laserlicht durch eine Loch-Blende. Mittels elektronischer Steuerung kann der Strahl das Objekt zeilenweise scannen. Reflektiertes Licht trifft wieder auf den Rasterspiegel und erreicht nach einer zweiten Loch-Blende einen Detektor. Diese so entstandene Punkt-zu-Punkt-Abbildung wird im Rechner durch Korrelation des mechanischen Rastervorganges mit den Lichtintensitäten erzeugt. In der vorliegenden Arbeit wurde das LSM 510 META - ConfoCor2 verwendet, um die zelluläre Lokalisation der GFP- und mCherry- Fusionsproteine zu untersuchen. Als Anregungslichtquellen standen am Mikroskop folgende Laser zur Verfügung: Argonionen-Laser (364 nm) und Argon-Laser (458 nm, 488 nm, 514 nm). Die Aufnahmen erfolgten mit dem Objektiv Plan-Apochromat 63 /1.40 Oil DIC.

3.6.1 Kolokalisationsstudien mit LAT2-exprimierenden Hek293-Zellen

Zur zellulären Lokalisation von Proteinen wurden Kolokalisationsstudien mit koexprimierten, Fluoreszenz-markierten Proteinen (LAT2-GFP, CD98-mCherry) durchgeführt. Für die Anfärbung der Plasmamembran wurde ein spezifischer Fluoreszenzfarbstoff (Trypanblau) verwendet, der als Komplex mit Membranproteinen fluoresziert, aber nicht in intakte Zellen eindringt. Hek293-Zellen wurden auf Deckgläsern in 35 mm-Schalen ausgesät und, wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben, transient transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Deckgläser in einer Küvette befestigt und 37 °C warmes PBS hinzugegeben. Je nach Erfordernis wurden einige Tropfen Trypanblaulösung (Endkonzentration 0,05 % (w/v)) dazugegeben. LSM-Aufnahmen stellen die GFP-Fluoreszenz grün und die Trypanblau-Fluoreszenz oder mCherry-Fluoreszenz rot dar. Bei Überlagerung der LSM-Aufnahmen beider Kanäle wurde die Kolokalisation der Fluoreszenz durch eine Gelbfärbung visualisiert.

3.6.2 Proteinexpressionsanalyse auf der Plasmamembran

Die semiquantitative Auswertung der Proteinexpression auf der Plasmamembran erfolgte mithilfe der Software ZEN 2010. Zur Auswertung wurden 60 bis 100 Zellen verwendet und für

jede Zelle je ein repräsentativer Bereich für die jeweilige Fluoreszenz im Zytosol sowie in der Membran ausgewählt. Die Trypanblau-Fluoreszenz diente lediglich zur Orientierung bei LAT2-GFP-exprimierenden Zellen. Des Weiteren wurden für die ausgewählten Bereiche die mittleren Fluoreszenzintensitäten ermittelt. Zusätzlich wurde in jeder Aufnahme die Hintergrund-Fluoreszenz in einem Bereich ohne erkennbare Fluoreszenz bestimmt und als Hintergrundrauschen von den ermittelten Fluoreszenzwerten subtrahiert. Zum Schluss folgte die Berechnung des Membran-Anteils gegenüber dem Gesamt-Fluoreszenz-Anteil.

3.7 Transportmessungen von radioaktiv markierten Substraten

Zur Charakterisierung der Aufnahme und Abgabe von Substraten über Transportproteine wurden Transportversuche an *Xenopus laevis* Oozyten aus der Gattung der Krallenfrösche und an der adhären wachsenden Hek293-Zelllinie durchgeführt. LAT2 und alle LAT2-Varianten, die oben beschrieben wurden, sollten auf ihre Transportrate hin untersucht werden. Die dabei verwendete Messlösung bestand zu einem kleinen, errechneten Anteil aus radioaktiv markierter Substanz, wobei die erwünschte Konzentration durch Zugabe von unmarkierter Substanz erreicht wurde.

3.7.1 Bestimmung der Substrataufnahme bei Hek293-Zellen

Bevor die Messungen an LAT2-überexprimierenden Hek293-Zellen durchgeführt werden konnten, wurden diese zweimal mit PBS gewaschen, um Substrate aus dem Kulturmedium, wie u.a. AS, zu entfernen. Das PBS wurde abgesaugt und die Aufnahmemessung durch Gabe von 600 μL Transportpuffer gestartet. Der Transportpuffer war mit 100 nM unmarkiertem und 0,1 nM radioaktiv markiertem 3,3'-T₂ supplementiert. Die Aufnahme erfolgte für 60 min bei RT. Anschließend wurde der Transport durch Absaugen des radioaktiven Transportpuffers und durch mehrmaliges Spülen mit eiskaltem Waschlösung gestoppt. Die Lyse der Zellen wurde durch die Zugabe von 1 mL einer 0,1 N NaOH-Lösung hervorgerufen. Anschließend wurde die Suspension in Messröhrchen überführt und zuletzt die Radioaktivität der aufgenommenen Substrate am γ -Counter aufgezeichnet.

Tabelle 3.16: Zusammensetzung der Lösung für die Substrataufnahme bei Hek293-Zellen

Lösung	Chemikalie	Menge
Waschpuffer (pH 7,4) Hek293		
	NaCl	125 mM oder
	ChCl	125 mM
	KCl	5 mM
	CaCl ₂ (Dihydrat)	1,3 mM
	MgCl ₂ (Hexahydrat)	1,2 mM
	HEPES	25 mM
	D-Glucose	5,6 mM
Transportpuffer (pH 7,4) Hek293		
	Waschpuffer mit radioaktives SDH-Substrat	0,1 nM oder
	radioaktives AA-Substrat	10 nM
	äquivalentes nicht-radioaktives Substrat	100 nM - 1mM

3.7.2 Bestimmung der Substrataufnahme bei Oozyten

Zur Aufnahmemessung wurden 10-15 optisch vitale Oozyten verwendet. Diese wurden in einer Kavität platziert und mit Waschpuffer gespült. Der Transportpuffer wurde mit dem zu testenden Substrat angesetzt, jedoch war zu berücksichtigen, dass die Endkonzentration von DMSO im Transportpuffer 0,2 % nicht überschreiten darf. Die Oozyten wurden in 600 μ L Transportpuffer für 60 min bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden sie gewaschen: Dazu wurden sie vorsichtig in eine Kavität mit eiskaltem Waschpuffer überführt. Dieser Waschvorgang erfolgte weitere sechs Male auf Eis. Schließlich wurden die Oozyten zur Messung einzeln in Messröhrchen überführt und die Radioaktivität des aufgenommenen Substrats im γ -Counter aufgezeichnet. Die gemessenen Werte der Radioaktivität der nicht-injizierten Zellen wurden stets als Hintergrund von den Werten der injizierten Oozyten abgezogen.

Tabelle 3.17: Zusammensetzung der Lösung für das Arbeiten mit Oozyten

Lösung	Chemikalie	Menge
Waschpuffer (pH 7,5)		
Standard	ChCl	100 mM oder
	NaCl	100 mM

Tabelle 3.17: Zusammensetzung der Lösung für das Arbeiten mit Oozyten

Lösung	Chemikalie	Menge
	KCl	2 mM
	CaCl ₂ (Dihydrat)	1 mM
	MgCl ₂ (Hexahydrat)	1 mM
	HEPES	10 mM
	Tris	10 mM
Transportpuffer (pH 7,5) Oozyten		
	Waschpuffer mit radioaktives SDH-Substrat	0,1 nM oder
	radioaktives AA-Substrat	10 nM
	äquivalentes nicht-radioaktives Substrat	100 nM - 1mM

3.7.3 Zeitabhängige Aufnahmestudien

Die zeitabhängigen Substratbestimmungen wurden nur bei nicht-injizierten und LAT2-WT injizierten Oozyten durchgeführt. Die Aufnahme erfolgte in einem Zeitraum von 1 min bis 120 min bei RT. Darüberhinaus glich die Versuchsdurchführung der oben beschriebenen. Die Methode diente der Ermittlung der basalen Substrataufnahme gegenüber den überexprimierenden Zellen, um einen optimalen Aufnahmezeitpunkt festzulegen. Hierzu wurde schließlich die Relation zwischen den WT-injizierten und den nicht-injizierten Oozyten berechnet. Der Zeitpunkt mit der größten Relation wurde schließlich für die weitere konzentrationsabhängige Substratmessung verwendet.

3.7.4 Konzentrationsabhängige Aufnahmestudien

Sobald LAT2-Varianten erhöhte 3,3'-T₂-Aufnahmeraten nach 60 min zeigten, wurden Aufnahmemessungen bei unterschiedlichen Konzentrationen für diese Varianten durchgeführt. Die konzentrationsabhängige Messung zu einem Zeitpunkt charakterisierte die Affinität eines Substrats zum Transporter und die Transportaktivität. Diese folgt der Michaelis-Menten-Kinetik, wobei die Konstanten Michaelis-Menten-Konstante (K_m) und die Maximalgeschwindigkeit einer Reaktion (V_{max}) Maße zur genauen Transportbestimmung sind. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie oben beschrieben; die einzige Abweichung war die Zusammensetzung des Transportpuffers (Tabelle 3.18), in dem die Oozyten für 60 min inkubiert wurden.

Tabelle 3.18: Verdünnungsreihe des Transportpuffers zur konzentrationsabhängigen Transportmessung

SHD μM	Faktor	V_{Ges} μL	$V_{\text{SDH}(40 \mu\text{M})}$ μL	V_{Puffer} μL
40	-	11.500	4000	-
30	1,33	4.000	3.007	992
20	2	4.000	2.000	2000
10	4	4.000	1.000	3000
5	8	4.000	500	3.500
1	40	4.000	100	3.900

3.7.5 Aufnahmemessungen durch kompetitive Inhibition

Unmarkierte Substanzen können über das Vorliegen der Fähigkeit zur kompetitiven Inhibition des 3,3'-T₂-Transports charakterisiert werden. Dies ermöglichte uns die Untersuchung vieler unterschiedlicher Substratvarianten. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie oben beschrieben. Oozyten wurden bei RT für 60 min mit 3,3'-T₂ inkubiert. Außerdem wurden dem Transportpuffer die Testsubstanzen dazugegeben. Dafür wurden SDH oder SDH-ähnliche Substanzen mit einer Stammkonzentration von 10 mM oder 40 mM in DMSO gelöst. Testsubstanzen mit hydrophoben Eigenschaften wurden direkt im Transportpuffer gelöst und wiesen eine Endkonzentration von 1 mM auf.

Selektion von Testsubstanzen

Die Suche nach geeigneten Testsubstanzen erfolgte mit Hilfe unserer eigenen FMP *in-house* Datenbank (DACS, <http://www.open-dacs.de/index.jsp>). Sie umfasst 9,1 Millionen Substanzen, die bei 39 Anbietern kommerziell erhältlich sind. Die Suche nach geeigneten Testsubstanzen erfolgte auf Grundlage von vorhandenen Substrukturen und von Substanzen, deren Transport über LAT2 bekannt war. Substanzen, die in die Struktursuche eingebunden wurden, waren das Gesamtspektrum der AS, alle Schilddrüsenhormone und ihre Derivate, sowie das Gerüst von BCH, dem LAT-spezifischen Inhibitor. Aus der Suche nach Substrukturen resultierten 512 ähnliche Substanzen. Aus dieser Bibliothek wurden die 14 vielversprechendsten Derivate manuell ausgewählt und beim jeweiligen Unternehmen bestellt.

3.7.6 Etablierung einer Abgabemessung

Für die Etablierung einer Abgabestudie untersuchten wir verschiedene Bedingungen (Zeit, Konzentration, Transstimulation) hinsichtlich der Charakteristik eines Antiporters. Dazu wurden die Oozyten, wie oben beschrieben, für 60 min mit einem radioaktiv markierten Substrat inkubiert. Ziel dieser Prä-Inkubation war es, die Oozyten zunächst mit dem Substrat zu beladen, um überhaupt einen potentiellen Efflux messen zu können. Anschließend wurden die Oozyten sechsmal auf Eis mit Puffer gewaschen und danach in ein Messgefäß überführt. Dieses enthielt entweder nur Waschpuffer oder Waschpuffer supplementiert mit AS bzw. SDH für die Trans-Stimulation. Der Puffer wurde abgenommen und in ein Messröhrchen gegeben. Die initialen Effluxraten wurden zwischen 1 min und 30 min Inkubationsdauer aufgenommen.

3.7.7 Bestimmung der Substratabgabe bei Oozyten

Der 60-minütigen Prä-Inkubation schlossen sich weitere 60 min Inkubationszeit im Effluxpuffer bei RT an. Die Radioaktivität von 10-15 Oozyten wurde nach der Substrataufnahme unmittelbar im Anschluss an den Waschvorgang gemessen. Des Weiteren wurden 10-15 Oozyten in den Effluxpuffer überführt. Dabei wurden die drei LAT2-Varianten betrachtet, die zuvor eine erhöhte Aufnahme von 3,3'-T₂ zeigten. Die Effluxdaten der LAT2-Varianten wurden im Vergleich zum WT gesetzt. Damit die Aufnahme im Verhältnis zur Abgabe stand, musste zuvor für jedes Konstrukt die Relation zwischen Aufnahme und Abgabe ermittelt werden.

3.7.8 Präparation zur Flüssigszintillationsmessung

Die Transportmessung der Tritium-markierten AS erfolgte durch die Messung der β -Strahlung in homogener Phase. Dazu wurden die Oozyten nach dem mehrmaligen Waschen einzeln in ein Szintillationsgefäß überführt und für 60 min mit 200 μ L 0,1 N NaOH lysiert. Anschließend wurden 4 mL organische Szintillatoren hinzugegeben und die Probe gut geschüttelt, sodass die Phasen gut vermischt wurden. Die aufgenommene Radioaktivität wurde im Flüssigszintillationszähler detektiert.

3.8 Statistische Auswertungen

Bei den Transportmessungen mit radioaktiv markierten Substraten wurden die Mittelwerte sowie die mittleren Standardabweichungen (SEM) oder der Standardfehler (SD) von mindestens zwei voneinander unabhängigen Versuchen ermittelt. In einer Excel-Tabelle wurden die Ergebnisse aus den Aufnahme- oder Abgabemessungen berechnet um die Substrataufnahme bzw. -abgabe pro Zeiteinheit in pmol Substrat/Oozyte/min zu errechnen. Die graphische Darstellung und statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mit dem Programm GraphPad Prism 4 durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM oder SD dargestellt. Bei unabhängigen Stichproben wurde ein ungepaarter t-Test verwendet, bei Mehrfachvergleichen ein One-way ANOVA mit einem Bonferroni's *Multiple Comparison* Test angewandt und damit auf Signifikanz der Mittelwerte zwischen den getesteten Gruppen überprüft. Die Konstanten K_m und V_{max} wurden nach der Michaelis-Menten-Gleichung

$$[y = V_{max}[S]/(K_m + [S])] \quad (3.1)$$

mit der selben Software bestimmt und dargestellt.

3.9 Bioinformatische Arbeiten

3.9.1 Modellierung von Proteinstrukturen

In allen Bereichen der Lebenswissenschaften steigt das Interesse nach Proteinstrukturen. Diese Tatsache unterstreicht die Bedeutung der Bestimmung und Vorhersage von dreidimensionalen Proteinstrukturen. Neben der Vielfalt an experimentellen Untersuchungsmethoden spielt die Modellierung von Proteinstrukturen eine wichtige Rolle zum Erstellen von neuen Proteinen und Liganden. Der allgemeine Ablauf zur Protein-Modellierung ist im Diagramm 3.2 dargestellt. Die sich am meisten bewährte Methode zur Generierung von neuen Proteinstrukturen ist die Kombination der Nutzung von verschiedenen Algorithmen sowie der manuellen Intervention und Erfahrung aus Datenbanken von homologen Proteinen, wie z.B. die Datennutzung von Mutationen oder anderen experimentellen Ergebnissen.

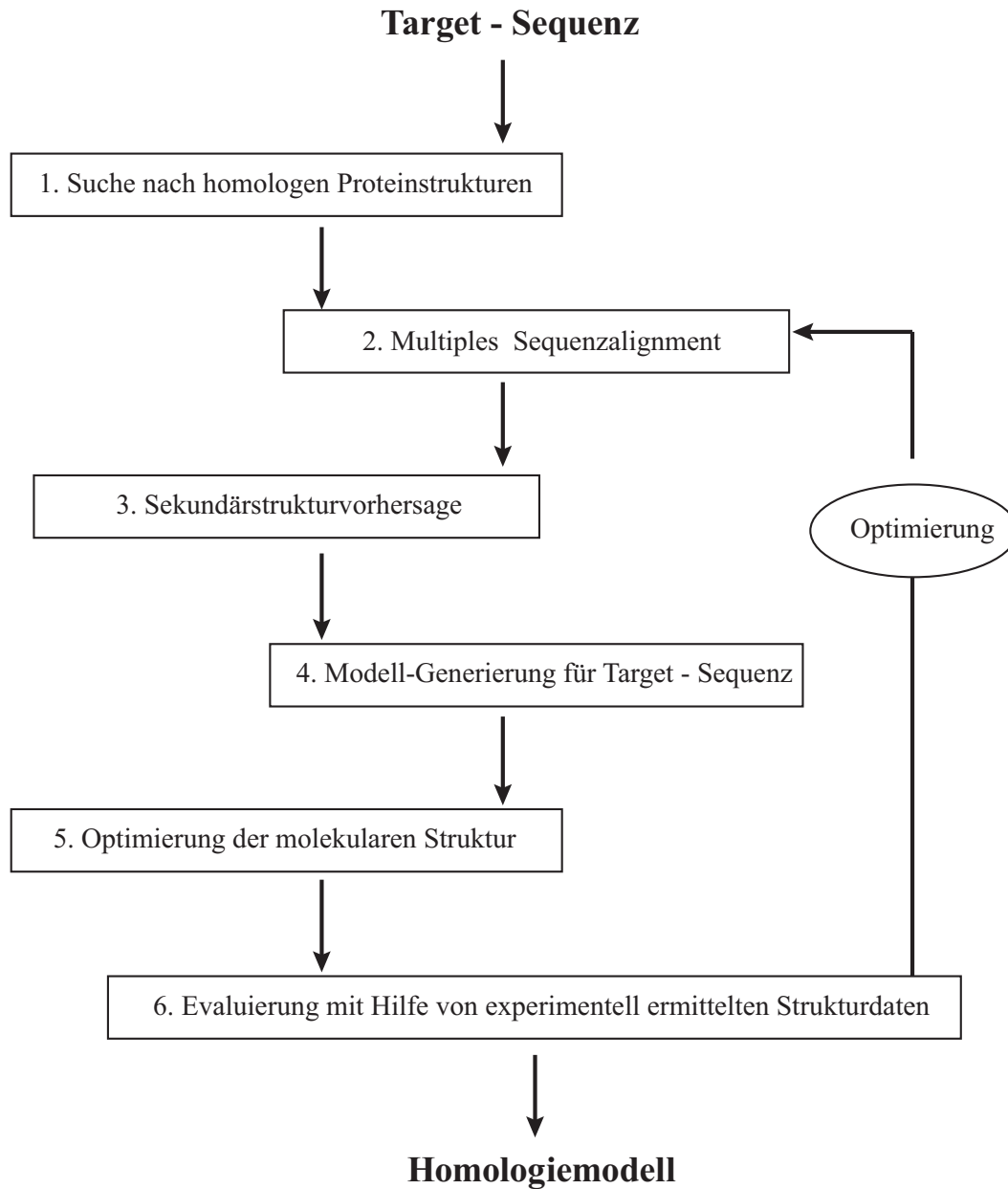


Abbildung 3.2: Allgemeines Fließschema zur Generierung von dreidimensionalen Proteinstrukturen. Zuerst erfolgt ein Sequenzabgleich, um homologe Proteinsequenzen zu identifizieren. Das Alignment wird mit der ausgewählten Template-Sequenz und der Target-Sequenz erstellt. Die Vorhersage der Sekundärstrukturelemente, die in der Zielsequenz auftreten können, wurden bestimmt. Es folgte die Modellgenerierung mit den ermittelten Strukturdaten. Die Überprüfung der Loop-Bereiche erfolgte durch manuelle Überarbeitung und schließlich eine Energieminimierung. Zur Evaluierung wurden Mutationen generiert und experimentell untersucht, sodass eine Orientierung der Residuen ermöglicht war.

3.9.2 Suche nach homologen Proteinen

Zunächst erfolgte eine FASTA-Suche nach geeigneten homologen Proteinstrukturen in der Protein-Datenbank (RCSB) (PDB) (www.rcsb.org). Sind Proteine homolog, haben sie sich evolutionär angepasst, entspringen jedoch gemeinsamer Vorfahren. So sind Proteine, die einer Familie zugeordnet werden, sehr Sequenz-ähnlich und korrelieren auch in ihrer räumlichen Anordnung, wobei die Proteine nicht unbedingt die gleichen Funktionen besitzen müssen. Die Suche nach homologen Proteinen, welche als Templates verwendet werden konnten, erbrachte 12 Resultate. Es wurden zwei Strukturen ausgewählt, nach denen die Sequenzhomologie im Detail analysiert wurde. Zum einen der Arginin-Agmatin Transporter (AdiC, PDB: 3L1L), welcher den Liganden Arginin in der Bindungstasche aufweist, und zum anderen ein Mitglied der APC-Superfamilie (ApcT, PDB: 3GI8). Sie sind beide Kristallstrukturen mit einer Auflösung von mindesten 3 Å und besitzen eine Identität von etwa 15 % und eine Ähnlichkeit von ungefähr 30 % zur Sequenz von LAT2. AdiC, ApcT sowie LAT2 sind alle Mitglieder der APC-Superfamilie. Sie besitzen eine 12-TMH-Struktur mit einem besonderen Loop (wieder eintauchendes Muster zwischen der TMH2 und 3). Zudem ist die Superfamilie für eine sich wiederholende 5+5 inverse Faltung der TMHs bekannt.

3.9.3 Sekundärstruktur- und Topologie-Vorhersage

Das Ziel war, aus einer LAT2-Sequenz eine Sekundärstruktur für die noch unbekannt Proteinstruktur zu berechnen, um eine genauere Klassifizierung durchzuführen. Um die Sekundärstruktur eines Proteins bestimmen zu können, muss zunächst seine Primärstruktur bekannt sein; jedoch kann nicht unmittelbar aus der Aminosäuresequenz auf die Sekundärstruktur geschlossen werden. Es existieren viele Methoden, um relativ gute Vorhersagen für Sekundärstrukturen zu erhalten. Eine der ersten publizierten Methoden, berechnete die Wahrscheinlichkeit für das Vorkommen einzelner AS in einer Sekundärstruktur auf der Basis von bekannten Kristallstrukturen (Chou and Fasman, 1978). Eine weitere geläufige Methode zur Vorhersage der Sekundärstruktur sind Neuronale Netze (z.B. PSIPRED). Sie umfassen eine Vielzahl von Einheiten, die die Fähigkeiten besitzen, eine Aufgabe, die Klassifikation, selbstständig aus Trainingsbeispielen zu erlernen. Diese Methode verbessert die Güte der Vorhersage (Jones, 1999). Zur Bestimmung der Helix-Grenzen wurden Skalen der Hydrophobizität verwendet. Die Methode basiert u.a. auf dem *Hidden-Markov-Modell*: Hier werden stetig neue Trainingsdaten aus Kristallstrukturen ermittelt, um die Topologie der TMHs besser vorhersagen zu

können. Eine optimale Methode der Wahl gibt es jedoch nicht. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Sekundärstruktur-Vorhersage-Methoden angewendet.

3.9.4 Multiples Sequenzalignment

Zur Erstellung eines multiplen Sequenzalignments wurden alle bekannten Sequenzen unterschiedlicher Spezies der Proteinfamilien SLC7 (SLC7A6 (LAT1), SLC7A8 (LAT2) und SLC7A11 (xCT)) verwendet. Im ersten Schritt wurde unter Verwendung der Software BioEdit ein automatisches Alignment mit dem Algorithmus von ClustalW erzeugt (Thompson et al., 1994). Auf der Basis einer etwa 30 %igen Sequenzähnlichkeit wurde die evidenzbasierte Substitutionsmatrix BLOSUM62 für den Vergleich und zur Erstellung des Alignments benutzt (Henikoff and Henikoff, 1992). Ein Vorteil dieser Methode ist, dass eine große Menge von langen Sequenzen in kurzer Zeit super-positioniert werden. Zudem ist die Wahrscheinlichkeit des Erhalts eines optimalen multiplen Alignments hoch, wenn Sequenzen einer Proteinfamilie verglichen werden. Die Nachteile des multiplen Alignments sind Lücken in den TMHs (*Gaps*), die dadurch auch entstehen können. Es folgte anschließend eine manuelle Feinabstimmung, sodass entstandene Lücken aus den TMHs in die variablen Bereiche (Loops) transferiert wurden. Aus dem Alignment folgernd zeigt sich, dass TMHs 1-6 der AdiC-Struktur und die Sequenzen der TMHs 7-12 der ApcT-Struktur am Besten gleichen.

3.9.5 Molekulare Modellierung des Transmembranproteins LAT2

Das komparative LAT2-Modell wurde schließlich aus zwei Kristallstrukturen generiert. Die TMH-Konstruktion des chimären Modells erfolgte auf der Grundlage der AdiC- und der ApcT-Sequenz und ihrer dreidimensionalen Strukturen. Die Ergebnisse aus der Sekundärstruktur-Vorhersage wurden verwendet, um die Helix-Grenzen optimal anzuwenden. Das manuelle Verfeinern des molekularen Strukturmodells wurde mit Hilfe von Sequenzähnlichkeiten und dadurch markanten *finger-print features* in den TMHs durchgeführt. Die Struktur-Motive oder die TMHs wurden aus der extrazellulär offenen ApcT-Konformation in die Substratgebundene, verschlossene AdiC-Konformation transferiert. Dies hatte zur Folge, dass eine leichte Verschiebung der α -Helix für LAT2 hervorging. Die Helices 1-4 und 6-7 des Homologiemodells wurden aus dem AdiC-Template verwendet; dahingegen wurden die korrespondierenden Helices 5 und 8-12 aus der ApcT-Struktur übernommen. Hoch konservierte Residuen und *finger-print features* wie $^{53}\text{IxGSGxF}^{58}$ in der TMH1 und $^{243}\text{SFxG}^{246}$ in der TMH6 wiesen

stark darauf hin, dass die Substraterkennung in AdiC ähnlich derer in LAT2 funktionieren könnte. Daraus ergeben sich folgende Residuen, die je eine der 12 TMHs umgeben: THM1, Gly⁴⁰ - Leu⁶⁶, TMH2, Gly⁷² - Val⁹⁷, TMH3, Leu¹¹⁶ - Val¹⁴⁵, THM4, Ser¹⁵⁸ - Trp¹⁷³, TMH5, Arg¹⁸⁰ - Ile²⁰⁵, TMH6, Gly²³¹ - Val²⁵³, THM7, Lys²⁶² - Thr²⁸⁸, TMH8, Leu³¹⁰ - Ala³⁴⁴, TMH9, Pro³⁶³ - Val³⁷⁹, THM10, Met³⁸³ - Leu⁴⁰⁸, TMH11, Ser⁴²² - Trp⁴⁴², TMH12, Gly⁴⁵¹ - His⁴⁷⁰.

Das Generieren des Modells und der variablen Loop-Bereiche erfolgte mit Hilfe der Software Sybyl-X2. Zur Loop-Modellierung beinhaltet das Programm ein spezielles Protein-Loop *conformational search* Tool. Diese Methode basiert auf der *ab-initio*-Generierung, welche mit der Datenbank PRODAT verknüpft ist, die auf Loops aus Kristallstrukturen zurückgreift. Durch diese Technik wurde das Schließen der entstandenen Lücken ermöglicht, indem Residuen oder Loop-Strukturen eingefügt wurden. Seitenketten und Loop-Bereiche wurden nach der Mutation repariert und ihre Stellung zunächst manuell optimiert, damit die automatische Berechnung mit dem AMBER7 FF99 Kraftfeld und der Gasteiger-Marsili-Ladung durchgeführt werden konnte. Schließlich wurde eine Gradienten-Minimierung bis zum Erreichen einer terminalen Energie von 0.1 kcal/ (mol x Å) vorgenommen.

3.9.6 Docking-Analyse von Liganden

Ein Vorteil der AdiC-Kristallstruktur war, dass ein Ligand in der Bindungstasche mit kristallisiert wurde und damit die Substratorientierung für das Modell eindeutig war. Substanzen aus der Tabelle 2.2 wurden manuell in die putative LAT2-Bindungstasche eingepasst. Das Docking und die Optimierung erfolgten gleichermaßen mit der Software Sybyl-X2 und die Energieminimierung wurden mit dem AMBER7 FF99 Kraftfeld berechnet. Die Aspekte die hierbei betrachtet wurden sind der mögliche Liganden-Raum im Protein und seine potentiellen Wechselwirkungen. Es wurde zunächst eine hohe Flexibilität des Ligandens sowie des Proteins betrachtet, wodurch sich verschiedene Superpositionen ergaben. Durch die Bindungskenntnis des Arg-Ligandens in AdiC wurden definierte Atome gezwungen, miteinander über Wasserstoffbrückenbindungen zu interagieren. Die gefundenen Komplexe von Protein und Ligand wurden anhand von einer *Scoring*-Funktion bewertet und sortiert und zudem wurden diejenigen mit dem größten Zahlenwert schließlich ausgewählt und visualisiert.

4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde der membranständige L-Typ Aminosäuretransporter 2 (LAT2) untersucht. Seine Verantwortlichkeit für die Aufnahme und Abgabe von Schilddrüsenhormonen (SDH) in Zellen soll hier näher betrachtet werden. Vor Beginn dieser Arbeit wurde zuvor vermutet, aber nie eindeutig gezeigt, dass SDH oder ihre Derivate auch über den LAT2 transportiert werden können. Die Tatsache, dass weder die SDH-Spezifität noch die SDH-Transportfähigkeit für LAT2 bekannt waren, steigerte das Interesse, die Struktur-Funktionsbeziehungen von LAT2 aufzuklären. Es sollte mittels zielgerichteter, genetischer Variabilität herausgefunden werden, welche spezifischen Aminosäuren (AS) im LAT2 für den SDH-Transport essentiell sind. Mit Hilfe der Substratmodifikationen sollten darüberhinaus die molekularen Substrateigenschaften untersucht werden und daraus Schlussfolgerungen für den molekularen Mechanismus gezogen werden. Diese *in vitro*-Untersuchungen erfolgten zum einen mit klassischen AS, um die Auswirkungen der Transporter-Veränderungen auf den typischen Aminosäuretransport von LAT2 zu identifizieren; zum anderen stand die Aufklärung des Transports der SDH und ihrer Derivate sowohl über LAT2 als auch über unterschiedliche LAT2-Varianten im Fokus dieser Arbeit.

4.1 Die *in vitro* Charakterisierung des murinen LAT2

4.1.1 Aufnahmestudien mit L-[³H]-AS über LAT2 in Oozyten

Zur Etablierung eines Transportsystems wurden Aufnahmestudien angelehnt an die Veröffentlichung von Pineda (Pineda et al., 1999) mit AS in *Xenopus laevis* Oozyten reproduziert. Für den Aminosäuretransport konnte bereits 1999 gezeigt werden, dass der LAT2 (als leichte Kette bezeichnet) nur in Anwesenheit des Eskortproteins CD98 (als schwere Kette bezeichnet) in die Plasmamembran integriert wird (Ritchie et al., 1999; Nakamura et al., 1999). Wir konnten für unsere Transportstudien zunächst das Vorliegen der Expression von LAT2 und CD98

mittels Western Blot in injizierten Oozyten nachweisen. Die ermittelte Expression nach Immunfärbung mit dem CD98-AK (siehe Abbildung 4.1 (A)) sowie nach der Immunfärbung mit dem LAT2-AK (siehe Abbildung 4.1 (B)) zeigen eindeutige Banden der beiden Proteine im Gesamtlysate. Anschließend folgte die Analyse des Aminosäuretransports. Die nicht-injizierten Oozyten zeigten eine unbedeutende L-Leucin (Leu)- und L-Phenylalanin (Phe)-Aufnahme, während die LAT2 und CD98 koinjizierten Oozyten eine stark gesteigerte Aufnahme zu einem Zeitpunkt nach 20 min aufwiesen (Abbildung 4.1 (C) und D)).

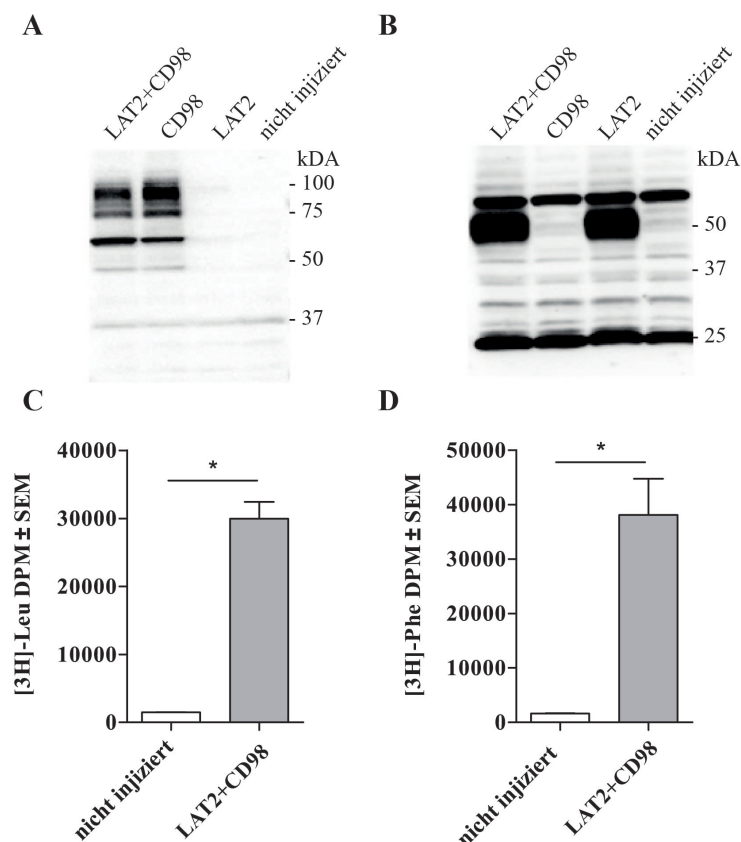


Abbildung 4.1: Expression und Aminosäuretransport in Oozyten. Expression und Aminosäuretransport in Oozyten. LAT2 und CD98 injizierte *Xenopus laevis* Oozyten wurden auf Proteinexpression mittels Western Blot und auf die Aufnahme von AS getestet. Die Expression des Transporters erfolgte im Gesamtlysate von Oozyten. A, Immunfärbung mit einem CD98-AK. B, Immunfärbung mit einem LAT2-AK. Die Aufnahme von radioaktiv markiertem C, Leu (100 nM) und D, Phe (100 nM) über 20 min bei RT zeigen die Mittelwerte von jeweils 10-15 Oozyten \pm SEM aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Die statistischen Unterschiede wurden mittels t-Test berechnet (* $P < 0,05$). Verändert nach (Kinne et al., 2015)

4.1.2 LAT2-Membranexpression nur als Heterodimer mit CD98 in Hek293-Zellen

Die Expressionsuntersuchungen wurden mit transient transfizierten Hek293-Zellen durchgeführt. Die leichte Kette des Transporters LAT2 und sein essentielles Eskortprotein CD98 wurden mit einem fluoreszierenden Marker gekennzeichnet, sodass die Lokalisation in der Zelle über die Durchflusszytometrie und auf der Plasmamembran mittels *laser scanning microscopy* (LSM) ermittelt werden konnten. Die Zellen wurden mit LAT2-GFP und CD98-mCherry einzeln und gemeinsam transient transfiziert und anschließend analysiert. Die LAT2-GFP einzeln transfizierten Zellen zeigen eine retikuläre Färbung des Zytoplasmas (grün) (Abbildung 4.2 (A)). Durch die Gabe von Bromphenolblau (rot) werden die Grenzen der Plasmamembran deutlich (Abbildung 4.2 (B+E)). In der Überlagerung beider Bilder befindet sich LAT2-GFP nur im Zellinneren, jedoch nicht an der Plasmamembran, weil keine Kollokalisierung (gelb) an der Membran sichtbar wird (Abbildung 4.2 (C)). Die transiente Einzeltransfektion von CD98-mCherry zeigt hingegen eine Lokalisation des Monomers an der Zelloberfläche (Daten hier nicht dargestellt). Bei transienter Kotransfektion liegt LAT2-GFP an der Plasmamembran (Abbildung 4.2 (D)). Nach Überlagerung beider Kanäle wird deutlich sichtbar, dass LAT2 nur als Heterodimer LAT2/CD98 an der Membran zu lokalisieren ist (gelb) (Abbildung 4.2 (F)). Die Resultate der Durchflusszytometrie, welche das Gesamtprotein ermittelt, weisen eine vergleichbare Expression auf, unabhängig davon, ob ein Protein einzeln oder kotransfiziert wurde (Abbildung 4.2 (G)).

4.1.3 Koexpression von LAT2 und CD98 induziert Natrium-unabhängigen SDH-Transport in Oozyten

Zur Charakterisierung der Transporteigenschaften von LAT2 und zur weiteren Etablierung des Assays wurde das *in vitro*-Modell zur Transporterüberexpression in den *Xenopus laevis* Oozyten genauer untersucht. Die Überexpression in Oozyten stellt ein solides System zur Untersuchung der Substratspezifität von Transporterproteinen dar. Dazu wurden zunächst die cRNA von LAT2 und CD98 sowohl einzeln als auch koinjiziert und der Transport von radioaktiv markierten Substraten in die Oozyten gemessen. Wie in Abbildung 4.3 (A) dargestellt, ist ausschließlich der SDH-Transport bei koinjizierten Oozyten messbar und zudem signifikant unterschiedlich. Bei einzeln injizierter cRNA von LAT2 oder CD98 ist die $3,3'$ -T₂-Aufnahme gleichzusetzen mit der Aufnahme durch nicht-injizierte oder H₂O-injizierte Oozyten. Bei der

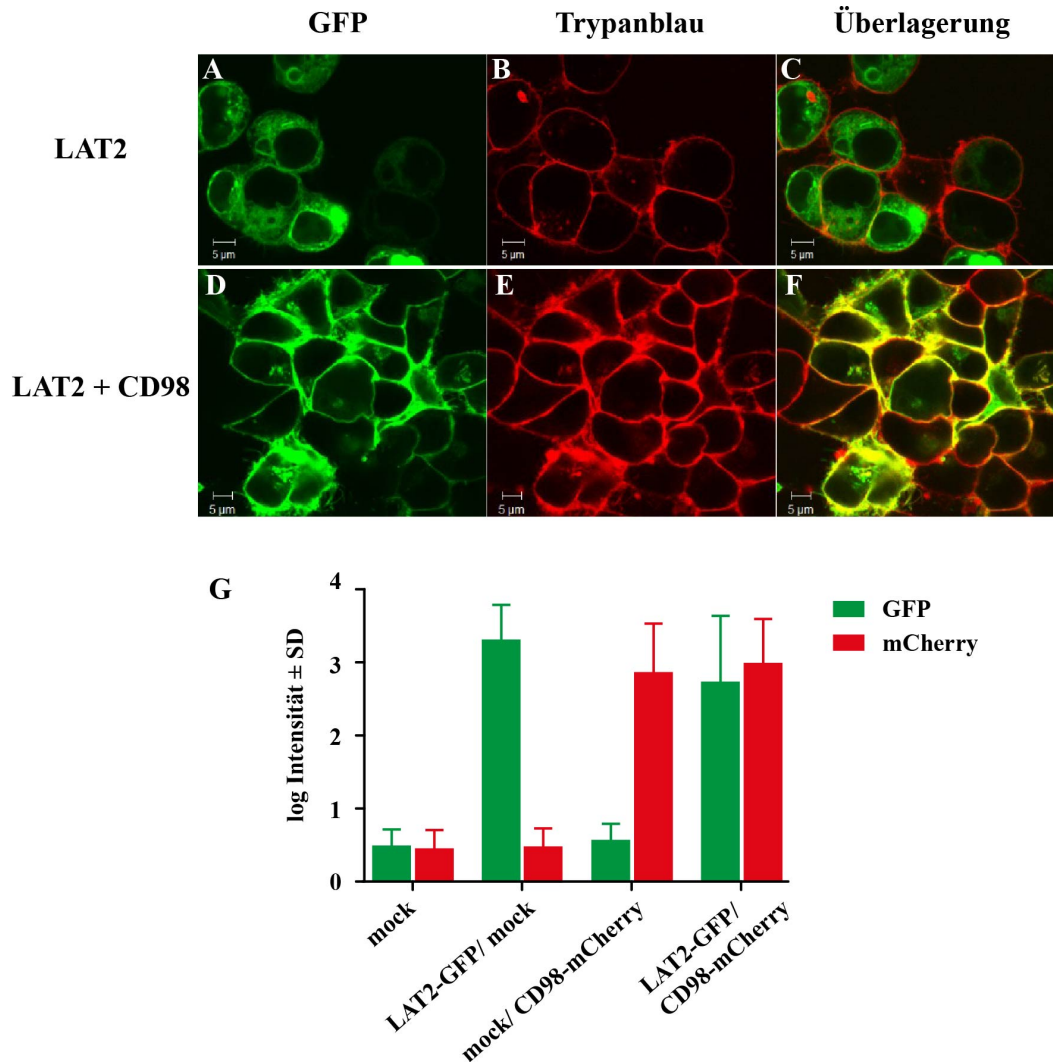


Abbildung 4.2: Expressionsuntersuchungen des LAT2/CD98- Heterodimers in Hek293-Zellen mit den zwei konventionellen Methoden: LSM und Durchflusszytometrie. Hek293-Zellen wurden einzeln oder gemeinsam mit cDNA von eGFP-LAT2-N1 und CD98 transient transfiziert. Die Oberflächenexpression wurde mittels LSM detektiert. Die Detektion der Einzeltransfektion von LAT2-GFP zeigt (A) ein GFP-Fluoreszenzsignal nur im Zytoplasma (grün) und (B) die Markierung der Zelloberfläche mit Trypanblau (rot). Die anschließende Überlagerung der beiden Fluoreszenzen zeigt (C) keine gelbe Färbung an der Plasmamembran. LAT2 einzeln exprimiert ist nicht an der Zelloberfläche lokalisiert. Die Koexpression stellt (D) die Detektion der GFP-Fluoreszenz (grün), (E) die Markierung der Zelloberfläche mit Trypanblau und (F) nach Überlagerung beider Fluoreszenzen eine Kolokalisation in gelb an der Plasmamembran dar. Verändert nach (Hinz et al., 2017) (G) Für alle Konstrukte wurde das Gesamtprotein mit der Durchflusszytometrie ermittelt. Das Ergebnis zeigt, dass alle transient transfizierten Konstrukte ähnlich exprimiert sind, unabhängig davon, ob eine Einzel- oder Kotransfektion durchgeführt wurden.

Untersuchung auf Transportabhängigkeit von Natrium, dargestellt in Abbildung 4.3, stellte sich heraus, dass es keinen Unterschied bei der SDH-Aufnahme im Vergleich zwischen Natrium- und Cholin-haltigem Puffer gibt. Um einen optimalen Zeitpunkt und beste Bedingungen für weitere Messungen zu ermitteln, erfolgte eine SDH-Aufnahme zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Nach Berechnungen der Relation von nicht-injizierten zu koinjizierten Oozyten wurde für den Zeitpunkt 60 min der größte Unterschied festgestellt. Schließlich konnten nach allen ermittelten Faktoren auch die kinetischen Parameter $K_m = 18,6 \mu\text{M}$ und $V_{max} = 5,4 \text{ pmol 60 min}$ bestimmt werden. Die Aufnahme durch koinjizierte Oozyten erfolgte hier bei 60 min und SDH-Konzentrationen zwischen $0,1 - 25 \mu\text{M}$.

4.1.4 Identifizierung von SDH als Substrat für den LAT2 in Oozyten

Um die Spezifität der SDH-Subtypen für LAT2 zu ermitteln, wurden Aufnahmestudien von radioaktiv markiertem SDH (100 nM) in LAT2/CD98 koinjizierten *Xenopus laevis* Oozyten über eine Dauer von 60 min bei RT durchgeführt. Die induzierte Aufnahme in LAT2/CD98 koexprimierenden Oozyten konnte nur für die beiden SDH-Subtypen 3,3'-T₂ und T₃ gemessen werden (Abbildung 4.4 (A)). Für rT₃ und T₄ konnte kein signifikanter Unterschied zu den nicht-injizierten Oozyten ausgemacht werden (Abbildung 4.4 (B)). Zur Charakterisierung von LAT2 wurde die 3,3'-T₂-Aufnahme in Anwesenheit verschiedener SDH-Derivate experimentell bestimmt (siehe Abbildung 4.3). Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Verringerung der 3,3'-T₂-Aufnahme durch die SDH-Derivate mit Ausnahme von rT₃. Die SDH-Derivate mit bis zu zwei Iodatomen konkurrieren mit 3,3'-T₂ um den Transport. Für sie konnte eine Inhibitionsrate zwischen 60-70 % ermittelt werden. Arbeiten zur Charakterisierung des LAT2-WTs wurden von Anita Kinne und Melanie Wittner durchgeführt und gemeinsam veröffentlicht (Kinne et al., 2015).

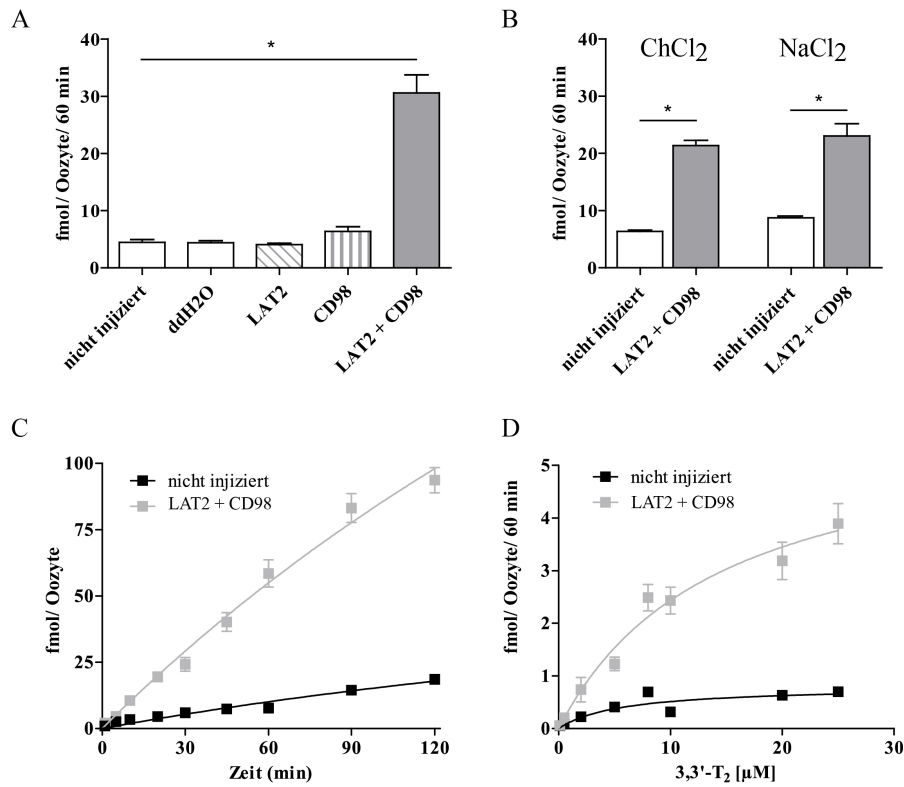


Abbildung 4.3: Koexpression von LAT2 und CD98 in Oozyten induziert Natrium-unabhängigen SDH-Transport. Aufnahme von radioaktiv markiertem $3,3'$ -T₂ (0,1 nM radioaktives und äquivalentes, nicht markiertes Substrat) in *Xenopus laevis* Oozyten injiziert mit cRNA von LAT2 und CD98 (46 ng) über eine definierte Dauer bei RT. A, Aufnahmekonzentration 100 nM für 60 min bei cRNA einzeln und koinjizierten Oozyten. B, Aufnahmekonzentration 100 nM in einem Natrium- oder Cholin-haltigen Transportpuffer für 60 min bei koinjizierten Oozyten. C, Aufnahmekonzentration von 100 nM für 1 min - 120 min bei koinjizierten Oozyten. D, Aufnahmekonzentration von 100 nM - 25 μ M für 60 min bei koinjizierten Oozyten. Alle Resultate zeigen die Mittelwerte von jeweils 10-15 Oozyten \pm SEM aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Zur Kontrolle dienten nicht-injizierte oder ddH₂O injizierte Oozyten. Die statistischen Unterschiede wurden mittels one-way ANOVA berechnet (*P < 0,05). Verändert nach (Kinne et al., 2015)

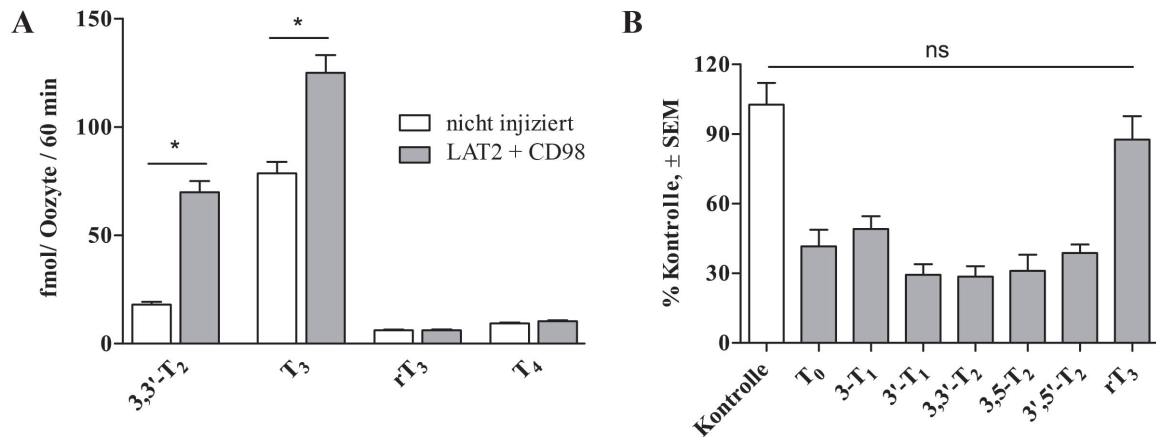


Abbildung 4.4: Identifizierung neuer Substrate für LAT2. Aufnahme von radioaktiv markierten SDH-Derivaten (100 nM) in koinjizierten *Xenopus laevis* Oozyten für 60 min bei RT. A, Aufnahme von 3,3'-T₂, T₃, rT₃ und T₄. B, Kompetitive Inhibition von SDH-Derivaten. Die Experimente wurden in An- und Abwesenheit der SDH-ähnlichen Substrate (jeweils 10 μ M) durchgeführt. Die gemessenen Werte wurden von den Messwerten der nicht-injizierten Oozyten subtrahiert und auf die Kontrolle (3,3'-T₂-Aufnahme) normalisiert. Alle Resultate zeigen die Mittelwerte von jeweils 10-15 Oozyten \pm SEM aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Alle statistischen Unterschiede wurden mittels one-way ANOVA berechnet (*P < 0,05). Verändert nach (Kinne et al., 2015)

4.2 Modellierung einer ersten dreidimensionalen Struktur für LAT2

4.2.1 Generierung der LAT2-Sekundärstruktur aus zwei Kristallstrukturen

Die funktionelle Expression und Charakterisierung von LAT2 zeigte wichtige Merkmale in der Substratspezifität, insbesondere die hohe Affinität gegenüber den SDH-Derivaten, auf. Dazu sollten exemplarisch die dreidimensionalen Strukturen von LAT2 generiert werden, um aus dem Modell zum einen Erklärungsansätze für die beobachteten Substratspezifitäten und das Substratspektrum abzuleiten und zum anderen Schlüsselpositionen für den SDH-Transport herauszustellen. Zur Modellierung von Proteinstrukturen erfolgt zunächst die Suche nach homologen Proteinen durch eine FASTA-Suche in der Protein-Datenbank. Hierbei wurden zwei Kristallstrukturen mit einer 30 % igen Sequenzähnlichkeit zur LAT2-Sequenz gefunden. Zur Vorhersage der Sekundärstrukturen und der Topologie von LAT2 wurden frei zugängliche Programme genutzt (TmPred, TMHMM, HMMTOP), denen unterschiedliche Algorithmen zugrunde gelegt sind. Mit Hilfe von ClustalW konnte ein multiples Sequenzalignment erstellt werden, um schließlich ein chimäres LAT2-Modell aus den beiden Kristallstrukturen (Tem-

plates) zu generieren. Die molekulare Modellierung des Transmembranproteins LAT2 erfolgte manuell mit Hilfe der Software Sybyl-X2. Die Vorgehensweise zur Auswahl geeigneter Templatestrukturen und die Modellentwicklung sind im Methodenkapitel in Abschnitt 3.9.5 genauer erläutert. Das Alignment in Abbildung 4.6 zeigt die zwei verwendeten Kristallstrukturen (AdiC (PDB: 3L1L); ApcT (PDB: 3GI8)) und LAT2 mit Annotationen zur Sekundärstruktur (α -Helix: Zylinder; Loop: Kurvenlinie). Die identischen Aminosäuren sind in schwarz und die ähnlichen sind in grau abgestuft dargestellt (vgl. Abbildung 4.6). Aufgrund der geringen Sequenzähnlichkeit (30 %) des zu modellierenden Transporters mit nur einem der beiden Templates erfolgte die Entwicklung eines chimären Modells aus beiden Kristallstrukturen (AdiC, ApcT). Die Zusammensetzung der zwölf TMHs in dem LAT2-Strukturmodell erfolgte jeweils nach der höchsten Sequenzähnlichkeit oder Sequenzmerkmalen (Abbildung 4.5). Das Modell

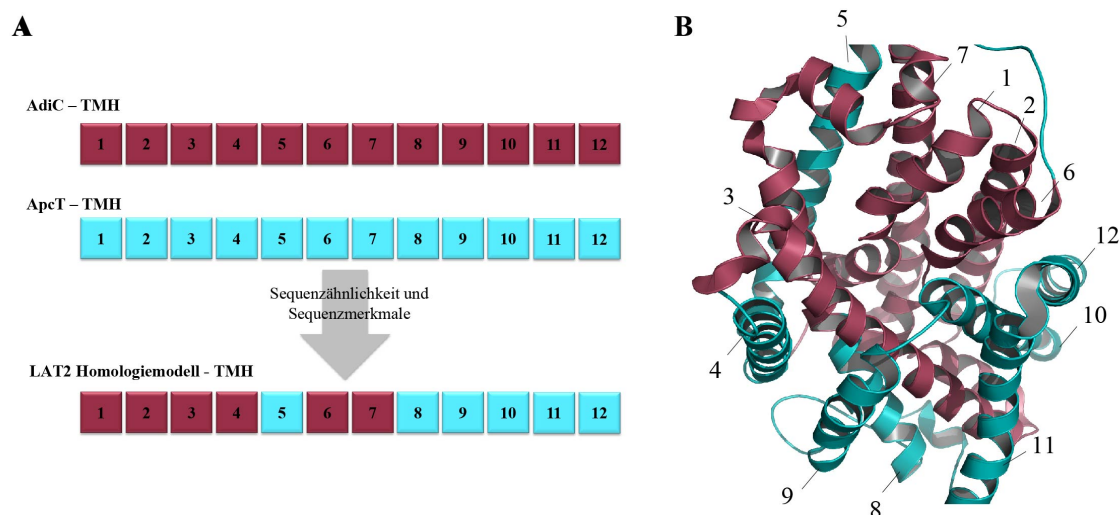


Abbildung 4.5: Zusammensetzung der TMHs des LAT2-Strukturmodells aus zwei Kristallstrukturen. A, Aus den zwölf TMHs der Kristallstrukturen AdiC (rot) und ApcT (cyanblau) wurden diejenigen, mit der höchsten Sequenzhomologie und mit zusätzlich übereinstimmenden Sequenzmerkmalen für das LAT2-Strukturmodell ausgewählt. B, Das resultierende chimäre LAT2-Strukturmodell mit den zwölf α -helicalen Segmenten und den Loop-Regionen basierend auf AdiC and ApcT. Die Visualisierung erfolgte mithilfe der PyMol Software.

bildet sich folglich fragmentarisch aus den einzelnen TMHs von AdiC (TMH1-4, 6, 7) und ApcT (TMH5, 8-12). Es resultierte schließlich für das LAT2-Strukturmodell eine Sequenzähnlichkeit von über 50 % in den TMHs (siehe auch Sequenzalignment im Anhang 6.3). Die Strukturhomologie/ Topologie der aus mehreren Fragmenten modellierten Struktur für LAT2 ist damit deutlich höher im Vergleich zur Verwendung von nur einer Kristallstruktur

als Strukturvorlage (Hinz et al., 2015).

4.2.2 Potentielle zentrale Substrat-Erkennungsstelle im LAT2-Modell

Das LAT2-Strukturmodell wurde auf der Basis von Homologie-Modellierungskriterien entwickelt. Im Anschluss an die Modell-Generierung wurde aus der Kristallstruktur des AdiC eine mögliche Bindungsstelle abgeleitet und in der modellierten LAT2-Struktur aufgrund von Sequenzähnlichkeit in TMH1 und 6 identifiziert. Das Template mit einer hohen Auflösung von 3 Å wurde mit einem Liganden (Arginin) in der Bindungstasche kristallisiert, wodurch das Ableiten einer putativen Bindungsstelle für LAT2 vereinfacht wurde (siehe Abbildung 4.7). In AdiC bindet die Carboxyl- und die Aminogruppe des Arginins über Wasserstoffbrückenbindungen an das Rückgrat zwischen zwei TMHs (TMH1 und 6). Aufgrund der Sequenzhomologie wird für LAT2 in den genannten Helices mit dem IxGSGxF- und dem SFxG-Motiv eine ähnliche Bindungsstelle wie bei AdiC vermutet. Beide Transporter gehören zur gleichen SLC-Superfamilie. Demnach wird auch hier eine ähnliche dreidimensionale Struktur vorhergesagt. Die Lokalisierung der LAT2-Bindungsstelle des SDH 3,3'-T₂ ist zunächst über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Carboxyl- und Aminogruppe des Substrats und dem Rückgrat des Transporters angenommen. Die Ergebnisse des Dockings orientieren das SDH mit dem Kopf in extrazellulärer Richtung aufgrund von freiem Raum und energetisch günstigeren Zuständen in diesem extrazellulär geöffnetem und Liganden gebundenem Homologiemodell (siehe Abbildung 4.7)(Hinz et al., 2015).

4.2.3 Transportkanal auskleidende Aminosäuren zur Auswahl für die gezielte Mutation

Mithilfe der postulierten Bindungsstelle konnten gezielte Mutationen einzelner, rundherum liegender Determinanten generiert werden. Diese wurden experimentell untersucht, um den essentiellen Beitrag bestimmter Determinanten zum SDH-Transport genauer zu betrachten. Es wurden zwölf unterschiedliche Positionen ausgewählt, wobei drei Aminosäurereste mehrmals verändert wurden. Die Seitenketten wurden so mutiert, dass sie ihre hydrophobe oder hydrophile Eigenschaften weitestgehend beibehielten, jedoch eine Verkürzung oder Verlängerung der Seitenkette erzwungen wurde. Eine drastische Mutation wurde nur dann durchgeführt, wenn für homologe Proteine gleiche Literaturdaten vorlagen (Mutanten N51A/S, K193L) oder ein größerer Raum an der Bindungsstelle entstehen sollte (N51A/S, N133S, F242V/W).

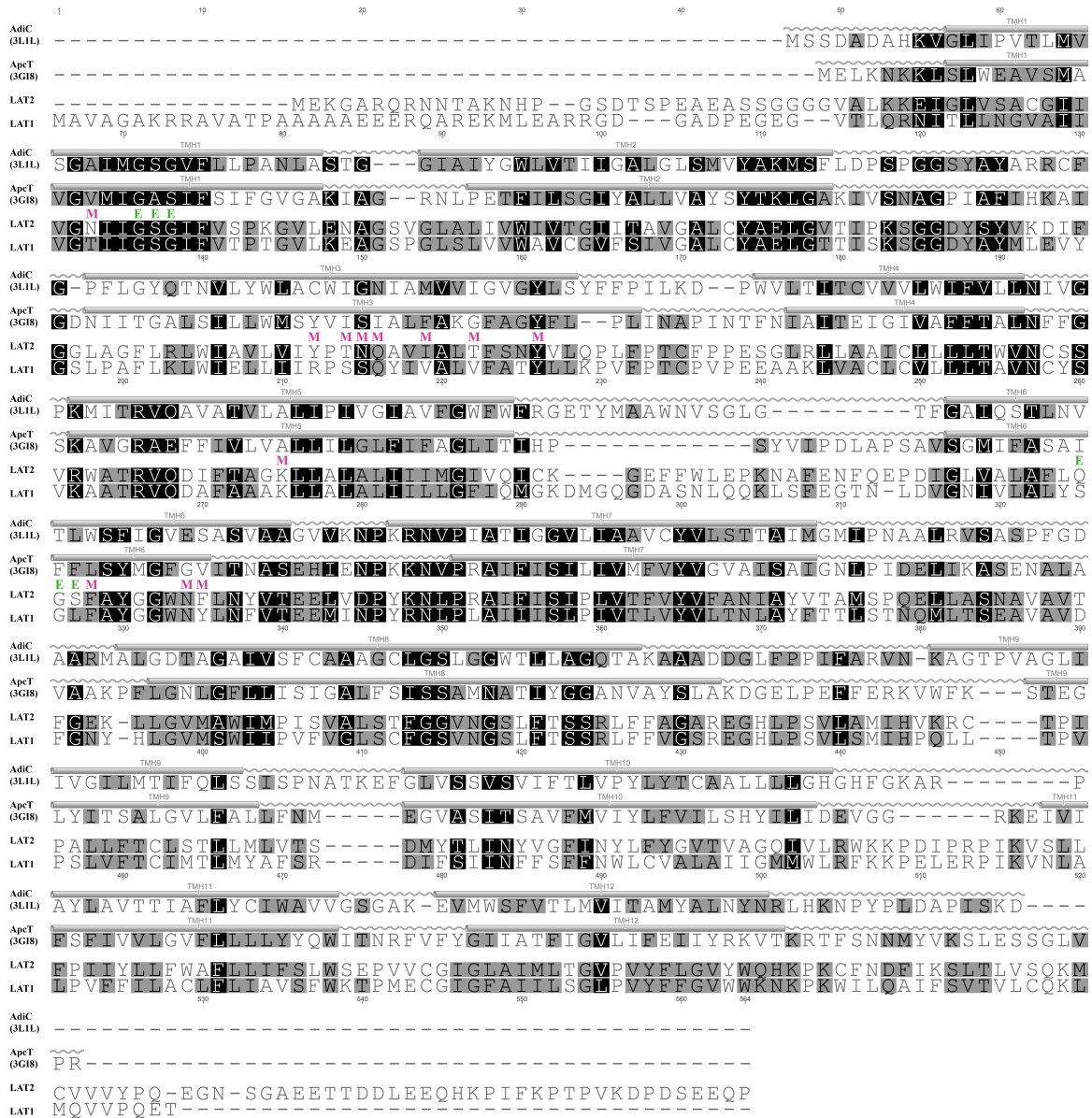


Abbildung 4.6: Multiples Sequenzalignment der Transporter LAT2 und LAT1 sowie der verwendeten Kristallstrukturen AdiC (PDB: 3L1L) und ApcT (PDB: 3G18). Multiples Sequenzalignment der Transporter LAT2 und LAT1 sowie der verwendeten Kristallstrukturen AdiC (PDB: 3L1L) und ApcT (PDB: 3G18). Das Alignment zeigt die Ähnlichkeit der Aminosäure in grau abgestuft; zudem Annotationen der Sekundärstruktur und die Topologie beider Kristallstrukturen, Helices (Zylinder) und Loop-Bereiche (Kurve). Die Mutationen sind oberhalb der LAT2-Sequenz mit M (magenta) und die Erkennungsstelle mit E (grün) kenntlich gemacht. Das Sequenz-Alignment wurde mit der Software Geneious dargestellt.

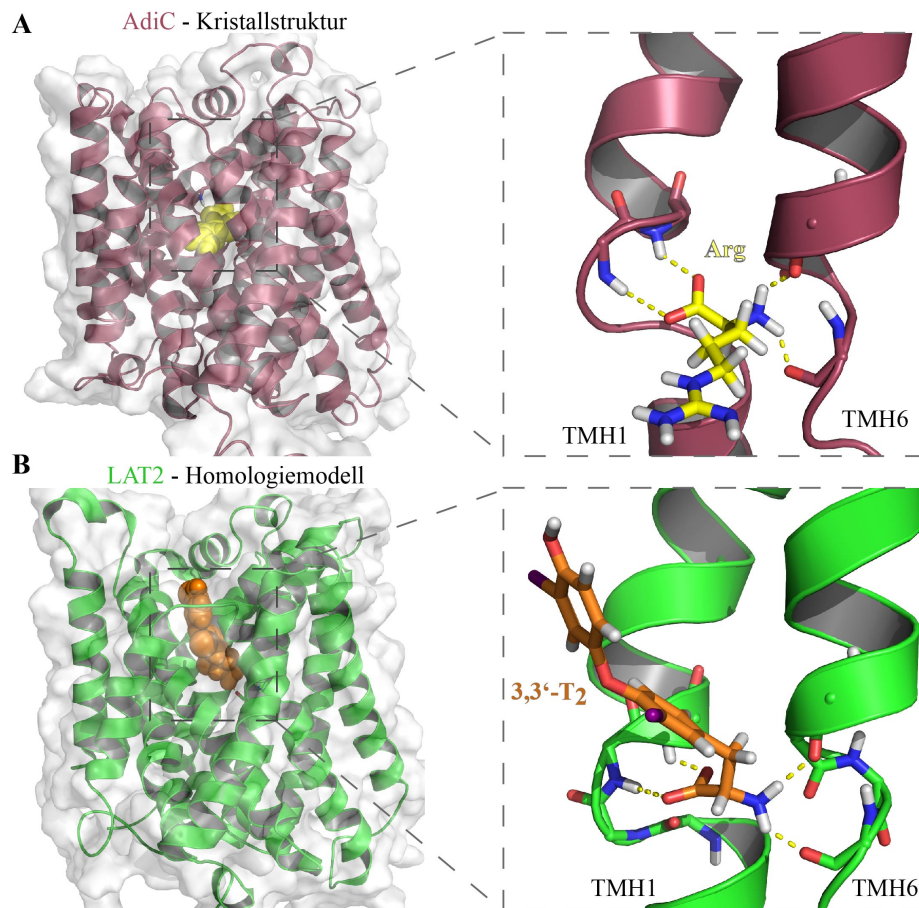


Abbildung 4.7: Vorhersage einer potentiellen LAT2-Substrat-Erkennungsstelle. A, Kristallstruktur von dem zwölf TMH-Transporter AdiC (rot, PDB: 3L1L) mit dem gebundenen Substrat Arginin (gelb). Die Carboxyl- und Aminogruppe des Arginins bilden eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Rückgrat der beiden TMH1 und 6 aus. Der Abstand der einzelnen Atome liegt zwischen 1,7 und 2,7 Å. B, Das dreidimensionale Strukturmodell von LAT2 (grün) mit einem Docking von 3,3'-T₂ (orange). Hier bindet die Aminosäuregruppe des 3,3'-T₂ nach dem gleichen Muster, zwischen den TMH1 und 6, da gleiche Sequenzmotive in den TMH1 und 6 von LAT2 im Vergleich zu AdiC aufzufinden sind. Verändert nach (Hinz et al., 2015).

Dabei wurden zwei mögliche Orientierungen für das SDH-Molekül angenommen. Hierbei ist das SDH-Molekül mit dem Phenyl-Ring extrazellulär (Abbildung 4.8 (A)) oder intrazellulär ausgerichtet (Abbildung 4.8 (B)). Die Aminosäuren an den Positionen F242, Y130 oder F249 wurden ausgewählt, da sie als potentielle Wechselwirkungspartner in Betracht kommen. *In silico*-Verkürzungen der Seitenkette führten folglich zu einer Vergrößerung der Bindungstasche und vice versa (Abbildung 4.8 (C)). Die ausgewählten Mutanten wurden im Weiteren experimentell untersucht, um die Lokalisierung und mögliche Substrat-Interaktionen genauer zu beleuchten.

4.3 Charakterisierung der Substrataufnahme über LAT2-Varianten zur Herleitung von Struktur-Funktionsbeziehungen

4.3.1 Etablierung einer Quantifizierungsmethode der Expressionsuntersuchung in Hek293-Zellen

Zur Aufklärung der Transportmechanismen und der unterschiedlichen Substratspezifitäten wurden 15 verschiedene Mutationen im SDH-Transporter LAT2 *in vitro* funktionell charakterisiert. Hierzu wurden zunächst die Expressionen aller 15 Mutanten und die Translokation zur Zellmembran der vier wichtigsten Mutanten (N51S, Y130A, N133S, F242W) untersucht. Anschließend wurde die Aufnahme der Substrate bestimmt und verglichen, um Struktur-Funktionsbeziehungen ableiten zu können. Die Hek293-Zellen zeigten sehr gute Transfektionsresultate von etwa 70 % und boten dadurch gute Bedingungen zur Expressionsuntersuchung von LAT2/CD98. Zunächst wurde die Gesamtproteinexpression mittels Durchflusszytometrie ermittelt; diese Ergebnisse sind in der Abbildung 4.9 (A) dargestellt. Die Fluoreszenz-Intensität der LAT2-Varianten (GFP-Label), aber auch die Intensität von CD98 (mCherry-Label) unterscheidet sich sehr stark vom WT. Das GFP-Signal der LAT2-Mutanten ist um das Vierfache geringer als beim WT, obwohl ein erhöhter 3,3'-T₂-Transport für die LAT2-Varianten detektiert wurde (Abbildung 4.9 (A)). Diese Daten stehen allerdings nicht im direkten Zusammenhang mit der Membranexpression. Für die CD98-mCherry-Fluoreszenz-Intensitäten zeigt sich ebenfalls eine Reduktion der Werte vom WT zu den LAT2-Mutanten. Die Signalstärke von CD98 bleibt aber zwischen den LAT2-Konstrukten konstant. Bildet man das Verhältnis der Gesamtexpression zwischen CD98-mCherry und dem jeweiligen LAT2-

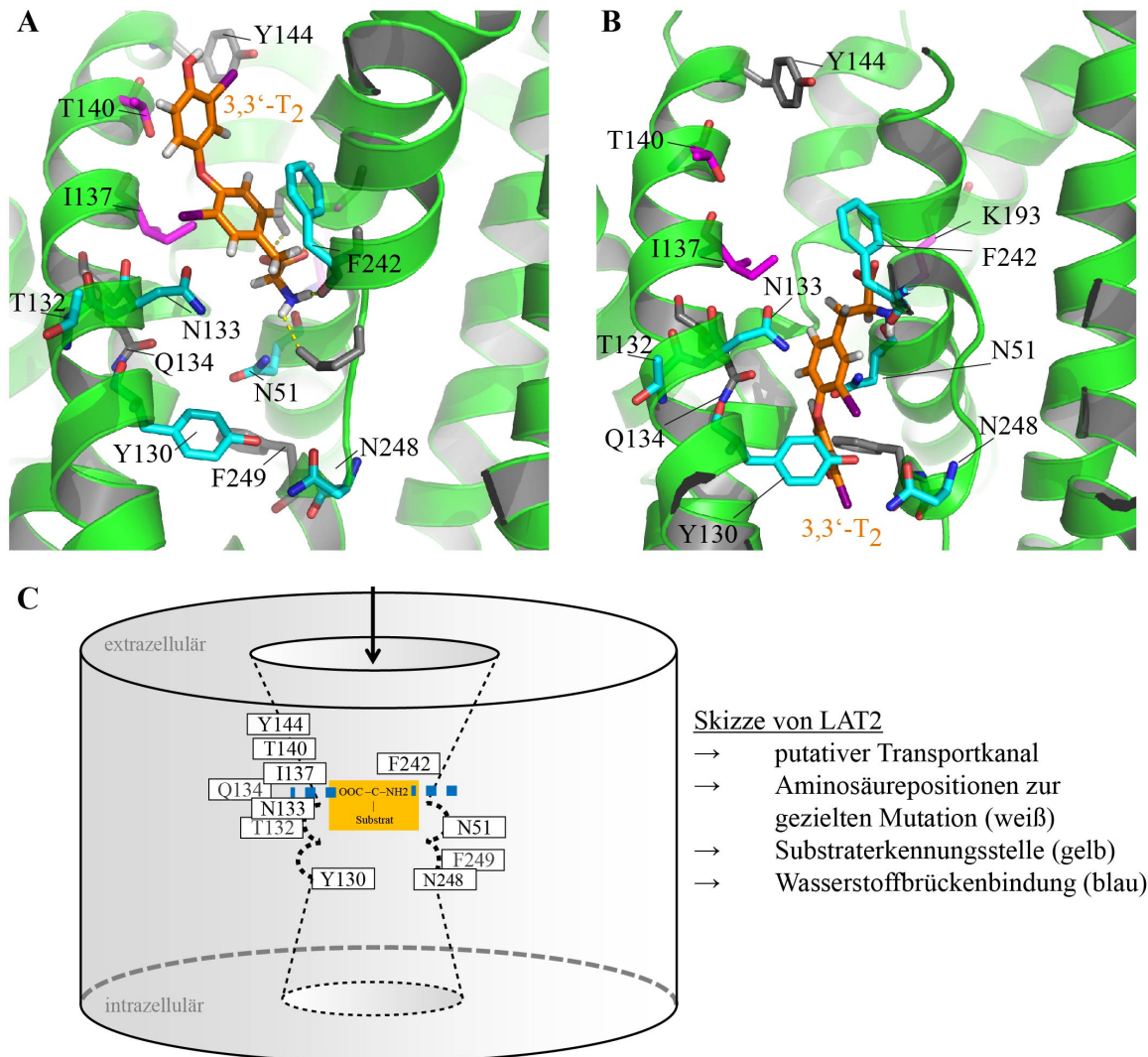


Abbildung 4.8: Substrat-Erkennungsstelle im LAT2-Homologiemodell hilft zur Auswahl von interagierenden Aminosäuren. Dargestellt ist das LAT2 Strukturmodell (grün) mit seinen zwölf TMHs und ausgewählten Aminosäuren, die zur experimentellen Untersuchung verwendet wurden. In der Mitte des Transporters gibt es eine Erkennungsstelle, in der das Substrat 3,3'-T₂ (orange) mit seiner Aminosäuregruppe gebunden ist. Zwei mögliche Orientierungen von 3,3'-T₂: A, aromatische Kopfgruppe nach extrazellulär ausgerichtet; B, aromatische Kopfgruppe nach intrazellulär in den geschlossenen Transporter ausgerichtet. C, Schema des Transportkanals durch das Zentrum von LAT2 mit einer geöffneten extrazellulären Seite. Dargestellt ist die Erkennungsstelle (blaue gestrichelte Linie) der Carboxyl- und Aminogruppe des Substrats (orange) in einem Substrattransportweg mit asymmetrischen Vertiefungen. In Übersicht wird die Lokalisierung der ausgewählten Aminosäuren im Transporter gezeigt.

GFP-Konstrukt (vgl. Abbildung 4.9 (B)) zeigt sich, dass die Intensitäten der beiden getaggten Proteine im Verhältnis zueinander für die Mutanten drei- bis vierfach höher sind als für den WT. Das Signal des WT ist also am niedrigsten. Ein vergleichbares Muster konnte ich bereits für den 3,3'-T₂-Transport finden, welches nochmals in der Abbildung 4.9 (C) zusammengefasst ist. Mit zwei konventionellen Analysen wurde die Proteinexpression auf der Membran unter-

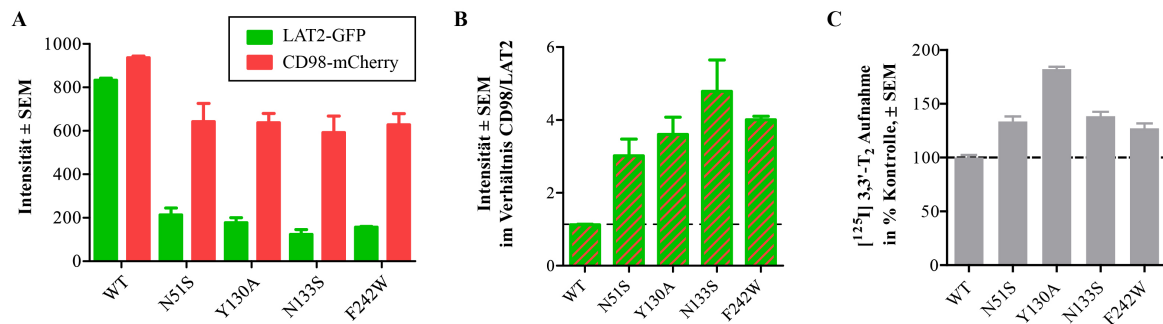


Abbildung 4.9: Unterschiede der Gesamtproteinexpression von LAT2-Varianten im Vergleich zum WT. Hek293-Zellen wurden mit LAT2 oder LAT2-Varianten und CD98 transient transfiziert. A, Die Intensität der LAT2-GFP Varianten (grün) und von CD98-mCherry (rot) wurde am Durchflusszytometer ermittelt. B, Das Verhältnis der Intensitäten CD98-mCherry zu LAT2-GFP wurde auf die Intensität des WTs normalisiert. Alle Resultate zeigen die Mittelwerte von jeweils drei Kavitäten \pm SD aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten. C, Die Daten sind ein Ausschnitt aus der Abbildung 4.11.

sucht. Für die Quantifizierung der Expression an der Plasmamembran wurden die ermittelten Werte der Oberflächenexpression mit den ermittelten Werten der Gesamtexpression aus den Analysen der Durchflusszytometrie ins Verhältnis gesetzt und in einem Diagramm dargestellt (Abbildung 4.10). Der WT ist die Expressionskontrolle, mit der die LAT2-Mutanten verglichen wurden. Betrachtet man nur das Verhältnis aus Gesamt- zu Membranexpression, so geht aus dem Diagramm hervor, dass keine großen Unterschiede im Membranlevel zwischen den Mutanten vorhanden sind. Das Protein ist mit oder ohne Mutation ähnlich stark auf der Zelloberfläche exprimiert. Somit war die Grundvoraussetzung für eine funktionelle Untersuchung unter gleichen Bedingungen gegeben.

4.3.2 Aufnahmestudien mit [¹²⁵I]-SDH über LAT2-Mutanten in Hek293-Zellen

Im Anschluss an die Expressionsuntersuchungen folgte die funktionelle Charakterisierung der Mutanten. Zunächst wurden initial alle Aufnahmeuntersuchungen in Hek293-Zellen mit dem

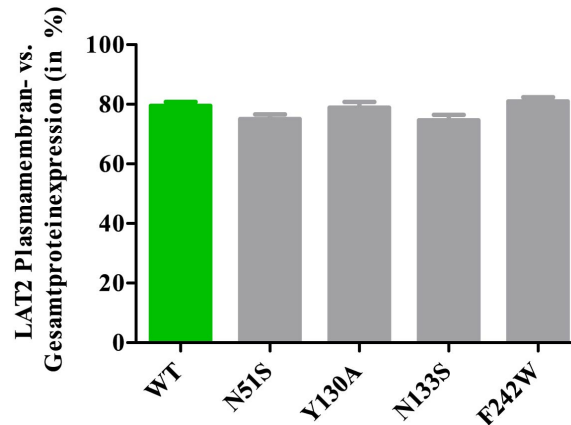


Abbildung 4.10: Kein Unterschied in der Membranexpression zwischen den LAT2-Konstrukten. Hek293-Zellen wurden mit LAT2 oder LAT2-Varianten und CD98 transient transfiziert. Die Intensität der Gesamtexpression von GFP wurde am Durchflusszytometer ermittelt. Die Expression an der Plasmamembran wurde mittels LSM detektiert. Dargestellt wird das Verhältnis der Membranexpression zur Gesamtexpression der GFP (LAT2)-Intensität. Die Werte wurden auf den WT normalisiert. Alle Resultate zeigen die Mittelwerte von jeweils drei Kavitäten \pm SD aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten, wobei 60-80 Zellen pro Kavität zur LSM-Auswertung verwendet wurden.

radioaktiv markierten $3,3'$ -T₂ durchgeführt. Die funktionellen Untersuchungen sollten in einem physiologischen Zusammenhang getestet werden. Dazu wurden die Hek293-Zellen ausgewählt, um den Einfluss der Mutanten auf den SDH-Transport zu charakterisieren. Hek293-Zellen weisen jedoch eine hohe endogene Transporter-Expression auf, die ebenfalls SDH transportieren können, wodurch ein relativ hohes Hintergrundrauschen bei den Analysen entsteht. Die mock (Leervektor) transfizierten Zellen stellen die Funktionalität anderer endogen exprimierten Transporterproteine in den Vordergrund, während der WT den Transport des SDH nur für den LAT2 aufzeigt. Die 15 Mutationen lassen sich in fünf Gruppen kategorisieren (siehe Abbildung 4.11): Die erste Gruppe umfasst die Mutanten, die keine signifikante Änderung der $3,3'$ -T₂-Aufnahme zum WT aufzeigen, wie N51A, Q134T und Y144A. Zur zweiten Gruppe, die im Vergleich zur mock transfizierten Gruppe unverändert bleibt, gehören beide einzeln transfizierten Konstrukte von LAT2 und CD98 sowie die beiden Mutanten I137M und T140F. In der dritten Gruppe (T132A und Y130R) zeichnet sich ein gesteigerter Transport im Vergleich zu mock transfizierten Zellen ab, jedoch bleibt dieser etwa 50 % schlechter als beim LAT2-WT. Allerdings gibt es auch zwei Mutanten (K193A und F242V), die eine 50 % geringere $3,3'$ -T₂-Aufnahme als die Kontrollgruppe zeigten. Eine weitere Gruppe bilden die LAT2-Mutanten mit gesteigerter $3,3'$ -T₂-Aufnahme: Hierzu gehören N51S, Y130A, N133S, F242W, N248S und F249A. Die Signifikanz ist farblich hervorgehoben (*P < 0,05).

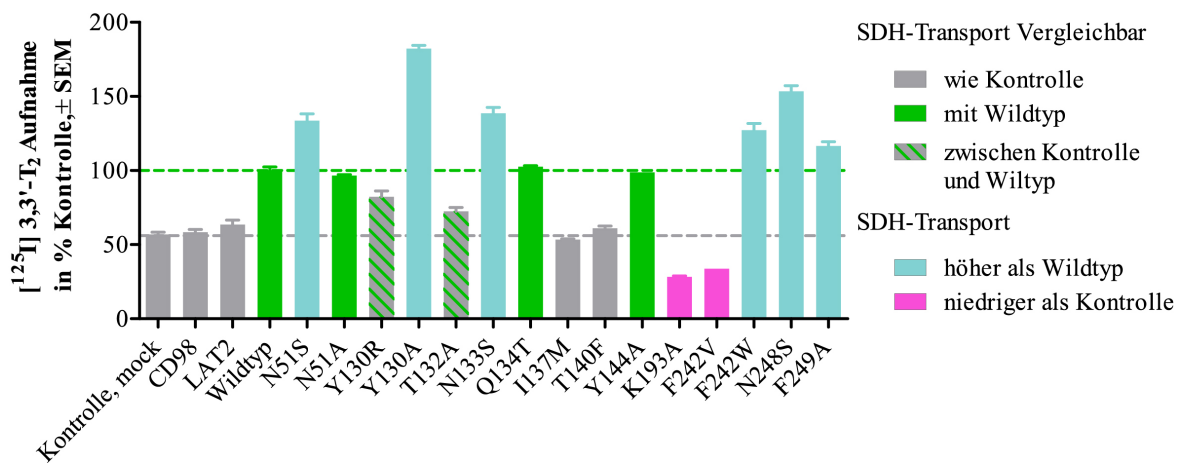


Abbildung 4.11: 3,3'-T₂-Aufnahmeuntersuchungen für verschiedene LAT2 und CD98 Konstrukte in Hek293-Zellen. Hek293-Zellen wurden mit einem Leervektor (mock), einzeln oder gekoppelt mit LAT2 oder LAT2-Varianten und CD98 transient transfiziert. Aufnahmeuntersuchungen wurden mit radioaktiv markiertem T₂ (100 nM) durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 60 min wurden die Zellen gewaschen und anschließend lysiert. Die Aufnahme von radioaktiv markiertem Substrat wurde im Lysat am γ -Zähler detektiert. Der WT zeigt eine 50 % höhere T₂-Aufnahme als die Kontrolle. Es zeichnen sich fünf signifikant (*p < 0,05) verschiedene Gruppen von Mutationen ab: T₂-Aufnahme wie Kontrolle (grau), T₂-Aufnahme wie WT (grün), T₂-Aufnahme zwischen Kontrolle und WT (grau/grün), niedrigere T₂-Aufnahme als Kontrolle (magenta) und gesteigerte T₂-Aufnahme im Vergleich zum WT (cyan). Die Daten sind repräsentativ für mindestens zwei unabhängige Experimente.

4.3.3 Einfluss der LAT2-Mutanten auf die 3,3'-T₂-Aufnahme in Korrelation zur Transporterexpression

Um zu untersuchen, welche Auswirkungen die jeweiligen Mutationen auf den Substrattransport haben, wurde ein weiteres *in vitro*-Modell verwendet. Die Oozyten bieten zur Charakterisierung der LAT2-Mutanten eine bessere Grundlage: Sie besitzen weniger endogene Transporter, sodass der zu untersuchende Transporter isoliert betrachtet werden kann. Der Nachteil, Oozyten als Modell zu nutzen, besteht in der schlechteren Voraussetzung zur Erschließung physiologischer Zusammenhänge. Die Bestimmungen der T₂-Aufnahme erfolgten bei LAT2-Varianten/CD98 koinjizierten Oozyten nach 60 min Inkubationszeit. Zunächst wurde bei allen Konstrukten die unspezifische T₂-Aufnahme, die den relativ geringen Aufnahme-Werten der nicht-injizierten Oozyten entspricht, abgezogen. Beim Vergleich der T₂-Aufnahme von Mutanten mit dem WT zeichnen sich drei Merkmale aus (siehe Abbildung 4.12 (A)). Die Mutationen N51A, Q134T, Y144A und F249A mit einer Seitenkettenverkürzung zeigten keine Veränderung der T₂-Aufnahme im Vergleich zum WT (grau). Folglich spielen diese AS beim Substrattransport nur eine untergeordnete Rolle. Eine weitere Fraktion von fünf Mutanten, wiesen einen verschlechterten T₂-Influx auf. Diese Mutationen teilen einerseits eine vergrößerte Seitenkette, wie bei Y130R, I137M und T140F, andererseits jedoch eine Verkürzung, wie bei K193A und F242V (magenta). Die Influx-Effekte der Mutanten K193A und F242V sind erklärbar und werden im Abschnitt 5.4 sowie 5.5 genauer diskutiert. Die Gruppe mit dem größten Potential, bei denen die T₂-Aufnahme signifikant erhöht ist (cyan), bilden die Mutationen N51S, Y130A, T132A, N133S, F242W und N248S. Die Aminosäureposition im Transportkanal kann der schematischen Darstellung 4.12 B entnommen werden (Hinz et al., 2015). Die Oozyten bieten für die Zelloberflächen-Expressionsanalyse aufgrund ihrer Größe und der komplizierten Handhabung ein geringes Methodenspektrum an. Demnach wurde hier nur die Gesamtproteinexpression betrachtet und ein Zusammenhang zu den Ergebnissen aus der Oberflächenanalyse der Hek293-Zelllinie hergeleitet. Dafür wurde eine Western Blot-Analyse an LAT2/CD98 koinjizierten Oozyten durchgeführt (Abbildung 4.13). Die Expressionen von WT und Mutanten sollten auf Gemeinsamkeiten und Unterschiede untersucht und verglichen werden. Die Proteinbanden des LAT2-Proteins liegen etwa bei 50 kDA, wobei auch eine weitere unbekannte Bande bei 45 kDA durch den AK erkannt wurde. Dieser färbte zudem viele andere unterschiedliche Banden an. Darunter befinden sich zum einen LAT2-Monomere oder LAT2/CD98-Heteromere, die unterschiedlich glykolysiert sind (75 kDA, 100 kDa oder größer), und zum anderen viele unspezifische Banden. Die Färbung der Ladekontrolle α -Tubulin weist eine spezifische und klare Bande auf. Diese war in jedem Experiment

von gleicher Stärke, das somit als ein Anzeichen für das gleichmäßige Auftragen der Proben angesehen werden kann. Die Western Blot-Analysen wurden zweimal unabhängig voneinander mit vergleichbaren Resultaten durchgeführt und nach Auswertung mit der ImageJ Software in einem Balkendiagramm dargestellt. Alle Mutanten zeigten eine vergleichbare Expression zum WT, mit Ausnahme von Y144A, welche eine Abweichung von 20 % vorweist (Hinz et al., 2015).

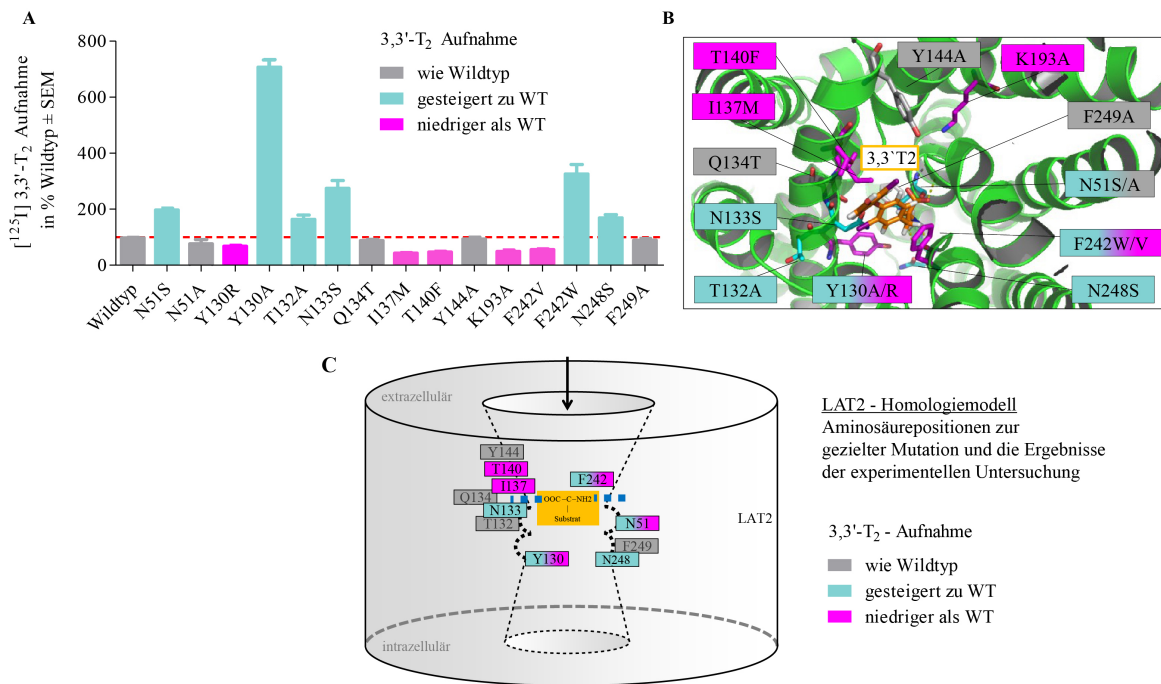


Abbildung 4.12: 3,3'-T₂-Aufnahmeuntersuchungen für verschiedene LAT2-Konstrukte in Oozyten. A, Aufnahme von radioaktiv markiertem 3,3'-T₂ (100 nM) in *Xenopus laevis* Oozyten koinjiziert mit cRNA von LAT2 oder LAT2-Varianten und CD98 (jeweils 23 ng) über die Dauer von 60 min bei RT. Die Ergebnisse sind als Prozentsatz des WT's angegeben. Die Werte wurden auf die entsprechende Gesamtexpression der jeweiligen LAT2-Varianten normiert. Drei verschiedene Merkmale können eingeteilt werden: T₂-Aufnahme wie WT (grau), verringert (magenta) und erhöht (cyan). Die Daten sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. Das Signifikanzniveau ($p < 0,05$) ist farblich (cyan, magenta) abgehoben. B, Das LAT2-Homologiemodell zeigt die an der Translokation von 3,3'-T₂ (orange) putativ beteiligten Aminosäuren im Zentrum von LAT2. Die Farbe der ausgewählten Mutationen entspricht den Farben im Balkendiagramm (siehe oben). C, LAT2-Skizze: proximale Positionen der mutierten Seitenketten umschließen die Substrat-Erkennungsstelle im LAT2-Substrat-Transportkanal. Verändert nach (Hinz et al., 2015).

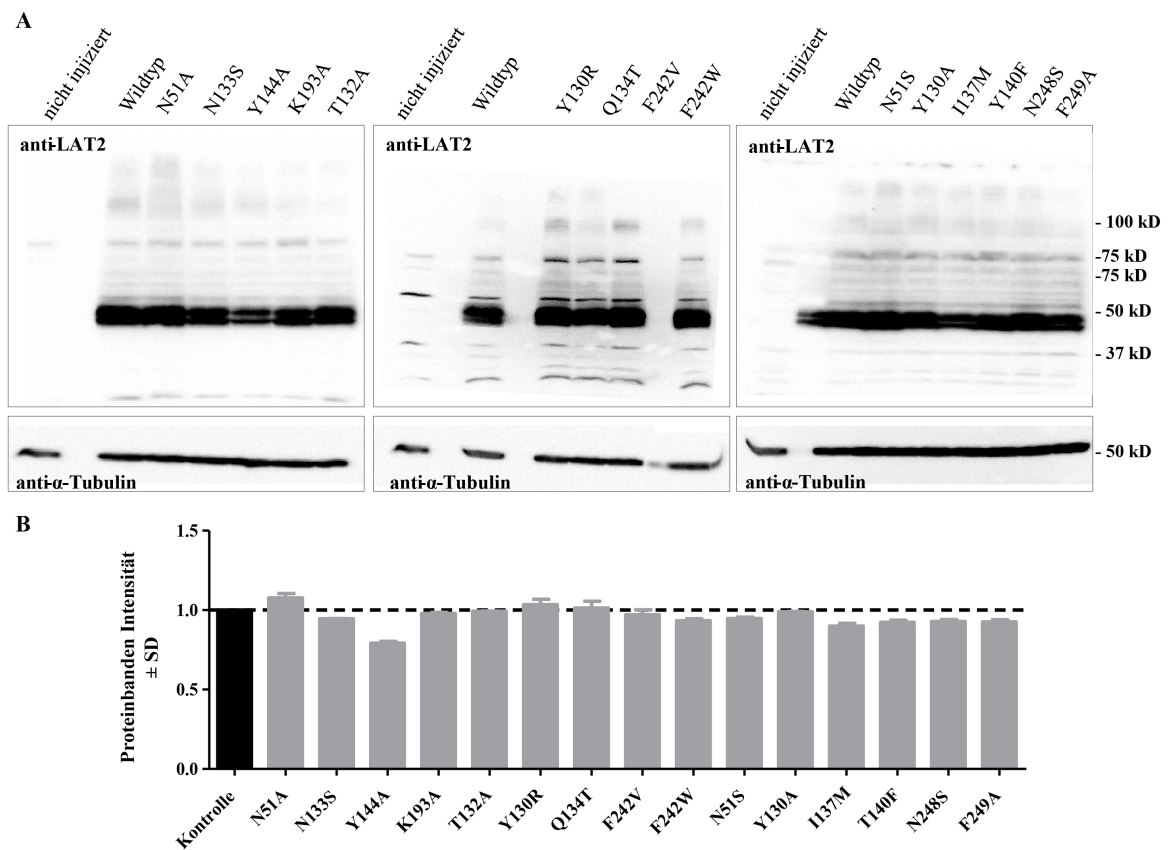


Abbildung 4.13: Immunfärbung des Lysats der LAT2/CD98 koinjizierten Oozyten. A, Eine repräsentative Expressionsanalyse der LAT2-Varianten in *Xenopus laevis* Oozyten im Vergleich zum WT. Zwei Tage nach Injektion wurde das Zelllysats auf LAT2- und α -Tubulin-Expression untersucht. Die Ergebnisse wurden mit der Software ImageJ analysiert. B, Die Experimente wurden zweimal mit dem gleichen Ergebnis durchgeführt. Die Daten beider sind als Balkendiagramm \pm SD aufgetragen (Hinz et al., 2015).

4.3.4 Seitenkettenverkürzung ermöglicht die T₄ und verbessert die T₂ und T₃-Aufnahme

Um den Einfluss der Seitenkettenverkürzung in der Substrataufnahme zu charakterisieren, wurden Oozyten mit den LAT2-Varianten N51S, Y130A, N133S und N248S mit CD98 koinjiziert und verschiedene Substrate in der Aufnahme untersucht. Der WT wurde als Kontrolle eingesetzt und alle Werte wurden relativ zum WT angegeben. Die verkürzten Seitenketten zeigten eine Erhöhung des 3,3'-T₂-Transportes, während N51S und N248S nur eine zweifache Erhöhung aufweisen, zeigte die Mutante N133S eine Verdreifachung und die Mutante Y130A sogar eine achtfache Erhöhung (vgl. Abbildung 4.14 (A)). Anders sieht es für die größeren

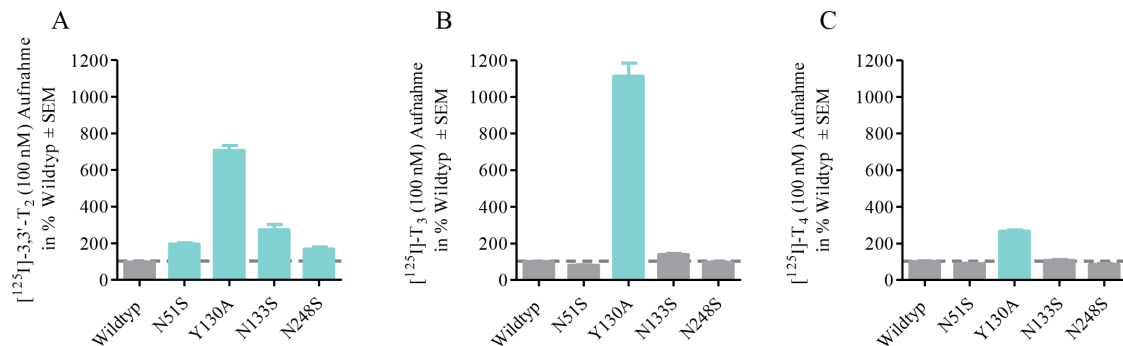


Abbildung 4.14: LAT2-Mutationen innerhalb des Transportkanals erleichtern die SDH-Aufnahme. Transportstudien von SDH in LAT2-Konstrukten und CD98 koinjizierten Oozyten (je 11,5 ng) nach 60 min Inkubation bei RT. Das Diagramm zeigt Mittelwerte von 10-15 Oozyten aus drei voneinander unabhängigen Experimenten. A) LAT2-Varianten mit erhöhter 3,3'-T₂-Aufnahme im Vergleich zum LAT2-WT: einzig LAT2-Y130A erhöht die Aufnahme; B) LAT2-Varianten mit erhöhter T₃-Aufnahme im Vergleich zum LAT2-WT (0,1 nM radioaktiv markiertes + 100 nM nicht radioaktiv markiertes T₃): einzig LAT2-Y130A ermöglicht die Aufnahme; C) LAT2-Varianten mit erhöhter T₄-Aufnahme im Vergleich zum LAT2-WT (2,7 nM radioaktiv markiertes + 100 nM nicht radioaktiv markiertes T₄): alleinige Aufnahme über LAT2-Y130A. Verändert nach (Hinz et al., 2017).

SDH-Moleküle aus: Nur die Mutation von Y130 zu Alanin bewirkt eine zehnfache Verbesserung der T₃-Aufnahme, dessen Transport im WT nur sehr schwach ist (vgl. Abbildung 4.14 (B)). Die Mutation ermöglicht sogar eine signifikante Erhöhung der T₄-Aufnahme, die im LAT2-WT garnicht möglich ist (vgl. Abbildung 4.14 (C)). Um Y130A zu verifizieren und um eine Orientierung des T₄ Moleküls im Homologiemodell vorherzusagen, wurde das T₄ Molekül in den Transportkanal an die potentielle Bindungsstelle manuell gedockt. In der Abbildung 4.15 wird eine mögliche Interaktion und Superposition von T₄ in LAT2 dargestellt. Die *in silico*-Analyse des T₄-Moleküls im Homologiemodell von LAT2 zeigt eine Blockierung des

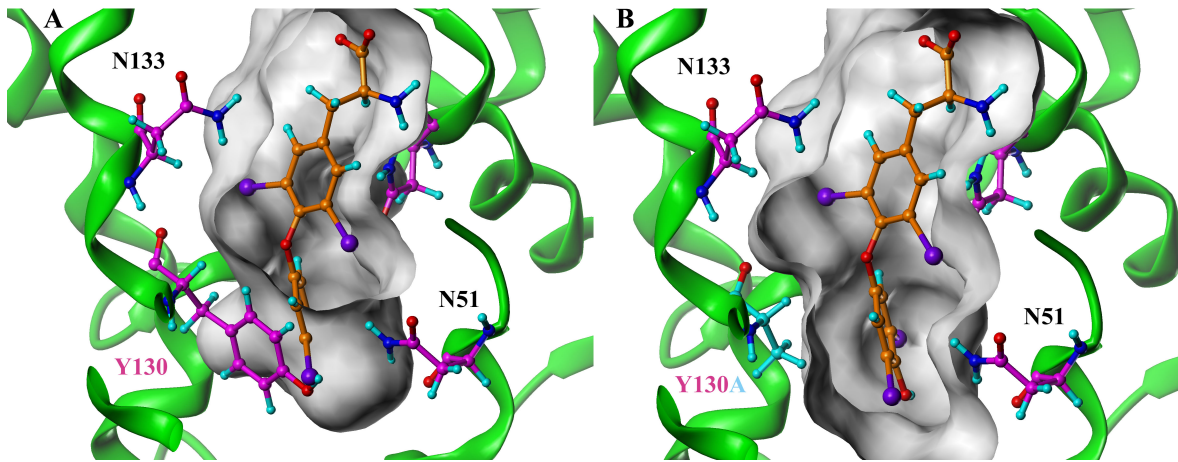


Abbildung 4.15: Eine mögliche T_4 (orange) Orientierung im Transportkanal vom LAT2-Modell (grün). Der Transportkanal (grau) wird u.a. durch die Residuen N51, Y130 und N133 (magenta) ausgekleidet, diese sind SDH-Aufnahme sensitiv. A, Die Seitenkette Y130 von LAT2-WT hindert sterisch das T_4 daran den Transportkanal zu passieren. Das Iod-Atom an 5'- oder 3'-Position des Phenyl-Rings überschreitet den vorhandenen Platz der Bindungstasche von LAT2-WT (graue Oberfläche) und stößt auf den aromatischen Ring der Tyr-Seitenkette. B, Das Modell von der LAT2-Y130A-Variante besitzt eine größere Bindungstasche wegen der verkürzten Seitenkette durch die Ala (cyan) Mutation. T_4 hat ausreichend Platz, das Molekül passt in die Bindungstasche und wird nicht mehr durch Tyr blockiert.

Transportkanals durch die Seitenkette Y130, indem es zur sterischen Hinderung durch den Phenylring des T_4 Moleküls kommt (vgl. Abbildung 4.15 (A)). Die Verkürzung der Seitenkette durch eine Mutation von Tyr zu Ala vergrößert zudem auch den Transportkanal. Die Öffnung des Kanals durch die Y130A Mutante ermöglicht den T_4 -Transport (vgl. Abbildung 4.15 (B)). Durch die Mutation kann das T_4 -Molekül nicht mehr von der kurzen Alanin Seitenkette sterisch blockiert werden. Nachdem die unterschiedlichen Substrate für verschiedene Mutanten getestet wurden, sollte noch der Einfluss der Mutanten auf die Substratbindung untersucht werden. Zunächst wurde hierfür eine Aufnahmekurve über die Zeit von 0 bis 120 min ermittelt. Es zeigte sich eine lineare Steigerung für WT (vgl. Abbildung 4.3) und Y130 (vgl. Abbildung 4.16) über den gesamten Zeitraum. 60 min lagen damit im linearen Bereich und wurden als Parameter für folgende Konzentrationskurven verwendet. Daraufhin wurden die LAT2-Konstrukte für 60 min mit Substraten von steigender Konzentration zwischen $0,1 \mu\text{M}$ und $40 \mu\text{M}$ inkubiert. Alle Messwerte wurden nach Subtraktion der Werte von nicht-injizierten Oozyten auf den entsprechenden V_{max} -Wert normalisiert und die Kinetikparameter anschließend über die Michaelis-Menten-Kinetik bestimmt. Zur Analyse der Konstanten wurden die Werte von WT und Y130A in der 3,3'- T_2 -Aufnahme zuverlässig bestimmt. Die Mutation reduziert den K_m -Wert auf $6,11 \mu\text{M}$ für Y130A, wohingegen der K_m -Wert des WTs bei etwa

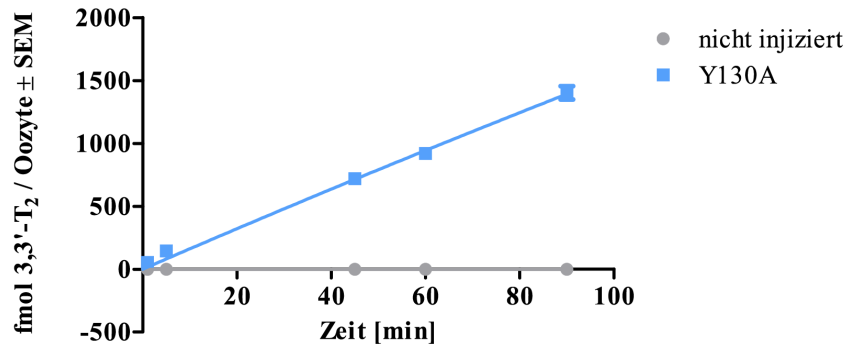


Abbildung 4.16: LAT2-Y130A zeigt keine Sättigung nach 90 minütiger T₂-Aufnahme Zeitaufnahmestudien von T₂ (0,1 μM) in LAT2-Y130A und CD98 koinjizierten Oozyten (je 11,5 ng) bei steigender Inkubationszeit. Das Diagramm zeigt den Mittelwert von 10-15 Oozyten. Die Werte der nicht-injizierte Oozyten dienten zur Kontrolle und wurden von den Y130A-Daten abgezogen.

16,24 μM liegt (vgl. Abbildung 4.17 (A)). Zusätzlich konnten für die Mutante Y130A die kinetischen Konstanten bei weiteren SDH bestimmt werden, die für den WT nicht ermittelt werden können, da SDH nur sehr gering oder gar nicht über den WT transportiert werden. Die Kurve zeigt in der T₃-Messung eine leichte Sättigung der Substrataufnahme, jedoch ist für T₄ fast nur eine ansteigende Gerade zu erkennen (vgl. Abbildung 4.17 (D)). Die Parameter konnten jedoch nicht eindeutig bestimmt werden, da die Aufnahmekurve von T₃ und T₄ nicht in der Sättigung liegt.

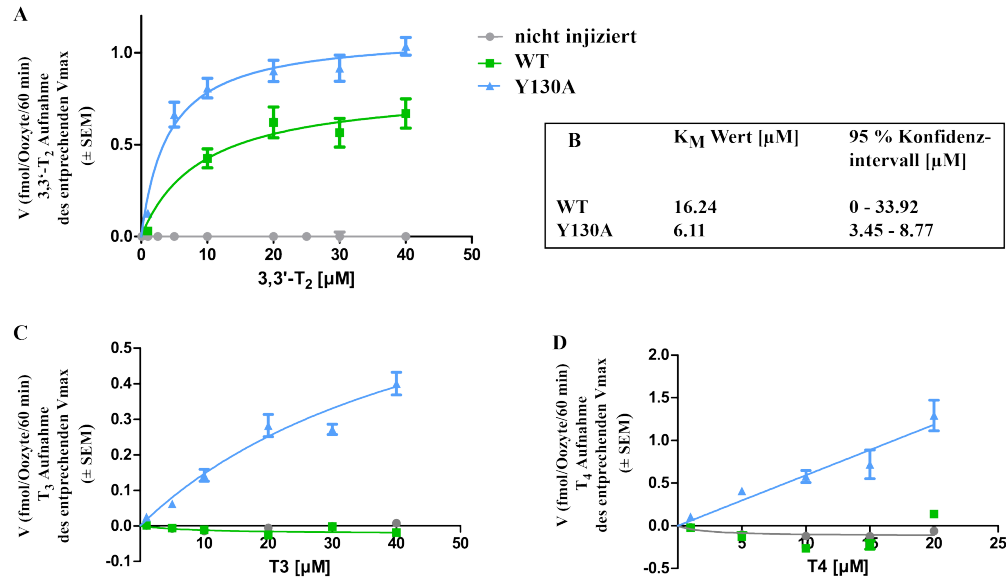


Abbildung 4.17: LAT2-Mutationen verbessern die Affinität und die Transportgeschwindigkeit. Konzentrationsaufnahmestudien von SDH in LAT2-WT, -Y130A und CD98 koinjizierten Oozyten (je 11,5 ng) nach 60 min Inkubation mit steigenden SDH-Konzentrationen von 0,1 μM - 40 μM. Das Diagramm zeigt den Mittelwert von 10-15 Oozyten aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen. Michaelis-Menten-Kurve von A, LAT2-WT (grün), -Y130A (cyan) für die 3,3'-T₂-Aufnahme B, die Ableitung derer Konstanten. C, Kurve von LAT2-WT und Y130A für die T₃-Aufnahme sowie D, für die T₄-Aufnahme. Alle Daten wurden nach Subtraktion der Messwerte von nicht-injizierten Oozyten (grau) auf den entsprechenden V_{max}-Wert normalisiert. Verändert nach (Hinz et al., 2017).

4.3.5 Nur die Seitenkettenvergrößerung von F242 ermöglicht eine verbesserte T₂-Aufnahme

Auf der Basis des LAT2-Homologiemodells wurden Aminosäurereste im Transportkanal ausgewählt und durch Verkürzung der Seitenketten mehr Platz geschaffen. Eine Vergrößerung der Seitenkette verkleinert den Transportkanal und würde eigentlich eine Verschlechterung des Substrattransports bewirken. Die Mutation von Phe²⁴² zum größeren Trp führt stattdessen zu einer Erhöhung der 3,3'-T₂-Aufnahme. Bei Änderung der aromatischen Eigenschaft durch eine Mutation von Phe²⁴² zum hydrophoben, kleineren Val führt dies zu einem verringerten 3,3'-T₂-Import. Die Mutation zu Trp erhält offensichtlich die Funktion und erhöht sogar den 3,3'-T₂-Import, obwohl Trp den Transportkanal verkleinert und dadurch theoretisch weniger Platz für das große 3,3'-T₂-Molekül wäre (siehe Abbildung 4.14). Das LAT2-Modell zeigt hier

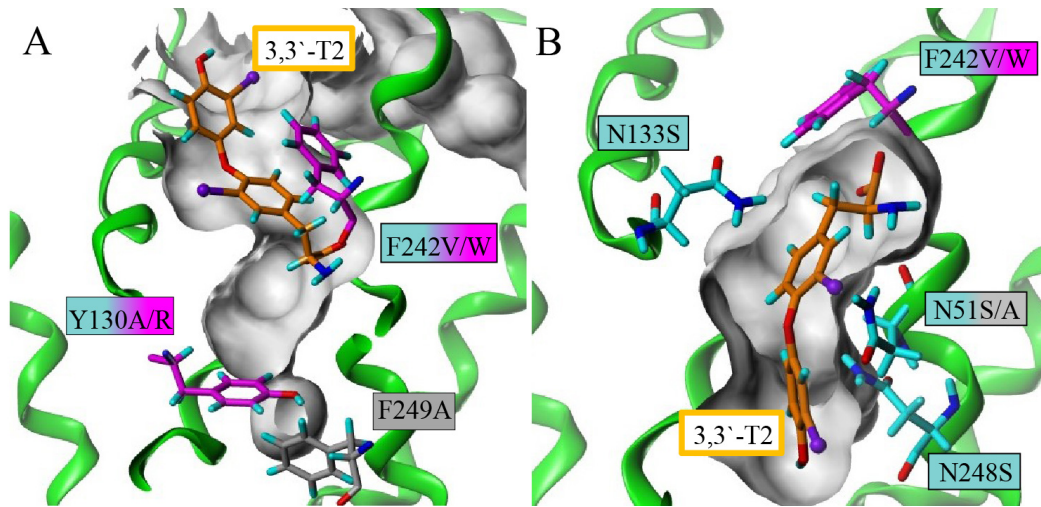


Abbildung 4.18: Phe²⁴² übernimmt eine mögliche Gate-Funktion. Im LAT2-Homologiemodell (grün) ist ein 3,3'-T₂ (orange) innerhalb des Transportkanals (grau) dargestellt. A, Phe²⁴² interagiert über aromatische π -System Wechselbeziehungen mit 3,3'-T₂ beim Eintauchen in den Transportkanal. Die Substitution von Tyr¹³⁰ zu Arg und Phe²⁴² zu Valin führt zu einer verschlechterten 3,3'-T₂-Aufnahme (magenta). B, Die Mutante F242W verstärkt die aromatische π -System Wechselbeziehungen und es resultiert ein erhöhter 3,3'-T₂-Transport. Phe²⁴² bildet im Substrat-gebundenen Zustand einen Deckel über der Bindungstasche von 3,3'-T₂. Die Verkürzung der Asn-Seitenketten durch eine Ser-Mutation resultiert in einer erhöhten SDH-Aufnahme (cyan).

eine mögliche π -Bindung mit dem Substrat auf der extrazellulären Transporter-Seite, die nur durch Phe²⁴² oder Trp²⁴² unterstützt werden könnte (Abbildung 4.18 (A)). Erkennbar ist, dass 3,3'-T₂ im Transportkanal gebunden ist und der aromatische Ring von Phe²⁴² oder die Mutation zu Trp fähig sind, den Kanal zu verschließen. Damit wäre die aromatische Funktion unmittelbar an der *Gating*-Funktion des Substrattransports beteiligt; zumindest ist dies für den SDH-Import ersichtlich (Abbildung 4.18 (B)). Außerdem erfolgte für die Mutante F242W die Bestimmung der kinetischen Parameter der 3,3'-T₂-Aufnahme, die wie zuvor erläutert, durchgeführt wurde. In der Grafik 4.19 ist die berechnete Michaelis-Menten-Kurve abgebildet. Es zeigt sich sowohl ein steiler Anstieg für F242W (cyan) als auch ein höheres Sättigungsplateau im Gegensatz zu LAT2-WT (grün). Die betrachtete LAT2-Variante weist demnach auch mit 3,78 μ M einen besseren K_m -Wert als WT auf.

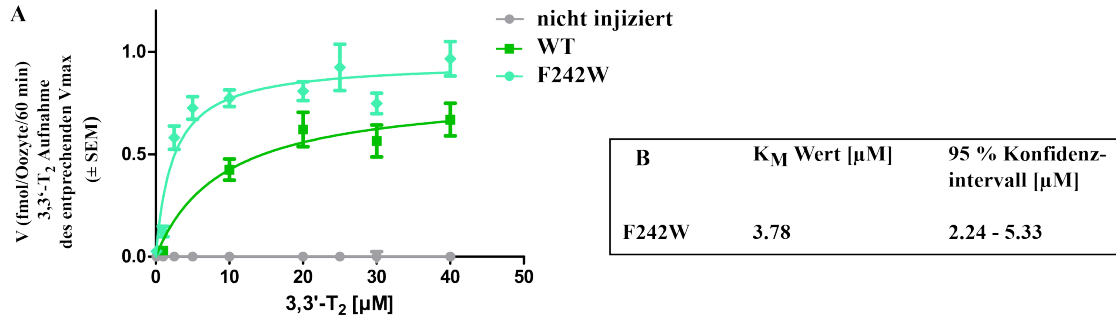


Abbildung 4.19: LAT2-F242W verbessert die Affinität und die Transportgeschwindigkeit. Konzentrationsaufnahme von $3,3'$ - T_2 in LAT2-WT, -F242W und CD98 koinjizierten Oozyten (je 11,5 ng) nach 60 min Inkubation mit steigenden $3,3'$ - T_2 -Konzentrationen von 0,1 μM - 40 μM . Das Diagramm zeigt eine Kurve von 10-15 Oozyten aus drei voneinander unabhängigen Versuchen. A, Michaelis-Menten-Kurve von LAT2-WT (grün) und F242W (cyan) für die $3,3'$ - T_2 -Aufnahme und B, der errechneten Konstante. Alle Daten wurden nach Subtraktion der Messwerte von nicht-injizierten Oozyten auf den entsprechenden V_{max} -Wert relativiert.

4.3.6 LAT2-Mutationen zeigen im Vergleich zur Aufnahme der SDH ein unterschiedliches Aufnahmeprofil für Aminosäuren

Es folgte die Analyse der LAT2-Varianten im Aminosäuretransport. Dazu wurden zwei für LAT2-WT typische Aminosäuren ausgewählt und deren Aufnahme nach 60 min in koinjizierten Oozyten bestimmt. Der Import wurde für die Aminosäuren Leu und Phe mit der Konzentration von 100 nM (Abbildung 4.20 (A, B)) durchgeführt. Besonders interessant waren diejenigen LAT2-Varianten, die eine gesteigerte 3,3'-T₂-Aufnahme zeigten (N51S, Y130A, N133S, F242W und N248S). Alle Daten wurden nach Subtraktion der Messwerte von nicht-injizierten Oozyten auf den WT relativiert. Die Ergebnisse zeigten einen gleichbleibenden Leu-Import mit Ausnahme von N51S und N248S. N51S zeigte eine etwa 50 % reduzierte Aufnahme von Leu und N248S eine Verringerung von circa 60 %. Bei der Aufnahme von Phe stellte sich im Gegensatz dazu nur für N51S eine kleinere Verringerung von 40 % im Vergleich zum LAT2-WT dar.

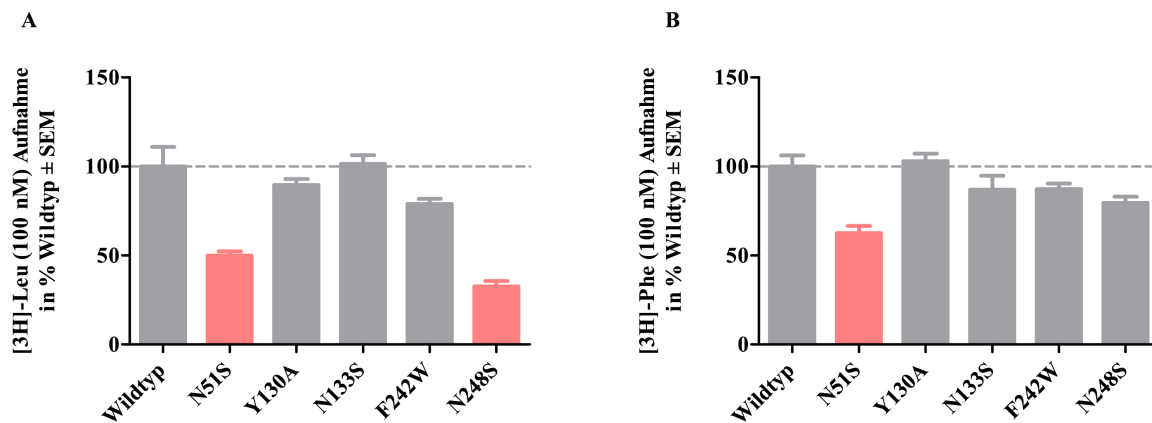


Abbildung 4.20: LAT2-Mutationen innerhalb des Transportkanals zeigten eine unveränderte Aminosäureaufnahme. Transportstudien von Aminosäuren in LAT2-Konstrukten und CD98 koinjizierten Oozyten (je 11,5 ng) nach 60 min Inkubation bei RT. Die Diagramme zeigen Mittelwerte von 10-15 Oozyten aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Aufnahmeexperimente mit 10 nM radioaktiv markiertem und 90 nM nicht markiertem Substrat weisen A) für Leu bei N51S und N248S eine stark reduzierte Aufnahme und B) für Phe nur bei N51S eine 40 % verminderte Aufnahme im Vergleich zu LAT2-WT nach. Alle Daten wurden nach Subtraktion der Messwerte von nicht-injizierten Oozyten auf den WT relativiert.

4.4 Inhibitionsuntersuchungen: Substratvariationen ermitteln putative Substrateigenschaften für LAT2

Um die Substrat-Charakterisierung von LAT2 aufzuklären, wurde die Aufnahme von 3,3'-T₂ in Anwesenheit unterschiedlicher Substrate experimentell bestimmt. Alle Inhibitionsexperimente wurden in LAT2 und CD98 koinjizierten Oozyten (je 23 ng) für 60 min bei RT durchgeführt. Die Durchführung der Experimente erfolgte durch die Masterstudentin Katja Meyer. Es wurden unterschiedliche Gruppen betrachtet, die entweder eine Variation in der Aminosäurefunktion besitzen oder hydrophobe Erweiterungen unmittelbar nach der Aminosäuregruppe und zwischen dem aromatischen Tyrosin-Ring aufweisen. Eine weitere Gruppe betrachtete die möglichen Substituenten am Tyrosin-Ring an Position 3 und 5. Zudem wurde die Gruppe mit Variation an der Position 3' und 5' des Phenyl-Rings analysiert. Durch die Iod-Substitution ergibt sich eine unterschiedliche Flexibilität der Substrate, die auch eine wichtige Rolle für die Substrat-Charakterisierung spielt.

4.4.1 NH₂ und COO⁻ der Aminosäurefunktion sind essentiell für den Substrattransport

Zunächst wurde das SDH-Derivat 3-T1 und davon abgewandelte, analoge Strukturen ohne die Aminogruppe 3-T1-AM oder ohne die Carboxylgruppe 3-T1-Ac für die Inhibitionsstudien verwendet (Abbildung 4.21 (E, Bereich A)). Ebenso wurden die Amide, Substrate S13 und S14, untersucht, die anstelle einer Carboxylgruppe eine Carbonylverbindung besitzen. Mit diesen Substraten wurde die Aufnahme von 3,3'-T₂ kompetitiv inhibiert (siehe Abbildung 4.21 (A)). Die interne Kontrolle (3,3'-T₂) zeigt eine Substratinhibition von 50 % und für 3-T1 eine Hemmung von etwa 40 % (Kinne et al., 2015). Die Substrate mit Veränderung an der Aminosäuregruppe können alle die Aufnahme von 3,3'-T₂ nicht kompetitiv inhibieren. Die Anwesenheit der Substrate führt zu einer unveränderten 3,3'-T₂-Aufnahme, mit Ausnahme von 3-T1-Ac, welches den 3,3'T₂-Import um 40 % erhöht (Hinz et al., 2015).

4.4.2 Keine Inhibition von Substraten mit räumlich großen, hydrophoben Erweiterungen

Im Anschluss an die Analyse der Aminosäurefunktion wurde die hydrophobe Erweiterung in Form von Methyl- oder Isopropylresten unmittelbar hinter der funktionellen Gruppe am

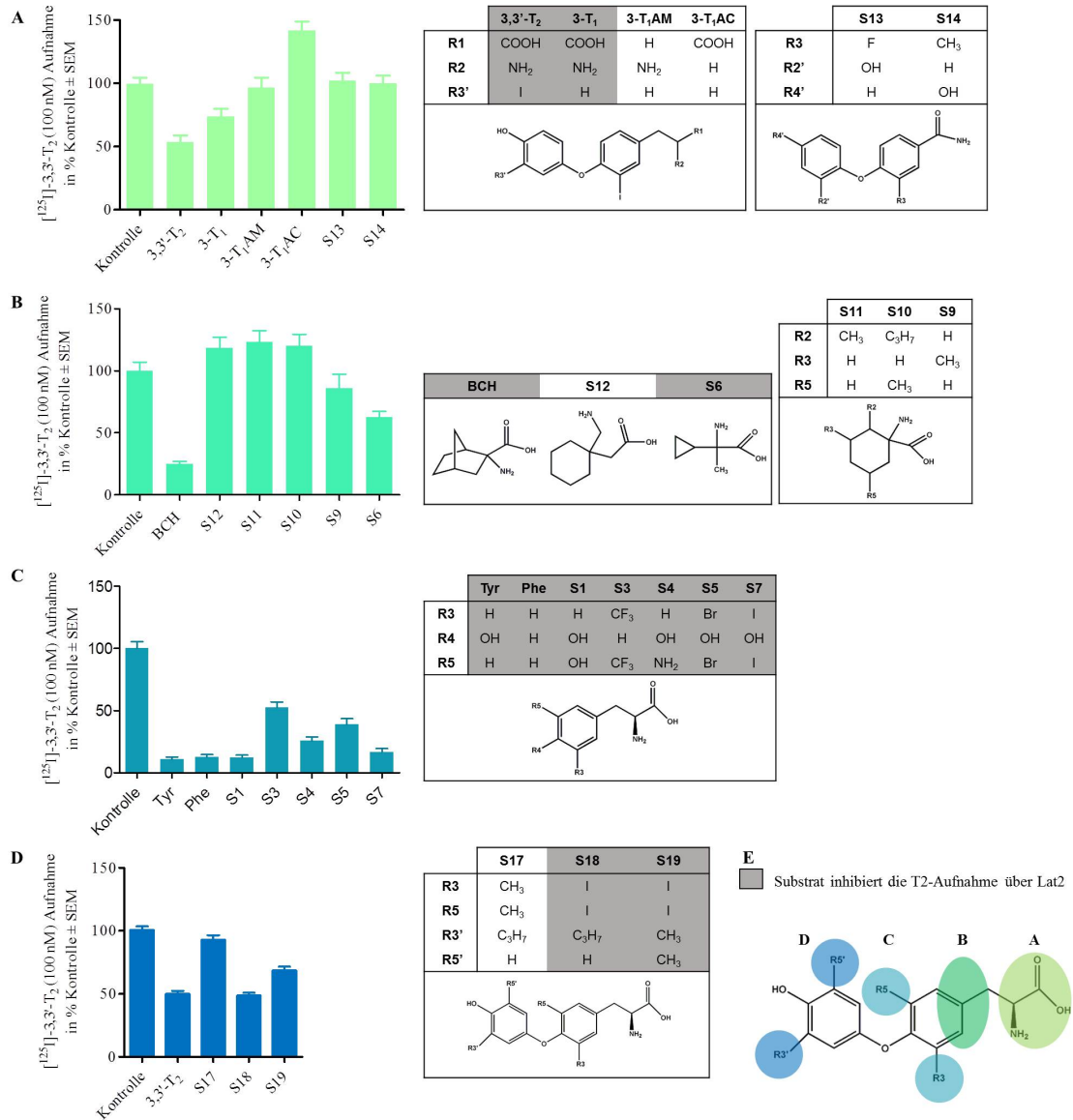


Abbildung 4.21: Kompetitive Hemmung des 3,3'-T₂-Transports mit Substratvarianten. Substrate A, mit Variation an der funktionellen Aminosäuregruppe, B, mit hydrophoben Erweiterungen, C, mit Substituenten an den Positionen 3 und 5 des Tyrosin-Rings und D, mit Substituenten an den Positionen 3' und 5' des Phenyl-Rings. Die Aufnahme von 3,3'-T₂ (100 nM) in koinjizierte Oozyten. Experimente wurden in Gegenwart von o.a. Substraten (A: 10 μM; B, C und D: 1 mM) durchgeführt. Die Hemmungsdaten zeigen den Mittelwert von 10-15 Oozyten ± SEM aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Normalisierung auf die Kontrolle erfolgte nach Subtraktion der nicht-injizierten Oozyten. E, Substratvariation der Gruppen A-D. Verändert nach (Hinz et al., 2015).

ersten Ring betrachtet (Abbildung 4.21 (E, Bereich B)). Dazu wurden die Substrate S6 und S9-S12 zur kompetitiven Inhibition der 3,3'-T₂-Aufnahme verwendet. Die zu untersuchenden Substrate besitzen eine Amino- und eine Carboxylgruppe an einem Cyclohexanring. Einzig das Substrat S12 besitzt eine andere Konformation im funktionellen Bereich, denn der Abstand zwischen der Amino- und Carboxylgruppe ist größer als bei BCH, dem bekannten LAT-Inhibitor, und den anderen Testsubstraten. Dagegen besitzt das S6 ebenfalls beide funktionellen Gruppen, aber hat einen kleineren Propyl-Ring. Die Ergebnisse zeigten, dass die Substrate S10-S12 nicht in der Lage sind, die Aufnahme von 3,3'-T₂ durch LAT2 kompetitiv zu hemmen. Es liegt hier eine geringfügig erhöhte Aufnahme von 3,3'-T₂ vor (siehe Abbildung 4.21 (B)). S9 mit seinem Methylrest in meta-Stellung weist eine leichte Verringerung des 3,3'-T₂-Imports um etwa 15 % auf. Ebenso zeigt das Substrat S6 eine 40 %ige Reduktion der 3,3'-T₂-Aufnahme (Hinz et al., 2015).

4.4.3 Große Substituenten am Tyrosin-Ring erlaubt

In den nächsten Experimenten wurde der erste aromatische Ring betrachtet. Es wurden Substrate untersucht, die im Vergleich zu Phe und Tyr an den Positionen 3 und 5 unterschiedliche Substituenten wie Hydroxy-, Trifluormethyl- oder Aminogruppen, aber auch Brom- oder Iod-Atome besitzen (Abbildung 4.21 (E, Bereich C)). Im Diagramm 4.21 C dargestellt, reduzieren alle verwendeten Substrate den 3,3'-T₂-Import unterschiedlich stark. In Anwesenheit von S1 und S7 wird die Aufnahme sogar auf 10-15 % herabgesetzt, so wie es auch bei den Kontrollen (Phe, Tyr) der Fall ist. Bei Anwesenheit von S4 mit einer Aminogruppe in meta-Stellung können noch immer 25 % des angebotenen 3,3'-T₂ über LAT2 aufgenommen werden. Das Substrat S3 mit zwei Trifluormethylsubstitutionen bzw. S5 mit zwei Brom-Atomen reduzieren die 3,3'-T₂-Aufnahme weniger, jedoch immer noch um 50 bzw. 60 % (Hinz et al., 2015).

4.4.4 Iod-Substitution essentiell für SDH-ähnliche Substrate

Schließlich erfolgte die Untersuchung von Substraten, die Substituenten am Phenyl-Ring an Position 3' und 5' besitzen, aber auch Unterschiede am Tyrosin-Ring aufweisen (Abbildung 4.21 (E, Bereich D)). Die SDH-Analoga S17 und S18 sind T₃-Analoga. Das Substrat S17 hat gar keine Iod-Substitution, denn anstelle von Iod-Atomen am Tyrosin-Ring besitzt es je eine Methyl-Gruppe und an der 3'-Position sogar eine sperrige Isopropyl-Gruppe. Im Gegensatz dazu besitzt S18 nur eine Isopropyl-Gruppe an der Position 3' des Phenyl-Rings, ansonsten

ist es unverändert im Vergleich zum T₃-Molekül. Das S19-Molekül ist ein T₄-Analogon. Es hat anstelle von Iod-Atomen zwei Methyl-Gruppen an Position 3' und 5' am Phenyl-Ring substituiert. Die zu testenden Substrate S17-S19 besitzen alle eine unterschiedliche Flexibilität. Gleichermaßen wird die 3,3'-T₂-Aufnahme durch eine erhöhte 3,3'-T₂ Konzentration verdrängt und gilt damit als interne Funktionskontrolle (siehe Abbildung 4.21 (D)). Die Ergebnisse zeigten, dass S17 ohne eine Iod-Substitution keine Reduktion der 3,3'-T₂-Aufnahme erreicht, während S18 mit zwei Iod-Atomen zu circa 50 % inhibiert. Sogar S19, welches an vier Positionen substituiert ist, zeigt eine leichte Hemmung von 25 % in Bezug auf die 3,3'-T₂-Aufnahme.

4.5 Inhibitionsuntersuchungen von Substratvarianten kombiniert mit LAT2-Varianten

Es sollte aufgeklärt werden, ob eine Verkürzung der Seitenkette einen Einfluss auf den Transport von durch den WT nicht transportierte SDH (u.a. T₄) und von BCH-ähnlichen Substanzen hat. Darüber hinaus sollte herausgefunden werden, ob sperrige Substituenten an den aromatischen Ringen der SDH-Derivate einen Einfluss auf die Substrat-Flexibilität haben können und somit Hinweise auf mögliche Substratorientierungen geben. Im Anschluss an die Untersuchungen des LAT2-WTs wurden die kompetitiven Hemmungsstudien von 3,3'-T₂ an den Varianten von LAT2 durchgeführt. Die Durchführung der Experimente erfolgte durch den Masterstudenten Dominik Neef. Es wurden nur die Mutanten betrachtet, die eine Erhöhung des 3,3'-T₂-Transports aufzeigten (N51S, Y130A, N133S und F242W). Zudem wurde der mögliche Einfluss von Iod auf den Transport von SDH durch kompetitive Hemmungsstudien mit Verbindungen, die Variationen in der Anzahl der Iod-Atome besitzen, untersucht. Alle Experimente wurden in Oozyten durchgeführt.

4.5.1 Substrat-Flexibilität und Iod-Substitution inhibieren die 3,3'-T₂-Aufnahme kompetitiv bei LAT2-Varianten

Im Fokus für dieser Analyse stand die Mutationen Y130A, welche in der Lage ist, sperrige SDH zu importieren, und F242W, welche nach Seitenkettenvergrößerung gegensätzliche Ergebnisse bei der 3,3'-T₂-Aufnahme zeigte. Es sollte getestet werden, ob die Mutante Y130A bei Hemmungsstudien von SDH-ähnlichen Substraten mit Variationen der Substituenten an

den Positionen 3, 5 und 3', 5' einen positiven Einfluss im Vergleich zum WT hat. Die Ergebnisse der Aufnahme von 3,3'-T₂ in kompetitiver Hemmung sind exemplarisch für Y130A und F242W in Abbildung 4.22 (A) dargestellt und numerisch in der Tabelle 4.23 eingetragen. S17 besitzt keinen Iod-Substituenten und hemmt die Aufnahme von 3,3'-T₂ beim WT nicht, jedoch inhibiert es die 3,3'-T₂-Aufnahme bei LAT2-Y130A um etwa 30 %. Währenddessen besitzt S18 zwei Iod-Atome am Tyrosin-Ring und konkurriert mit 3,3'-T₂ sowohl beim WT als auch bei der Y130A-Mutante. Hierbei sind Hemmungen von 40-50 % messbar. Auch die

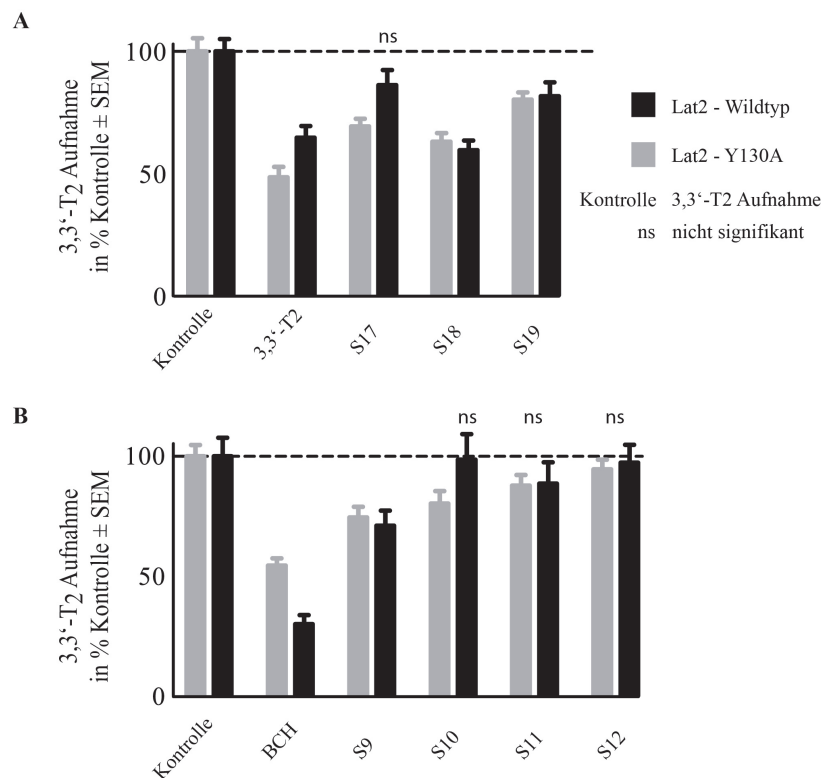


Abbildung 4.22: Kompetitive Hemmung mit Substratvariationen an LAT2-Y130A. Aufnahme von radioaktiv markiertem 3,3'-T₂ (100 nM) in *Xenopus laevis* Oozyten koinjiziert mit cRNA von LAT2 oder LAT2-Varianten und CD98 (jeweils 11,5 ng) über die Dauer von 60 min bei RT. Die Experimente wurden in Anwesenheit der genannten Substrate bei einer Konzentration der SDH-Derivate von 10 μ M und BCH oder AS von 1 nM durchgeführt. Die Diagramme zeigen die Mittelwerte von jeweils 10-15 Oozyten \pm SEM aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Die Daten wurden nach Subtraktion der Messwerte von nicht-injizierten Oozyten auf die Kontrolle normalisiert, welche ausschließlich die Aufnahme von 3,3'-T₂ widerspiegelt.

Substanz S19 besitzt zwei Iod-Atome am Tyrosin-Ring. Sie weist aber zusätzlich zwei Methyl-Gruppen am Phenyl-Ring auf und ist dadurch sperriger als S18. Trotzdem hemmt S19 den 3,3'-T₂-Import beim WT und bei der Mutante gleichermaßen zu annähernd 25 %. Um fest-

zustellen, ob Iod Auswirkungen auf den Transport von SDH hat, wurde die Mutante F242W nahe der Erkennungsstelle analysiert. Das Substrat S7 und Phe, die eine zueinander ähnliche Struktur aufweisen, wurden zusätzlich zu den drei oben betrachteten Substraten in die Hemmungsstudie mit einbezogen. S7 besitzt im Gegensatz zu Phe zwei Iod-Atome an Position 3 und 5, jedoch zeigten beide Substrate eine gleich starke Inhibition der T₂-Aufnahme von fast 100 %. F242W zeigt für S17, das Substrat ohne Iod als Substituent, fast keine Hemmung des Transports von 3,3'-T₂ (10 %), aber eine starke Hemmung von 50 % für S18, das als Unterschied eine Iod-Substitution an Position 3 und 5 besitzt. Alleine S19 zeigt keinen Unterschied in der Hemmung zwischen F242W und WT. Jedoch konkurriert S19 zu etwa 25 % in beiden Varianten mit 3,3'-T₂ mehr als das Substrat S17 in den beiden Varianten.

4.5.2 3,3'-T₂-Inhibition bei LAT2-Varianten durch BCH verringert und durch BCH-ähnliche Substrate erhöht

Vier LAT2-Varianten wurden darauf getestet, ob die Vergrößerung der Bindungstasche an den genannten Positionen auf eine Aufnahme von den Substraten S9, S10, S11 und S12 schließen lassen kann. Es sollte ebenfalls untersucht werden, ob die Mutante F242W mit einer verkleinerten Bindungstasche einen negativen Einfluss auf den Transport hat. Alle Ergebnisse der Hemmungsstudie mit BCH und BCH-Derivaten sind in der Tabelle 4.23 aufgelistet und zeigen den Mittelwert der Messwerte von 10-15 Oozyten aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Die Mutante Y130A ermöglicht S10 mit 3,3'-T₂ zu konkurrieren und zeigt einen signifikanten Unterschied zum WT, während die Inhibition von 3,3'-T₂ durch S9 unverändert bleibt. Insbesondere hemmt der spezifische LAT-Inhibitor BCH den Transport des 3,3'-T₂ in der Variante-Y130A weniger effektiv als im WT, obwohl der Transportkanal durch die Mutation von Tyr zu Ala vergrößert wird. Interessanterweise zeigt auch N133S eine noch stärker verminderte Inhibition von 3,3'-T₂ durch BCH (hemmt 30 %), während Substrate wie S10, S11 und S12 die Aufnahme von 3,3'-T₂ um 13-22 % stärker kompetitiv inhibieren als beim WT. Hervorzuheben ist außerdem F242W: Obwohl diese Mutante einen verengten Transportkanal aufweist, ist sogar eine erhöhte 3,3'-T₂-Hemmung von rund 30 % durch die Substrate S10, S11 und S12 festzuhalten. Die Mutante N51S zeigt durch den Inhibitor BCH keine Veränderung beim 3,3'-T₂-Import im Vergleich zum WT, jedoch konkurrieren S10 und S12 mit 3,3'-T₂ zu etwa 20 % um den Transport.

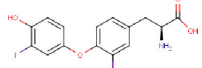
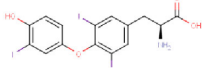
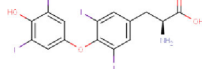


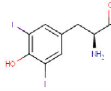

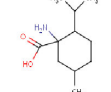


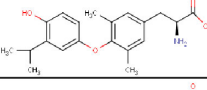
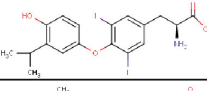
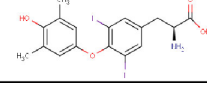
ID	Molekülname	Molekülstruktur	LAT2-WT	Y130A	N133S	F242W
T2	3,3'-Diodo-L-thyronin		43,4 ± 4,5	51,4 ± 4,1		82,8 ± 1,2
T3	3,3',5-Triiodo-L-thyronin		51,6 ± 5,7	30,5 ± 3,2		83,0 ± 1,5
T4	3,3',5,5'-Tetraiodo-L-thyronin		22,1 ± 2,8	29,1 ± 5,9		
BCH	2-Aminobicyclo-(2,2,1)-heptan-2-carbonsäure		66,8 ± 3,7	45,5 ± 3,0	28,2 ± 2,8	72,8 ± 1,5
Phe	L-Phenylalanin		94,4 ± 0,8			98,0 ± 0,8
S7	3,5-Diiodo-L-tyrosin		91,6 ± 1,3			99,1 ± 0,3
S9	1-Amino-3-methylcyclohexan-1-carbonsäure		28,8 ± 6,2	25,4 ± 4,4	23,7 ± 2,9	27,3 ± 4,9
S10	1-Amino-5-methyl-2-(propan-2-yl)cyclohexan-1-carbonsäure		1,1 ± 10,6	19,7 ± 5,2	15,9 ± 2,4	29,3 ± 3,5
S11	1-Amino-2-methylcyclohexan-1-carbonsäure		11,4 ± 8,9	12,2 ± 4,4	13,1 ± 3,1	32,7 ± 3,1
S12	1-(Aminomethyl)cyclohexylessigsäure		2,6 ± 7,5	5,4 ± 4,0	22,1 ± 2,3	25,1 ± 3,9
S17	3'-Isopropyl-3,5-dimethyl-L-thyronin		13,9 ± 6,2	30,6 ± 3,1		7,0 ± 3,8
S18	3'-Isopropyl-3,5-diiod-L-thyronin		40,4 ± 4,0	36,9 ± 3,6		60,0 ± 3,3
S19	3,5-Diiodo-3',5'-dimethyl-L-thyronin		18,3 ± 5,6	19,7 ± 2,9		27,9 ± 3,3

Abbildung 4.23: Die kompetitiven Inhibitionsuntersuchungen mit unterschiedlichen Substratvariationen an LAT2-Varianten. Aufnahme von radioaktiv markiertem 3,3'-T₂ (100 nM) in *Xenopus laevis* Oozyten koinjiziert mit cRNA von LAT2 oder LAT2-Varianten und CD98 (jeweils 11,5 ng) über die Dauer von 60 min bei RT. Die Experimente wurden in An- und Abwesenheit der genannten Substrate bei einer Konzentration der SDH-Derivate von 10 μM und BCH oder AS von 1 nM durchgeführt. Die Tabelle gibt die Mittelwerte von jeweils 10-15 Oozyten ± SEM aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Experimenten an. Die Daten wurden nach Subtraktion der Messwerte von nicht-injizierten Oozyten auf die Kontrolle normalisiert, welche ausschließlich die Aufnahme von 3,3'-T₂ widerspiegelt. Verändert nach (Hinz et al., 2017).

4.6 Charakterisierung der Substratabgabe über den LAT2

Bisher war die Rolle von LAT2 sowohl in der Aufnahme als auch in der Abgabe von SDH unklar. Die vorangegangenen Arbeiten identifizierten lediglich die Aufnahme von SDH. Im Folgenden wurden Abgabestudien durchgeführt, um den SDH-Efflux über LAT2 aufzuklären. Der Verlauf der Experimente erfolgte analog zum Aufnahme-Assay, allerdings mit dem Unterschied, dass nach der Präinkubation der Oozyten diese nicht detektiert, sondern in einen Substrat-haltigen Puffer überführt und schließlich das in den Puffer abgegebene radioaktiv markierte Substrat bestimmt wurde.

4.6.1 Abgabestudien mit L-[³H]-AS über LAT2 in Oozyten

Zur Etablierung des Efflux-Assays wurden die Experimente zunächst mit den AS durchgeführt. Für AS ist bekannt, dass sie über LAT2 in beide Richtungen transportiert werden, während die Abgabe von SDH noch nicht untersucht wurde. Die LAT2/CD98 koinjizierten Oozyten wurden zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (10 und 60 min) mit radioaktiv markiertem Leu beladen und im Anschluss erfolgte eine zeitabhängige Abgabemessung für 1 - 30 min. Die Diagramme zeigen je eine exemplarisch repräsentative Kurve und geben die Mittelwerte von jeweils 10-15 Oozyten \pm SEM aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten an. Nach zehn minütiger Präinkubation mit Leu zeigt die Efflux-Kurve für den WT eine streng monotone Rechtskurve, wobei das Wachstum über die Zeit abnimmt. Der Unterschied zu den nicht-injizierten Oozyten wächst über die Zeit und ist für den WT nach 20 min sechsfach höher (Abbildung 4.24 (A)). Der Leu-Export, der nach 60 min Präinkubation zu messen ist, zeigt nach 20 min einen 30-fachen Unterschied von WT zu nicht-injizierten Oozyten. Die Kurve des WT's flacht nach 30 min andauerndem Efflux stark ab und endet in einer Plateau-Phase. Ein äquivalentes Experiment wurde mit Phe durchgeführt. Die Beladung erfolgte für 60 min mit 100 μ M radioaktiv markiertem Phe. Die zeitabhängige Abgabe wurde mit 1 nM Leu transstimuliert. Interessanterweise ist der Efflux durch die nicht-injizierten Oozyten zehnfach höher als bei den Analysen mit Leu (vgl. Abbildung 4.25). Des Weiteren zeigte sich, dass die Unterschiede zwischen nicht-injizierten und WT injizierten Oozyten sehr gering sind. Die nicht-injizierten Oozyten erreichen die Plateau-Phase bei etwa 3500 DPM \pm SEM; der WT bei etwa 6500 DPM \pm SEM. Nach 20 min zeigt die Kurve eher einen Abfall des Phe-Exports.

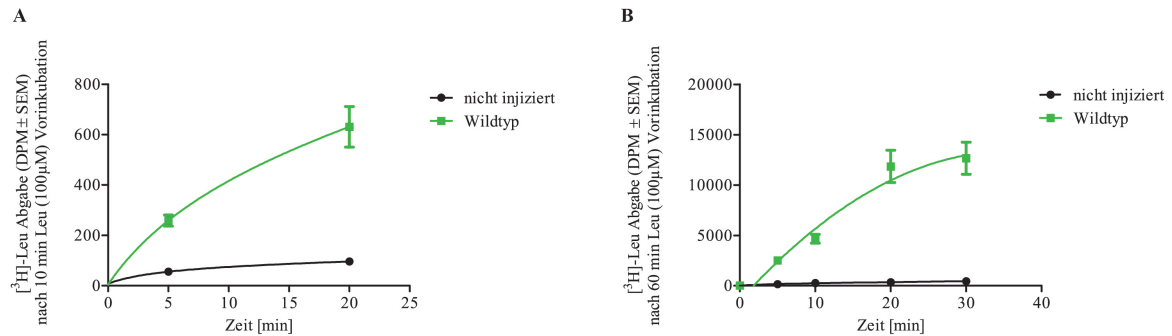


Abbildung 4.24: Freisetzung von radioaktiv-markiertem Leu wurde zeitabhängiger in LAT2/CD98 exprimierenden *Xenopus laevis* Oozyten bestimmt. Die Freisetzung von radioaktiv markiertem Leu wurde zeitabhängig in LAT2/CD98 exprimierenden *Xenopus laevis* Oozyten bestimmt. Die Beladung der Oozyten mit $[^3\text{H}]$ Leu ($100 \mu\text{M}$) erfolgte zuvor über die Dauer von A, 10 min oder für B, 60 min. Die Abgabe nach 1-30 min wurde in Anwesenheit von 1 nM Phe transstimuliert. Das Diagramm zeigt exemplarisch eine repräsentative Kurve und gibt die Mittelwerte von jeweils 10-15 Oozyten \pm SEM aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten an.

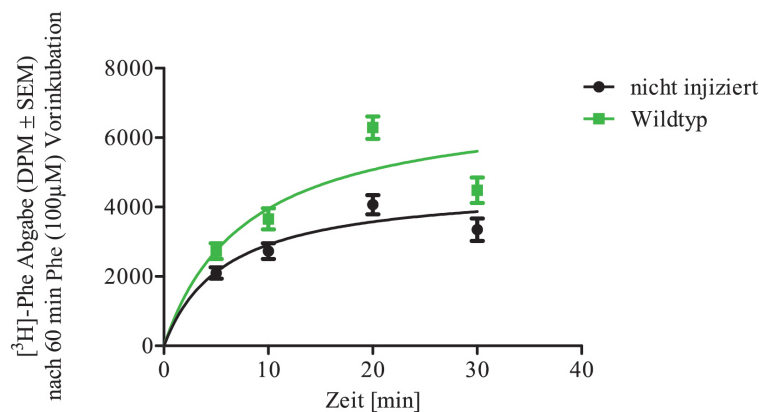


Abbildung 4.25: Die Freisetzung von radioaktiv markiertem Phe wurde zeitabhängig in LAT2/CD98 exprimierenden Oozyten bestimmt. Die Beladung der Oozyten mit $[^3\text{H}]$ Phe ($100 \mu\text{M}$) erfolgte zuvor über die Dauer von 60 min. Die Abgabe nach 1-30 min wurde in Anwesenheit von 1 nM Leu transstimuliert. Das Diagramm zeigt exemplarisch eine repräsentative Kurve und gibt die Mittelwerte von jeweils 10-15 Oozyten \pm SEM aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten an.

4.6.2 Keine SDH-Abgabe (Efflux) über den LAT2 möglich

Um die Abgabe von SDH über LAT2 zu charakterisieren, wurden LAT2/CD98 koinjizierte Oozyten für 60 min mit 3,3'-T₂ (100 nM) präinkubiert. Es wurde nur 3,3'-T₂ ausgewählt, da aus vorangegangenen Experimenten hervorgeht, dass dieses SDH-Derivat zuverlässig über LAT2 aufgenommen wird, sodass die Beladung keine Barriere für die Untersuchungen darstellte. Der Efflux wurde nach 1-30 min in Anwesenheit von verschiedenen Substraten (Leu, Phe und 3,3'-T₂) transstimuliert. In der Abbildung 4.26 werden je eine exemplarische, repräsentative Kurve dargestellt. Angegeben werden die Mittelwerte von jeweils 10-15 Oozyten ± SEM aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Alle Kurven zeigen keinen oder nur einen geringen Unterschied der nicht-injizierten zu den WT injizierten Oozyten. Nur in Anwesenheit von Phe hebt sich ein kleiner Unterschied zwischen beiden Gruppen ab. Jedoch gleicht die Rechtskurve im Diagramm eher einer linearen Funktion und erreicht nach 30 min einen *counts per minutes* (cpm) Wert von etwa 30 (siehe Abbildung 4.26 (B)).

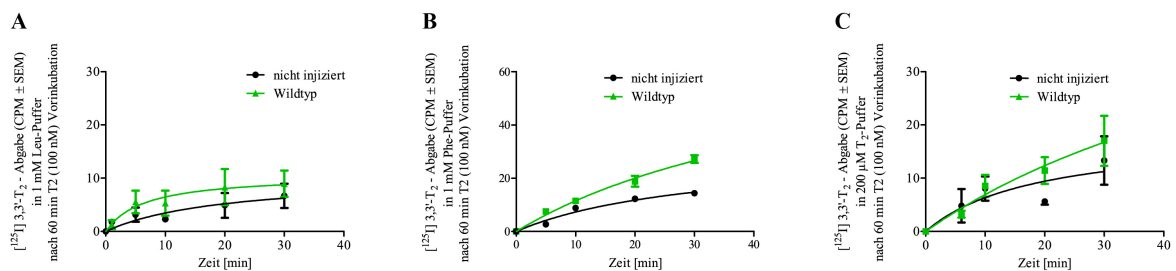


Abbildung 4.26: Keine Freisetzung von radioaktiv markiertem 3,3'-T₂ nach zeitabhängiger Bestimmung in LAT2/CD98 exprimierenden Oozyten. Die Beladung der Oozyten mit [¹²⁵I] 3,3'-T₂ (100 nM) erfolgte zuvor über die Dauer von 60 min. Die Abgabe nach 1-30 min wurde in Anwesenheit von A, 1 mM Leu, B, 1 mM Phe oder C, 20 µM 3,3'-T₂ transstimuliert. Das Diagramm zeigt exemplarisch eine repräsentative Kurve und gibt die Mittelwerte von jeweils 10-15 Oozyten ± SEM aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Experimenten an.

4.7 Charakterisierung der Substratabgabe an LAT2-Varianten

Auch für den Substrat-Efflux wurden die Struktur-Funktionszusammenhänge von Transporter und Substrat untersucht. Es sollte aufgeklärt werden, ob AS, die den Influx positiv beeinflussen auch den Efflux bestimmen. Dazu wurden drei zentrale LAT2-Varianten (Y130A, N133S und F242W) mit erhöhter 3,3'-T₂-Aufnahme ausgewählt. Nach Substrat-Beladung der Oozyten

wurde die Transstimulation mit 1 nM Phe vorgenommen und anschließend die Radioaktivität des freigesetzten Substrats im Puffer bestimmt.

4.7.1 LAT2-Varianten zeigen unterschiedliche Aufnahme- und Abgabepprofile

Um den Einfluss der Seitenketten-Modifizierung im Aminosäure-Export zu untersuchen, wurden die LAT2-Varianten überexprimierenden Oozyten mit radioaktiv markiertem Leu oder Phe (je 100 μM) für 60 min beladen, zwischendurch gewaschen und nach 20 min andauernder Transstimulation wurde die radioaktive Export-Rate für jedes Konstrukt bestimmt. Für den direkten Vergleich der Efflux-Rate wurde für jedes Konstrukt die Aufnahme nach 60 min bestimmt, um schließlich den relativen Anteil des Effluxes zu berechnen. LAT2-N133S weist einen erhöhten Export sowohl für Leu als auch für Phe auf, während Y130A einen gleichbleibenden Export zeigt. Das Konstrukt F242W legt im Vergleich zum WT eher einen negativen Export-Effekt dar (Abbildung 4.27): für Leu signifikant und für Phe nur als Tendenz. Insgesamt sind auch Unterschiede in der Freisetzung von Leu und Phe für den WT zu erkennen, denn auch der Import der Aminosäuren über die Konstrukte wird integriert und zeigt wie schon in den Abbildungen 4.24 oder 4.25 markante Exportdifferenzen.

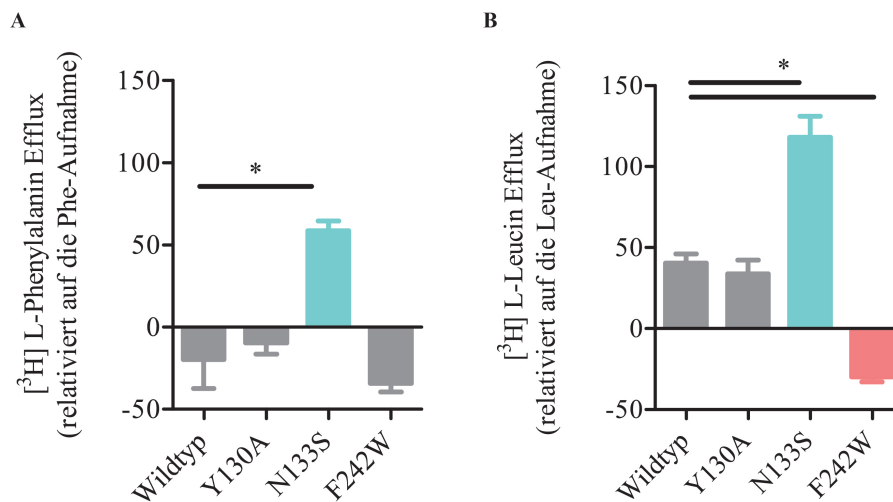


Abbildung 4.27: Erhöhte Freisetzung von radioaktiv markierten AS durch LAT2-N133S exprimierende Oozyten. Die Beladung der LAT2-Varianten/CD98 überexprimierenden Oozyten mit A, [³H] Leu (100 μM) und B, [³H] Phe (100 μM) erfolgte zuvor über die Dauer von 20 min. Die Abgabe nach 60 min wurde in Anwesenheit von 1 nM Phe transstimuliert. Das Diagramm gibt die Mittelwerte von jeweils 10-15 Oozyten \pm SEM aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Experimenten an. Verändert nach (Hinz et al., 2017).

4.7.2 3,3'-T₂ Abgabe über LAT2-Varianten erlaubt

Im Anschluss an die Bestimmungen des AS-Exports erfolgte die Analyse der SDH-Abgabe durch die LAT2-Konstrukte. Während der Import gute Aufnahmeraten für 3,3'-T₂ zeigte und damit eine ausreichende Konzentration in den Oozyten gewährleistet war, waren initiale Experimente zur Bestimmung des Effluxes über LAT2-WT negativ. Die überexprimierenden Oozyten wurden mit SDH (100 nM) beladen und anschließend wurde die Transstimulation für 60 min mit 1 nM Phe durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten eindeutig, dass nur der Export des SDH-Derivats 3,3'-T₂ durch die Konstrukte Y130A bzw. N133S zu 100 % bzw. zu 120 % gesteigert wird (siehe Abbildung 4.28 (A)). Im Gegensatz dazu wurde der Export von T₃ oder T₄ über den Zeitraum bis zu 60 min nur für die LAT2-Y130A Variante betrachtet, da diese als einzige einen zuverlässigen Uptake der beiden SDH zeigte. Allerdings wurde keines der beiden Substrate exportiert (Abbildung 4.28 (B und C)). Die Unterschiede der nicht-injizierten Oozyten sind weder zum WT noch zur Y130A-Mutante signifikant.

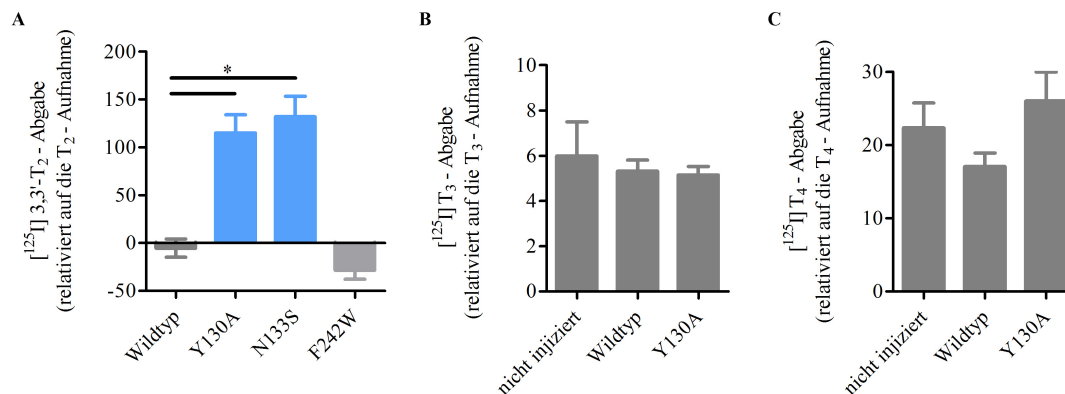


Abbildung 4.28: Erhöhte Freisetzung von 3,3'-T₂ über LAT2-Varianten, aber keine Freisetzung von T₃ oder T₄. Die Beladung der LAT2-Varianten/CD98 überexprimierenden Oozyten mit [¹²⁵I] 3,3'-T₂, T₃ oder T₄ (100 nM) erfolgte zuvor über die Dauer von 60 min. Die Abgabe nach 60 min wurde in Anwesenheit von 1 nM Phe transstimuliert. Das Diagramm gibt die Mittelwerte von jeweils 10-15 Oozyten ± SEM aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Experimenten an. Verändert nach (Hinz et al., 2017).

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des L-Typ Aminosäuretransporter 2 (LAT2) als möglicher Schilddrüsenhormontransporter untersucht. Im Fokus standen die Struktur-Funktionsanalysen des Transporters. Mithilfe von Homologiemodell geleiteten, molekularen LAT2-Variationen wurde aufgedeckt, welche spezifischen Aminosäureseitenketten für den SDH-Transport verantwortlich sind. Zudem wurde auch die Charakterisierung der Substrate für LAT2 durchgeführt. Bislang gab es keine Struktur-Funktionsuntersuchungen dieses Aminosäuretransporters im Hinblick auf den SDH-Transport.

Die Kenntnis des Transportmechanismus von SDH über LAT2 ist nicht nur wissenschaftlich interessant, sondern könnte auch medizinisch von großer Bedeutung sein. Unter Umständen könnte LAT2 die SDH-Transportfunktionen bei einem MCT8-defizienten Patienten übernehmen (siehe AHDS). Zudem gewinnt die Rolle des nicht klassischen SDHs T_2 zunehmend an Bedeutung. Ihm werden neue essentielle Funktionen zugeordnet, da ein erhöhter Stoffwechsel durch die Gabe von T_2 gemessen wurde (Pietzner et al., 2015; Senese et al., 2014). Aus der Literaturanalyse des Transporters ging hervor, dass der Transport von SDH durch LAT2- vermittelt sein könnte. Wobei die konkreten Daten von LAT2 als SDH-Transporter nicht eindeutig gezeigt wurden (Friesema et al., 2001). Folglich wurde der spezifische SDH-Transport in LAT2 überexprimierenden Oozyten untersucht und entsprechend auch intensiv die Substrateigenschaften sowohl für den Import als auch den Export im Detail analysiert. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der LAT2 neben AS auch SDH davon hauptsächlich $3,3'$ - T_2 und in geringerem Maße T_3 aufnimmt aber weder rT_3 noch T_4 in die Zelle importiert. Im Gegensatz zu den AS, welche bidirektional über die Membran transportiert werden, wird keines der untersuchten SDH-Derivate durch den LAT2-WT aus der Zelle exportiert.

5.1 Ist das Heterodimer LAT2/CD98 an der Plasmamembran lokalisiert und transportiert es SDH?

5.1.1 LAT2-vermittelte Substrataufnahme nur durch Koexpression mit dem Eskortprotein CD98 induziert

Der LAT2 ist bekannt dafür, dass er mit dem CD98 ein Heterodimer formt und an der Zellmembran exprimiert ist. Die Notwendigkeit eines solchen Eskortproteins sollte zunächst für das hier verwendete Expressionssystem überprüft werden. So wurden in der vorliegenden Studie die *Xenopus laevis* Oozyten mit Wasser bzw. mit cRNA von LAT2 mit und ohne CD98, sowie CD98 alleine injiziert. Die Transportstudien mit $3,3'$ -T₂ in den Wasser injizierten Oozyten wiesen darauf hin, dass die endogene Proteinexpression für diesen Versuchsablauf vernachlässigbar ist, da sie nur ein geringes Hintergrundsignal verursacht. Die hier durchgeführten $3,3'$ -T₂-Aufnahmen durch LAT2 legen nahe, dass die beobachteten Ergebnisse eines gesteigerten T₂-Imports LAT2 spezifisch sind. Die Proteinexpressionsuntersuchung mittels Western Blot unterstreicht die Resultate der Transportuntersuchungen. Weder die Einzelinjektion von LAT2 noch die von CD98 führte zu einer signifikanten Transportsteigerung von $3,3'$ -T₂. Einzig die Koinjektion der kodierenden RNA beider Proteine führte zur deutlichen Aufnahme von $3,3'$ -T₂ sowie von AS im Vergleich zu den nicht-injizierten Oozyten. Diese Ergebnisse sind konsistent mit anderen Beobachtungen. In der Veröffentlichung von Segawa et al. (Segawa et al., 1999) wiesen die L-Leu- und die L-Phe-Aufnahmestudien darauf hin, dass nur die koinjizierten Oozyten substanzielle Ergebnisse erbrachten. Es geht eindeutig hervor, dass sowohl der Transport von AS als auch der von SDH nur bei Expression beider Proteine als Heterodimer erreicht werden kann, was für diese heterodimere Aminosäuretransporter charakteristisch ist (Fukasawa, 2000; Pineda et al., 1999). Diese neu gewonnenen Erkenntnisse, dass der murine LAT2 SDH aufnimmt, werden auch von anderen experimentellen Daten unterstützt. Die Untersuchungen des humanen LAT2 sowie LAT1 zeigten vergleichbare Ergebnisse bei der SDH-Aufnahme (Khunweeraphong et al., 2012; Morimoto et al., 2008). Hierbei sind die kleinen LAT2-Sequenzunterschiede zwischen Mensch und Maus demnach zu vernachlässigen, da sie ein ähnliches Transportverhalten für SDH zeigen.

5.1.2 Der natriumunabhängige Transport von 3,3'-T₂ durch LAT2

Ob eine Natriumunabhängigkeit in dem Expressionssystem vorhanden ist, wurde schließlich auch untersucht. Wie oben beschrieben, wurden 3,3'-T₂-Aufnahmenuntersuchungen von ko-injizierten Oozyten bei unterschiedlicher Pufferzusammensetzung durchgeführt. Durch die Ergänzung des Puffers mit entweder Natrium- oder Cholinchlorid, konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von 3,3'-T₂ durch LAT2 natriumunabhängig ist, da sich hierbei kein signifikanter Unterschied zwischen dem Natrium- oder Cholinchlorid-haltigen Puffer zeigte. Interessanterweise war die Aufnahme durch sowohl nicht-injizierte als auch injizierte Oozyten bei der Inkubation im Cholinchlorid haltigem Puffer signifikant niedriger. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Ergebnissen von Friesema (Friesema et al., 2001). Sie zeigten, dass die Aufnahme von Iodthyroninen durch endogene Transporter in Oozyten teilweise durch die Anwesenheit von Natrium beeinflusst werden könnte. Dies korreliert auch mit anderen Erkenntnissen, in denen die Gegenwart eines natriumabhängigen LAT2-ähnlichen Transporters in Oozyten beschrieben ist (Bröer et al., 1998). Trotz der kleinen Hinweise auf einen Natriumeinfluss, spricht man beim LAT2 von einer klaren Natrium-unabhängigkeit im Transport.

5.1.3 Identifizierung der SDH-Substratspezifität von LAT2

Für LAT2 wurde ein Transport von Iodthyroninen vermutet, jedoch wurde bislang nie der direkte Transport von SDH durch LAT2 identifiziert. Inhibitionsuntersuchungen waren kein eindeutiger Beweis für die LAT2 spezifische SDH-Aufnahme (Khunweeraphong et al., 2012; Morimoto et al., 2008). In dieser Arbeit wurde die effektivste Aufnahme für das 3,3'-T₂ gezeigt. T₃ zeigte lediglich einen schwachen Import und für die sperrigen Substrate rT₃ und T₄ konnte kein Transport durch LAT2 beobachtet werden. Im Gegensatz zu LAT2 zeigt LAT1 bei Koexpression mit humanem CD98 in Oozyten, eine markante Aufnahme von rT₃. LAT1 zeigte ebenso eine geringe Aufnahmefähigkeit für T₃ und T₄ (Friesema et al., 2001). In den kompetitiven Aufnahmeuntersuchungen von Leucin mit SDH bewies sich LAT1 als T₃- und T₄-Transporter im Vergleich zu LAT2 (Morimoto et al., 2008; Khunweeraphong et al., 2012). In beiden Studien wurde die L-Leu-Aufnahme durch LAT1 deutlich von T₃ und in geringerem Umfang durch T₄ inhibiert. In der gleichen Studie zeigten T₃ und T₄ eine mildere Wirkung auf die L-Leu-Aufnahme und keine Hemmung auf den L-Ala Transport durch LAT2. Zevenbergen et al. bestätigte in transient transfizierten COS1-Zellen eine hohe Affinität zu 3,3'-T₂ und eine geringere zu T₃. Sie bewiesen ebenfalls, dass rT₃ und T₄ nicht durch LAT2 importiert werden (Zevenbergen et al., 2015).

5.1.4 Ermittlung der kinetischen Parameter für die SDH-Aufnahme

Zur verbesserten Auswertung experimenteller Transportuntersuchungen erfolgte die Ermittlung der kinetischen Parameter über die Michaelis-Menten-Kinetik. Es gibt diverse Ansätze zur Durchführung, wovon hier nur einer betrachtet wurde, weil dieser ökonomischer für den Radioaktivmüll war und die Effektivdosis für beruflich strahlenexponierte Personen unterschritt. Das Arbeiten mit Radioaktivität ist schließlich für den Experimentator und für die Umwelt eher mit Risiken behaftet und sollte mit Bedacht durchgeführt werden. Zunächst wurde ein Zeitpunkt der Substrataufnahme ermittelt, der im linearen Messbereich liegt. Hierbei konnte 60 Minuten Inkubation als optimaler Zeitpunkt festgelegt werden. Zum einen lag der gewählte Zeitpunkt von 60 Minuten im linearen Messbereich und zum anderen waren zum festgelegten Zeitpunkt valide Messwerte gewährleistet, da die 60 Minuten das beste Verhältnis zwischen der Transportaktivität von nicht-injizierten zu koinjizierten Oozyten zeigten.

Im Vergleich zu anderen SDH-Transportern, wie z.B. MCT8, der bereits einen bemerkenswerten Transport nach zwei Minuten Inkubation zeigt, scheint LAT eher einen langsamen Transport zu besitzen (Mastroberardino et al., 1998). Vergleichbare Inkubationszeiten waren notwendig, um die Aufnahme von SDH durch LAT1 zu untersuchen (Friesema et al., 2001). Schließlich wird die Kinetik bei 60 minütiger Inkubation mit steigender $3,3^3\text{-T}_2$ Konzentration bestimmt und der K_m -Wert von $16,24 \mu\text{M}$ ($0\text{-}33,92 \mu\text{M}$) für LAT2-WT festgehalten. Im Vergleich der SDH-Affinität wurde für die Transporter LAT1, MCT8 und OATP1C1 ebenfalls ein K_m -Wert im niedrigen mikromolaren Bereich berechnet (vgl. Tabelle 5.1). Die Berechnungen der K_m -Werte erfolgten normalerweise unter der Annahme der logarithmischen Normalverteilung: Hierfür werden die ermittelten Werte im definierten Konfidenzintervall (CI) angegeben. Jedoch wurden für die ermittelten Resultate in Tabelle 5.1 nur K_m -Werte als Mittelwert mit der Standardabweichung angegeben. Dies liegt einer Berechnung der Normalverteilung zugrunde und ist damit, im Gegensatz zur log-Normalverteilung in der Genauigkeit stark fehlerbehaftet. Dies ist ein typischer Fehler bei Merkmalen, die einer logarithmischen Normalverteilung folgen. Die Verteilung ist schlecht einzuschätzen und führt zu einer Verzerrung des realen Intervalls der K_m -Werte. Unter Umständen ist es möglich, dass sich die Konfidenzintervalle der K_m -Werte zwischen 0,002 und 18,6 überschneiden und damit in einem vergleichbaren Bereich liegen.

Tabelle 5.1: Übersicht der K_m -Werte (in $[\mu\text{M}]$ angegeben) von SDH bestimmt für die primären und sekundären SDH-Transporter.

Transporter	Spezies	T_4	rT_3	T_3	$3,3'$ - T_2 (CI)	Referenz
LAT2	Maus				16,24 (0 - 33,92)	(Kinne et al., 2015)
LAT1	Mensch	7,9	12,5	0,8	7,9	(Friesema et al., 2001)
MCT8	Ratte	4,7	2,2	4		(Friesema et al., 2003)
	Mensch	7,5				(Kinne et al., 2010)
OATP1C1	Ratte	0,18				(Westholm et al., 2010)
	Maus	0,34	0,46			(Tohyama et al., 2004)
	Mensch	0,094	0,128			(Pizzagalli et al., 2002)

5.2 LSM-Analyse als optimale Methode zur Bestimmung der Zellmembranexpression von LAT2

Die Proteinexpression des Transporters hat auch einen Einfluss auf den SDH-Import, da sie stark im Zusammenhang mit der cRNA-Qualität steht. Um Fehler zu vermeiden, die auf die cRNA-Degradation zurückzuführen sind, wurden in den Versuchen unterschiedliche cRNA-Syntheseansätze verwendet. Dadurch konnten die Ergebnisse des Transports und die der Expression validiert und bestätigt werden. Expressionsstudien durch Western Blots von Gesamtzelllysaten wurden verarbeitet und gegen CD98 und LAT2 geplottet. Die Blots zeigen für beide Antikörper sehr starke Bandenmuster. Vor allem der anti-LAT2 bindet sehr unspezifisch in den Oozyten. Abzuleiten ist dies aus der hohen und starken Bandenexpression bei den nicht-injizierten Oozyten. Abweichend von den Ergebnissen in den Oozyten ist die Kreuzreaktivität im murinen und humanen Gewebe sehr gering (Braun et al., 2011b; Wirth et al., 2009). Damit war keine gute Voraussetzung zur Detektion von LAT2 an der Oozytenmembran mittels Biotinylierung gegeben. Dennoch können Schlüsse aus den Oozyten-Gesamtzelllysaten gezogen werden. Der Nachweis für die überexprimierenden Proteine konnte durch starke Signale in den LAT2 bzw. CD98 oder koinjizierten Proben gefunden werden. Schwache Signale waren im Zelllysate von nicht-injizierten Zellen mit anti-CD98 zu erkennen, die eine leichte endogene Expression des Proteins in Oozyten bestätigen (Estévez et al., 1998). Ebenfalls kann für LAT2 eine endogene Expression vermutet werden, wobei die unspezifische AK-Bindung den endogenen Anteil nicht eindeutig ermitteln lässt. Die LAT2-Expressionsbestimmung des Gesamtzelllysats gibt Rückschlüsse über die Güte der Ergebnisse eines Versuchs. Ob die Oozyten

kontaminiert oder die cRNA degradiert waren, sollte für jeden einzelnen Versuch individuell eingeschätzt werden. Der einzige Nachteil war, dass daraus keine direkten Schlussfolgerungen zur LAT2 Membranexpression hervorgingen. Die Oberflächenexpression in Oozyten stellte eine große Herausforderung in dieser Arbeit dar. Es wurden verschiedene Konfigurationen für die Zelloberflächen-Biotinylierungsassays ausgetestet, jedoch resultierten keine sinngemäßen Ergebnisse mit dem derzeit verfügbaren humanen LAT2-AK in Oozyten. In beiden Fällen, Streptavidin-Präzipitation und anschließendem LAT2-Nachweis oder LAT2-Präzipitation mit Biotin-Nachweis, wurden durch den LAT2-AK unspezifische Proteinbanden erzielt. Es ergaben sich Resultate die der Literatur nicht entsprachen. Zudem war es nicht möglich, den LAT2 extrazellulär mit Label zu markieren. Ein möglicher Grund dafür, zeigte sich später im Verlauf der Promotion. Denn unmittelbar über der extrazellulären Oberfläche von LAT2 ist die voluminöse extrazelluläre Domäne von CD98 lokalisiert und überdeckt vollständig die extrazellulären Loops von LAT2 (Rosell et al., 2014; Meury et al., 2014), sodass ein Label am extrazellulären Loop (ECL) 2 für AK nur schwer erreichbar ist. Als Konsequenz wurden LAT2 und CD98 erneut kloniert und jeweils mit einer Fluoreszenzmarkierung C-Terminal versehen. Im Folgenden konnte die Oberflächenexpression am LSM und die äquivalente Gesamtexpression am Durchflusszytometer jedoch nur in Hek293-Zellen detektiert werden. Da es sich bei den Oozyten um polarisierte Zellen handelt, ist es bisher nicht möglich, mit der konfokalen LSM-Analyse valide Ergebnisse zu erhalten. Offensichtlich scheint die LSM-Analyse mit Hek293-Zellen derzeit die beste Methode zu sein. Diese Durchführung ist in unserem Labor (AG R. Schüle/ G. Krause, FMP, Berlin) etabliert. Sie wird genutzt um ein semi-quantitatives Verhältnis der Membranfluoreszenz zur Gesamtfluoreszenz zu berechnen (Wüller et al., 2004). In Bezug auf die Membranexpression der Mutanten spielt die ausgewählte Methode eine übergeordnete Rolle. Sie dient dem Vergleich der WT- und der Mutantenexpression in der Plasmamembran. Die Daten der Durchflusszytometrie belegen die Qualität der transienten Zelltransfektion. Anhand der Resultate (vgl. Abbildung 4.10) aus den angewandten Methoden ist zu erkennen, dass die Membranexpressionen sowohl vom WT als auch der untersuchten Mutanten vergleichbar sind. Demnach sind die SDH-Transportergebnisse der LAT2-Varianten nicht das Resultat einer erhöhten oder erniedrigten Proteinexpression. Diese Transporteffekte sind einzig und allein auf den Transporteinfluss der Mutation zurückzuführen.

5.3 Oozyten als optimales System für Transportstudien

5.3.1 *Xenopus laevis* Oozyten als Expressionssystem

Das Expressionssystem der *Xenopus laevis* Oozyten wird vielfältig in der Forschung eingesetzt. Sie besitzen eine geringe endogene Membranproteinexpression, da Oozyten praktisch unabhängig von exogenen Nährstoffen überleben können. Dennoch werden wenige Proteine in Oozyten exprimiert. Dies führt zu einer minimalen Hintergrundaktivität und somit zu guten Voraussetzungen für Transportstudien von membranständigen Transporterproteinen. Die Tierhaltung ist einfach und mit geringen Kosten verbunden. Aus den Amphibien lassen sich durch schnelle und einfache Präparationen kleine aber auch große Mengen an Oozyten gewinnen. Die manuelle cRNA Injektion führt zur Expression des gewünschten Proteins oder mehrerer Proteine. Die Transportstudien wurden durchgeführt, um die molekularen Determinanten des SDH-Transports über LAT2 zu ermitteln und deren Substrateigenschaften *in vitro* zu charakterisieren. In vorangegangenen Arbeiten wurde der SDH-Transport über Mitglieder der LAT-Familie und der MCT-Familie bereits erfolgreich in Oozyten untersucht (Kinne et al., 2010; Friesema et al., 2001). Das System hat jedoch auch Nachteile und kann bei falscher Durchführung fehleranfällig sein. Es erfordert demnach eine sehr sorgfältige und geübte Handhabung, um die Fehlerquellen gering zu halten. Die manuelle Mikroinjektion von cRNA in jede einzelne Oozyte kann zur unterschiedlichen Expression von LAT2 führen und dadurch kann es zu einer größeren Standardabweichung der jeweiligen Transportergebnisse kommen. Darüber hinaus kann dieser Effekt auch auf die Qualität der jeweiligen Oozyte zurückzuführen sein. Diese kann zum einen mit dem Zustand des Frosches oder der darauffolgenden Defollikulierung (Kollagenase-Abbau) zusammenhängen, die Defekte in der Oozytenmembran entstehen lassen könnten. Der Transport wäre folglich unspezifisch über Poren in die Zelle. Um Fehlern vorzubeugen, wurde pro Versuchsreihe die Experimente zwei- bis dreimal unabhängig voneinander mit je 10-15 Oozyten durchgeführt, um damit große Datenausreißer durch tote oder nicht-exprimierende Oozyten zu beseitigen. Die Qualität der durchgeführten Experimente wurde kontrolliert, indem das Verhältnis von nicht-injizierten Oozyten zu LAT2/CD98 koinjizierten Oozyten gebildet wurde. Ein Experiment galt dann als erfolgreich und von guter Qualität, wenn ein Verhältniswert gleich oder höher als drei erreicht wurde. Außerdem konnte die Qualität der Oozyten durch stetiges Wechseln des Antibiotikums beibehalten werden. Andernfalls würden multi-resistente Bakterien die Qualität der Oozyten und damit auch die Qualität der Ergebnisse beeinflussen (O'Connell et al., 2011).

5.3.2 Vergleich zwischen zwei Expressionssystemen: Oozyten und Hek293

Durch den Vergleich zweier Testsysteme, native Oozyten und humane Hek293-Zellen, soll verdeutlicht werden, warum das Arbeiten mit den Oozyten zur Charakterisierung des LAT2 von Vorteil ist. Für den Vergleich der Funktionalität von LAT2 und den LAT2-Varianten wurde die Transportaktivität von $3,3'$ -T₂ untersucht. Hierzu wurden die Transporterproteine in den jeweiligen Zellsystemen überexprimiert. Das genaue Vorgehen wurde im Kapitel Methoden 3.1.2 erläutert. Obwohl beide Systeme eine deutliche $3,3'$ -T₂-Aufnahme zeigten, hebt sich dennoch hervor, dass die Oozyten eine geringere Hintergrundaufnahme von $3,3'$ -T₂ haben als die Hek293-Zellen. Das Verhältnis von nicht-injizierten Oozyten zu koinjizierten (WT) Oozyten liegt bei 1:3 (siehe Abbildung 4.3 A). Während die nicht-transfizierten Hek293-Zellen gegenüber den transient transfizierten (WT) Zellen nur ein Verhältnis von 1:2 aufbringen (siehe Abbildung 4.11). Die Anwesenheit von endogenen Transporterproteinen in Zelllinien, wie Hek293-Zellen, kann zum Hintergrundsignal führen und dadurch nachteilig sein. Das spielt insbesondere bei der Untersuchung der LAT2-Varianten eine große Rolle. Nach der Expression von LAT2 in Hek293-Zellen konnten die Eigenschaften des modifizierten Transporters wegen der geringen Empfindlichkeit des Expressionssystems nicht genauer untersucht werden. Dies liegt daran, dass Transportunterschiede sich mit einem geringeren Hintergrundsignal zuverlässiger erkennen und eindeutiger interpretieren lassen. Wie z.B. die bei der Mutation Y130A, welche im Fokus der LAT2 Charakterisierung steht. Die Transportdifferenz ist in Oozyten siebenmal höher als bei Hek293-Zellen (Hinz et al., 2015, 2017). Auch für die Mutanten N133S und F242W ist die erhöhte Aufnahmeprägnanter in den Oozyten (vgl. Abbildung 4.12). Die höchsten Aufnahmeprägnanter konnten in Oozyten gemessen werden und boten eine gute Ausgangssituation für die Inhibitionsuntersuchungen sperriger Substrate. Ein großes Ausgangsverhältnis hatte unter anderem für die Inhibitionsuntersuchung den Vorteil, dass man den Unterschied deutlicher abbilden kann. Dies spiegelt sich auch in den berechneten Signifikanzniveaus wieder.

5.4 Verifizierung des chimären LAT2-Strukturmodells

Das Homologiemodell von LAT2 wurde auf der Basis von zwei Kristallstrukturen aufgebaut. Die Transporterstrukturen von AdiC und ApcT besitzen beide eine gute Auflösung. Der Vorteil der AdiC-Struktur ist ein vorliegender Protein-Liganden-Komplex mit Arginin in der Bindungstasche. Das Arginin bindet mit seiner Aminosäurefunktion (NH_2 , COO^-) zwischen der ersten und der sechsten Transmembranhelix an das Rückgrat der Polypeptidkette. Aufgrund der Sequenzähnlichkeit zwischen LAT1 und LAT2 von 63 %, ist es nicht überraschend, dass die AdiC-Struktur bereits von anderen Wissenschaftlern als Einzelvorlage für ein LAT1 Modell verwendet wurde (Geier et al., 2013; Rosell et al., 2014). Es war erkennbar, dass AdiC nur ein gutes Strukturtemplate für die TMHs 1-4, 6, 7 von LAT2 ist. Die übrigen Helices (5, 7-12) zeigen eine bessere Übereinstimmung bzw. teilen ähnliche Sequenzmotive mit der Sequenz der ApcT-Kristallstruktur. Unter strikter Verwendung der Aminosäureerkennungsfunktion des AdiC-Transporters im Zentrum des Translokationsweges wurde ein chimäres Modell für LAT2 entwickelt (Hinz et al., 2015). Zur Validierung des chimären LAT2-Modells wurden in erster Linie Aminosäurereste mutiert, die in den entsprechenden Positionen der Template-Kristallstrukturen existieren. Experimentell wurde das Transportverhalten von Templates (AdiC, ApcT) mit dem der LAT2-Mutationen gegenübergestellt. Hierfür wurden Mutationen verwendet, die in ApcT (K158A) oder AdiC (N22A) bereits mutiert wurden und eine identische AS zu LAT2 (Lys¹⁹³, Asn⁵¹) besitzen. Anschließend wurden die publizierten Mutationsdaten der Templatstrukturen mit denen von LAT2 in der vorliegenden Arbeit verglichen. Die Ergebnisse der LAT2-Mutanten N51A/S und K193A erlauben mögliche Rückschlüsse auf die Aminosäurepositionen im Transporter. Die ermittelte 3,3'-T₂-Aufnahme für N51A/S und K193A zeigte eine Verminderung des Transports (Abbildung 4.11 bzw. 4.12). Die Aufnahmeuntersuchung durch die beiden LAT2-Mutationen ist vergleichbar zu den entsprechenden Mutationsergebnissen der Transporter AdiC und ApcT (Gao et al., 2009; Shaffer et al., 2009). Sie spielen offensichtlich eine entsprechende Rolle für die richtige Proteinfaltung (Faltungstabilisierung Lys¹⁹³) und sind somit essentiell für die Aufnahme von Substraten (Asn⁵¹) wie in AdiC und ApcT. Die LAT2-Resultate weisen darauf hin, dass eine vergleichbare Positionierung der Residuen im LAT2 sehr wahrscheinlich ist. Zumindest für diese beiden Bereiche wurde das generierte LAT2-Strukturmodell durch bereits publizierte Daten über AdiC und ApcT verifiziert.

5.5 Gezielte Mutationen am LAT2 klären essentielle Eigenschaften des SDH-Imports auf

Es wurden drei LAT2-Aminosäurereste (Asn⁵¹, Tyr¹³⁰, Phe²⁴²) ausgewählt, die den Transportweg auskleiden, potentiell eine Interaktion mit dem Substrat eingehen und damit für den Transportmechanismus unersetzlich wären. Die Seitenkettenreste wurden so mutiert, dass eine Seitenkettenverlängerung oder eine Seitenkettenverkürzung erfolgt, aber die Eigenschaften im weitesten Sinne beibehalten wurden. Einzelne Positionen wurden zum besseren Vergleich unterschiedlich mutiert, um direkte Hinweise auf deren speziellen Charakter an der für sie spezifischen Lokalität zu bekommen. Die Transportuntersuchungen wurden sowohl mit SDH (T₂, T₃, T₄) als auch mit AS (Leu, Phe) durchgeführt. Die Ergebnisse der Transportuntersuchungen waren mit Hilfe des Homologiemodells plausibel, führte die Verkürzung von Tyr¹³⁰ zu Alanin zu einer verstärkten SDH-Aufnahme (vgl. Abbildung 4.11 und 4.12). Divergent dazu bewirkte die Seitenkettenverlängerung von Tyr¹³⁰ zu Arg eine Blockierung des Transportweges und folglich zu einem verminderten bzw. keinem messbaren SDH-Transport. Bei Seitenkettenverkürzung unter Beibehaltung oder Veränderung der Eigenschaften im Sinne der Hydrophilie resultierte eine deutlich erhöhte (N51S) oder unveränderte (N51A) Aufnahme von 3,3'-T₂. Dies bewies einerseits die Notwendigkeit von kleinen Seitenketten und andererseits die Auswirkung des hydrophilen Charakters im zentralen Transportkanal von LAT2. Eine interessante Entdeckung wurde für Phe²⁴² gefunden, die durch zwei verschiedene Mutationen hervortrat. Bleibt der hydrophobe Charakter erhalten und werden die aromatischen Eigenschaften durch eine Valin Substitution (F242V) reduziert, führt das zu einer verminderten 3,3'-T₂-Aufnahme. Dem entgegen rettet die Mutation zum vergrößerten aromatischen Tryptophan (F242W) den Effekt und führt sogar zu einer erhöhten 3,3'-T₂-Aufnahme im Vergleich zum WT. Dies deutet auf eine eindeutige Wirkung des aromatischen Rings von Phe²⁴² hin. Insbesondere entspricht Phe²⁴² der identischen Position von Trp²⁰² in AdiC (Tsai et al., 2012), sodass die Hypothese eines notwendigen aromatisches Ringsystem stark unterstützt wird. Dadurch wird die Erkennungsstelle bei Substratbindung auf der extrazellulären Seite abgedeckt. Die Ausrichtung von Trp²⁰² (in AdiC) erlaubt im Substrat-freien Zustand die Zugänglichkeit von Liganden bzw. Substraten zur Erkennungsstelle (Fang et al., 2009). Im Arginin gebundenen Zustand bewegt sich das Trp²⁰², sodass es als Deckel die Bindungsstelle abschließt (Tsai et al., 2012; Kowalczyk et al., 2011; Claxton et al., 2010). Auch in anderen Transportersystemen z.B. im LeuT oder anderen Neurotransmittern existieren aromatische Reste, die als bewegender Deckel die Bindungstasche nach Liganden Bindung abschließen (Beuming et al.,

2006; Shi et al., 2008). Bei der Charakterisierung von Phe²⁴² im LAT2 weisen Mutationen auf eine essentielle Funktionalität an der spezifischen Stelle 242 hin. Der Fakt, dass Phe²⁴² von LAT2 der Position von Trp²⁰² in AdiC entspricht, wird die Hypothese einer ähnlichen *gate keeper* Funktion von Phe²⁴² in LAT2 nachdrücklich unterstützt. Diese *gating*-Funktion ist offenbar eine kritische Stelle, die die initiale Bewegung des Transporters auslöst, um das Substrat auf die andere Seite zu befördern. Allerdings sind weitere Studien an der intrazellulären Seite notwendig, um diese Hypothese zu klären.

5.5.1 Charakterisierung des LAT2-Transportkanals durch den systematischen Aminosäureaustausch

Für die ortsgerichtete Mutagenese wurden Aminosäurereste von dem LAT2-Homologiemodell abgeleitet. Diese Mutationen kleiden den Transportkanal von LAT2 aus. Seitenketten wurden unter Beibehaltung ihrer hydrophilen Eigenschaften (N51S, N133S, N248S) verkleinert. Es resultierte ein vergrößerter Transportkanal, was zu einem erhöhten 3,3'-T₂-Import führte (vgl. Abbildungen 4.11 und 4.12 A). Seitenkettenvergrößerungen anderer Aminosäurereste (I137M, T140F oder Y130R) verringerten die 3,3'-T₂-Aufnahme, was auf eine sterische Hinderung der SDH-Aufnahme hindeutete. Es entstanden auch LAT2-Varianten, die nach Substitution keinen Transportunterschied zum WT zeigten, obwohl sie in ihren Eigenschaften stark verändert wurden (N51A, Q134T, Y144A, F249A). Diese spielen offenbar nur eine untergeordnete Rolle für den SDH-Transport. Wie in Kapitel 5.2 bereits erläutert, sind die Transportunterschiede real und kein Resultat aus Expressionsunterschieden. Klassischerweise hätte man hier ein Alaninscan zur Identifizierung der Struktur-Funktionszusammenhänge angewendet. Der systematische Austausch der Aminosäurereste gegen Alanin hat jedoch in der Regel einen Verlust der Proteinfunktion zur Folge (Morrison and Weiss, 2001). Der Transportmechanismus, den es zu analysieren galt, wäre nach Funktionsverlust nicht aufzuklären. Nicht nur aus diesem Grund wurden die Aminosäureeigenschaften geringfügig verändert bzw. sequenziell gegen charakteristisch vergleichbare Aminosäuren ausgetauscht. Eine Beibehaltung der entsprechenden Eigenschaften beeinflussten auch weniger die Expressionsraten. Diese Methode ist in unserer Arbeitsgruppe etabliert und wurde bereits zielführend in der Analyse von Transporten angewendet (Kinne et al., 2010; Protze et al., 2017). Aus dem Homologiemodell sind zwei asymmetrisch geformten Kavitäten im zentralen Bereich der Bindungstasche von LAT2 abzuleiten. Sie sind groß genug, sodass zwei aufeinander folgende aromatische Ringstrukturen mit flexiblem Anteil durch nur zwei Iodsubstituenten in 3,3'-, in 3,5- oder in 3',5'-Position hinein passen.

Außerdem wurden die drei Mutationen (Y130A, N133S, F242W) mit dem größten T₂-Import detailliert betrachtet (siehe Abbildungen 4.14 - 4.20). Eine bessere Analyse der experimentellen Transportunterschiede erfolgte durch die Ermittlung der kinetischen Parameter über die Michaelis-Menten-Kinetik. Die resultierenden K_m-Werte zeigten eine Verbesserung der Affinität für alle drei gemessenen LAT2-Varianten. Obwohl sich die Konfidenzintervalle für WT, F242W und Y130A teilweise überschneiden, zeigt F242W mit 3,78 μM den schnellsten Transport für T₂. Für den T₂-Transport kinetisch vergleichbar mit F242W, aber dennoch flexibler, ist die Y130A Substitution (vgl. Abbildung 4.17 und 4.19). Sie erlaubt zudem eine zuverlässige Aufnahme von T₃ und T₄, erreicht aber leider keine Substratsättigung. Die K_m-Werte für T₃ und T₄ konnten also nicht berechnet werden. Limitierend für diesen Assay sind drei Faktoren: die Löslichkeit der SDH in DMSO, die toxische Wirkung von DMSO auf die Zellen bei höherer Konzentration und das Detektionslimit des Gamma-Counters. Obwohl kein K_m-Wert für Y130A ermittelt werden konnte, lässt sich aus den T₃ und T₄ Messkurven eindeutig ein aktiver Transport ableiten (vgl. Abbildung 4.17). Für N133S wurde ein vergleichbarer K_m-Wert wie für Y130A und F242W vermutet und nicht im Detail analysiert, denn schließlich sind die Konfidenzintervalle in einem ähnlichen niedrigen mikromolaren Bereich. Interessanterweise bleibt der Aminosäureimport bei der Mutante Y130A für kleine L-AS wie Leu und Phe unverändert, was darauf hinweist, dass Tyr¹³⁰ eine sterische Hürde für starre und sperrige Moleküle wie T₄ und rT₃ darstellt. Dementsprechend ist die Schlussfolgerung aus den LAT2-Varianten, dass die Aminosäureveränderungen ausschließlich den SDH-Import beeinflussen. Damit sind sie SDH sensitiv und vermitteln einige Rückschlüsse über ihre Position im Transporter und dem SDH-Transportmechanismus.

5.6 Iodsubstitution beeinflusst die T₂-Aufnahme

Die bisherigen Daten weisen daraufhin, dass LAT2-WT nur 3,3'-T₂ und in geringerem Maße T₃ importiert. Es ist außerdem sehr wahrscheinlich, dass auch alle T₂-Derivate von LAT2 importiert werden. Denn aus den Inhibitionsexperimenten geht eindeutig hervor, dass 3,5-T₂ und 3',5'-T₂ mit dem 3,3'-T₂-Import gleich stark konkurrieren (Kinne et al., 2015). Allerdings importiert LAT2 kein sperriges rT₃ oder T₄ (Kinne et al., 2015). Dies steht in Übereinstimmung mit bereits bekannten Arbeiten. Auch hier wird gezeigt, dass das T₄ keine Hemmung auf die Alanin-Aufnahme hat (Khunweeraphong et al., 2012). Das Ersetzen von Tyrosin an der Position 130 durch Alanin vergrößert die Bindungstasche und ermöglicht schließlich die Aufnahme des sperrigen T₄ mit seinen vier Iodsubstituenten. Obwohl mehrere Seitenketten-

mutationen getestet wurden, konnte nur für eine Mutante (Y130A) die T₄-Aufnahme nachgewiesen werden. Zusätzlich war ein verbesserter T₃-Import zu beobachten. Der LAT2-Rest Tyr¹³⁰ behindert T₄ und schränkt den T₃-Import ein. Demgegenüber steht eine zehnfach höhere Importrate für das etwas flexiblere T₃ Molekül. Der Tyrosinrest Tyr¹³⁰ ist evolutionär in LAT2 konserviert, obwohl für andere SLC7-Mitglieder, wie LAT1 oder xCT, ein Arginin an dieser Position ist (Sequenzalignment nicht gezeigt). Währenddessen kommt es beim Ersetzen von Tyrosin durch Arginin (Y130R) zu einer sehr starken Beeinträchtigung des Substrattransports von T₂ (Hinz et al., 2015). Interessanterweise sind die Transportunterschiede durch die Mutanten im direkten Vergleich zu betrachten, da eine vergleichbare Membranexpression der Mutanten gegeben ist (Hinz et al., 2017). Offensichtlich spielen die Halogenverbindungen eine bedeutende Rolle für die Transporter und Substratinteraktionen. Bekannt ist, dass die T₄-Affinität aufgrund der Menge an Iodsubstituenten höher ist als für T₃ (Cody and Duax, 1973; Wotczak et al., 1992). Bei Inhibitionsuntersuchungen mit weiteren Iodverbindungen, S17 - S18, konnten weitere Unterschiede gefunden werden (siehe Abbildung 4.21 sowie 4.23). Der chemische Unterschied zwischen S17 und S18 besteht darin, dass in S18 zwei Iodatome anstelle von zwei Methylgruppen in S17 substituiert sind. Abgesehen vom größeren Volumen können die verschiedenen physikalisch chemischen Eigenschaften von Iod auch für die Affinitätswirkung verantwortlich sein. Iod kann eine Halogenbindung herstellen. Halogene Verbindungen sind die nichtkovalente Wechselwirkung zwischen Halogenatomen (Lewis-Säuren) und neutralen oder anionischen Lewis-Basen, bei denen das Halogenatom als Halogendonator und die Lewis-Base als Halogenakzeptor bezeichnet wird (Yan et al., 2014). Den Ursprung der Verbindung fand man bereits im Jahre 1961. Von Zingaro und Hedges wurde der Begriff Halogenbrücke zum ersten Mal aufgegriffen. Die starke Polarisierung von Halogenen ist auf das sogenannte σ -Loch zurückzuführen, welches aufgrund der ungleichen Verteilung der Ladungsdichte entstanden ist. Tiefergreifende Studien folgten (Clark et al., 2007). Röntgenstrukturen sowie Berechnungen bewiesen, dass das Valenzelektron des p-Z-Orbitals an der Bildung einer kovalenten σ -Bindung an ein Kohlenstoffatom beteiligt ist. Eine Halogenbrücke entsteht demnach hauptsächlich wegen elektrostatischer Wechselwirkungen und der Polarisierung zwischen äquatorialer Ebene und der Bindungsachse. Die Polarisierung des elektrostatischen Potentials steigt stetig mit zunehmendem Radius der halogenen Substituenten. Folglich ist der stärkste Halogendonator das Iodatome. Es weist eine vergleichbare Bindungsstärke wie Wasserstoffbrückenbindungen auf, jedoch unterscheiden sie sich in der gerichteten Wechselwirkung der Halogenbrücken. Diese entstehen nur in dem bestimmten Bindungswinkel von 180°. Es wurde beschrieben, dass die Halogenierung von SDH eine entscheidende Rolle bei der Substraterkennung spielt (Auffinger et al., 2004). Es ist möglich, dass das substituierte Iod

des Liganden mit den aromatischen AS der Seitenkette in der Bindungstasche des Transporters interagiert. Diese sogenannten π -X-Bindungen wurden zuerst durch Wechselwirkungen zwischen dem aromatischen Ring von aromatischen Seitenketten in einer Proteinkinase beschrieben (Voth et al., 2009). In dem vorliegenden Homologiemodell weist LAT2 eine Vielzahl aromatischer AS Tyr¹³⁰, Tyr¹⁴⁴, Phe²⁴², Phe²⁴⁹ auf, die die Bindungstasche abdecken. Die Wahrscheinlichkeit, dass π -X-Bindungen auftreten ist demnach sehr hoch. Dieses Gegebenheit zeigten sich auch in den hier beschriebenen Beobachtungen. Die Hydrophobizität spielt eine nachgestellte Rolle, denn bei Entfernung des aromatischen Charakters, insbesondere bei der Mutante F242V führt dies zu einem signifikant verringerten 3,3'-T₂-Import (Hinz et al., 2015). Hervorzuheben sind auch die unterschiedlichen Ergebnisse in den Hemmungsstudien von S17 und S18 (vgl. Abbildung 4.21 D). Die Iodsubstitution an Position 3 und 5 verändern nicht den pKa-Wert der 4'-OH Gruppe. Demnach bleibt der Dissoziationszustand der beiden T₃-Analoge unverändert und die halogene Brückenbindung im definierten Bindungswinkel spielt eine tragende Rolle.

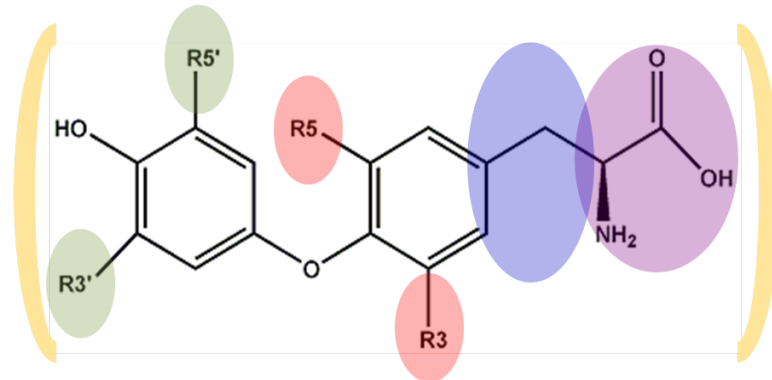
5.7 Substrat-Varianten von SDH und BCH decken spezifische Substrat-Merkmale für LAT2 auf

Aus den kompetitiven Inhibitionsuntersuchungen konnten Substratmerkmale für den LAT2-Transport definiert werden (Abbildung 5.1). Abgeleitet aus den Grundstrukturen wurde ein Screen gegen eine hausinterne Bibliothek durchgeführt, um kommerziell erhältliche SDH- und BCH-ähnliche Substrate zu finden. Es folgten *in silico*-Docking-Studien mit LAT2, um Interaktionen von Substraten mit dem Transporter vorherzusagen und diese schließlich mit Hilfe von *in vitro* durchgeführten Experimenten zu bestätigen. Es zeigte sich, dass eine vollständige Aminosäurefunktion (NH₂ und COO⁻) des Substrats für den Transport notwendig ist. Ebenso darf eine räumliche Dimension des Substrats nicht überschritten werden, sodass das Passieren durch LAT2 überhaupt ermöglicht werden kann. Gleichmaßen zeigte sich, dass bei großen Molekülen ausreichend Flexibilität vorhanden sein muss, um einen inhibitorischen Effekt auf den Substrattransport durch LAT2 zu erzielen.

Die Flexibilität der aromatischen Ringe ist essentiell für den Transport oder die Inhibition. Substrate mit Substitutionen an Position 3,5 sowie 3',5' schränken die Flexibilität ein.

Sperrige Substituenten wie Iod, Brom oder Trifluormethyl sind am Tyrosinring zugelassen.

Aminosäurefunktion ist möglicherweise für die Substraterkennung wichtig. Zweifellos ist die Carboxyl- und die Aminogruppe für die Substrathemmung wesentlich.



Sperrige Substituenten am Phenylring sind nur teilweise erlaubt, solange es die Flexibilität nicht extrem einschränkt (wie z.B. bei T₄).

Die **räumliche Dimension** des Cyclohexanrings darf nicht wesentlich überschritten werden, sonst keine Hemmung

Iodsubstitution bei Position 3, 5, 3' oder 5' hat einen stark Einfluss auf die Substratinhibition.

Abbildung 5.1: Zusammenfassung der essentiellen pharmakologischen Substratmerkmale am Schilddrüsenhormongerüst, die für den Import durch LAT2 notwendig sind. Die Flexibilität des Phenylrings in Bezug auf den Tyrosinring von SDH ist abhängig von verschiedenen Iodsubstitutionen. 3,3'-T₂ und 3',5'-T₂ sind ausreichend flexibel für den Import, während das sperrige T₄ mit seinen vier Iodatomen sterisch am Transport gehindert wird.

5.7.1 Zwei notwendige funktionelle Gruppen am Substrat

Zur Charakterisierung der Substratspezifität von LAT2, wurden kompetitive Inhibitionsstudien von 3,3'-T₂ in Oozyten durchgeführt. Hemmt ein Substrat den 3,3'-T₂-Import, konkurriert es mit dem 3,3'-T₂ um den Transport über LAT2. Indirekt kann man daraus schließen, dass das Substrat selbst transportiert werden kann. Ein eindeutiger Nachweis für den Transport selbst stellt es jedoch nicht dar. Erfolgt keine 3,3'-T₂-Hemmung durch das zu testende Substrat, konkurriert es nicht um den Transport. Unterstützt wurden die experimentellen Daten durch das molekulare Homologiemodell von LAT2. Die notwendigen Eigenschaften lassen sich durch das Modell erschließen. Die These, dass ein Substrat auf die vollständige Aminosäurefunktion (NH₂ und COO⁻) für die Substraterkennung angewiesen ist, konnte schließlich auch

in den experimentellen Untersuchungen bewiesen werden (Hinz et al., 2015). Zum Vergleich wurden die 3-T₁-Derivate mit jeweils einer fehlenden Aminosäuregruppe betrachtet. Die Substrate S13 und S14 wurden zum Test hinzugezogen, weil sie beide über eine Amino- und eine Hydroxylgruppe verfügen. Schließlich konnte nur die Hemmung für das 3-T₁ nachgewiesen werden, während die Substrate mit bruchstückhafter Aminosäurefunktion keine Inhibition des 3,3'-T₂-Imports aufwiesen. Schlussfolgernd führt das *miss matching* aufgrund der unvollständigen Aminosäurefunktion mit fehlenden Wasserstoffbrückenbindungen beider Funktionsgruppen (NH₂ und COO⁻) zu keiner adäquaten Substraterkennung. Die Folge daraus ist, dass das Substrat nicht inhibieren kann. Auch in der AdIC Kristallstruktur bindet das Substrat mit der Amino- und der Carboxygruppe an das Rückgrat der TMH1 und 6 über Wasserstoffbrückenbindungen (Gao et al., 2010). Daraus ist abzuleiten und ebenso an dem bereits bekannten Substratspektrum zu erkennen (Rossier et al., 1999; Khunweeraphong et al., 2012; Morimoto et al., 2008), dass die Aminosäurefunktion eine Schlüsseleigenschaft zum Substratimport darstellt. Diese löst unter Umständen die Konformationsänderung des Transporters aus, um das Substrat auf die andere Seite zu bringen. Anders als bei LAT2, spielt die funktionelle AS-Gruppe eine weniger prägnante Rolle in LAT1. Jüngste Ergebnisse von Zur et al. zeigten, dass auch Hydroxamsäuren über den LAT1 transportiert werden. Die Resultate zeigen ebenso eine mögliche Interaktion mit Aminosäureestern, was auf essentielle Wasserstoffbrückenbindungen zurückzuführen ist, die die Amino- und Carboxylgruppeninteraktion an gleicher Stelle ersetzen können (Zur et al., 2016).

5.7.2 Cyclische Verbindungen hemmen T₂ nur in definierter räumlicher Orientierung

Zur Substratcharakterisierung wurde eine mögliche Dimension im Bereich der Aminosäuregruppe untersucht. Dazu wurden strukturell ähnliche Substrate zu BCH ausgewählt. Das hydrophobe BCH ist ein bekannter kompetitiver Inhibitor der LAT-Familie und ein nicht metabolisierbares, zyklisches Analogon von Leu (Christensen et al., 1969; del Amo et al., 2008). Die Substrate S6, S9-S11 haben als Grundstruktur einen Cyclohexanring. Sie variieren lediglich in ihren hydrophoben Resten. S12 (Gabapentin) hat ebenfalls einen Cyclohexanring aber bildet eine größere Dimension (vgl. Abbildung 5.2 C). Zusammenfassend zeigen die experimentellen Untersuchungen und die Docking-Studien gegenseitig ergänzende Resultate für den LAT2-WT. Substrate mit vergrößertem Volumen (S10-S12) zeigen keine 3,3'-T₂-Hemmung, während kleiner, dimensionierte Substrate (S6, S9) zur Hemmung von 3,3'-T₂ führen. Das heißt S6, passt sterisch in die LAT2-Bindungstasche (vgl. Abbildung 5.2 D). S12 gehört einer

Wirkstoffklasse an, welche zur Behandlung von Patienten mit Epilepsie eingesetzt wird. Dieses Gabapentin (S12) ist im Vergleich zum transportierten BCH sterisch unterschiedlich konstituiert. Die funktionelle Gruppe verfügt über einen anderen Winkel. Vermutlich kollidiert das Substrat sterisch in der Bindungstasche, sodass es den Transportmechanismus nicht initialisieren kann. Zum verbesserten Verständnis wurde das S12 in die Bindungstasche von LAT2 manipuliert (siehe Abbildung 5.2 C). Obwohl die Winkel der Amino- und Carboxylgruppe

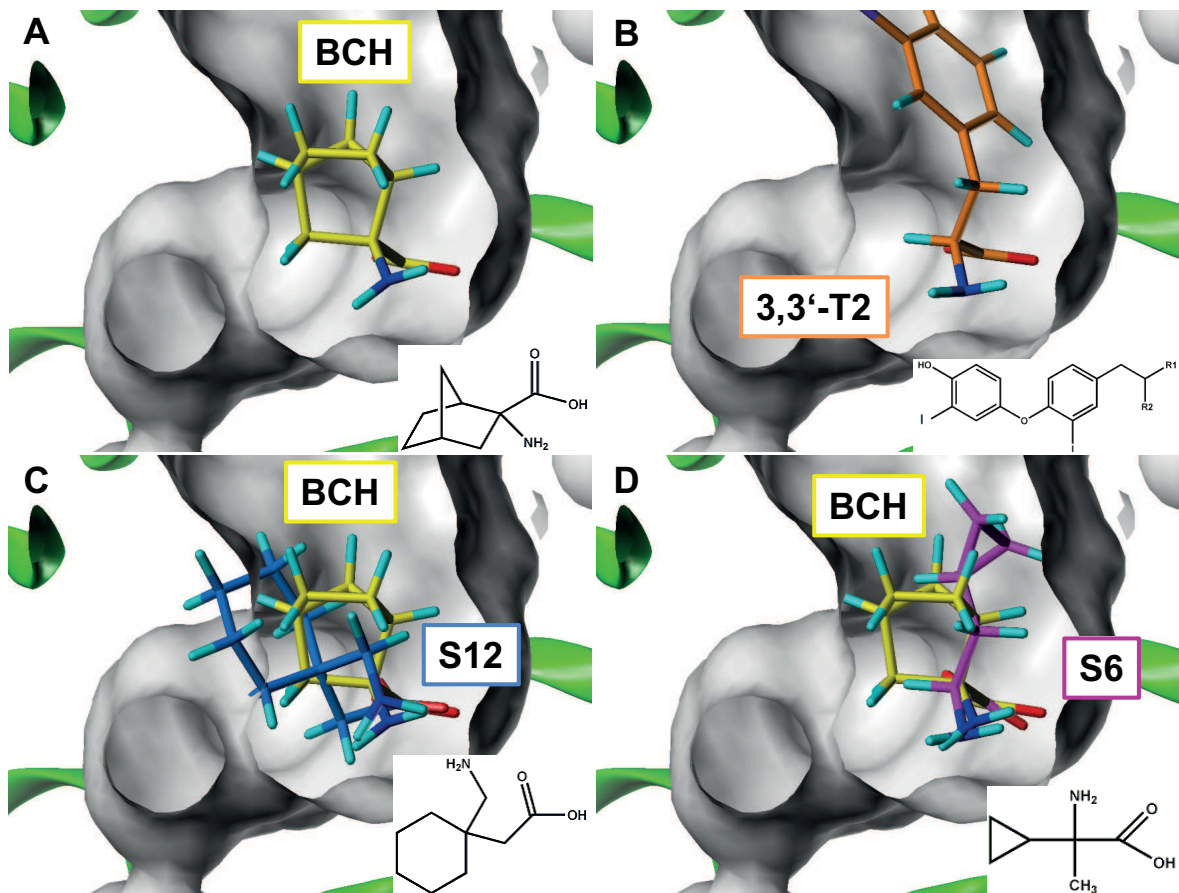


Abbildung 5.2: *In silico*-Docking von experimentell untersuchten Substraten im LAT2-WT. Die funktionellen Gruppen der Aminosäurefunktion der Substrate wurden optimal auf die Erkennungsstelle ausgerichtet. Bindungstasche (grau) von LAT2 mit (A) BCH (gelb), (B) 3,3'-T₂ (orange), (C) BCH und S12 (blau) sowie (D) BCH und S6 (magenta). S12 steht im Konflikt, da das Substrat die Bindungstasche überragt. S6 verfügt über ausreichend Platz und könnte dadurch zur starken Hemmung von 3,3'-T₂ führen.

von S12 unterschiedlich zum BCH sind, besteht die Möglichkeit der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, jedoch kommt es dadurch zur sterischen Hinderung mit der Bindungstasche. Vergleichbare experimentelle Studien wurden von Morimoto et al. in S2-Zellen

mit transfiziertem LAT2 gemacht (Morimoto et al., 2008). Sie untersuchten die kompetitiven Hemmungsfähigkeiten von Gabapentin auf Leu und konnten ebenfalls keine Inhibition durch Gabapentin feststellen. Im Gegensatz dazu wies LAT1 eine sehr starke Hemmung von Leu auf (Morimoto et al., 2008). S10 und S11 sind in ortho- (S11) bzw. in ortho- und para-Stellung (S10) substituiert. Eine oder beide dieser Positionen könnten der Grund für eine sterische Hinderung und damit verantwortlich für den fehlenden Transport sein. Unterdessen zeigen experimentelle Daten von S9 die Reduktion der 3,3'-T₂-Aufnahme. Die hydrophobe Gruppe in meta- Stellung scheint offensichtlich keine Hinderung für die Hemmung im WT zu sein. Die Auswirkung infolge dreier ausgewählter Bindungstaschenmodifikationen von LAT2 auf das BCH und dessen Derivate wurden ebenfalls untersucht. Welche Veränderung in der kompetitiven Inhibition des 3,3'-T₂-Transports entstanden ist, wurde dadurch ebenfalls aufgeklärt. Untersuchungen von Y130A mit BCH und ähnlichen cyclischen Verbindungen zeigten, dass S10 im Vergleich zum WT den T₂ -Import nach Mutation hemmt. Die Cyclohexanverbindung nimmt ein großes Volumen ein. Sie besitzt eine Isopropyl- und eine Methylgruppe in ortho-Stellung. Im Gegensatz dazu stehen die etwas kleineren Moleküle S11 und S12, die den 3,3'-T₂-Import auch nach Mutation (Y130A) nicht hemmen können. N133S weist wie Y130A eine vergrößerte Bindungstasche auf. Es wundert also nicht, dass die Inhibitionsresultate der kompetitiven Hemmung von N133S konkordant zu Y130A sind. Stattdessen werden durch die Mutation-F242W starke Hemmungsergebnisse für die cyclischen Substrate (S10-S12) sichtbar. Obgleich die Bindungstasche verkleinert wurde. So führt das sterisch vergrößerte Volumen in der unmittelbaren Nachbarschaft der Aminosäurefunktion zu einer erhöhten T₂-Hemmung. Besonders hervorzuheben ist N133S: Diese Mutation zeigt eine deutliche Schwächung der BCH-Hemmung im Vergleich zum LAT2-WT. N133S befindet sich in der unmittelbaren Nähe des Substraterkennungsmusters für die Aminosäurefunktion. Die Vermutung ist, dass eine verminderte BCH-Affinität durch Delokalisierung des Substrates nach Vergrößerung des Hohlraums verursacht wird. Das Asparagin an Position 133 ist einer der vermeintlichen Hauptakteure für den SDH-Transport und interagiert ebenfalls mit BCH. Denn durch die Abwesenheit von Asparagin wird eine mögliche BCH-Wechselwirkung geschwächt (siehe Abbildung 5.3).

5.7.3 Große Substituenten am Tyrosinring inhibieren die T₂-Aufnahme

Die Untersuchungen der Substrateigenschaften von LAT2-WT umfassten auch die Substituenten am Tyrosinring. Hierbei wurden vor allem voluminöse Atome betrachtet. Alle getesteten Substrate wiesen trotz stark variierender Größe der Substituenten eine solide Hemmung des

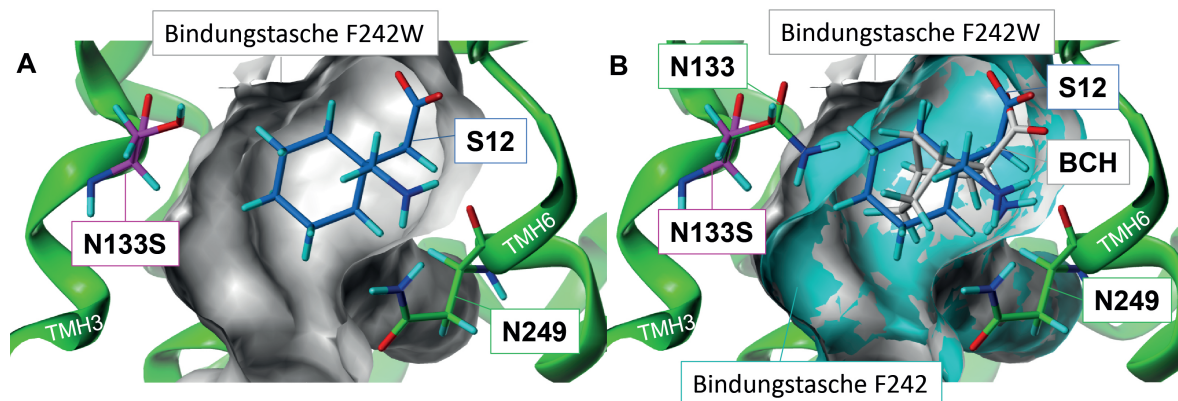


Abbildung 5.3: *In silico*-Docking von experimentell untersuchten Substraten in LAT2-N133S. Die funktionellen Gruppen der Aminosäurefunktion wurden optimal auf die Erkennungsstelle ausgerichtet. Bindungstasche von LAT2-N133S (grau) mit (A) S12 (blau). S12 steht nicht mehr im Konflikt. Das Substrat verfügt über ausreichend Platz und könnte dadurch zur Hemmung von 3,3'-T₂ führen. (B) N133 (magenta) reicht weit in den Raum (cyan) und engt den Platz für S12 stark ein, während BCH (grau) ohne Einschränkung hinein passt.

3,3'-T₂-Imports in Oozyten auf. Analoge Hinweise dazu lieferten auch die Docking-Studien der Substrate. Die Mutationen von LAT2 wurden in diesem Zusammenhang nicht genauer untersucht, da eine starke Inhibition des Transports beim WT bereits möglich war. Das Levodopa (S1) zeigt eine sehr starke kompetitive Hemmung des 3,3'-T₂-Transports durch LAT2-WT. Dies wurde auch von anderen publiziert. In deren kompetitiven Inhibitionsstudien wurde die Aufnahme von Leu durch LAT2 zu etwa 80 % durch S1 inhibiert und die Aufnahme von Ala um nahezu 88 % reduziert (Morimoto et al., 2008; Khunweeraphong et al., 2012). Alle *in vitro* oder auch *in silico*-Arbeiten zeigen vergleichbare Resultate. Ein Transport wurde nur indirekt über die Konkurrenz belegt. Damit wird LAT2 als ein möglicher Transporter für Levodopa in Betracht gezogen. Levodopa ist eine α -Aminosäure und dient als Vorläufer von Neurotransmittern wie u.a. Dopamin, Adrenalin und Noradrenalin. Als Botenstoff, ist es fähig die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und wird daher als Therapeutikum eingesetzt. Selbst die Substrate mit den sperrigsten Substituenten (S3, S5) in meta- und ortho- Stellung wirken kompetitiv auf die 3,3'-T₂-Aufnahme. Die verschiedenen halogenen Atome führen nur zu kleinen Unterschieden in der Hemmung. Die verschlechterte Hemmung von S3 könnte zudem auch auf eine sterische Hinderung zurück zu führen sein. Stattdessen zeigt das Vorläufersubstrat (S7) von T₃ und T₄ eine gute 3,3'-T₂-Hemmung. Es erfüllt offensichtlich alle Kriterien für den Substrattransport. Bereits in den 50iger Jahren wurden die ersten sterischen Parameter für Substituenten von Taft et al. bestimmt (Taft, 1957). Diese Werte geben den Einfluss eines Substituenten an, auf den der nukleophile Angriff durch Wasser während der Hydrolyse eines

Esters ermöglicht war. Erst 20 Jahre später wurden diese Parameter von MacPhee et al. erneut aufgegriffen und verbessert. Diese Parameter geben die Größe eines Moleküls an, die bei großen Substituenten, bezogen auf den Referenzwert von Wasserstoff, höher ist. Hieraus ergibt sich, dass die Trifluoromethyl-Gruppe größer ist als das Bromatom oder das Iodatome (MacPhee et al., 1978). Der Beweis dafür ist die schlechtere S3-Hemmung von 3,3'-T₂, im Vergleich zu den anderen getesteten Substraten. Auch die Iodatome nehmen wesentlich mehr Raum ein als Brom, Fluor oder die Hydroxyverbindung. In unseren experimentellen Hemmungsstudien von 3,3'-T₂ in LAT2 zeigten sich analoge Eigenschaften zu den ermittelten Parametern von MacPhee et al. Warum S5 mit zwei Bromsubstitutionen eine schlechtere Hemmung als S7 mit zwei Iodsubstitutionen aufweist, kann mit den Parametern leider nicht erklärt werden. Eine weitere Erklärung bieten die halogenen Eigenschaften der Iodatome. Wie oben beschrieben interagieren die Halogene mit dem Elektronensystem von Aromaten (Clark et al., 2007). In der Bindungstasche von LAT2 befinden sich viele aromatische Aminosäureseitenketten die mit den Iodatomen von S7 interagieren und dadurch womöglich einen Einfluss auf den Import von Iod substituierten Substraten haben (vgl. Kapitel 5.6).

5.7.4 Flexibilität von SDH-Derivaten muss zur Aufnahmeinhibition gegeben sein

Experimente zur Konformation der Substrate zeigten, dass sperrige Substrate einen definierten Raum nicht passieren können. Die Flexibilität spielt dabei eine bedeutende Rolle, denn die Bindungstasche hat zwei asymmetrische geformte Vertiefungen. Die zwei aufeinanderfolgenden aromatischen Ringe müssen zueinander drehbar sein, damit die Substrate die kleine Bindungstasche von LAT2 überwinden können. Gleichzeitig ist auch der Winkel zur Erkennungsstelle von großer Bedeutung. Docking-Studien bieten die Möglichkeit, die Flexibilitäten der SDH-Derivate darzustellen (hier nicht durchgeführt). Dadurch entstehen vielfältige Interpretationsmöglichkeiten für den Substrattransport. Das 3',5'-T₂ mit zwei sperrigen Iodatomen am Phenylring zeigt trotzdem eine sehr gute Flexibilität zwischen den beiden aromatischen Ringen. Dadurch ist das Molekül in der Lage, sich optimal durch die zwei vorhandenen, asymmetrisch geformten Bindungstaschen des Transportkanals hindurch zu winden. Experimentell wurde dieser potentielle T₂ Transport in einer Hemmungsstudie bestätigt. Korrespondierend dazu waren die anpassungsfähigen T₂-Derivate, 3,5-T₂ und 3,3'-T₂. Sobald SDH-Derivate höchstens zwei Iodatome besitzen (oder weniger) in der 3 (3') und / oder 5 (5') Position, unabhängig von ihrer Ringzuordnung, bleibt das Molekül flexibel genug um LAT2 zu passieren. Moleküle mit drei oder vier sperrigen Substituenten sind unflexibler. Sie können den

engen Transportweg schlecht oder gar nicht überwinden. Diese Iodatome verteilen sich über den Tyrosin- und Phenylring. Auf diese Weise behindern sie sich sterisch und schränken die Torsion der beiden Ringe ein. Dies würde erklären, warum die T_3 -Aufnahme durch LAT2 in Oozyten und in anderen Zelllinien stark eingeschränkt ist, aber auch warum T_4 und rT_3 am Import gehindert werden (Kinne et al., 2015; Zevenbergen et al., 2015). Demnach ist die Substratspezifität von LAT2 durch die unterschiedliche Flexibilität der SDH-Moleküle begründet und sie müssen über eine bestimmte räumliche Orientierung in der Bindungstasche verfügen.

5.8 LAT2 exportiert kein SDH

Die Struktur-Funktionsuntersuchungen lokalisierten drei wesentliche SDH empfindliche Seitenketten im Transportkanal von LAT2 (Hinz et al., 2015, 2017). Beim Vergleich der Profile für die Aufnahme sowie für die Abgabe von SDH und AS durch den WT und die drei ausgewählten LAT2-Varianten zeigten sich Transportunterschiede. Obwohl LAT2 als Antiporter für Aminosäuren bekannt ist, konnte kein Export von SDH durch LAT2 in Oozyten beobachtet werden. Dem entgegen zeigte sich in der gleichen Versuchsdurchführung ein robuster AS-Export. Hinsichtlich der AS wurden vergleichbare Exportergebnisse bereits von anderen publiziert (Bröer, 2013). Studien belegen den Export der nicht-proteinogenen α -Aminosäure Levodopa. Die Voraussetzung für den Export ist alleinig die Anwesenheit einer trans-stimulierenden AS auf der Membrangeenseite, wie z.B. Leu (Camargo et al., 2014). Die Erkenntnis, dass der LAT2 einen bidirektionalen Transport für AS und kleine Derivate bietet, jedoch nur einen unidirektionalen Transport für größere SDH, wird erstmalig erwähnt. Zeitgleich zur Anfertigung dieser Arbeit, wurden vergleichbare Daten veröffentlicht. Sie dokumentieren in gleicher Weise keinen Export von SDH durch LAT2 in COS1-Zellen (Zevenbergen et al., 2015). Ein möglicher Grund für den blockierten Export ist eine bekannte geringere Affinität für AS intrazellulär im Vergleich zu extrazellulär (Verrey, 2003). Dies könnte auch auf die SDH übertragen werden. Die Affinität von AS bzw. SDH intrazellulär könnte eine entscheidende Rolle beim Substratexport spielen. Eine wichtige Tatsache ist, dass die Substrataffinität auch durch den pKa-Wert der 4'-OH-Gruppe beeinflusst wird. Diese hängen im unmittelbaren Zusammenhang mit der Iodsubstitution an der Position 3' und 5'. Es gibt weitere Hinweise darauf, dass kleine, hydrophobe AS bevorzugt exportiert werden. Leu zeichnet sich mit höheren Exportwerten als Phe in den durchgeführten Untersuchungen aus. Weitere Beobachtungen deuten darauf hin, dass LAT2 wichtig für den Cystein-Export ist. Fernandez et al. zeigte, dass es zu einer erhöhten in-

trazellulären Cystein-Konzentration in der proximalen Tubulus-Zelllinie (OK-Zellen) kommt, wenn die Expression von LAT2 runterreguliert ist (Fernandez, 2003). Nach Veränderungen des Transporters durch die zielgerichtete Mutation der spezifisch ausgewählten Seitenketten zeigt sich interessanterweise durch die Seitenkettenverkürzung von Asn¹³³ zu Serin ein erhöhter Aminosäureexport (vgl. Abbildung 5.4). So scheint diese spezifische Position nicht nur eine wichtige Rolle im SDH-Import zu spielen, sondern ist auch essentiell am Export von AS beteiligt. Die N133S-Mutation ermöglicht außerdem den Export von 3,3'-T₂. Vergleichsweise wird durch die Mutation Y130A nur der Transport von SDH aktiviert, während die AS unbeeinträchtigt bleiben. Obwohl die Mutation Y130A den Import von T₃ erhöht und von T₄ überhaupt erst ermöglicht, kann diese Mutation den Export von T₃ und T₄ nicht erzwingen. Es belegt, dass LAT2 für den SDH-Export nicht konfiguriert ist. Gemäß dem molekularen Homologiemodell befindet sich Asn¹³³ näher an dem zentralen Erkennungsmuster der Aminosäurefunktion als Tyr¹³⁰, welches mehr auf der intrazellulären Seite lokalisiert ist. Es zeigt sich zudem, dass die Mutante F242W für den AS- oder SDH-Export unempfindlich ist. Neueste Untersuchungen von LAT zeigen, dass der SDH-Import sowie SDH-Export vom pH-Wert beeinflusst werden (Zevenbergen et al., 2015). Bei physiologischem pH-Wert liegt der Phenyl-Ring des T₃ in einer deprotonierten Form vor (etwa 15 %). Allerdings ist bei T₄ ein weitaus größerer Anteil aufgrund seines zusätzlichen Iodatoms deprotoniert (90 %) (Tóth et al., 2013). Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden ausschließlich im physiologischen pH-Bereich gemessen. Daher könnten sie mit SDH und SDH-ähnlichen Verbindungen bei unterschiedlichen pH-Werten abweichende Transportkapazitäten aufweisen. Auch Säugetiere besitzen Barrieren mit vielen verschiedenen pH-Werten in den Zellen, die damit einen direkten Einfluss auf den Transport von SDH im Physiologischen haben könnten.

5.9 Die Bedeutung von T₂ in der Zelle

Welche Rolle spielt der bevorzugte T₂-Transport über LAT2? Es gibt bereits zunehmende Anzeichen dafür, dass T₂ von essentieller Bedeutung für die Auslösung zellulärer Reaktionen ist. Anstatt ein bloßes Abbauprodukt zu sein, wie es bisher häufig angenommen wurde, beeinflussen die T₂-Derivate den Zellstoffwechsel (Pietzner et al., 2015). So wurde für 3,3'-T₂ bereits eine Bindungsstelle in Ratten-Mitochondrien entdeckt, das auf eine potentielle Rolle in der metabolischen Regulation der Zelle hinweist (Lanni et al., 1994). Das 3,5-T₂ konnte im zirkulierenden, humanen Serum nachgewiesen werden (Lehmpful et al., 2014). Dadurch können sie unmittelbar schnell auf die mitochondriale Funktion wirken. Es wurde gezeigt,

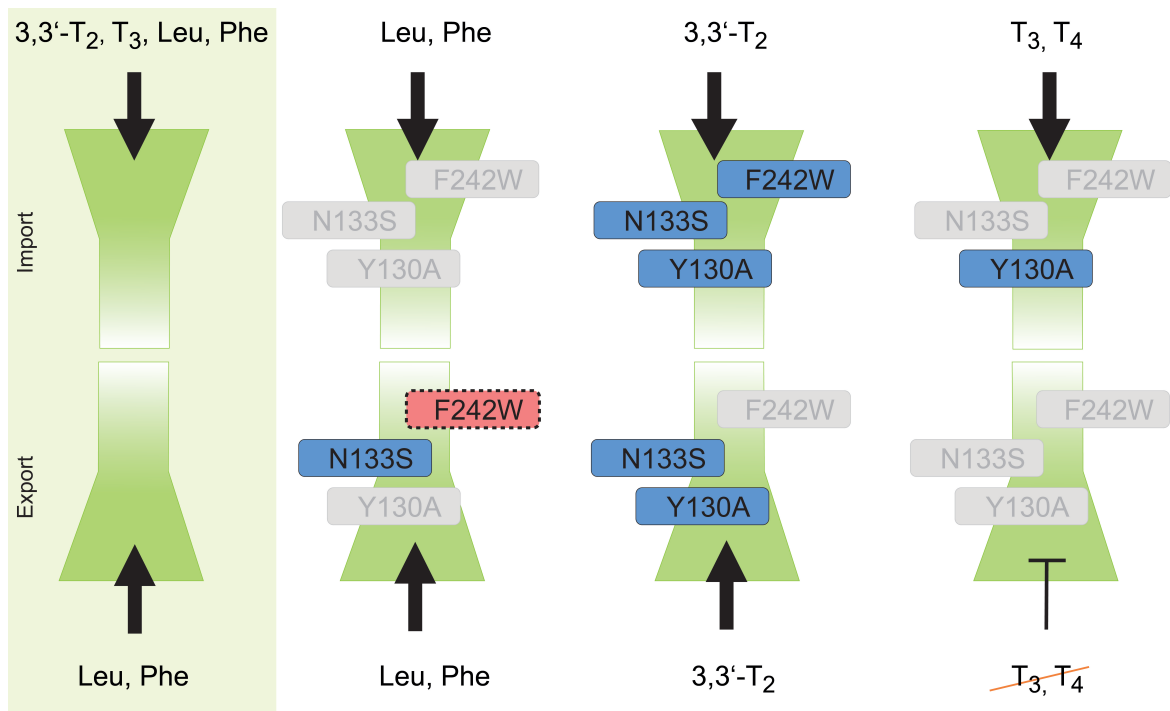


Abbildung 5.4: Schematische Zusammenfassung von LAT2-WT und -Mutationen, die entweder den Import (oberes Feld) oder den Export (unteres Feld) von AS (Leu, Phe) und SDH 3,3'-T₂, T₃, T₄ verstärken (blau) oder reduzieren (rot, gestrichelt). Sie repräsentieren molekulare Merkmale, die für verschiedene Import- und Exportprofile von AS und SDH verantwortlich sind.

dass 3,5-T₂ bei höheren Konzentrationen die T₃ Effekte nachahmen kann (Pietzner et al., 2015; Jonas et al., 2015; Padron et al., 2014; Moreno et al., 2008; Ball, 1997). Zum Beispiel wurde die Stimulation der Cytochrom-Oxygenase (COX) festgestellt. Außerdem sorgte *in vivo* verabreichtes T₂ für einen erhöhten Metabolismus in Leberzellen. Zudem beeinflusst 3,5-T₂ das Volumen der Adipozyten und induziert dadurch die Lipolyse. Dies erhöht den mitochondrialen Gehalt im braunen Fettgewebe wodurch wiederum die Thermogenese gesteigert wird (Lombardi et al., 2015). Abgesehen von der Rolle im Glukosestoffwechsel, zeigen epidemiologische Kohorten-Studien, dass 3,5-T₂ ebenfalls an der Schilddrüsenhormon-Homöostase beteiligt ist (Lehmpful et al., 2014). Neuere Erkenntnisse in Fischen beweisen sogar eine aktivierende Rolle für das 3,5-T₂, das an die SS1-Isoform des Schilddrüsenhormonrezeptors bindet. Zusammenfassend lässt sich für das T₂ eine wichtige Rolle in der Wirkungsweise von SDH zuordnen (Mendoza et al., 2013; Navarrete-Ramirez et al., 2013). Im Vergleich zu den anderen SDH-Transportern MCT8, MCT10 oder OATP1C1 zeigt der LAT2 einen bevorzugten Import von 3,3'-T₂ sowie sehr wahrscheinlich auch für andere T₂- und T₁-Derivate (Kinne et al.,

2015). Bisher ist bekannt, dass der SDH-Kreislauf entweder durch die T_3 -Inaktivierung oder durch den rT_3 -vermittelten Abbau über die Deiodinase 1 in der Zelle endet. Das vermeintliche Endprodukt T_2 könnte also über LAT2 die Membran passieren und in die Blutbahn gelangen, wo es weiter in die einzelnen Bestandteile zerlegt wird. Diese Perspektive eröffnet neue Hypothesen über den Verbleib oder den Metabolismus von T_2 . Zusammenfassend konnte ich in dieser Arbeit einen ersten Einblick von LAT2 im SDH-Transport darstellen. Ich generierte ein Homologiemodell für diesen SDH-Transporter (Hinz et al., 2015). In Kombination mit der zielgerichteten Mutagenese lieferten diese Untersuchungen erste strukturelle Informationen für den SDH-Transportmechanismus von LAT2. Die verantwortlichen Aminosäurereste wurden identifiziert. Darüber hinaus zeigte sich, dass LAT2 nur den unidirektionalen Import von T_2 und T_3 in die Zellen vollzieht. Dabei sind vier essentielle Merkmale in der Substratcharakterisierung erfasst worden. Diese legen eine definierte Substratspezifität von LAT2 fest. Bei ausreichender Flexibilität von großen SDH-ähnlichen Derivaten, muss zwingend die vollständige Aminosäurefunktion vorhanden sein. Hervorzuheben sind die Mutationsanalysen von LAT2. Dadurch wurden sechs Aminosäuren identifiziert, die zur Steigerung des T_2 Transports führten. Hingegen wurde nur ein Aminosäurerest definiert, der sich in einer Steigerung des T_3 -Imports auswirkte. Die Besonderheit, die durch die Struktur-Funktionsuntersuchungen herausgefunden werden konnte, war ein ermöglichter T_4 -Import. Dieser manifestierte sich nach nur einer Bindungstaschen vergrößernden Mutation (Y130A) und ermöglichte damit den T_4 -Transport in die Zellen. Weitere Untersuchungen der Exportfähigkeiten zeigten sogar, dass zwei Mutationen (N133S, Y130A) die Abgabe von $3,3'$ - T_2 bewilligten. Dabei fiel auf, dass die intra- und extrazellulären molekularen Anordnungen der Determinanten unterschiedlich zueinander sind. Um den Exportmechanismus von T_2 aufzuklären, könnten Transportstudien mit LAT3 und LAT4, deren Fähigkeit zum SDH-Export bekannt ist, hilfreich sein. Mit diesen Ergebnissen könnten Rückschlüsse über den blockierten SDH-Export von LAT2 gezogen werden. Außerdem sind weitere Studien über die intrazelluläre Konformation und den Export von SDH-Varianten notwendig, um den Transportmechanismus von LAT2 noch besser zu verstehen.

6 Fazit und Ausblick

Die aus den LAT2-Studien gewonnenen Erkenntnisse können als Basis für das Verständnis über die Transporter-Substrat-Interaktionen dienen. Die Forschung der Transporter gewinnt stetig mehr an Relevanz, weil Störungen des Membrantransportweges mit einer wachsenden Anzahl an Krankheiten assoziiert sind. In diesem Zusammenhang stehen z.B. die Thyreoiditis oder auch angeborene Stoffwechselerkrankungen. Die LATs bieten aufgrund ihres breiten Substratspektrums und der weitreichenden Gewebeexpression sehr viele mögliche Therapiemaßnahmen an. Hierbei könnte der Transporter entweder selbst als Target dienen oder könnte Target-Substrate zum gewünschten Ziel transportieren. Eine wichtige Rolle spielt aber auch die Identifizierung von Pharmakophoren, die über Transporter in die Zielzelle gelangen können. Mithilfe der Struktur-Wirkungsbeziehung von Molekülen lassen sich Transport-Modelle vorhersagen, um im weiteren Schritt Arzneistoffe von diesen Strukturen abzuleiten. Mithilfe von Mutationen werden die Sequenz-Struktur-Funktionsbeziehungen der Transporter untersucht. Die Kombination solcher Funktionsdaten mit strukturellen Informationen bietet ein solides Hilfsmittel, um tiefer gehende Einblicke in die Mechanismen des Substrattransports zu gewinnen. Dies unterstützt das Verständnis des Transportmechanismus und bietet Ideen, um pharmakologische Interventionen zu entwickeln. Nach der Entdeckung von Proteinen kommt es Schritt für Schritt zur Identifizierung molekularer Determinanten, die für den Aufnahme- und Abgabemechanismus erforderlich sind. Die Ergebnisse meiner Arbeit haben eine direkte Relevanz für das molekulare Verständnis der Pathogenese von SDH-Transporter assoziierten Krankheiten und sind einhergehend mit der Dysregulation von SDH in der Zelle. Darüber hinaus bietet das hier gewonnene Verständnis über die molekularen Determinanten und den damit verbundenen Transportmechanismus die Grundlage für zukünftige pharmakologische Interventionen gegen Fehlfunktionen, sodass SDH-abhängige Krankheitsbilder verhindert oder gezielt therapiert werden könnten. Aus diesen Daten geht hervor, dass es unterschiedliche Erkennungsmechanismen auf der extra- und intrazellulären Seite von LAT2 gibt. Die Arbeit stellt einen wichtigen Beitrag zum besseren Verständnis der Struktur-Funktionsbeziehung von LAT2 im SDH-Transport dar. Dennoch bleiben zahlreiche Fragen offen: Welche anderen Proteine

sind neben LAT2 an der Membran lokalisiert und vielleicht sogar auch am Transport von SDH beteiligt? Gibt es womöglich ein Proteinzusammenspiel? Unklar ist zudem, ob die Transporterexpression durch Homo- oder Heterodimerisierung beeinflusst wird. Zur Aufklärung bedarf es einer Untersuchungsmethode, die es möglich macht, Protein-Protein-Interaktionen aufzuzeigen. Der Einsatz der biophysikalischen Methode des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) wäre ein möglicher Ansatz zur Bestimmung der Interaktionsdynamik zweier Transporter. Die kompetitive Hemmungsfähigkeit von Gabapentin auf Leu konnte keine Inhibition bei LAT2 hervorrufen. Im Gegensatz dazu zeigte der LAT1 eine sehr starke Hemmung durch Gabapentin auf L-Leucin (Morimoto et al., 2008). Daraus abzuleiten ist, dass sogar zwischen den homologen Transportern offensichtlich besondere Unterschiede vorhanden sind. Worin unterscheiden sie sich also genau? Liegen andere Transportmechanismen zugrunde oder ist es eher eine Frage der Bindungstaschengröße? Außerdem wäre interessant zu wissen, welche physiologische Rolle LAT2 im MCT8-defizienten Organismus spielt? Da hauptsächlich T_2 über LAT2 transportiert wird und nur eingeschränkt der T_3 -Transport vermittelt wird, stellt sich die Frage: Ist das SDH-Derivat T_2 ein möglicher Ansatz für eine Therapieform bei SDH-Transporter-Fehlfunktionen? Können modifizierte SDH oder SDH-Derivate die Membran über LAT passieren und gleichermaßen an den im Zellkern liegenden SDH-Rezeptor als Transkriptionsfaktor binden? Kürzlich konnte gezeigt werden, dass außer des T_3 's auch SDH-Analoga mit dem SDH-Rezeptor interagieren können, wie z.B. das TRIAC oder das DITPA. Ob die Analoga über Transporter oder andere Wege in die Zelle gelangen, konnte bislang nicht nachgewiesen werden. Ein Experiment, das zur Aufklärung dieser Frage helfen könnte, wäre z.B. ein siRNA-Screen. Hierbei wird durch selektives Abschalten von einzelnen Transport-relevanten Proteinen die Substrataufnahme und die damit verbundene Rezeptoraktivierung verhindert. Vielleicht bietet sich auch in Zukunft die Möglichkeit, neue SDH-Analoga zu designen, um diese Pharmakophore gezielt über LAT in die Zelle zu bringen, damit sie als Transkriptionsfaktor im Zellkern die Genexpression verstärken können.

Literaturverzeichnis

- Abe, T., Kakyo, M., Sakagami, H., Tokui, T., Nishio, T., Tanemoto, M., Nomura, H., Hebert, S. C., Matsuno, S., Kondo, H., and Yawo, H. (1998). Molecular characterization and tissue distribution of a new organic anion transporter subtype (oatp3) that transports thyroid hormones and taurocholate and comparison with oatp2. *J. Biol. Chem.*, 273(35):22395–22401.
- Accorroni, A., Saponaro, F., and Zucchi, R. (2016). Tissue thyroid hormones and thyronamines. *Heart Fail. Rev.*, 21(4):373–390.
- Auffinger, P., Hays, F. A., Westhof, E., and Ho, P. S. (2004). Halogen bonds in biological molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101(48):16789–94.
- Ball, S. (1997). 3,5-Diiodo-L-thyronine (T2) has selective thyromimetic effects in vivo and in vitro. *J. Mol. Endocrinol.*, 19(2):137–147.
- Bassi, M. T., Sperandeo, M. P., Incert, B., Bulf, A., Pepe, A., Surace, E. M., Gat, C., Grandi, A. D., Buonincont, A., Riboni, M., Manzoni, M., Andria, G., Ballabio, A., Borsani, G., and Sebastio, G. (1999). SLC7A8, a Gene mapping within the lysinuric protein intolerance critical region, encodes a new member of the Glycoprotein-Associated amino acid transporter family. *Genomics*, 62(2):297–303.
- Bernal, J., Guadaño-Ferraz, A., and Morte, B. (2015). Thyroid hormone transporters - functions and clinical implications. *Nat. Rev. Endocrinol.*, 11(July):1–12.
- Beuming, T., Shi, L., Javitch, J. A., and Weinstein, H. (2006). A comprehensive structure-based alignment of prokaryotic and eukaryotic neurotransmitter/Na⁺ symporters (NSS) aids in the use of the LeuT structure to probe NSS structure and function. *Mol. Pharmacol.*, 70(5):1630–42.

- Bijsmans, I. T. G. W., Bouwmeester, R. A. M., Geyer, J., Faber, K. N., and van de Graaf, S. F. J. (2012). Homo- and hetero-dimeric architecture of the human liver Na⁺-dependent taurocholate co-transporting protein. *Biochem. J.*, 441(3):1007–15.
- Braun, D., Kinne, A., Brauer, A. U., Sapin, R., Klein, M. O., Köhrle, J., Wirth, E. K., and Schweizer, U. (2011a). Developmental and cell type-specific expression of thyroid hormone transporters in the mouse brain and in primary brain cells. *Glia*, 59(3):463–471.
- Braun, D., Wirth, E. K., Wohlgemuth, F., Reix, N., Klein, M. O., Uters, A. G., Ohrle, J., and Schweizer, U. (2011b). Aminoaciduria, but normal thyroid hormone levels and signalling, in mice lacking the amino acid and thyroid hormone transporter Slc7a8. *Biochem. J.*, 439:249–255.
- Bröer, S. (2013). Epithelial neutral amino acid transporters: lessons from mouse models. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 22(5):539–44.
- Bröer, S., Schneider, H. P., Bröer, A., Rahman, B., Hamprecht, B., and Deitmer, J. W. (1998). Characterization of the monocarboxylate transporter 1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes by changes in cytosolic pH. *Biochem. J.*, 333:167–174.
- Camargo, S. M. R., Vuille-dit Bille, R. N., Mariotta, L., Ramadan, T., Huggel, K., Singer, D., Götze, O., and Verrey, F. (2014). The molecular mechanism of intestinal levodopa absorption and its possible implications for the treatment of Parkinson's disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 351(1):114–23.
- César-Razquin, A., Snijder, B., Frappier-Brinton, T., Isserlin, R., Gyimesi, G., Bai, X., Reithmeier, R. A., Hepworth, D., Hediger, M. A., Edwards, A. M., and Superti-Furga, G. (2015). A Call for Systematic Research on Solute Carriers. *Cell*, 162(3):478–487.
- Chillarón, J., Font-Llitjós, M., Fort, J., Zorzano, A., Goldfarb, D. S., Nunes, V., and Palacín, M. (2010). Pathophysiology and treatment of cystinuria. *Nat. Rev. Nephrol.*, 6(7):424–434.
- Chou, P. Y. and Fasman, G. D. (1978). Empirical Predictions of Protein Conformation. *Ann. Rev. Biochem.*, 47(1):251–76.
- Christensen, H. N., Handlogten, M. E., and Thomas, E. L. (1969). Na plus-facilitated reactions of neutral amino acids with a cationic amino acid transport system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 63(3):948–55.

- Clark, T., Hennemann, M., Murray, J. S., and Politzer, P. (2007). Halogen bonding: The sigma-hole: Proceedings of "Modeling interactions in biomolecules II", Prague, September 5th-9th, 2005. *J. Mol. Model.*, 13(2):291–296.
- Claxton, D. P., Quick, M., Shi, L., and Weinstein, H. (2010). Ion/substrate-dependent conformational dynamics of a bacterial homolog of neurotransmitter: sodium symporters. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 17(7):822–830.
- Cody, V. and Duax, W. L. (1973). Distal conformation of the thyroid hormone 3,5,3'-triiodo-L-thyronine. *Science*, 181(4101):757–8.
- del Amo, E. M., Urtti, A., and Yliperttula, M. (2008). Pharmacokinetic role of L-type amino acid transporters LAT1 and LAT2. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 35(3):161–174.
- Di Cosmo, C., Liao, X.-H., Dumitrescu, A. M., Philp, N. J., Weiss, R. E., and Refetoff, S. (2010). Mice deficient in MCT8 reveal a mechanism regulating thyroid hormone secretion. *J. Clin. Invest.*, 120(9):3377–3388.
- Dumitrescu, A. M., Liao, X. H., Weiss, R. E., Millen, K., and Refetoff, S. (2006). Tissue-specific thyroid hormone deprivation and excess in monocarboxylate transporter (Mct) 8-deficient mice. *Endocrinology*, 147(9):4036–4043.
- Dumont, J. N. (1972). Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morphol.*, 136(2):153–179.
- Estévez, R., Camps, M., Rojas, a. M., Testar, X., Devés, R., Hediger, M. a., Zorzano, a., and Palacín, M. (1998). The amino acid transport system y⁺L/4F2hc is a heteromultimeric complex. *FASEB J.*, 12(13):1319–1329.
- Fang, Y., Jayaram, H., Shane, T., Kolmakova-Partensky, L., Wu, F., Williams, C., Xiong, Y., and Miller, C. (2009). Structure of a prokaryotic virtual proton pump at 3.2 Å resolution. *Nature*, 460(7258):1040–3.
- Fernandez, E. (2003). Basolateral LAT-2 Has a Major Role in the Transepithelial Flux of L-Cystine in the Renal Proximal Tubule Cell Line OK. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 14(4):837–847.
- Fotiadis, D., Kanai, Y., and Palacín, M. (2013). The SLC3 and SLC7 families of amino acid transporters. *Mol. Aspects Med.*, 34(2-3):139–158.

- Frascarelli, S., Ghelardoni, S., Chiellini, G., Galli, E., Ronca, F., Scanlan, T. S., and Zucchi, R. (2011). Cardioprotective effect of 3-iodothyronamine in perfused rat heart subjected to ischemia and reperfusion. *Cardiovasc. Drugs Ther.*, 25(4):307–313.
- Friesema, E., Docter, R., Moerings, E. P., Stieger, B., Hagenbuch, B., Meier, P. J., Krenning, E. P., Hennemann, G., and Visser, T. J. (1999). Identification of thyroid hormone transporters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 254(2):497–501.
- Friesema, E., Docter, R., Moerings, E. P. C. M., Verrey, F., Krenning, E. P., Hennemann, G., and Visser, T. J. (2001). Thyroid hormone transport by the heterodimeric human system L amino acid transporter. *Endocrinology*, 142(10):4339–4348.
- Friesema, E. C. H., Ganguly, S., Abdalla, A., Manning Fox, J. E., Halestrap, A. P., and Visser, T. J. (2003). Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *J. Biol. Chem.*, 278(41):40128–40135.
- Friesema, E. C. H., Grueters, P. A., Biebermann, H., Krude, H., Von Moers, A., Reeser, M., Barrett, T. G., Mancilla, E. E., Svensson, J., Kester, M. H. A., Kuiper, G. G. J. M., Balkassmi, S., Uitterlinden, A. G., Koehrle, P. J., Rodien, P., Halestrap, P. A. P., and Visser, P. T. J. (2004). Association between mutations in a thyroid hormone transporter and severe X-linked psychomotor retardation. *Lancet*, 364(9443):1435–1437.
- Friesema, E. C. H., Jansen, J., Jachtenberg, J.-W., Visser, W. E., Kester, M. H. a., and Visser, T. J. (2008). Effective cellular uptake and efflux of thyroid hormone by human monocarboxylate transporter 10. *Mol. Endocrinol.*, 22(6):1357–1369.
- Fukasawa, Y. (2000). Identification and Characterization of a Na⁺-independent Neutral Amino Acid Transporter That Associates with the 4F2 Heavy Chain and Exhibits Substrate Selectivity for Small Neutral D- and L-Amino Acids. *J. Biol. Chem.*, 275(13):9690–9698.
- Gao, X., Lu, F., Zhou, L., Dang, S., Sun, L., Li, X., Wang, J., and Shi, Y. (2009). Structure and Mechanism of an Amino Acid Antiporter. *Science*, 324(5934):1565–1568.
- Gao, X., Zhou, L., Jiao, X., Lu, F., Yan, C., Zeng, X., Wang, J., and Shi, Y. (2010). Mechanism of substrate recognition and transport by an amino acid antiporter. *Nature*, 463(7282):828–832.
- Gasol, E., Jiménez-Vidal, M., Chillarón, J., Zorzano, A., and Palacín, M. (2004). Membrane topology of System xc⁻ light subunit reveals a re-entrant loop with substrate-restricted accessibility. *J. Biol. Chem.*, 279(30):31228–31236.

- Geier, E. G., Schlessinger, A., Fan, H., Gable, J. E., Irwin, J. J., Sali, A., and Giacomini, K. M. (2013). Structure-based ligand discovery for the Large-neutral Amino Acid Transporter 1, LAT-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 110(14):5480–5.
- Gurdon, J., Lane, C., Woodland, H., and Marbaix, G. (1971). Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature*, Sep 17(233(5316)):177–82.
- Halestrap, A. P. (2013). The SLC16 gene family-Structure, role and regulation in health and disease. *Mol. Aspects Med.*, 34(2-3):337–349.
- Halestrap, A. P. and Meredith, D. (2004). The SLC16 gene family - From monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, 447(5):619–628.
- Hediger, M. A., Cléménçon, B., Burrier, R. E., and Bruford, E. A. (2013). The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): Introduction. *Mol. Aspects Med.*, 34(2-3):95–107.
- Hediger, M. A., Romero, M. F., Peng, J. B., Rolfs, A., Takanaga, H., and Bruford, E. A. (2004). The ABCs of solute carriers: Physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, 447(5):465–468.
- Henikoff, S. and Henikoff, J. G. (1992). Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89(22):10915–10919.
- Hennemann, G., Docter, R., Friesema, E. C. H., Jong, M. D. E., Krenning, E. P., Visser, T. J., Medicine, N., J, M., and Medicine, I. (2001). Plasma Membrane Transport of Thyroid Hormones and. *Endocr. Rev.*, 22(4):451–476.
- Hinz, K. M., Meyer, K., Kinne, A., Schülein, R., Köhrle, J., and Krause, G. (2015). Structural insights into thyroid hormone transport mechanisms of the L-type amino acid transporter 2. *Mol. Endocrinol.*, 29(6):933–42.
- Hinz, K. M., Neef, D., Rutz, C., Furkert, J., Köhrle, J., Schülein, R., and Krause, G. (2017). Molecular features of the L-type amino acid transporter 2 determine different import and export profiles for thyroid hormones and amino acids. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 443:163–174.
- Höglund, P. J., Nordström, K. J. V., Schiöth, H. B., and Fredriksson, R. (2011). The solute carrier families have a remarkably long evolutionary history with the majority of the human families present before divergence of Bilaterian species. *Mol. Biol. Evol.*, 28(4):1531–1541.

- Iacobuzio-Donahue, C. A., Ashfaq, R., Maitra, A., Adsay, N. V., Shen-Ong, G. L., Berg, K., Hollingsworth, M. A., Cameron, J. L., Yeo, C. J., Kern, S. E., Goggins, M., and Hruban, R. H. (2003). Highly Expressed Genes in Pancreatic Ductal Adenocarcinomas: A Comprehensive Characterization and Comparison of the Transcription Profiles Obtained from Three Major Technologies. *Cancer Res.*, 63(24):8614–8622.
- Jack, D. L., Paulsen, I. T., and Saier, J. (2000). The amino acid/polyamine/organocation (APC) superfamily of transporters specific for amino acids, polyamines and organocations. *Microbiology*, 146(8):1797–1814.
- Jonas, W., Lietzow, J., Wohlgemuth, F., Hoefig, C. S., Wiedmer, P., Schweizer, U., Köhrle, J., and Schürmann, A. (2015). 3,5-Diiodo-L-thyronine (3,5-T₂) Exerts thyromimetic effects on hypothalamus-pituitary-thyroid axis, body composition, and energy metabolism in male diet-induced obese mice. *Endocrinology*, 156(1):389–399.
- Jones, D. T. (1999). Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J. Mol. Biol.*, 292(2):195–202.
- Jung, F. T. (1970). Klinische Pathophysiologie. *JAMA J. Am. Med. Assoc.*, 212(6):1071.
- Khunweeraphong, N., Nagamori, S., Wiriyasermkul, P., Nishinaka, Y., Wongthai, P., Ohgaki, R., Tanaka, H., Tominaga, H., Sakurai, H., and Kanai, Y. (2012). Establishment of Stable Cell Lines With High Expression of Heterodimers of Human 4F2hc and Human Amino Acid Transporter LAT1 or LAT2 and Delineation of Their Differential Interaction With α -Alkyl Moieties. *J. Pharmacol. Sci.*, 119(4):368–380.
- Kinne, A., Kleinau, G., Hoefig, C. S., Grüters, A., Köhrle, J., Krause, G., and Schweizer, U. (2010). Essential molecular determinants for thyroid hormone transport and first structural implications for monocarboxylate transporter 8. *J. Biol. Chem.*, 285(36):28054–28063.
- Kinne, A., Wittner, M., Wirth, E. K., Hinz, K. M., Schüle, R., Köhrle, J., and Krause, G. (2015). Involvement of the L-Type Amino Acid Transporter Lat2 in the Transport of 3,3'-Diiodothyronine across the Plasma Membrane. *Eur. Thyroid J.*, 4(1):42–50.
- Kowalczyk, L., Ratera, M., Paladino, A., Bartoccioni, P., Errasti-Murugarren, E., Valencia, E., Portella, G., Bial, S., Zorzano, A., Fita, I., Orozco, M., Carpena, X., Vázquez-Ibar, J. L., and Palacín, M. (2011). Molecular basis of substrate-induced permeation by an amino acid antiporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 108(10):3935–3940.

- Krude, H., Kühnen, P., and Biebermann, H. (2015). Treatment of congenital thyroid dysfunction: Achievements and challenges. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 29(3):399–413.
- Lanni, A., Moreno, M., Horst, C., Lombardi, A., and Fernando, G. (1994). Specific binding sites for 3,3'-diiodo-L-thyronine (3,3'-T₂) in rat liver mitochondria. *FEBS Lett.*, 351(2):237–240.
- Lanni, A., Moreno, M., Lombardi, A., Goglia, F., Generale, F., Ii, F., and Mezzocannone, V. (1996). Calorogenic effect of diiodothyronines in the rat. *J. Physiol.*, 494(3):831–837.
- Law, C. J., Maloney, P. C., and Wang, D.-N. (2009). NIH Public Access. *Annu. Rev. Microbiol.*, 62(67):289–305.
- Lehmpful, I., Brabant, G., Wallaschofski, H., Ruchala, M., Strasburger, C. J., Köhrle, J., and Wu, Z. (2014). Detection of 3,5-Diiodothyronine in Sera of Patients with Altered Thyroid Status Using a New Monoclonal Antibody-Based Chemiluminescence Immunoassay. *Thyroid*, 24(9):1350–1360.
- Liang, V. C., Sedgwick, T., and Shi, Y. B. (1997). Characterization of the *Xenopus* homolog of an immediate early gene associated with cell activation: sequence analysis and regulation of its expression by thyroid hormone during amphibian metamorphosis. *Cell Res.*, 7(2):179–193.
- Lin, L., Yee, S. W., Kim, R. B., and Giacomini, K. M. (2015). SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 14(8):543–560.
- Lombardi, A., Senese, R., De Matteis, R., Busiello, R. A., Cioffi, F., Goglia, F., Lanni, A., and López, M. (2015). 3,5-Diiodo-L-Thyronine Activates Brown Adipose Tissue Thermogenesis in Hypothyroid Rats. *PLoS One*, 3(102).
- MacPhee, J. A., Panaye, A., and Dubois, J. E. (1978). Steric effects-I. A critical examination of the taft steric parameter-Es. Definition of a revised, broader and homogeneous scale. Extension to highly congested alkyl groups. *Tetrahedron*, 34(24):3553–3562.
- Mareninova, O., Shin, J. M., Vagin, O., Turdikulova, S., Hallen, S., and Sachs, G. (2005). Topography of the Membrane Domain of the Liver Na⁺-Dependent Bile Acid Transporter. *Biochemistry*, 44(8):13702–13712.
- Mastroberardino, L., Spindler, B., Pfeiffer, R., Skelly, P. J., Loffing, J., Shoemaker, C. B., and Verrey, F. (1998). Amino-acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family. *Nature*, 395(6699):288–91.

- Mayerl, S., Müller, J., Bauer, R., Richert, S., Kassmann, C. M., Darras, V. M., Buder, K., Boelen, A., Visser, T. J., and Heuer, H. (2014). Transporters MCT8 and OATP1C1 maintain murine brain thyroid hormone homeostasis. *J. Clin. Invest.*, 124(5):1987–1999.
- Mendoza, A., Navarrete-Ramirez, P., Hernandez-Puga, G., Villalobos, P., Holzer, G., Renaud, J. P., Laudet, V., and Orozco, A. (2013). 3,5-T2 Is an Alternative Ligand for the Thyroid Hormone Receptor beta 1. *Endocrinology*, 154(8):2948–2958.
- Meury, M., Costa, M., Harder, D., Stauffer, M., Jeckelmann, J. M., Brühlmann, B., Rosell, A., Ilgü, H., Kovar, K., Palacín, M., and Fotiadis, D. (2014). Detergent-induced stabilization and improved 3D map of the human heteromeric amino acid transporter 4F2hc-LAT2. *PLoS One*, 9(10):e109882.
- Moreno, M., de Lange, P., Lombardi, A., Silvestri, E., Lanni, A., and Goglia, F. (2008). Metabolic effects of thyroid hormone derivatives. *Thyroid*, 18(2):239–53.
- Morimoto, E., Kanai, Y., Kim, D. K., Chairoungdua, A., Choi, H. W., Wempe, M. F., Anzai, N., and Endou, H. (2008). Establishment and characterization of mammalian cell lines stably expressing human L-type amino acid transporters. *J. Pharmacol. Sci.*, 108(4):505–516.
- Morrison, K. L. and Weiss, G. A. (2001). Combinatorial alanine-scanning. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 5(3):302–307.
- Nakada, N., Mikami, T., Hana, K., Ichinoe, M., Yanagisawa, N., Yoshida, T., Endou, H., and Okayasu, I. (2014). Unique and selective expression of L-amino acid transporter 1 in human tissue as well as being an aspect of oncofetal protein. *Histol. Histopathol.*, 29(2):217–227.
- Nakamura, E., Sato, M., Yang, H., Miyagawa, F., Harasaki, M., Tomita, K., Matsuoka, S., Noma, A., Iwai, K., and Minato, N. (1999). 4F2 (CD98) heavy chain is associated covalently with an amino acid transporter and controls intracellular trafficking and membrane topology of 4F2 heterodimer. *J. Biol. Chem.*, 274(5):3009–3016.
- Navarrete-Ramirez, P., Luna, M., Valverde-R, C., and Orozco, A. (2013). 3,5-Di-Iodothyronine Stimulates Tilapia Growth Through an Alternate Isoform of Thyroid Hormone Receptor beta 1. *J. Mol. Endocrinol.*, 52(1):1–9.
- Núñez, B., Martínez De Mena, R., Obregon, M. J., Font-Llitjós, M., Nunes, V., Palacín, M., Dumitrescu, A. M., Morte, B., and Bernal, J. (2014). Cerebral cortex hyperthyroidism

- of newborn Mct8-deficient mice transiently suppressed by Lat2 inactivation. *PLoS One*, 9(5):3–9.
- O’Connell, D., Mruk, K., Rocheleau, J. M., and Kobertz, W. R. (2011). *Xenopus laevis* oocytes infected with multi-drug-resistant bacteria: implications for electrical recordings. *J. Gen. Physiol.*, 138(2):271–7.
- Orozco, A., Navarrete-Ramirez, P., Olvera, A., and Garcia-G, C. (2014). 3,5-Diiodothyronine (T2) is on a role. A new hormone in search of recognition. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 203:174–180.
- Padron, A. S., Neto, R. A. L., Pantaleao, T. U., De Souza Dos Santos, M. C., Araujo, R. L., De Andrade, B. M., Da Silva Leandro, M., De Castro, J. P. S. W., Ferreira, A. C. F., and De Carvalho, D. P. (2014). Administration of 3,5-diiiodothyronine (3,5-T2) causes central hypothyroidism and stimulates thyroid-sensitive tissues. *J. Endocrinol.*, 221(3):415–427.
- Pao, S. S., Paulsen, I. T., and Saier, M. H. (1998). Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62(1):1–34.
- Pietzner, M., Lehmpful, I., Friedrich, N., Schurmann, C., Ittermann, T., Dörr, M., Nauck, M., Laqua, R., Völker, U., Brabant, G., Völzke, H., Köhrle, J., Homuth, G., and Wallaschofski, H. (2015). Translating Pharmacological Findings from Hypothyroid Rodents to Euthyroid Humans: Is There a Functional Role of Endogenous 3,5-T2? *Thyroid*, 25(2):188–197.
- Pineda, M., Fernández, E., Torrents, D., Estévez, R., López, C., Camps, M., Lloberas, J., Zorzano, a., and Palacín, M. (1999). Identification of a membrane protein, LAT-2, that Co-expresses with 4F2 heavy chain, an L-type amino acid transport activity with broad specificity for small and large zwitterionic amino acids. *J. Biol. Chem.*, 274(28):19738–44.
- Pizzagalli, F., Hagenbuch, B., Stieger, B., Klenk, U., Folkers, G., and Meier, P. J. (2002). Identification of a novel human organic anion transporting polypeptide as a high affinity thyroxine transporter. *Mol. Endocrinol.*, 16(10):2283–2296.
- Protze, J., Braun, D., Hinz, K. M., Bayer-Kusch, D., Schweizer, U., and Krause, G. (2017). Membrane-traversing mechanism of thyroid hormone transport by monocarboxylate transporter 8. *Cell. Mol. Life Sci.*, 74(12):2299–2318.
- Ritchie, J. W. A., Peter, G. J., Shi, Y. B., and Taylor, P. M. (1999). Thyroid hormone transport by 4F2hc-IU12 heterodimers expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Endocrinol.*, 163(2):R5–9.

- Rosell, A., Meury, M., Álvarez-Marimon, E., Costa, M., Pérez-Cano, L., Zorzano, A., Fernández-Recio, J., Palacín, M., and Fotiadis, D. (2014). Structural bases for the interaction and stabilization of the human amino acid transporter LAT2 with its ancillary protein 4F2hc. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 111(8):2966–71.
- Rossier, G., Meier, C., Summa, V., Sordat, B., Verrey, F., and Kühn, L. C. (1999). LAT2, a new basolateral 4F2hc/CD98-associated amino acid transporter of kidney and intestine. *J. Biol. Chem.*, 274(49):34948–34954.
- Rudnick, G. (2011). Cytoplasmic permeation pathway of neurotransmitter transporters. *Biochemistry*, 50(35):7462–7475.
- Saier, M. H., Reddy, V. S., Tsu, B. V., Ahmed, M. S., Li, C., and Moreno-Hagelsieb, G. (2016). The Transporter Classification Database (TCDB): Recent advances. *Nucleic Acids Res.*, 44(D1):D372–D379.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, a. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 74(12):5463–7.
- Segawa, H., Fukasawa, Y., Miyamoto, K.-i., Takeda, E., Endou, H., and Kanai, Y. (1999). Identification and Functional Characterization of a Na⁺ - independent Neutral Amino Acid Transporter with Broad Substrate Selectivity. *J. Biol. Chem.*, 274(28):19745–19751.
- Senese, R., Lasala, P., Leanza, C., and de Lange, P. (2014). New avenues for regulation of lipid metabolism by thyroid hormones and analogs. *Front. Physiol.*, 5(Nov):1–7.
- Shaffer, P. L., Goehring, A., Shankaranarayanan, A., and Gouaux, E. (2009). Structure and Mechanism of a Na⁺-Independent Amino Acid Transporter. *Science (80-.)*, 325(5943):1010–1014.
- Shi, L., Quick, M., Zhao, Y., Weinstein, H., and Javitch, J. A. (2008). The Mechanism of a Neurotransmitter:Sodium Symporter-Inward Release of Na⁺ and Substrate Is Triggered by Substrate in a Second Binding Site. *Mol. Cell*, 30(6):667–677.
- Stein, W. D. and Litman, T. (2015). *Channels, Carriers, and Pumps: An Introduction to Membrane Transport*. Elsevier.
- Taft, R. W. (1957). A Precise Correlation of Nuclear Magnetic Shielding in m- and p-Substituted Fluorobenzenes by Inductive and Resonance Parameters from Reactivity. *J. Am. Chem. Soc.*, 79(5):1045–1049.

- Taylor, P. M. and Ritchie, J. W. A. (2007). Tissue uptake of thyroid hormone by amino acid transporters. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 21(2):237–251.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994). ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res*, 22(22):4673–4680.
- Tohyama, K., Kusuhara, H., and Sugiyama, Y. (2004). Involvement of multispecific organic anion transporter, Oatp14 (Slc21a14), in the transport of thyroxine across the blood-brain barrier. *Endocrinology*, 145(9):4384–4391.
- Tóth, G., Mazák, K., Hosztafi, S., Kökösi, J., and Noszál, B. (2013). Species-specific lipophilicity of thyroid hormones and their precursors in view of their membrane transport properties. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 76:112–118.
- Trajkovic, M., Visser, T., and Mittag, J. (2007). Abnormal thyroid hormone metabolism in mice lacking the monocarboxylate transporter 8. *J. Clin. Invest.*, 117(3):627–635.
- Tsai, M. F., Fang, Y., and Miller, C. (2012). Sided functions of an arginine-aggmatine antiporter oriented in liposomes. *Biochemistry*, 51(8):1577–1585.
- Uchino, H., Kanai, Y., Kim, K., Wempe, M. F., Chairoungdua, A., Morimoto, E., Anders, M. W., and Endou, H. (2002). Transport of Amino Acid-Related Compounds Mediated by L-Type Amino Acid Transporter 1 (LAT1): Insights Into the Mechanisms of Substrate Recognition. *Mol. Pharmacol.*, 61(4):729–737.
- Van Winkle, L. J. (1993). Endogenous amino acid transport systems and expression of mammalian amino acid transport proteins in *Xenopus* oocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1154(2):157–172.
- Verrey, F. (2003). System L: heteromeric exchangers of large, neutral amino acids involved in directional transport. *Pflugers Arch.*, 445(5):529–533.
- Visser, W. E., Friesema, E. C. H., Jansen, J., and Visser, T. J. (2008). Thyroid hormone transport in and out of cells. *Trends Endocrinol. Metab.*, 19(2):50–56.
- Voth, A. R., Khuu, P., Oishi, K., and Ho, P. S. (2009). Halogen bonds as orthogonal molecular interactions to hydrogen bonds. *Nat. Chem.*, 1(1):74–9.
- Weber, W.-M. (1999). Ion currents of *Xenopus laevis* oocytes: state of the art. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, 1421(2):213–233.

- Westholm, D. E., Marold, J. D., Viken, K. J., Duerst, A. H., Anderson, G. W., and Rumbley, J. N. (2010). Evidence of evolutionary conservation of function between the thyroxine transporter *Oatp1c1* and major facilitator superfamily members. *Endocrinology*, 151(12):5941–5951.
- Wirth, E. K., Roth, S., Blechschmidt, C., Hölter, S. M., Becker, L., Racz, I., Zimmer, A., Klopstock, T., Gailus-Durner, V., Fuchs, H., Wurst, W., Naumann, T., Bräuer, A., de Angelis, M. H., Köhrle, J., Grüters, A., and Schweizer, U. (2009). Neuronal 3',3,5-triiodothyronine (T3) uptake and behavioral phenotype of mice deficient in *Mct8*, the neuronal T3 transporter mutated in Allan-Herndon-Dudley syndrome. *J. Neurosci.*, 29(30):9439–9449.
- Wirth, E. K., Schweizer, U., and Köhrle, J. (2014). Transport of thyroid hormone in brain. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, 5(JUN):1–7.
- Wotczak, A., Luft, J., and Cody, V. (1992). Mechanism of molecular recognition. Structural aspects of 3,3'-diiodo-L-thyronine binding to human serum transthyretin. *J. Biol. Chem.*, 267(1):353–357.
- Wüller, S., Wiesner, B., Löffler, A., Furkert, J., Krause, G., Hermosilla, R., Schaefer, M., Schüle, R., Rosenthal, W., and Oksche, A. (2004). Pharmacochaperones post-translationally enhance cell surface expression by increasing conformational stability of wild-type and mutant vasopressin V₂ receptors. *J. Biol. Chem.*, 279(45):47254–47263.
- Yan, X. Q., Wang, H., Chen, W. D., and Jin, W. J. (2014). The halogen bond between amantadine and iodine and its application in the determination of amantadine hydrochloride in pharmaceuticals. *Anal. Sci.*, 30(3):365–370.
- Yen, P. M. (2001). Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol. Rev.*, 81(3):1097–142.
- Zevenbergen, C., Meima, M. E., De Souza, E. C. L., Peeters, R. P., Kinne, A., Krause, G., Edward Visser, W., and Visser, T. J. (2015). Transport of iodothyronines by human l-type amino acid transporters. *Endocrinology*, 156(11):4345–4355.
- Zhou, Y., Samson, M., Francon, J., and Blondeau, J.-p. (1992). Thyroid hormone concentrative uptake in rat erythrocytes. *Biochem. J.*, 281:81–86.
- Zhou, Y., Samson, M., Osty, J., Francon, J., and Blondeau, J. P. (1990). Evidence for a close link between the thyroid hormone transport system and the aromatic amino acid transport system T in erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, 265(28):17000–17004.

Zur, A. A., Chien, H. C., Augustyn, E., Flint, A., Heeren, N., Finke, K., Hernandez, C., Hansen, L., Miller, S., Lin, L., Giacomini, K. M., Colas, C., Schlessinger, A., and Thomas, A. A. (2016). LAT1 activity of carboxylic acid bioisosteres: Evaluation of hydroxamic acids as substrates. *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, 26(20):5000–5006.

Anhang

Ein multiples Sequenzalignment verschiedener Spezies

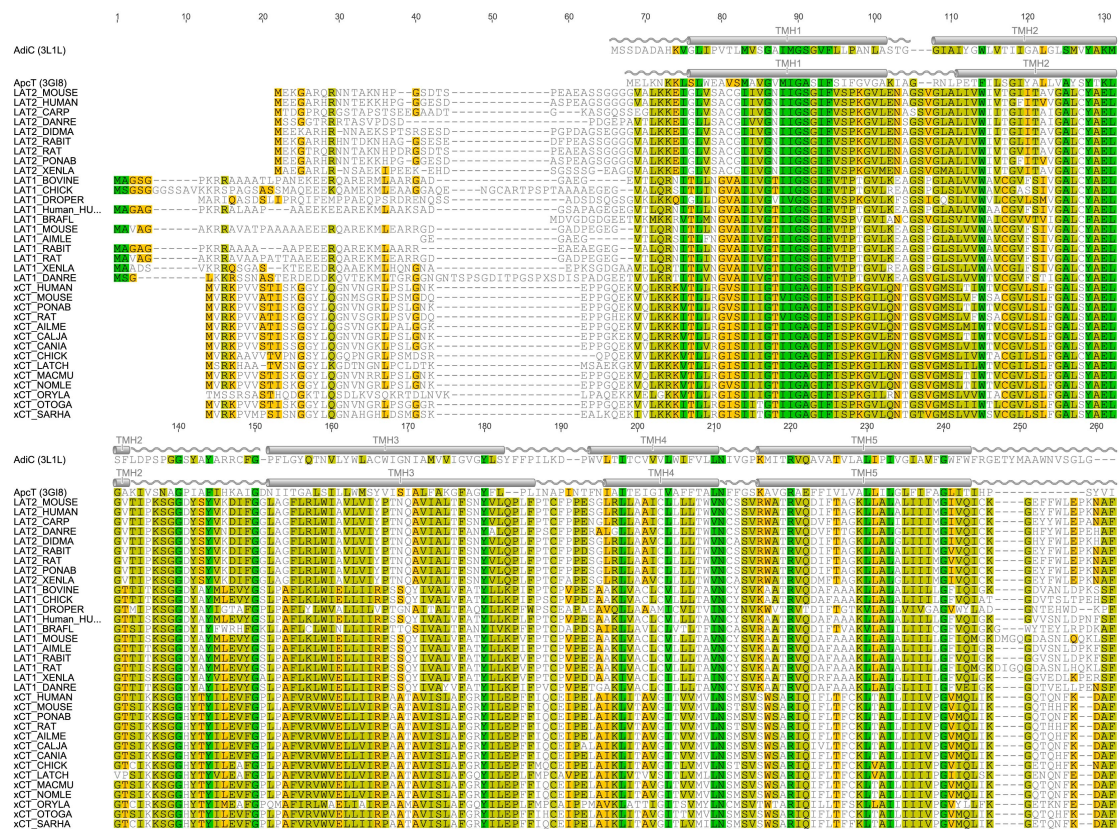


Abbildung 6.1: Ein multiples Sequenzalignment verschiedener Spezies (A). Das multiple Sequenzalignment der Aminosäuresequenzen der Kristallstrukturen von AdiC, ApcT sowie die Sequenzen der LAT1, LAT2 und xCT erfolgte mit ClustalW. Oberhalb der Sequenzen der Kristallstrukturen sind die Helixgrenzen sowie die flexiblen Bereiche dargestellt. Sie zeigen für beide Transporter je 12 TMHs. Die Länge der TMHs sowie der Loop-Bereiche variiert zwischen beiden Kristallstrukturen. Die Sequenzen beginnen N-Terminal und enden C-terminalen mit einem Loop. Die gefärbten Aminosäuren werden durch eine hohe Ähnlichkeit im Sequenzalignment definiert.



Abbildung 6.2: Ein multiples Sequenzalignment verschiedener Spezies (B). Das multiple Sequenzalignment der Aminosäuresequenzen der Kristallstrukturen von Adic, ApcT sowie die Sequenzen der LAT1, LAT2 und xCT erfolgte mit ClustalW. Oberhalb der Sequenzen der Kristallstrukturen sind die Helixgrenzen sowie die flexiblen Bereiche dargestellt. Sie zeigen für beide Transporter je 12 TMHs. Die Länge der TMHs sowie der Loop-Bereiche variiert zwischen beiden Kristallstrukturen. Die Sequenzen beginnen N-Terminal und enden C-terminalen mit einem Loop. Die gefärbten Aminosäuren werden durch eine hohe Ähnlichkeit im Sequenzalignment definiert.

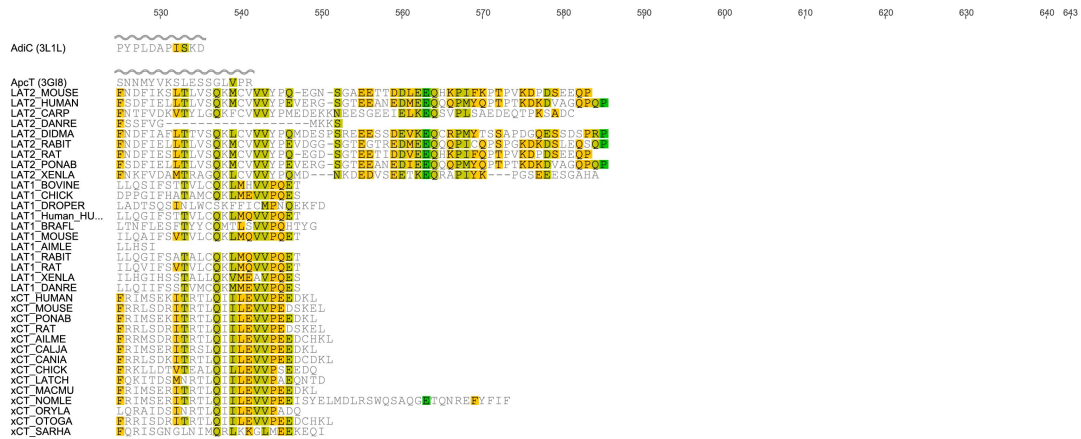


Abbildung 6.3: Ein multiples Sequenzalignement verschiedener Spezies (C). Das multiple Sequenzalignement der Aminosäuresequenzen der Kristallstrukturen von AdiC, ApcT sowie die Sequenzen der LAT1, LAT2 und xCT erfolgte mit ClustalW. Oberhalb der Sequenzen der Kristallstrukturen sind die Helixgrenzen sowie die flexiblen Bereiche dargestellt. Sie zeigen für beide Transporter je 12 TMHs. Die Länge der TMHs sowie der Loop-Bereiche variiert zwischen beiden Kristallstrukturen. Die Sequenzen beginnen N-Terminal und enden C-terminalen mit einem Loop. Die gefärbten Aminosäuren werden durch eine hohe Ähnlichkeit im Sequenzalignement definiert.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides Statt, dass diese Arbeit von niemand anderem als meiner Person verfasst worden ist. Alle verwendeten Hilfsmittel wie Berichte, Bücher, Internetseiten oder ähnliches sind im Literaturverzeichnis angegeben, Zitate aus fremden Arbeiten sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungskommission vorgelegt. Abgesehen von den Teilpublikationen wurde diese Dissertation nicht veröffentlicht. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt.

Berlin, 27. Juli 2017

Katrin Manuela Hinz

Publikationsliste

Teile dieser Dissertation sind in den folgenden Publikationen enthalten:

Kinne, A., Wittner, M., Wirth, E. K., Hinz, K. M., Schülein, R., Köhrle, J., and Krause, G.

Involvement of the L-Type Amino Acid Transporter Lat2 in the Transport of 3,3'-Diodothyronine across the Plasma Membrane.

Eur. Thyroid J., 4(1):42-50. (2015)

Hinz, K. M., Meyer, K., Kinne, A., Schülein, R., Köhrle, J., and Krause, G.

Structural insights into thyroid hormone transport mechanisms of the L-type amino acid transporter 2.

Mol. Endocrinol., 29(6):933-42. (2015)

Hinz, K. M., Neef, D., Rutz, C., Furkert, J., Schülein, R., Köhrle, J., and Krause, G.

Molecular features of the L-type amino acid transporter 2 determine different import and export profiles for thyroid hormones and amino acids.

Mol. Cell. Endocrinol. (2017)

Weitere Publikationen:

Protze, J., Braun, D., Hinz, K. M., Bayer-Kusch, D., Schweizer, U., Krause, G.

Membrane traversing mechanism of thyroid hormone transport by monocarboxylate transporter 8. Cell. Mol. Life Sci. doi:10.1007/s00018-017-2461-9. (2017)

Krause, G., Hinz, K. M. *Thyroid hormone transport across L-type amino acid transporters: What can molecular modelling tell us?*

Mol. Cell. Endocrinol. doi:10.1016/j.mce.2017.03.018 (2017)

Konferenzbeiträge

Vortrag

K. M. Hinz *Initial structure-function studies of the L-type amino acid transporter 2 (Lat2) in thyroid hormone transport*

29. Arbeitstagung Experimentelle Schilddrüsenforschung - Essen, Deutschland
December 12 - 14, 2013

A. Kinne, K. M. Hinz, M. Wittner, J. Köhrle, G. Krause

First insights into LAT2 as T2 Transporter and its structure-function relationships

38th Annual Meeting of the European Thyroid Association - Santiago de Compostela, Spain
September 6 - 10, 2014

K. M. Hinz

Lat2: Structure function analysis of transport mechanisms and of thyroid hormone like substrates characteristics

30. Arbeitstagung Experimentelle Schilddrüsenforschung - Bremen, Deutschland
December 4 - 5, 2014

K. M. Hinz, D. Neef, G. Krause

Thyroid Hormone Uptake and Efflux Profiles Differ at the L-Type Amino Acid Transporter 2

15th International Thyroid Congress (ITC) - Orlando, Amerika
October 18 - 23, 2015

K. M. Hinz

L-Type amino acid transporter 2: Determinants enable uptake and efflux of TH-derivatives

31. Arbeitstagung Experimentelle Schilddrüsenforschung - Bremen, Deutschland
December 10 - 12, 2015

K. M. Hinz, D. Neef, G. Krause

Distinct molecular features at L-type amino acid transporter 2 determine differing thyroid hormone influx and efflux profiles

39th Annual Meeting of the European Thyroid Association
September 3 - 6, 2016

Poster

K. M. Hinz, A. Kinne, G. Krause

Homology model of the L-type amino acid transporter Lat2 for elucidating the structure-function relationships of substrate transport

ETA 2013: 37th Annual Meeting of the European Thyroid Association - Leiden, Netherlands
September 7 - 11, 2013

K. M. Hinz, A. Kinne, G. Krause

Model driven site-directed mutagenesis of the L-type amino acid transporter 2 reveals sensitive sites of the thyroid hormone 3,3'-T2 uptake

57. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie - Dresden, Deutschland
March 19 - 22, 2014

K. M. Hinz

Model driven site directed mutagenesis of the L-Type amino acid transporter reveals sensitive sites of the thyroid hormone 3,3'-T2 uptake

ESE Bregenz Summer School on Endocrinology 2014 - Bregenz, Austria
August 3 - 7, 2014

K. M. Hinz, K. Meyer, M. Lisurek, J. Köhrle, A. Kinne, G. Krause

Thyroid hormone Transporter: Analysis of substrate characteristics by variation of thyroid hormone like scaffolds

38th Annual Meeting of the European Thyroid Association - Santiago de Compostela, Spain
September 6 - 10, 2014

K. M. Hinz, K. Meyer, E. M. Wirth, J. Köhrle, A. Kinne, G. Krause

Thyroid Hormone Transport by the L-Type Amino Acid Transporter Lat2: Sites for 3,3'-T2 and T3 recognition and potential gate function identified

Thyroid-Trans-Act 1st International conference - Bremen, Deutschland
December 5 - 7, 2014

K. M. Hinz, A. Kinne, G. Krause

Structural insights into thyroid hormone transport mechanisms of the L-type amino acid transporter - Lat2

9th International Research Conference, BioMedical Transporters 2015 - Lugano, Switzerland
August 9 - 13, 2015

K. M. Hinz, D. Neef, G. Krause

Thyroid Hormone Uptake and Efflux Profiles Differ at the L-Type Amino Acid Transporter 2
15th International Thyroid Congress (ITC) - Orlando, Amerika
October 18 - 23, 2015