

**Funktionelle Charakterisierung der beiden
hepatischen organischen Anionentransporter OAT2
(*SLC22A7*) und OAT7 (*SLC22A9*) mittels *in vitro*
Methoden und zwei neu generierten Mausmodellen**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
M.Sc. Charlotte Franziska Kölz
aus Bad Friedrichshall

Tübingen
2023

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

07.08.2023

Dekan:

Prof. Dr. Thilo Stehle

1. Berichterstatter/-in:

Prof. Dr. Anne Nies

2. Berichterstatter/-in:

Prof. Dr. Matthias Schwab

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis.....	i
Abstract.....	iv
Zusammenfassung.....	vi
1 Einleitung.....	1
1.1 Membrantransportproteine.....	1
1.1.1 Die Rolle von Membrantransportern in der klinischen Pharmakologie.....	2
1.1.2 Klassifizierung von Membrantransportproteinen.....	6
1.1.2.1 ABC Transporter.....	6
1.1.2.2 SLC Transporter.....	7
1.1.3 Methoden zur funktionellen Charakterisierung von Membrantransportern.....	8
1.1.3.1 <i>In vitro</i> Charakterisierung mittels zellbasierter Assays.....	9
i Rekombinante Transporter-exprimierende Zelllinien.....	9
ii Polarisierte Monolayerzellen.....	10
iii Primäre Hepatozyten.....	10
1.1.3.2 Mausmodelle zur Charakterisierung von Membrantransportern.....	11
1.2 Der organische Anionentransporter 2 (OAT2 / <i>SLC22A7</i>).....	13
1.2.1 Entdeckung und Lokalisation von OAT2.....	13
1.2.2 Substratspezifität und physiologische Rolle von OAT2.....	16
1.3 Der organische Anionentransporter 7 (OAT7 / <i>SLC22A9</i>).....	19
1.3.1 Entdeckung, Lokalisation und Funktion von OAT7.....	19
1.3.2 Substratspezifität und physiologische Rolle von OAT7.....	20
1.4 Ziele der Arbeit.....	21
2 Material und Methoden.....	22
2.1. Material.....	22
2.1.1 Chemikalien.....	22
2.1.2 Kits.....	27
2.1.3 Plasmide.....	28
2.1.4 TaqMan Genexpressionsassays.....	28
2.1.5 RNA-Microarrays.....	28
2.1.6 Antikörper.....	29
2.1.7 Radioaktiv markierte Substanzen.....	30
2.1.8 Puffer / Lösungen.....	32
2.1.9 Zellkulturmedien.....	36
2.1.10 Zelllinien.....	36
2.1.11 Verbrauchsmaterialien.....	38
2.1.12 Geräte und Hilfsmittel.....	41
2.1.13 Software.....	44

2.2 Methoden.....	45
2.2.1 Zellkultur.....	45
2.2.1.1 Stabil transfizierte Zelllinien.....	45
2.2.1.2 Verwendete vorhandene Zelllinien	45
2.2.1.3 Stabile Transfektion von Flp-In-293 Zellen mit OAT2 des Menschen und der Maus.....	46
2.2.1.4 Routinekultivierung der Zellen.....	47
2.2.1.5 Primäre Leberzelltypen des Menschen	48
2.2.1.6 Primäre Hepatozyten aus Mäusen	48
2.2.2 Mäuse	50
2.2.2.1 Generierung zweier Mauslinien.....	50
i Generierung der hOAT7 <i>Knockin</i> Mauslinie.....	50
ii Generierung der mOat2 <i>Knockout</i> Mauslinie	54
2.2.2.2 Haltung der Mäuse.....	58
2.2.2.3 Lyse der Ohrbiopsien, Schwanzspitzen sowie Gewebeproben der Mäuse	59
2.2.2.4 Genotypisierung der Mäuse	59
2.2.2.5 Präparation der Mäuse.....	62
2.2.3 Transportversuche.....	63
2.2.3.1 Aussäen der Zellen für Transportversuche.....	63
2.2.3.2 Influx Transportversuch mit radioaktiv markierten Substraten	63
2.2.3.3 Efflux Transportversuch mit radioaktiv markierten Substraten.....	64
2.2.3.4 Influx Transportversuch mit nicht radioaktiv markiertem Substrat.....	65
2.2.4 Herstellung von Gefrier-Gewebeschnitten	66
2.2.4.1 Schneiden von Mäuseleber für Immunfluoreszenzfärbungen	66
2.2.4.2 Schneiden von Mäuseniere für H&E-Färbungen und RNA-Isolation.....	66
2.2.5 Herstellung von FFPE Gewebeblocken und Mikrotomschnitten.....	67
2.2.5.1 Herstellung von FFPE Gewebeblocken.....	67
2.2.5.2 Herstellung von Gewebeschnitten aus FFPE Blöcken.....	67
2.2.6 Immunfluoreszenzfärbungen und Fluoreszenzmikroskopie	67
2.2.6.1 Immunfluoreszenzfärbungen von Zellen und Gefrier-Gewebeschnitten.....	67
2.2.6.2 Fluoreszenzmikroskopie	68
2.2.7 Histologische und immunhistochemische Färbungen	69
2.2.7.1 Hämatoxylin-Eosin (H&E) Färbung von Gefrier-Gewebeschnitten.....	69
2.2.7.2 Immunhistochemische Färbungen von FFPE-Gewebeschnitten	69
2.2.8 Gewinnung von Proteinen aus Zellen und Gewebe und Proteinbestimmung nach Smith.....	70
2.2.8.1 Gewinnung von Membranprotein aus Zellen	70
2.2.8.2 Gewinnung von Gesamtprotein aus Lebergewebe der Maus	70
2.2.8.3 Gewinnung von Transmembranproteinen aus Lebergewebe der Maus.....	71
2.2.8.4 Proteinbestimmung nach Smith	71
2.2.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Immunblot	72

2.2.10 Proteomanalysen mit Lebergewebe aus Mäusen	74
2.2.11 RNA Isolation aus Zellen und Geweben	74
2.2.11.1 Aufarbeitung von Zellen für die RNA Isolation	74
2.2.11.2 Aufarbeitung von Mausgewebe für die RNA Isolation.....	75
2.2.11.3 RNA Isolation mithilfe des <i>mirVana</i> miRNA Isolationskits.....	75
2.2.12 Gewinnung von cDNA aus RNA und Real Time PCR.....	76
2.2.12.1 cDNA Synthese aus RNA mittels des cDNA high capacity Kit.....	76
2.2.12.2 Quantitative PCR (qPCR).....	76
2.2.12.3 Analyse der Genexpression von <i>mSlc22a7</i> in verschiedenen Mausgeweben	77
2.2.13 Sequenzierung der <i>mSlc22a7</i> cDNA in Kontroll- und <i>mOat2-Knockout</i> Mäusen.....	78
2.2.13.1 Amplifikation der <i>mSlc22a7</i> mRNA mittels PCR.....	78
2.2.13.2 Gel-Elution	79
2.2.13.3 Sequenzier-Reaktion.....	80
2.2.13.4 Aufreinigung der Sequenzier-Reaktion und Sequenzierung	80
2.2.14 RNA-Microarrays	80
2.2.15 Klinische Chemie mit Plasma von Mäusen	81
2.2.16 Statistische Auswertung	81
3 Ergebnisse	82
3.1 Der organische Anionentransporter 2.....	82
3.1.1 <i>In vitro</i> Charakterisierung von humanem und murinem OAT2 mittels stabil transfizierter Zelllinien	82
3.1.1.1 Generierung und Charakterisierung von hOAT2- und mOat2-exprimierenden Zelllinien	82
3.1.1.2 Funktionelle Charakterisierung der hOAT2 und mOat2-exprimierenden Zelllinien anhand prototypischer Substrate	84
i cGMP als prototypisches Substrat von hOAT2 und mOat2.....	84
ii Xanthin als prototypisches Substrat von hOAT2	93
3.1.1.3 Identifizierung neuer endogener hOAT2 / mOat2 Substrate	96
3.1.2 Zelltypspezifische hepatische Expression von hOAT2, anderen cGMP Transportproteinen und wichtigen cGMP Signalwegkomponenten	100
3.1.3 <i>In vivo</i> Charakterisierung von mOat2 mittels einer neu generierten globalen <i>mOat2-Knockout</i> Mauslinie	103
3.1.3.1 Systematische Analyse der Expression von <i>Slc22a7</i> der Maus	103
3.1.3.2 Generierung und Etablierung der Mauslinie	104
3.1.3.3 Phänotypische Charakterisierung der Mauslinie.....	106
3.1.3.4 Klinische Chemie von Kontroll- und <i>mOat2-Knockout</i> Mäusen.....	109
3.1.3.5 Umfassende Charakterisierung der Mauslinie mittels verschiedener molekularbiologischer Methoden.....	111
i Charakterisierung der Mauslinie auf DNA Ebene.....	111
ii Charakterisierung der Mauslinie auf RNA Ebene.....	113
iii Charakterisierung der Mauslinie auf Proteinebene.....	120

3.1.3.6 Genomweite Genexpressionsanalyse mittels RNA-Microarrays	124
3.1.3.7 Isolation primärer muriner Hepatozyten zur Charakterisierung von mOat2...	127
3.2 Der organische Anionentransporter 7.....	128
3.2.1 <i>In vitro</i> Charakterisierung von hOAT7 mittels stabil transfizierter Zelllinien	128
3.2.1.1 Testung möglicher endogener und exogener Substrate mithilfe einer hOAT7-exprimierenden Zelllinie	128
3.2.2 <i>In vivo</i> Charakterisierung von hOAT7 mittels eines neu generierten humanisierten Mausmodells (leberspezifische hOAT7- <i>Knockin</i> Mauslinie).....	134
3.2.2.1 Generierung und Etablierung der Mauslinie	134
3.2.2.2 Phänotypische Charakterisierung der Mauslinie.....	134
3.2.2.3 Klinische Chemie von Kontroll- und hOAT7- <i>Knockin</i> Mäusen	137
3.2.2.4 Umfassende Charakterisierung der Mauslinie mittels verschiedener molekularbiologischer Methoden.....	139
i Charakterisierung der Mauslinie auf DNA Ebene.....	139
ii Charakterisierung der Mauslinie auf RNA Ebene	140
iii Charakterisierung der Mauslinie auf Proteinebene.....	141
3.2.2.5 Genomweite Genexpressionsanalyse mittels RNA-Microarrays	148
3.2.2.6 Isolation primärer muriner Hepatozyten zur Charakterisierung von hOAT7 ..	150
4 Diskussion.....	152
4.1 <i>In vitro</i> Versuche zur funktionellen Charakterisierung von OAT2 und OAT7.....	153
4.1.1 Charakterisierung von hOAT2 und mOat2 mithilfe von <i>in vitro</i> Versuchen.....	153
4.1.1.1 Etablierung der hOAT2- und mOat2-exprimierenden Zelllinien	153
4.1.1.2 Die Rolle von OAT2 im cGMP Signalweg.....	155
i Erkenntnisse aus cGMP Transportversuchen.....	155
ii Erkenntnisse aus der Analyse der Expression von Komponenten des cGMP Signalwegs in verschiedenen Leberzelltypen	158
4.1.1.3 Charakterisierung der Transportaktivität von hOAT2 / mOat2 für Xanthin	160
4.1.1.4 Identifikation verschiedener Pterine als neue OAT2-Substrate.....	162
4.1.2 Charakterisierung von hOAT7 mithilfe von <i>in vitro</i> Versuchen	164
4.2 Mausmodelle zur funktionellen Charakterisierung von OAT2 und OAT7	165
4.2.1 Eignung von transgenen Mausmodellen zur Charakterisierung von OAT2 und OAT7.....	165
4.2.2 Charakterisierung der mOat2- <i>Knockout</i> und hOAT7- <i>Knockin</i> Mauslinie	167
4.3 Zusammenfassung und Ausblick	172
Literaturverzeichnis	174

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC-Transporter	ATP- <i>binding cassette</i> Transporter
Actb	β -Actin
ADME	Aufnahme, Verteilung, Metabolisierung und Exkretion von Medikamenten (von engl.: <i>absorption, distribution, metabolism and excretion</i>)
ALP	Alkalische Phosphatase
ALT	Alanin-Aminotransferase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
BH4	Tetrahydrobiopterin
BSEP	<i>Bile salt export pump</i>
bp	Basenpaar
BCRP	<i>Breast cancer resistance protein</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
cm	Zentimeter
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CNG	Zyklisch Nukleotid-gesteuerter Ionenkanal (von engl.: <i>cyclic nucleotide-gated channel</i>)
CYP2C8	Cytochrom P450 2C8
DHEAS	Dehydroepiandrosteron
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EMA	European Medicines Agency
E3S	Estron-3-sulfat
FCS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FRT	<i>Flp Recombination Target</i> Zielsequenz
h	Stunde
HEK293 Zellen	Humane Embryonale Nierenzellen 293 (von engl.: <i>human embryonic kidney</i>)
hOATP1B1	Humaner Organo-Anionentransporter (von engl.: <i>organic anion transporting polypeptide</i>) 1B1

hOATP1B3	Humaner Organo-Anionentransporter (von engl.: <i>organic anion transporting polypeptide</i>) 1B3
hOATP2B1	Humaner Organo-Anionentransporter (von engl.: <i>organic anion transporting polypeptide</i>) 2B1
hOAT2	Humaner Organischer Anionentransporter (von engl.: <i>organic anion transporter</i>) 2
hOAT7	Humaner Organischer Anionentransporter (von engl.: <i>organic anion transporter</i>) 7
hOCT1	Humaner Organischer Kationentransporter (von engl.: <i>organic cation transporter</i>) 1
hOCT3	Humaner Organischer Kationentransporter (von engl.: <i>organic cation transporter</i>) 3
HNF1 α	<i>Hepatocyte nuclear factor 1 alpha</i>
HNF4 α	<i>Hepatocyte nuclear factor 4 alpha</i>
hNTCP	Humaner Natrium / Gallensäure Cotransporter (von engl.: <i>Na⁺-Taurocholate cotransporting polypeptide</i>)
H&E Färbung	Hämatoxylin-Eosin Färbung
IF	Immunfluoreszenz
IHC	Immunhistochemische Färbung
kDa	Kilodalton
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
l	Liter
LDH	Lactatdehydrogenase
MATE	<i>Multidrug and toxin extrusion protein</i>
MDR1	<i>P-Glycoprotein</i> (von engl.: <i>multidrug resistance protein 1</i>)
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar (mmol / l)
mOat2	Muriner Organischer Anionentransporter (von engl.: <i>organic anion transporter</i>) 2
mPmat	Muriner <i>plasma membrane monoamine transporter</i>

MRP2	Humanes <i>Multidrug Resistance Protein</i> 2 (Gen: <i>ABCC2</i>)
MRP4	Humanes <i>Multidrug Resistance Protein</i> 4 (Gen: <i>ABCC4</i>)
MRP5	Humanes <i>Multidrug Resistance Protein</i> 5 (Gen: <i>ABCC5</i>)
MRP8	Humanes <i>Multidrug Resistance Protein</i> 8 (Gen: <i>ABCC8</i>)
mSult2a1	Murine Sulfotransferase 2A1
NLT	<i>Novel liver-specific transporter</i>
nm	Nanometer
nM	Nanomolar (nmol / l)
OAT1	Organischer Anionentransporter 1 (von engl.: <i>organic anion transporter</i>)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (von engl.: <i>polymerase chain reaction</i>)
PDE	Phosphodiesterase
PG	Prostaglandin
qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion
RMCE	Rekombinase vermittelter Kassettenaustausch (von engl.: <i>recombinase-mediated cassette exchange</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (von engl.: <i>revolutions per minute</i>)
s	Sekunde
SLC-Transporter	<i>Solute Carrier</i> Transporter
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (von engl.: <i>single nucleotide polymorphism</i>)
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMD	Transmembrandomäne
mA	Milliampere
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar (µmol / l)
V	Volt
V _{max}	Maximalgeschwindigkeit
WB	Westernblot / Immunblot
γ-GT	γ-Glutamyltransferase

Abstract

Membrane transporters mediate the transport of various endogenous as well as exogenous substances across the cell membrane and are therefore not only essential players in homeostasis but also in the adsorption, distribution, metabolism and excretion of drugs. Therefore, functional characterization of membrane transporters is crucial in order to understand their physiological function and to avoid severe side effects or therapeutic failure of administered drugs.

The organic anion transporters 2 and 7 (OAT2, *SLC22A7* and OAT7, *SLC22A9*) enable the transport of organic anions across the cell membrane and are only poorly characterized so far. Both transporters are expressed in the sinusoidal membrane of hepatocytes and OAT2 can also be found in proximal tubule cells of the kidneys. For OAT7 only few substrates have been identified so far and although there are several endogenous and exogenous substrates known for OAT2, the physiological as well as the pharmacological roles of both transporters remain unclear.

The aim of this work therefore was to functionally characterize OAT2 and OAT7 with the help of transporter-expressing cell lines as well as with two novel transgenic mouse models.

Cell lines stably expressing human OAT2 and its mouse orthologue mOat2, hOAT7 as well as other relevant hepatic sinusoidal uptake transporters were used to investigate the transport function of OAT2 and OAT7 with in vitro experiments.

Transport of the second messenger cGMP through hOAT2 has already been described before and could be confirmed in this study. Furthermore, we could show that mOat2 as well is able to transport cGMP. The cGMP transport function was extensively characterized for human and mouse OAT2 with a special focus on species-specific differences. We could additionally show that hOAT2 is the only one of the most relevant hepatic sinusoidal drug uptake transporters capable of transporting cGMP, suggesting an important role of hOAT2 in cGMP signaling and therefore in various physiological processes.

The transport of xanthine, an intermediate product of purine degradation, through hOAT2 has also been described before and was shown to be time- and concentration-dependent for the first time in this work. Furthermore, as for cGMP, we were able to show that hOAT2 is the only one of the most relevant hepatic sinusoidal drug uptake transporters able to transport xanthine. Additionally, we showed that xanthine is not a

substrate of mOat2.

We were also able to identify a new substrate class of OAT2. Different pterines that have important functions in various physiological processes, for example as cofactors for enzyme function, were identified as substrates of hOAT2 and mOat2. As seen for cGMP and xanthine, we found species-specific differences in substrate specificity and transport function between human and mouse OAT2. The hOAT2-mediated transport of neopterin, an important player in the immune system, was further characterized.

To elucidate the physiological role of OAT2 and OAT7 and to further characterize the two transporters, we generated on the one hand a mOat2 knockout and on the other hand a hepatocyte-specific hOAT7 knockin mouse model and tested the applicability of the animals for the investigation of the two membrane transporters.

mOat2 knockout as well as hOAT7 knockin mice were healthy and did not show any phenotypic abnormalities. Liver histology and clinical chemistry were comparable to wildtype control mice. With extensive characterization on DNA, RNA and protein level using various molecular biology techniques like qPCR, immunoblotting and immunohistochemical staining, we could show that mice of the two lines actually showed missing expression of mOat2 or liver-specific expression of hOAT7 as expected.

Genomewide gene expression analyses revealed altered hepatic expression of *mSult2a1* in the mOat2 knockout and of *mHsd17b6* and *mLcn2* in the hOAT7 knockin mice. In humans, all three genes are involved in the development of hepatocellular carcinoma. Furthermore, we established a method for the easy isolation and culture of primary mouse hepatocytes from both mouse lines via ex vivo liver perfusion. Thereby we created a powerful tool for characterization of OAT2 and OAT7.

Taken together, with the help of stably transfected cell lines we performed an in-depth investigation of the transport function of hOAT2 and mOat2. We were able to identify novel substrates for both hOAT2 and mOat2 and showed that hOAT2 is likely to have an important role in cGMP signaling. Two newly generated mouse models were established and extensively characterized whereby their applicability for the functional characterization of OAT2 and OAT7 could be confirmed. In future experiments, the generated stably transfected cell lines and mouse models can complement each other in the elucidation of the physiological and pharmacological roles of OAT2 and OAT7 as well as in the search for novel drug substrates of both transporters.

Zusammenfassung

Membrantransporter vermitteln den Transport einer Vielzahl endogener sowie exogener Substanzen über die Zellmembran und sind daher nicht nur essentiell für die Homöostase, sondern auch für die Aufnahme, Verteilung, Metabolisierung und Exkretion von Medikamenten. Aus diesem Grund ist die funktionelle Charakterisierung von Membrantransportern entscheidend, sowohl um ihre physiologische Funktion zu verstehen als auch um schwere Nebenwirkungen von verabreichten Medikamenten oder ein Therapieversagen zu vermeiden.

Die organischen Anionentransporter 2 und 7 (OAT2, *SLC22A7* und OAT7, *SLC22A9*) ermöglichen den Transport von organischen Anionen über die Zellmembran und sind bisher nur unzureichend charakterisiert. Beide Transportproteine sind in der sinusoidalen Membran der Hepatozyten exprimiert, OAT2 kann außerdem in den proximalen Tubuluszellen der Niere gefunden werden. Für OAT7 wurden bisher nur wenige Substrate identifiziert und obwohl bereits einige endogene und exogene Substrate für OAT2 bekannt sind, bleibt die physiologische sowie die pharmakologische Rolle der beiden Transportproteine ungeklärt.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher eine funktionelle Charakterisierung von OAT2 und OAT7 mithilfe von Transporter-exprimierenden Zelllinien sowie mit zwei neuen transgenen Mausmodellen vorzunehmen.

Stabil transfizierte Zelllinien, welche hOAT2 des Menschen und sein Maus Ortholog mOat2 sowie hOAT7 und andere relevante hepatische sinusoidale Aufnahmetransporter exprimieren, wurden genutzt, um die Transportfunktion von OAT2 und OAT7 mittels *in vitro* Experimenten zu untersuchen.

Der Transport des sekundären Botenstoffes cGMP durch hOAT2 wurde schon zuvor beschrieben und konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Wir konnten außerdem zeigen, dass auch mOat2 in der Lage ist, cGMP zu transportieren. Die cGMP Transportfunktion für hOAT2 und mOat2 wurde eingehend charakterisiert, wobei insbesondere auf speziesspezifische Unterschiede geachtet wurde. Wir konnten zusätzlich zeigen, dass hOAT2 als einziger der für den Arzneistofftransport hauptverantwortlichen hepatischen sinusoidalen Aufnahmetransporter in der Lage ist cGMP zu transportieren. Dies impliziert eine wichtige Rolle von hOAT2 im cGMP Signalweg und damit in einer Vielzahl von physiologischen Prozessen.

Der OAT2-vermittelte Transport von Xanthin, einem Zwischenprodukt des Purin

Abbaus, wurde ebenfalls schon zuvor beschrieben, wobei wir in dieser Arbeit zum ersten Mal nachweisen konnten, dass dieser Transport zeit- und konzentrationsabhängig stattfindet. Außerdem konnten wir zeigen, dass hOAT2, ähnlich wie für cGMP, der einzige der für den Arzneistofftransport hauptverantwortlichen hepatischen sinusoidalen Aufnahmetransporter ist, der in der Lage ist Xanthin zu transportieren. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Xanthin kein Substrat von mOat2 ist.

Wir konnten außerdem eine neue Substratklasse für OAT2 identifizieren. Verschiedene Pterine, welche wichtige Funktionen in verschiedenen physiologischen Prozessen, beispielsweise als Kofaktoren von Enzymen, haben, wurden als Substrate von hOAT2 und mOat2 identifiziert. Wie auch schon bei cGMP und Xanthin, fanden wir speziesspezifische Unterschiede in Substratspezifität und Transportfunktion zwischen humanem und Maus OAT2. Der hOAT2-vermittelte Transport von Neopterin, welches eine bedeutende Rolle im Immunsystem einnimmt, wurde umfassend charakterisiert.

Um der physiologischen Rolle von OAT2 und OAT7 auf den Grund zu gehen, haben wir einerseits ein mOat2-*Knockout* und andererseits ein hepatozytenspezifisches hOAT7-*Knockin* Mausmodell entwickelt und die Anwendbarkeit dieser Tiere für die Erforschung der beiden Membrantransporter getestet.

Die mOat2-*Knockout* Mäuse waren genau wie die hOAT7-*Knockin* Mäuse gesund und zeigten keine phänotypischen Auffälligkeiten. Histologische Untersuchungen der Leber und klinisch-chemische Parameter waren vergleichbar mit denen von Kontrollmäusen. Durch umfassende Charakterisierung auf DNA, RNA und Proteinebene mittels einer Vielzahl von molekularbiologischen Methoden wie qPCR, Immunblot Analysen und immunhistochemischen Färbungen, konnten wir zeigen, dass die Mäuse der beiden Linien wie erwartet die fehlende Expression von mOat2 bzw. die leberspezifische Expression von hOAT7 zeigen.

Genomweite Genexpressionsanalysen zeigten veränderte hepatische Expressionswerte von *mSult2a1* in den mOat2-*Knockout* und von *mHsd17b6* und *mLcn2* in den hOAT7-*Knockin* Mäusen. Alle drei Gene sind im Menschen an der Entwicklung eines Hepatozellulären Karzinoms beteiligt. Überdies haben wir eine neue Methode zur einfachen *ex vivo* Isolation und Kultur primärer Maus Hepatozyten beider Mauslinien etabliert und damit ein leistungsstarkes Werkzeug für die Charakterisierung von OAT2 und OAT7 geschaffen.

Zusammengefasst konnten wir mithilfe stabil transfizierter Zelllinien eine eingehende Analyse der Transportfunktion von hOAT2 und mOat2 durchführen. So konnten neue Substrate für hOAT2 und mOat2 identifiziert und gezeigt werden, dass hOAT2 vermutlich eine wichtige Rolle im cGMP Signalweg spielt. Zwei neu generierte Mausmodelle wurden etabliert und umfassend charakterisiert, womit ihre Eignung für die funktionelle Charakterisierung von OAT2 und OAT7 bestätigt werden konnte. In zukünftigen Experimenten können die in dieser Arbeit generierten stabil transfizierten Zelllinien und die Mausmodelle gemeinsam dazu dienen, die physiologische und pharmakologische Rolle von OAT2 und OAT7 aufzuklären sowie neue Arzneistoffe als Substrate der Transportproteine zu identifizieren.

1 Einleitung

1.1 Membrantransportproteine

Die Aufnahme und Abgabe von körpereigenen und körperfremden Stoffen in Zellen und Zellorganellen wird von Membrantransportproteinen reguliert. So werden beispielsweise einerseits Aminosäuren, Nukleotide und Neurotransmitter, andererseits aber auch die unterschiedlichsten Arzneistoffe durch eine Vielzahl Transportproteine über Membranen hinweg befördert (Hediger et al. 2013; Liu 2019).

Membrantransporter in der Zellmembran können entweder die Aufnahme (Influx) oder die Abgabe (Efflux) von Substanzen in oder aus Zellen vermitteln, wobei einige Transportproteine in der Lage sind, beide Prozesse zu steuern (Hediger et al. 2013). Der Transport der Substrate kann dabei zum einen mit dem Konzentrationsgradienten erfolgen, was als passiver Transport bezeichnet wird. Erfolgt der Transport der Substanz entgegen ihres Konzentrationsgradienten, spricht man von aktivem Transport. Der aktive Transport kann wiederum in den primär aktiven und den sekundär aktiven Transport unterteilt werden. Beim primär aktiven Transport wird die Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) zum Transport des Substrates gegen das Konzentrationsgefälle genutzt, es wird also eine energetisch günstige an eine energetisch ungünstige Reaktion gekoppelt. Beim sekundär aktiven Transport wird der Transport des Substrates entgegen des Konzentrationsgefälles mit dem Transport einer weiteren Substanz entlang des Konzentrationsgefälles verbunden. Erfolgt der Transport dieser weiteren Substanz in dieselbe Richtung wie der des Substrates, spricht man von Symport, handelt es sich um die entgegengesetzte Richtung, spricht man von Antiport (Roberts 2021; Vasiliou et al. 2008).

1.1.1 Die Rolle von Membrantransportern in der klinischen Pharmakologie

Da Membrantransportproteine eine Vielzahl an endogenen Substanzen wie beispielweise Vitamine, Gallensalze, Hormone und Signalmoleküle transportieren, spielen sie eine wichtige Rolle bei der Generierung der Homöostase von Körperzellen und Organen und sind damit lebenswichtig (Fisel et al. 2017; Liu 2019). Die Funktion von Membrantransportern wird allerdings durch eine Vielzahl von Prozessen reguliert. Genetische Faktoren wie Mutationen und Polymorphismen, ebenso wie Regulation durch Kernrezeptoren, posttranslationale Modifikationen, epigenetische Prozesse und alternatives Splicing können die Aktivität der Transportproteine sowie ihre interindividuelle Expression beeinflussen und auch zu Fehlfunktionen führen (Brouwer et al. 2022; Kölz et al. 2021). Solche Fehlfunktionen von Transportproteinen sind wiederum die Ursache einer Vielzahl verschiedenster Erkrankungen, was sie als therapeutische Ziele interessant macht (Lin et al. 2015). So führen beispielsweise Mutationen, welche den Funktionsverlust des Humanen *Multidrug Resistance Protein 2* (MRP2) auslösen, zum Dubin-Johnson Syndrom, welches sich klinisch in einer chronischen konjugierten Hyperbilirubinämie etabliert (Kartenbeck 1996; Paulusma et al. 1997). Auch bei neurodegenerativen Erkrankungen können Fehlfunktionen von Membrantransportern eine Rolle spielen. So scheint die gestörte Funktion des Glutamattransporters GLT1 eine Rolle in der Entwicklung der Amyotrophen Lateralsklerose und der Alzheimer-Krankheit zu spielen, da der verlangsamte oder fehlende Abtransport des Neurotransmitters Glutamat aus dem synaptischen Spalt zum Absterben von Nervenzellen durch die andauernde Reizweiterleitung führt (Kanai et al. 2013).

Trotz dieser Erkenntnisse und der Tatsache, dass Membrantransportproteine zusammen mit anderen am Stoffwechsel beteiligten Proteinen entscheidend zum reibungslosen Ablauf verschiedener endogener Signalwege und somit zur Kommunikation zwischen Zellen und Organen beitragen („remote sensing and signaling“ Hypothese), ist deutlich weniger über die physiologische Rolle von Transportproteinen als über deren Transportkapazität für verschiedene Arzneistoffe bekannt (Nigam 2015; Nigam und Granados 2022).

Dennoch lässt sich nicht bestreiten, dass Membrantransporter nicht nur für den Transport endogener Substanzen essentiell sind, sondern auch der Transport vieler Arzneistoffe über Membranen hinweg durch sie ermöglicht wird. Diese Eigenschaft macht Membrantransportproteine zu entscheidenden Faktoren für die Aufnahme,

Verteilung, Metabolisierung und Exkretion von Arzneistoffen (ADME, von engl.: *absorption, distribution, metabolism and excretion*) (Giacomini et al. 2010), was in Abbildung 1 schematisch gezeigt wird. Fehlfunktionen von Transportproteinen können demnach beispielsweise einerseits durch Anreicherung eines Arzneistoffes in toxischen Mengen zu schweren Nebenwirkungen bis hin zum Tod, andererseits aber auch zum Therapieversagen durch mangelnde Effizienz führen (DeGorter et al. 2012; Nigam 2015). So scheint beispielsweise das Risiko für eine Doxorubicin-induzierte Herzschiädigung direkt mit der Expressionsstärke des organischen Kationentransporter 3 (OCT3) im Herzen zusammenzuhängen, so wie auch andere Membrantransporter einen Einfluss auf durch Chemotherapeutika ausgelöste Herzschiädigungen haben (Huang et al. 2021; Uddin et al. 2022).

Da Membrantransporter eine entscheidende Rolle in ADME Prozessen spielen, ist es von großer Bedeutung bei der Entwicklung neuer Medikamente den Einfluss von Transportproteinen auf deren Aufnahme, Verteilung und Exkretion in Betracht zu ziehen, da die gewünschte Wirkung sonst mitunter nicht erzielt werden kann (Fisel et al. 2017).

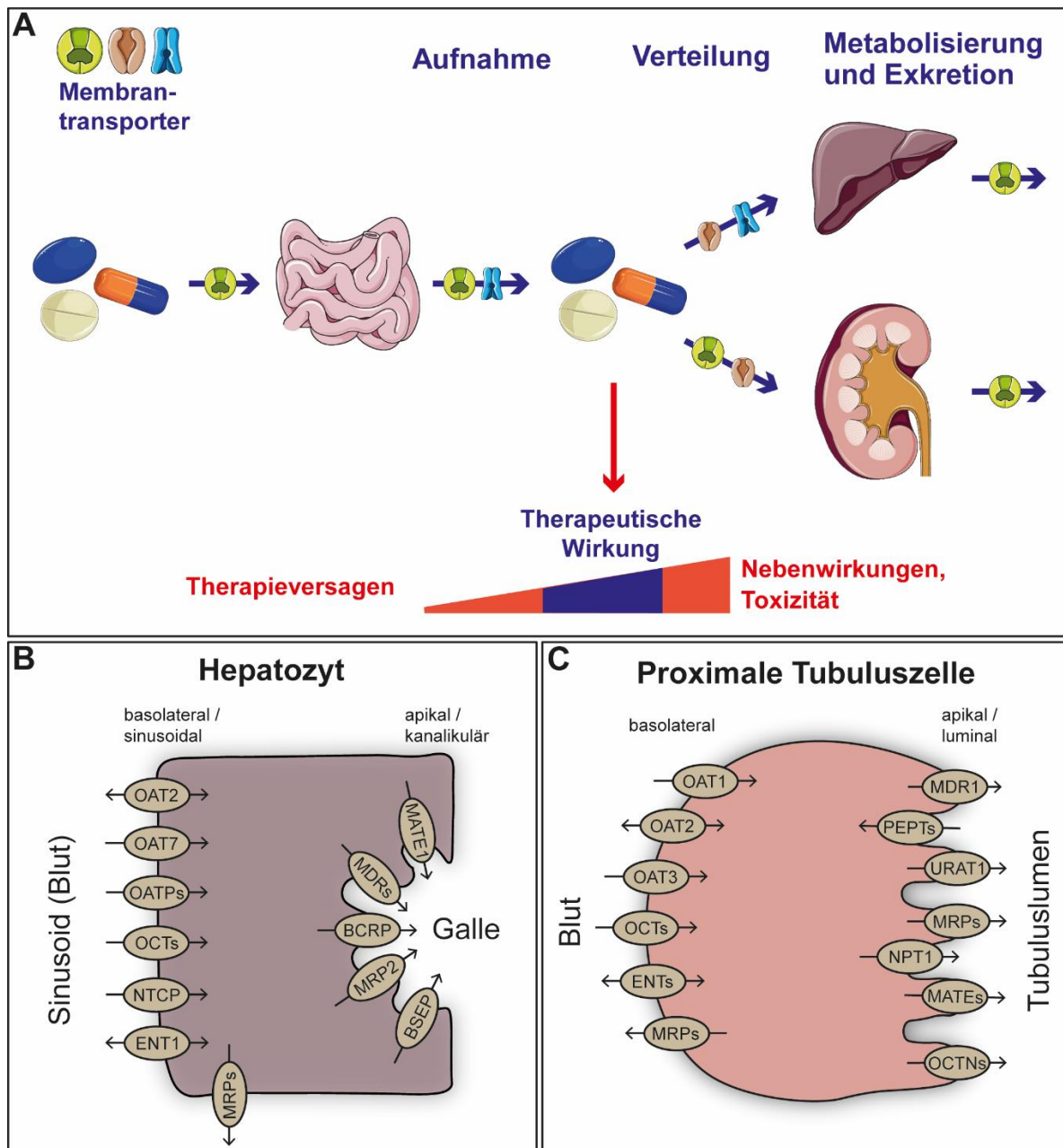


Abbildung 1: Membrantransporter spielen eine essentielle Rolle in ADME Prozessen.

A: Membrantransporter sind an der zu großen Teilen im Darm stattfindenden Aufnahme von Arzneistoffen, an deren Verteilung und Metabolisierung im Körper sowie an deren Exkretion durch Leber und Nieren wesentlich beteiligt. Ihre Funktion bestimmt maßgeblich die Wirkung von Arzneimitteln und eine veränderte Funktion von Membrantransportern kann zu Nebenwirkungen oder Therapieversagen führen.

B, C : Membrantransporter, die in Hepatozyten (B) und proximalen Tubuluszellen (C) vorkommen, tragen zur Metabolisierung und Exkretion von Arzneistoffen bei.

Einzelne Elemente der Abbildung entstammen Servier Medical Art, einer Plattform, welche von Servier bereitgestellt wird und unter einer Creative Commons Attribution 3.0 Unported Lizenz lizenziert ist (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>). Die Abbildung wurde in Anlehnung an Neul et al. 2016 und Zamek-Gliszczyński et al. 2018 erstellt (Neul et al. 2016; Zamek-Gliszczyński et al. 2018).

Die Einbeziehung von Membrantransportern bei der Entwicklung von Medikamenten ist außerdem von essentieller Bedeutung, da Arzneistoffe die Funktion von Transportproteinen beeinflussen können. Dies kann nicht nur aufgrund der physiologischen Rolle von Membrantransportern zum Problem werden, wenn die Inhibition oder Verstärkung der Funktion eines Transportproteins die Homöostase in Zellen oder Organen stört. Der Einfluss verschiedener Medikamente auf Transportproteine kann auch zu unerwünschten Arzneimittelinteraktionen führen, wenn andere eingenommene Arzneistoffe entweder nicht mehr oder verstärkt durch das beeinflusste Transportprotein transportiert und so ADME Vorgänge gestört werden (DeGorter et al. 2012; Maeda und Sugiyama 2013).

Ein prominentes Beispiel für eine Membrantransporter-abhängige unerwünschte Arzneimittelinteraktion ist die Wechselwirkung zwischen den lipidsenkenden Medikamenten Gemfibrozil und Cerivastatin. Die inhibierende Wirkung von Gemfibrozil auf den organischen Anionentransporter OATP1B1 sowie auf ein Cytochrom P450-Enzym (CYP2C8) führte zur schweren Nebenwirkung der Rhabdomyolyse und zum Tod von Patienten, welche gleichzeitig Cerivastatin einnahmen. Die fehlende Aufnahme von Cerivastatin durch OATP1B1 in die Hepatozyten und damit die fehlende Metabolisierung durch CYP2C8 führte in einigen Patienten zur Toxizität des Stoffes (Maeda und Sugiyama 2013; Shitara et al. 2004).

Um solche Fälle zukünftig zu verhindern, ist es essentiell bei der Entwicklung neuer Medikamente standardmäßig deren Wirkung auf wichtige Membrantransportproteine zu evaluieren. Die Untersuchung dieser Wechselwirkungen wird sowohl von den europäischen als auch den amerikanischen Arzneimittelzulassungsbehörden European Medicines Agency (EMA) und U.S. Food and Drug Administration (FDA) für die Zulassung neuer Medikamente empfohlen (Europeans Medicines Agency 2012; U.S. Food & Drug Administration 2020).

Trotz des offensichtlich entscheidenden Einflusses von Membrantransportern auf lebenswichtige körpereigene Funktionen sowie auf die klinische Pharmakologie kam die Forschung an Transportproteinen lange Zeit nur langsam voran, weswegen die physiologische Rolle sowie Substratspezifität von vielen Transportern noch unklar ist (César-Razquin et al. 2015; Fisel et al. 2017; Pizzagalli et al. 2021).

1.1.2 Klassifizierung von Membrantransportproteinen

Circa 10 % aller menschlichen Gene kodieren für Membrantransportproteine oder für von Transportern benötigte zusätzliche Genprodukte, wie zum Beispiel regulatorische Proteine oder andere Interaktionspartner. Membrantransportproteine können in vier verschiedene Klassen eingeteilt werden, zu welchen die Ionenkanäle und die Aquaporine sowie die in zwei Hauptfamilien unterteilte Gruppe der Membrantransporter gehören (Hediger et al. 2013; Vasiliou et al. 2008).

Diese zwei Hauptfamilien sind die Solute Carrier (SLC) und die ABC Transporter (von engl.: *ATP-binding-cassette*), welche nachfolgend genauer beschrieben werden. Während die ABC-Familie hauptsächlich Efflux Transporter enthält, besteht die SLC Familie sowohl aus Influx als auch aus Efflux Transportern (César-Razquin et al. 2015; Fisel et al. 2017; You und Morris 2022).

1.1.2.1 ABC Transporter

Das humane Genom enthält 48 ABC Gene, die 7 Familien (ABCA - ABCG) zugeteilt werden können und größtenteils für strukturell sehr ähnliche Membrantransporter kodieren. Die aus der Hydrolyse von ATP gewonnene Energie wird von ABC Transportern für den primär aktiven Transport einer großen Bandbreite von Substanzen über Membranen hinweg genutzt (Vasiliou et al. 2008; You und Morris 2022).

ABC Transporter spielen eine wichtige Rolle in der Detoxifikation des Körpers, da sie in der Lage sind, nicht nur endogene, sondern auch eine große Anzahl an exogenen, toxischen Substanzen sowie Arzneistoffen, aus den Zellen und damit auch aus dem Körper zu transportieren (Schinkel und Jonker 2003; Szakács et al. 2008). Da einige ABC Transporter verschiedene Zytostatika transportieren können und zudem häufig in Krebszellen überexprimiert sind, können sie in vielen Fällen eine Resistenz von Tumorzellen gegen eine große Bandbreite an Zytostatika vermitteln. Daher werden einige dieser ABC Transporter im Englischen auch als *multidrug resistance proteins* bezeichnet (Robey et al. 2018; Szakács et al. 2008).

Die klinisch am relevantesten und daher am besten charakterisierten ABC Transporter sind das vom Gen *ABCB1* kodierte MDR1 oder P-Glycoprotein, das *breast cancer resistance protein* (BCRP), welches von *ABCG2* kodiert wird, der *Cystic Fibrosis*

Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) und die *Multidrug Resistance (associated)* Proteine 1 und 2 (MRP1 und MRP2, Gene: *ABCC1* und *ABCC2*) (Choudhuri und Klaassen 2006; Schinkel und Jonker 2003; Szakács et al. 2008).

1.1.2.2 SLC Transporter

Die SLC-Familie besteht aus über 450 Transportern, welche in 65 Genfamilien unterteilt werden, und bildet damit die größte Gruppe der Membrantransportproteine und die zweitgrößte Gruppe von Membranproteinen im menschlichen Genom nach den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Engelhart et al. 2020) (s. <http://slc.bioparadigms.org/>). SLC Transporter vermitteln den passiven sowie den sekundär-aktiven Transport von endogenen und exogenen Substanzen über Membranen (César-Razquin et al. 2015; Hediger et al. 2013). Diese Gruppe ist im Gegensatz zu den ABC Transportern sehr heterogen und verschiedene SLC Transporter unterscheiden sich in ihrer Struktur teilweise stark voneinander. Innerhalb der einzelnen Familien ähneln sich die Strukturen der Proteine jedoch (Colas et al. 2016).

SLC Transporter sind das Ziel einer Vielzahl von Medikamenten und tragen außerdem wie auch die ABC Transporter zur Aufnahme, Metabolisierung und Abgabe unzähliger anderer Arzneistoffe bei (Colas et al. 2016). Zu den klinisch relevanten Gruppen der SLC Transporter gehören zum einen die Organische Anionen transportierenden Polypeptide (*organic anion transporting polypeptides*, OATP, Familie SLCO) und die *multidrug and toxin extrusion transporters* (MATE, Familie SLC47) (Giacomini et al. 2010). MATEs sind beispielsweise wichtig für die Exkretion von Arzneistoffen über die Niere. Genetische Varianten, die zu Funktionsverlusten oder Expressionsänderungen in diesen Transportern führen, können daher durch den veränderten renalen Efflux von Arzneistoffen schwere Nebenwirkungen wie Nierenschäden auslösen (Nies et al. 2016; Veiga-Matos et al. 2020).

Weitere klinisch relevante Gruppen innerhalb der SLC Transporter stellen die organischen Kationentransporter (*organic cation transporters*, OCT) und die organischen Anionentransporter (*organic anion transporters*, OAT) dar, welche beide in die Familie SLC22 eingeordnet werden können (Giacomini et al. 2010). Diese Transportproteine bestehen aus 12 Transmembrandomänen und sind hauptsächlich in Epithelgewebe wie den proximalen Tubuli der Niere oder den Hepatozyten zu finden

(Nigam 2018). Einer der klinisch relevanten Vertreter der SLC22 Familie ist OCT1 (*SLC22A1*), ein organischer Kationentransporter, der unter anderem für die Aufnahme von Metformin in die Leber verantwortlich ist, wobei es sich um ein Medikament zur Behandlung von Diabetes Typ 2 handelt (Nies et al. 2022; Wang et al. 2002).

1.1.3 Methoden zur funktionellen Charakterisierung von Membrantransportern

Wie oben beschrieben, ist die funktionelle Charakterisierung von Membrantransportern sowohl für das Verständnis von physiologischen Prozessen wie der Homöostase als auch für die Abschätzung der Wirkung und Verträglichkeit von Arzneimitteln von großer Wichtigkeit (Fisel et al. 2017; Giacomini et al. 2010). Es stehen verschiedene Methoden zur funktionellen Charakterisierung von Transportproteinen zur Verfügung, wobei die Entscheidung, welche Methode angewendet werden sollte, von der jeweiligen Fragestellung und auch maßgeblich von dem zu untersuchenden Transportprotein abhängt. So müssen Efflux Transporter anders untersucht werden als Aufnahmetransporter und zur Klärung der physiologischen Rolle eines Transportproteins werden andere Versuchssysteme benötigt als zur Abschätzung der Transportkapazität des Proteins für einen bestimmten Arzneistoff (Brouwer et al. 2013). Die Möglichkeiten der Erforschung von Membrantransportproteinen haben sich in den letzten Jahren durch neue technologische Innovationen vervielfacht (Giacomini et al. 2022), was bereits die Bildung des RESOLUTE Konsortiums anregte. Dieses Konsortium hat es sich zur Aufgabe gemacht, Wissenschaftlern Werkzeuge und Kenntnisse zur Erforschung und Charakterisierung von SLC Transportern bereitzustellen (Wiedmer et al. 2022). Nachfolgend sind daher nur einige der wichtigsten Methoden zur funktionellen Charakterisierung von Transportproteinen beschrieben.

1.1.3.1 *In vitro* Charakterisierung mittels zellbasierter Assays

i Rekombinante Transporter-exprimierende Zelllinien

Rekombinante Zelllinien haben sich schon seit vielen Jahren als wertvolles Werkzeug zur Bestimmung von Substraten und Inhibitoren von Transportproteinen etabliert. Zur Generierung der Zelllinien werden Zellen einer beliebigen Wirtszelllinie, welche eine möglichst geringe Expression von endogenen Transportern aufweisen sollte, mit der cDNA des zu untersuchenden Transportproteins transfiziert. Hierbei ist die stabile Transfektion der transienten Transfektion vorzuziehen, da bei letzterer die Expressionsstärke des Transportproteins zwischen verschiedenen Versuchen oder Transportproteinen stark variieren kann (Brouwer et al. 2013).

Mit diesen Transporter-exprimierenden Zelllinien können dann Transportversuche durchgeführt werden, welche zur Identifikation von Substraten des Transporters dienen können. Die Zellen werden hierfür mit der Substanz von Interesse inkubiert, nach einer bestimmten Inkubationszeit wird die intrazelluläre Konzentration der Substanz bestimmt und mit der von Kontrollzellen, welche den Membrantransporter nicht exprimieren, verglichen. So können Substrate identifiziert und mit diesen nachfolgend zeit- und konzentrationsabhängige Transportversuche durchgeführt sowie kinetische Konstanten, wie beispielsweise die Michaelis-Menten-Konstante (K_m) und die Maximalgeschwindigkeit (V_{max}), bestimmt werden. Es ist außerdem möglich, Inhibitoren von Membrantransportern zu identifizieren, indem man die Aufnahme eines prototypischen Substrates in die Zellen in An- und Abwesenheit der zu testenden Substanz bestimmt und auswertet, ob es durch Zugabe der Substanz zu einer Verringerung der Transportkapazität kommt (Brouwer et al. 2013).

Um die Bestimmung der intrazellulären Konzentration einer Substanz möglich zu machen, können entweder radioaktiv markierte oder fluoreszierende Substanzen eingesetzt werden (Tremmel et al. 2022). Es gibt außerdem die Möglichkeit unmarkierte Substanzen einzusetzen und deren Konzentration in den Zellen mittels Massenspektrometrie zu bestimmen (Nies et al. 2021). Jede dieser Methoden hat hinsichtlich Kosten, Durchführung und Verwertbarkeit der Ergebnisse sowohl Vor- als auch Nachteile (Dvorak et al. 2021).

ii Polarisierte Monolayerzellen

Die oben beschriebenen rekombinanten Zelllinien, welche nur einen Membrantransporter exprimieren, sind ein gutes Werkzeug zur Erforschung von Aufnahmetransportern, können aber zur Charakterisierung von Efflux Transportern nicht verwendet werden, da die zu transportierende Substanz in diesem Fall zunächst in die Zelle eingebracht werden muss. Daher haben sich als eine Methode zur Analyse von Efflux Transportern oder auch zur Erforschung des Zusammenspiels von Aufnahme- und Efflux Transportern Transportversuche mit doppelt transfizierten polarisierten Zelllinien etabliert (Brouwer et al. 2013).

Hierfür werden Zellen, welche auf Membranfiltern polarisierte Zell-Monolayer ausbilden können, mit cDNAs für einen Aufnahme- und einen Efflux Transporter transfiziert. Mit diesen Zellen können nachfolgend Transportversuche durchgeführt werden, mit welchen der gerichtete Transport von Substanzen von der apikalen Inkubationskammer zur basalen oder von der basalen zur apikalen bestimmt werden kann. So kann zum einen die Transportkapazität der Transportproteine für die Substanzen bestimmt und zum anderen die Zusammenarbeit von Aufnahme- und Efflux Transportern beim Transport von Substanzen über Membranen hinweg beurteilt werden (Brouwer et al. 2013).

iii Primäre Hepatozyten

Rekombinante Zelllinien sind ein wichtiges Werkzeug zur Charakterisierung der Transportaktivität von Membrantransportern, stellen aber dennoch ein artifizielles System dar und können die physiologische Situation nicht widerspiegeln. Um dieses Problem zumindest teilweise zu umgehen, haben sich Transportversuche mit frisch isolierten primären Hepatozyten bewährt (Brouwer et al. 2013). Hepatozyten können durch Perfusion von Lebergewebe aus Mensch oder Maus isoliert werden. Die so gewonnenen Zellen können für die oben beschriebenen Transportversuche entweder in Suspension oder ausgesät auf beschichteten Platten verwendet werden. So lässt sich die durch die hepatischen Transportproteine vermittelte Aufnahme von Substanzen in die Hepatozyten untersuchen. Die Situation im Transportversuch ist hierbei ähnlich zur *in vivo* Situation, wodurch eher das Zusammenspiel von Transportproteinen als die Aktivität eines einzelnen Membrantransporters evaluiert wird. Um die Transportaktivität von Efflux Transportern beurteilen zu können, können

die Hepatozyten auch in mit der Hilfe von Matrigel hergestellten Sandwich-Kulturen für die Transportversuche verwendet werden. Durch diese spezielle Kulturmethode kommt es zum Ausbilden einer polarisierten Monolayer-Zellschicht und zur Bildung kanalikulärer (apikaler) Netzwerke, was die Erforschung von Efflux Transportern in der kanalikulären Membran der Hepatozyten ermöglicht (Brouwer et al. 2013).

1.1.3.2 Mausmodelle zur Charakterisierung von Membrantransportern

Obwohl zellbasierte *in vitro* Transportversuche eine gut etablierte Methode darstellen, um die Transportaktivität einzelner Membrantransporter zu untersuchen, so können sie doch das Zusammenspiel von verschiedenen Transportproteinen und anderen in ADME Prozessen relevanten Proteinen im lebenden Organismus nicht widerspiegeln. Diese Tatsache macht Tiermodelle in der Erforschung der physiologischen Rolle von Transportproteinen und deren Einfluss auf die Aufnahme, Metabolisierung und Ausscheidung von Medikamenten unerlässlich (DeGorter und Kim 2011; Dvorak et al. 2021). Aus verschiedenen Gründen, wie beispielsweise der kurzen Reproduktionsdauer und der großen Wurfgrößen, welche sich von Stamm zu Stamm unterscheiden, sind Mäuse als Tiermodell besonders interessant (Jiang et al. 2010).

Für die Erforschung von Membrantransportern mit Mausmodellen werden meist genetisch veränderte Mauslinien verwendet. Mithilfe verschiedener Techniken, wie dem Cre-Lox-System, können einzelne Gene aus dem Mausgenom ausgeschnitten oder in das Mausgenom eingebracht werden. So wird in vielen Fällen ein Gen, welches für ein murines Transportprotein kodiert, gezielt ausgeschaltet, was zum Funktionsverlust des Membrantransporters führt. Man spricht in diesem Fall von einem *Knockout* Mausmodell. Eine andere Methode ist es, ein fremdes Gen in das Mausgenom einzubringen (*Knockin*). Handelt es sich um ein humanes Gen, beispielsweise um eines, welches für einen humanen Membrantransporter kodiert, so spricht man von einem humanisierten Mausmodell. Humanisierte Mausmodelle umgehen demnach das Problem, dass Transportproteine der Maus teilweise andere Substratspezifitäten als die des Menschen aufweisen, was bei *Knockout* Mausmodellen teilweise zu Schwierigkeiten in der Interpretation der Ergebnisse führen kann (Jiang et al. 2010).

Knockout und *Knockin* Mausmodelle können dann dazu dienen, die physiologische Rolle von Membrantransportproteinen genauer zu erforschen, indem mit

verschiedenen Methoden Unterschiede zwischen den *Knockout / Knockin* Mäusen und Kontrollmäusen analysiert werden. Dazu können beispielsweise der allgemeine Gesundheits- und Entwicklungszustand der Mäuse, ihr Sozialverhalten, aber auch histologische Untersuchungen verschiedener Organe oder ihre Blutwerte herangezogen werden (Jiang et al. 2010; Sabolić et al. 2016).

Doch nicht nur die Rolle des Transporters für die Erhaltung normaler Körperfunktionen kann mittels der Mausmodelle untersucht werden. Der Einfluss des Transportproteins auf die Aufnahme, Verteilung und Abgabe von Medikamenten kann beispielsweise durch Pharmakokinetik-Studien in Transporter-*Knockout / Knockin* Mäusen ebenfalls evaluiert werden (Sabolić et al. 2016).

Obwohl Mausmodelle also selbstverständlich Limitationen haben und auch von dem mit diesen Modellen erlangten Wissen nicht direkt auf die Situation im Menschen rückgeschlossen werden kann, so tragen sie doch dazu bei, erste Erkenntnisse über die Rolle von Membrantransportern in der Erhaltung wichtiger Körperfunktionen und in ADME Vorgängen zu generieren. Diese Erkenntnisse können dann wiederum genutzt werden, um sie gezielt in klinischen Studien im Menschen weiter zu untersuchen und zu vertiefen (Sabolić et al. 2016).

1.2 Der organische Anionentransporter 2 (OAT2 / SLC22A7)

1.2.1 Entdeckung und Lokalisation von OAT2

Der organische Anionentransporter 2 (OAT2, Gen: *SLC22A7*) wurde 1994 aus cDNA von Rattenleber kloniert und als NLT (von engl.: *novel liver-specific transport protein*) bezeichnet. Die Substratspezifität des Transportproteins wurde im Rahmen seiner Entdeckung nicht untersucht (Simonson et al. 1994). Simonson und Kollegen hatten damit unwissentlich den ersten organischen Anionentransporter in Säugetieren identifiziert. Sekine und Kollegen klonierten das Transportprotein vier Jahre später ebenfalls aus Rattenleber und ordneten NLT aufgrund seiner starken Ähnlichkeit zu dem 1997 aus Rattennieren klonierten organischen Anionentransporter 1 (OAT1) zur Gruppe der organischen Anionentransporter zu, weswegen sie den Transporter in OAT2 umbenannten (Sekine et al. 1997; Sekine et al. 1998).

Die Klonierung von humanem OAT2 (hOAT2) aus cDNA humaner Leber und Niere erfolgte 2001 durch Sun und Kollegen, ein Jahr später wurde auch murines OAT2 (mOat2) aus Nierengewebe von Mäusen kloniert (Kobayashi et al. 2002; Sun et al. 2001).

Im Menschen liegt das *hSLC22A7* Gen auf Chromosom 6p21.1, in der Maus ist die *mSlc22a7* Gensequenz auf Chromosom 17C zu finden (Kobayashi et al. 2002; Kok et al. 2000). Die Expression von OAT2 wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst, wobei noch nicht alle ausreichend untersucht sind (Shen et al. 2017). Auf Ebene der Transkription ist beispielsweise der Transkriptionsfaktor *Hepatocyte nuclear factor 4 alpha* (HNF4 α) in der Lage, die Expression von *hSLC22A7* zu regulieren (Popowski et al. 2005).

Genetische Varianten wie Einzelnukleotid-Polymorphismen (*single nucleotide polymorphism*, SNP) tragen häufig zur interindividuellen Variabilität der Funktion von Membrantransportern bei (Fisel et al. 2017). Obwohl auch für das *hSLC22A7* Gen verschiedene SNPs identifiziert wurden (Shin et al. 2010; Xu et al. 2005), kommen diese nur selten vor, weshalb die *hSLC22A7* Gensequenz insgesamt nur eine geringe Variabilität zeigt. Genetische Polymorphismen scheinen daher, wenn überhaupt, nur geringfügig zur Variabilität in der hOAT2 Proteinexpression und Transportaktivität beizutragen (Shen et al. 2017).

Die Topologie von hOAT2 und mOat2 ist in Abbildung 2 dargestellt. Das OAT2 Protein besteht, wie für die SLC22-Familie üblich, aus 12 Transmembran-Domänen (TMD),

wobei sowohl N- als auch C-Terminus intrazellulär lokalisiert sind. Zwischen TMD 1 und TMD 2 befindet sich eine große extrazelluläre Schleife, welche Glykosylierungsstellen aufweist (Shen et al. 2017). Daten, welche mithilfe von OAT1 gewonnen wurden, deuten darauf hin, dass die Glykosylierung in dieser Region essentiell für den korrekten Transport des Proteins zur Zellmembran ist (Tanaka et al. 2004).

Cropp und Kollegen beschrieben außerdem zwei alternativ gespleißte Varianten von hOAT2. Diese sind auf mRNA Ebene in hOAT2-exprimierenden Geweben ungefähr gleich stark exprimiert und unterscheiden sich lediglich durch einen 6 Basenpaare (bp) langen Einschub in Intron 1 der *hSLC22A7* Gensequenz und dadurch durch zwei zusätzliche Aminosäuren im Bereich der oben beschriebenen extrazellulären Schleife bei der Variante 548aa. Die Region des Aminosäureeinschubs ist bei OATs hoch konserviert und enthält mehrere Cystein-Reste, welche eine wichtige Rolle in der Ausbildung von Disulfidbrücken und damit in der Stabilisierung der Tertiärstruktur spielen. In Übereinstimmung damit führt der Aminosäureeinschub zu einer durch Immunfluoreszenz nachgewiesenen ausschließlich intrazellulären Lokalisation und einer deutlich schwächeren Fluoreszenz sowie zum kompletten Verlust der Transportfunktion dieser Proteinvariante (Cropp et al. 2008). Die fehlende Lokalisation in der Plasmamembran und der damit einhergehende Verlust der Transportaktivität der Proteinvariante wurde von Hotchkiss und Kollegen anhand einer umfassenden Studie mit verschiedenen OAT2-exprimierenden Zelllinien bestätigt (Hotchkiss et al. 2015).

Zwischen TMD 6 und TMD 7 befindet sich eine weitere große, diesmal aber intrazellulär lokalisierte Schleife, welche mehrere Phosphorylierungsstellen enthält, deren reversible Phosphorylierung die Transportfunktion von OAT2 zu regulieren scheint (Shen et al. 2017; Srimaroeng et al. 2008).

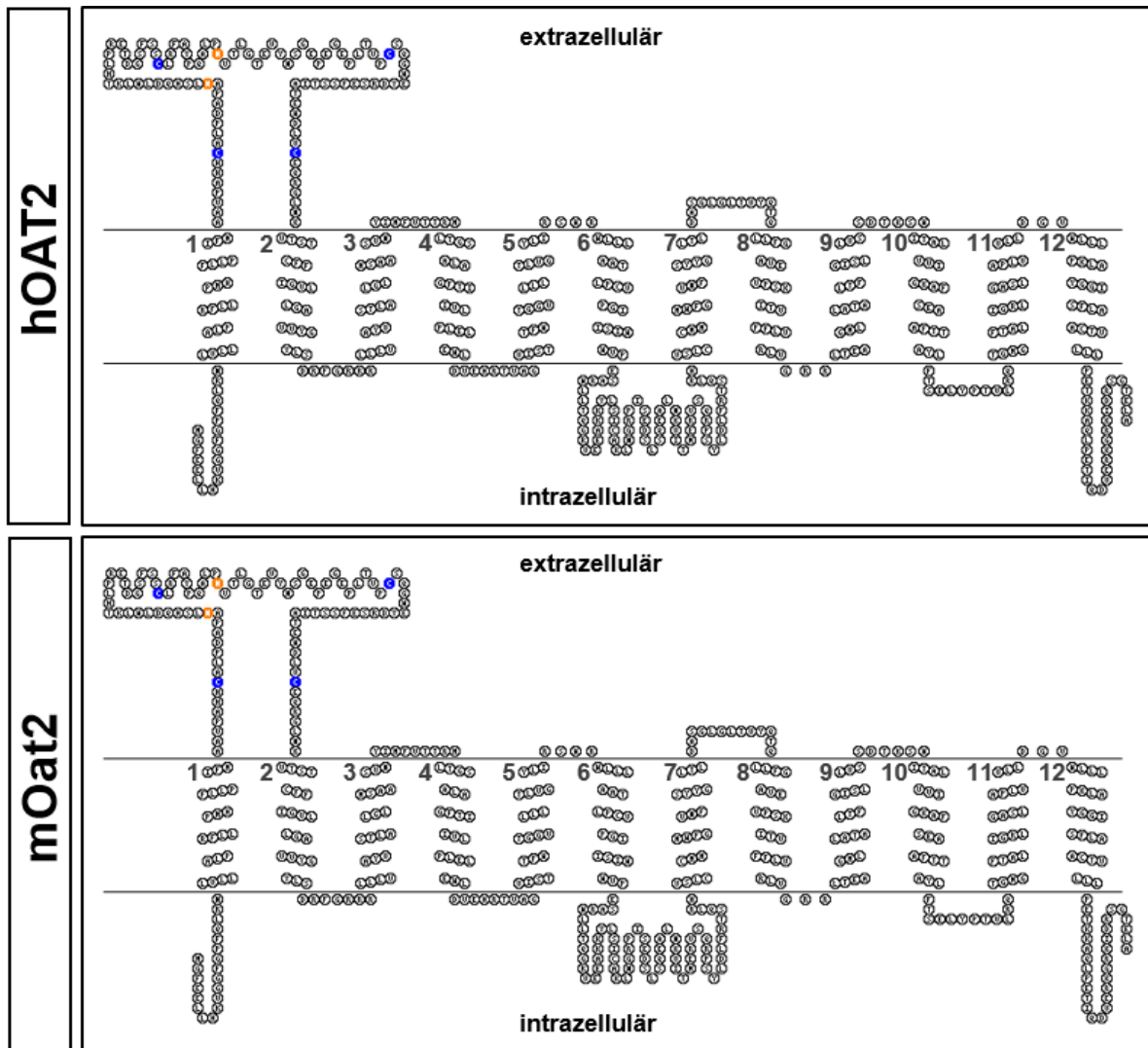


Abbildung 2: Topologiemodell von hOAT2 und mOat2

Das Programm TOPO2 wurde genutzt, um ein Topologiemodell der Membrantransporter hOAT2 und mOat2 zu erstellen (www.sacs.ucsf.edu/TOPO2/). Die Information zur vorhergesagten Position der Transmembransegmente entstammte UniProt (Q9Y694, SLC22A7 human, <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9Y694/entry>; Q91WU2, Slc22a7 mouse, <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q91WU2/entry>). Die beiden Transportproteine bestehen jeweils aus 12 TMDs, wobei beide zwischen TMD1 und TMD2 eine große extrazelluläre und zwischen TMD6 und TMD7 eine große intrazelluläre Schleife aufweisen. Glykosylierungsstellen sind in orange, Cystein-Reste in blau markiert.

Im Menschen ist hOAT2 in der Leber und der Niere exprimiert, wobei die Expression in der Leber stärker ist (Hilgendorf et al. 2007; Sun et al. 2001). Eine sehr schwache Expression von hOAT2 wurde zudem auf RNA Ebene in Hoden, Uterus und Ileum nachgewiesen (Fork et al. 2011). Die Expression von mOat2 in der Maus ähnelt der von hOAT2 im Menschen. Eine Expression des Transporters wurde hier ebenfalls in der Leber und etwas schwächer in der Niere nachgewiesen (Pavlova et al. 2000; Sekine et al. 1998).

Die Expression von OAT2 weist in Nagetieren in den verschiedenen Organen geschlechtsspezifische Unterschiede auf, im Menschen wurden dahingehende Untersuchungen noch nicht durchgeführt (Koepsell 2013; Ljubojević et al. 2007). Es sind außerdem speziesspezifische Unterschiede in der subzellulären Lokalisation von OAT2 in der Niere bekannt (Rizwan und Burckhardt 2007). Im Menschen konnte das Transportprotein in der basolateralen Membran der proximalen Tubuluszellen nachgewiesen werden (Enomoto et al. 2002), während es in Maus und Ratte in der apikalen Membran dieser Zellen exprimiert ist (Ljubojević et al. 2007). In den Hepatozyten ist OAT2 in Mensch, Maus und Ratte in der sinusoidalen (basolateralen) Membran lokalisiert (Kudo et al. 2014; Simonson et al. 1994; Yasui et al. 2014).

1.2.2 Substratspezifität und physiologische Rolle von OAT2

OAT2 ist in der Lage, eine Vielzahl von endogenen und exogenen Substraten über die Zellmembran hinweg zu transportieren (Shen et al. 2017). Wie der Name des Transportproteins schon vermuten lässt, handelt es sich bei den Substraten um organische Anionen, eine Gruppe von strukturell sehr unterschiedlichen Substanzen, welche bei physiologischem pH-Wert negativ geladen sind (Sekine et al. 1998). Weil OAT2 im Vergleich zu OAT1 und OAT3, welche hauptsächlich in der Niere exprimiert sind, am stärksten in der Leber exprimiert ist, wird vermutet, dass das Transportprotein eine entscheidende Rolle in der hepatischen Regulierung von organischen Anionen einnimmt (Kobayashi et al. 2005).

Zu den endogenen Substraten von OAT2 gehören unter anderem Prostaglandin (PG) PGF₂, Kreatinin, Nikotinsäure, Harnsäure, Orotsäure und Glutamat (Fork et al. 2011; Mathialagan et al. 2020; Shen et al. 2015; Shen et al. 2017).

Ein weiteres endogenes Substrat von OAT2 ist cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP). OAT2 transportiert cGMP mit einer hohen Affinität und ist in der Lage sowohl

die Aufnahme als auch den Efflux des Substrates zu vermitteln (Cropp et al. 2008). cGMP ist ein sekundärer Botenstoff, der in verschiedensten Prozessen im Körper wie beispielsweise der Reizweiterleitung im Nervensystem, entzündlichen Prozessen und der kardiovaskulären Homöostase eine entscheidende Rolle spielt (Feil und Kemp-Harper 2006). Der cGMP Signalweg umschließt eine Vielzahl an Komponenten, welche sich in die cGMP-generierenden Guanylatzyklen, die cGMP-degradierenden Phosphodiesterasen und die cGMP Effektoren, wie cGMP-abhängige Proteinkinasen und zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle, aufteilen lassen. Da der cGMP Signalweg in so vielen körpereigenen Prozesse involviert ist, ist es nicht verwunderlich, dass verschiedene Medikamente Komponenten des cGMP Signalweges zum Ziel haben (Hofmann 2020).

Die zur Familie der ABC Transporter gehörenden Efflux Transporter MRP4 (*ABCC4*), MRP5 (*ABCC5*) und MRP8 (*ABCC11*) wurden in der Literatur als cGMP Transporter beschrieben, können allerdings als Efflux-Pumpen nur die Abgabe von cGMP aus Zellen steuern (Guo et al. 2003; Jedlitschky et al. 2000; van Aabel et al. 2002; Wielinga et al. 2003). OAT2 ist daher bisher der einzige beschriebene hepatische Transporter, welcher in der Lage ist, die Aufnahme von cGMP in Zellen zu vermitteln.

Die bereits oben erwähnte „remote sensing and signaling“ Hypothese besagt, dass Membrantransportproteine gemeinsam mit anderen am Stoffwechsel und in ADME Prozessen beteiligten Proteinen zum reibungslosen Ablauf verschiedener Signalwege und damit zur Kommunikation zwischen Zellen und Organen beitragen (Nigam 2015; Nigam und Granados 2022). Im Einklang mit dieser Hypothese scheint OAT2 für die Regulation der intra- und extrazellulären cGMP Spiegel wichtig zu sein und ist damit vermutlich entscheidend im cGMP Signalweg und in einer Vielzahl von körpereigenen Prozessen involviert (Nigam 2018; Wu et al. 2011).

OAT2 transportiert auch eine Vielzahl an exogenen Substraten, wie beispielsweise diverse Arzneistoffe. So gehören unter anderem verschiedene Nichtsteroidale Antirheumatika wie Diclofenac und Acetylsalicylsäure, Antibiotika wie Tetracyclin, Virustatika wie Entecavir, Antidiabetika wie Tolbutamid und Zytostatika wie Methotrexat zu den exogenen OAT2-Substraten (Bi et al. 2018; Khamdang et al. 2002; Ma et al. 2019; Mathialagan et al. 2020; Shen et al. 2017; Sun et al. 2001).

Verschiedene exogene Substanzen sind außerdem in der Lage, den Transport von anderen Substraten durch OAT2 zu inhibieren. Dazu gehören beispielsweise

Cimetidin, Rosuvastatin, Bromsulfophthalein (BSP) und Ketoprofen (Mathialagan et al. 2018; Shen et al. 2015).

Obwohl Glutamat das Gegenion für den Transport von Orotsäure durch OAT2 darstellt, da Orotsäure entgegen des Glutamat Konzentrationsgefälles durch OAT2 in die Zellen hinein transportiert wird (Fork et al. 2011), kann Glutamat nicht als universelles Gegenion für den Transport durch OAT2 dienen. Ein Austausch von cGMP und Glutamat konnte nicht beobachtet werden (Henjakovic et al. 2015). Der Transport von organischen Anionen durch OAT1 und OAT3 in die proximalen Tubulizellen der Niere erfolgt im Austausch mit dem Dicarboxylat α -Ketoglutarat, welches mit dem Konzentrationsgradienten aus den Zellen transportiert wird (Sekine et al. 1997; Shen et al. 2017). Doch weder Mono- und Dicarboxylate noch Hydroxidionen konnten bisher als Gegenionen für den elektroneutralen Transport von organischen Anionen durch OAT2 beobachtet werden (Henjakovic et al. 2015; Shen et al. 2017).

Trotz vergleichsweise großem Forschungsinteresse an OAT2 ist die physiologische Rolle des Membrantransporters noch weitgehend unbekannt. Allerdings wurde ein interessanter Zusammenhang zwischen der Expressionsstärke von hOAT2 und dem Risiko für die Ausbildung eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) in der Literatur beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass eine niedrige *hSLC22A7* Expression das Rückfall-Risiko bei HCC-Patienten erhöhte (Kudo et al. 2014). Außerdem war das Risiko, HCC zu entwickeln, in Patienten mit chronischer Hepatitis C, welche eine niedrige hOAT2 Expression aufwiesen, erhöht (Yasui et al. 2014).

Obwohl viele Arzneistoffe und endogene Substanzen mittlerweile als Substrate von hOAT2 identifiziert wurden und stets neue Substrate des Transportproteins entdeckt werden (Mathialagan et al. 2020), ist immer noch wenig über die Rolle bekannt, welche hOAT2 in physiologischen, pharmakologischen und toxikologischen Abläufen spielt (Shen et al. 2017). Dies ist auch der Grund, weswegen das Internationale Transporterkonsortium derzeit keine spezifischen Empfehlungen für die Einbeziehung von hOAT2 in die Entwicklung neuer Medikamente ausspricht (Zamek-Gliszczyński et al. 2022).

1.3 Der organische Anionentransporter 7 (OAT7 / SLC22A9)

1.3.1 Entdeckung, Lokalisation und Funktion von OAT7

Der humane organische Anionentransporter 7 (hOAT7, Gen: *hSLC22A9*) wurde 2007 von Shin und Kollegen aufgrund seiner Ähnlichkeit zu anderen OATs bei einer Datenbanksuche des menschlichen Genoms entdeckt, aus humaner Leber kloniert und charakterisiert (Shin et al. 2007). In Nagetieren gibt es keinen zu hOAT7 orthologen Transporter, bisher wurde das Membrantransportprotein nur im Menschen beschrieben (Jacobsson et al. 2007).

Die *hSLC22A9* Gensequenz ist auf Chromosom 11q13.1 lokalisiert und die Transkription von *hSLC22A9* wird durch HNF1 α und HNF4 α aktiviert (Emami Riedmaier et al. 2016; Klein et al. 2010; Shin et al. 2007). Bisher identifizierte Missense-Mutationen wiesen nur eine sehr geringe Allelfrequenz auf und es konnte gezeigt werden, dass sowohl genetische Varianten als auch nicht-genetische Faktoren, wie Alter und Geschlecht, nur geringfügig zur interindividuellen Variabilität in der hOAT7 Expression beitragen (Emami Riedmaier et al. 2016).

Die Topologie von hOAT7 ähnelt stark der von anderen Mitgliedern der OAT-Familie, wie beispielsweise hOAT2, und weist so ebenfalls 12 TMDs und eine große extrazelluläre Schleife zwischen TMD1 und TMD2 sowie eine große intrazelluläre Schleife zwischen TMD6 und TMD7 auf (s. Abb. 3).

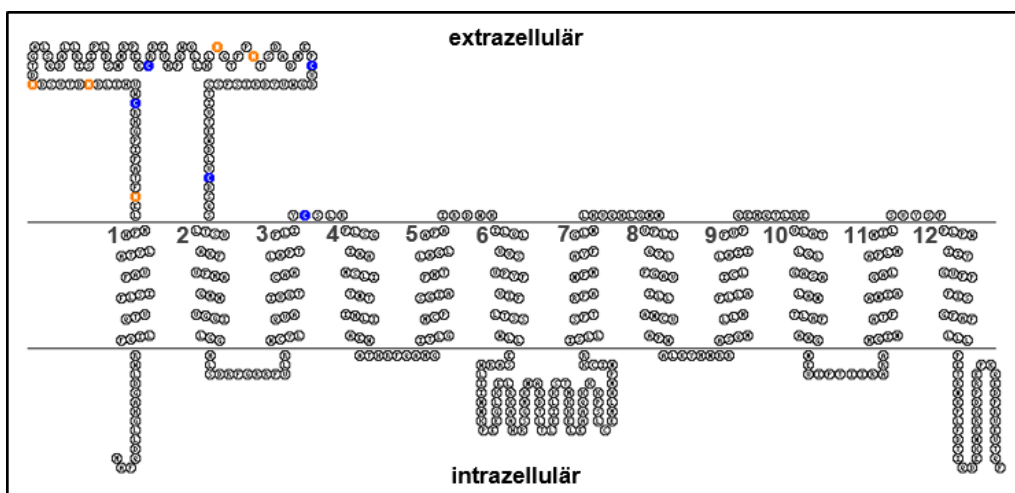


Abbildung 3: Topologiemodell von hOAT7

Das Programm TOPO2 wurde genutzt, um ein Topologiemodell des Membrantransporters hOAT7 zu erstellen (www.sacs.ucsf.edu/TOPO2/). Die Information zur vorhergesagten Position der TMDs entstammte UniProt (Q8IVM8, SLC22A9 human, <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q8IVM8/entry>).

Glykosylierungsstellen sind in orange, Cystein-Reste in blau markiert.

Da hOAT7 auf Proteinebene bisher nur in der Leber nachgewiesen wurde, ist von einer vorrangig hepatischen Expression des Transportproteins auszugehen. Dort ist es in der sinusoidalen Membran der Hepatozyten lokalisiert, was eine Rolle des Proteins im Transport von Substanzen aus dem Blut in die Hepatozyten oder andersherum vermuten lässt (Shin et al. 2007).

1.3.2 Substratspezifität und physiologische Rolle von OAT7

Im Gegensatz zu den anderen bekannten organischen Anionentransportern sind bisher nur wenige Substrate von hOAT7 bekannt. Mit vielen Substraten und Inhibitoren von anderen OATs interagiert hOAT7 nicht. Daher kann bei diesem Transportprotein von einem im Vergleich zu anderen OATs wesentlich kleineren Substratspektrum ausgegangen werden (Koepsell 2013).

Bisher sind nur drei endogene hOAT7-Substrate bekannt. Dabei handelt es sich um die kurzkettige Fettsäure Butyrat und die sulfatierten Steroide Estronsulfat (Estron-3-sulfat, E3S) und Dehydroepiandrosteron (DHEAS) (Mathialagan et al. 2018; Shin et al. 2007). Die Aufnahme von Butyrat wird in Transportversuchen durch den Austausch mit E3S stimuliert, was vermuten lässt, dass es in der Leber ebenfalls zur Abgabe von sulfatierten Steroiden ins Blut und im Austausch damit zur Aufnahme von Butyrat in die Hepatozyten kommt (Shin et al. 2007).

Bis dato ist nur ein exogenes Substrat von hOAT7 identifiziert worden. Dabei handelt es sich um das cholesterinsenkende Arzneimittel Pravastatin. Andere getestete Statine wurden nicht durch hOAT7 transportiert (Emami Riedmaier et al. 2016).

Aufgrund des bisher relativ geringen Forschungsinteresses an hOAT7 sowie des sehr kleinen Substratspektrums des Transporters ist die physiologische sowie die pharmakologische Rolle des Transportproteins bisher weitgehend unbekannt.

Da hOAT7 eine starke Expression in der Leber zeigt und Butyrat transportiert, könnte der Membrantransporter die Aufnahme von kurzkettigen Fettsäuren in die Hepatozyten und damit den hepatischen Metabolismus kurzkettiger Fettsäuren regulieren. Da E3S ebenfalls ein Substrat von hOAT7 ist, kann auch vermutet werden, dass hOAT7 eine Rolle in der Abgabe von Steroidhormonen, welche in der Leber sulfatiert wurden, ins Blut und damit in der Regulierung von Steroidhormonen spielt (Koepsell 2013).

1.4 Ziele der Arbeit

Da Membrantransportproteine eine essentielle Rolle in der Regulierung von körpereigenen und ADME Prozessen spielen, ist deren funktionelle Charakterisierung ein wichtiger Baustein in der Erforschung von physiologischen und pharmakologischen Vorgängen. Die organischen Anionentransporter OAT2 und OAT7 sind beide in der Leber exprimiert, OAT2 außerdem noch in der Niere. Daher ist anzunehmen, dass die beiden Transportproteine eine wichtige Rolle in der Ausscheidung von endogenen Substanzen und Arzneistoffen spielen. Obwohl für OAT2 schon verschiedene endogene sowie exogene Substrate identifiziert wurden, wobei der sekundäre Botenstoff cGMP aufgrund seiner Relevanz in verschiedenen körpereigenen Abläufen von besonderem Interesse ist, ist die physiologische Rolle des Transportproteins sowie sein Einfluss auf die Regulation pharmakologischer Prozesse bisher weitgehend ungeklärt. Für OAT7 wurden im Gegensatz zu OAT2 bisher nur wenige Substrate identifiziert, weshalb eine umfassende Charakterisierung auch dieses Transportproteins von großem Interesse ist.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die beiden Membrantransportproteine OAT2 und OAT7 funktionell zu charakterisieren. Hierfür sollten einerseits Zelllinien verwendet werden, welche die Transportproteine stabil exprimierten. Diese sollten für Transportversuche mit zahlreichen endogenen und xenobiotischen Substanzen zur Untersuchung der funktionellen Transportaktivität von OAT2 und OAT7 genutzt werden. Andererseits sollten zwei neue Mausmodelle generiert werden, mit denen die physiologische Rolle der Transportproteine *in vivo* aufgeklärt werden kann. Dabei handelte es sich um eine Mauslinie, welche einen globalen *Knockout* von mOat2 zeigte und um eine humanisierte Mauslinie, die einen hepatozytenspezifischen *Knockin* von hOAT7 aufwies. Die beiden Mauslinien sollten im Rahmen der Arbeit generiert, charakterisiert sowie ihre Eignung für die weitere Erforschung von OAT2 und OAT7 evaluiert werden.

2 Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Acetonitril, wasserfrei ≥99,8%	VWR, Darmstadt, Deutschland
Acrylamid 30 %	Bio-Rad, München, Deutschland
Agarose Tabletten (à 0,5 g)	Meridian Bioscience, Cincinnati, USA
Ameisensäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt, Deutschland
AquaSafe 300+	Zinsser Analytic GmbH, Eschborn, Deutschland
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Bicinchoninsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Borsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Bromphenolblau Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Bromsulphophthalein Dinatriumsalz Hydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Chenodesoxycholsäure Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Cortisol (Hydrocortison)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Crizotinib	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland
Cyclisches Guanosin 3',5'-monophosphat (cGMP)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dako Antibody Diluent Solution	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Dako REAL Peroxidase-Blocking Solution	Agilent Technologies, Santa Clara, USA

Dako Target Retrieval Solution, Citrate pH 6 (10x)	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Dako Target Retrieval Solution, pH 9 (10x)	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Dasatinib	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland
Deoxycholsäure Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose (DMEM)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle's Medium - low glucose (DMEM)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dulbecco's Phosphate buffered saline (PBS), ohne Kalzium, ohne Magnesium (Gibco™)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
D-(+)-Glucose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
D-(+)-Neopterin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Einbettmedium Kryostat: Cryochrome™	Epredia, Kalamazoo, USA
Einbettmedium Neo-Mount™	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure (Eisessig) 100%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol, 100 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol, 70 %, vergällt	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach a. Inn, Deutschland
Ethanol, 96 %, vergällt	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach a. Inn, Deutschland
Ethanol, 99 %, vergällt	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach a. Inn, Deutschland
Ethidiumbromidlösung 0,025 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ficoll® 400	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Filgotinib	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland
Fostamatinib	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland

Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Gelatine	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Glycerol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Glycin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycochenodeoxycholsäure Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Glycocholsäure Natriumsalz Hydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Glycolithocholatsulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
G418-BC (50 mg / ml)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Hämatoxylinlösung Papanicolaou 1a	Merck, Darmstadt, Deutschland
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hoechst 34580	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
HotStarTaq Master Mix	Qiagen, Venlo, Niederlande
Hygromycin B (50 mg / ml)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ibrutinib	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland
Idelalisib	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland
Isofluran CP 1 ml / ml	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, Deutschland
Isopropanol (70 %)	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Isopropanol ROTIPURAN® (100 %)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ketoprofen	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Kupfer(II)-Sulfatlösung, 4 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Lipofectamine™ 2000 Transfektionsreagenz	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Lipoxin A ₄	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Lithocholsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

L-Glutamin 200 mM (Gibco™)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
L-Thyroxin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Magnesiumchlorid-Lösung (25 mM)	Qiagen, Venlo, Niederlande
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Methanol, 100 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mowiol 4-88	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumcholat-Hydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumcitrat-Dihydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Neo-Clear™	Merck, Darmstadt, Deutschland
Nukleasefreies Wasser	Qiagen, Venlo, Niederlande
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Pefabloc® SC	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Penicillin-Streptomycin (10 000 U/mL)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Poly-L-Lysin-Lösung, 0,01 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ponceau S Lösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards	Bio-Rad, München, Deutschland
Proteinase K (20 mg / ml)	Qiagen, Venlo, Niederlande
Rattenkollagen I	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
RNase AWAY™ Oberflächendekontaminationsmittel	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

RNase Inhibitor (Applied Biosystems™)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
ROTI®Histofix 4 % (4 % Formaldehyd)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
SDS Pellets	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Shandon™ Eosin Y	Epredia, Kalamazoo, USA
SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
TaqMan™ Universaler PCR-Mastermix (2x) (Applied Biosystems™)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Testosteron	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Thromboxan B ₂	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
TO-PRO™-3 Iodid (642/661)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tris-Base	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris-Hydrochlorid (Tris-HCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TritonX-100	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-EDTA (0.05%)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
TWEEN 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
TWEEN 80	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Vemurafenib	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland
William's E Medium, ohne Glutamin (Gibco™)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Xylencyanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zeocin™ (100 mg / ml)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
100 bp DNA-Leiter	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
(1'R,2'S)-Biopterin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
1,4-Dithioerythritol (DTE)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
(6R)-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin - dihydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
7,8-Dihydro-L-Biopterin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
7,8-Dihydro-Neopterin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

2.1.2 Kits

Tabelle 2: Verwendete Kits

Kit	Bezugsquelle
BigDye™ Terminator Version 3.1 Zyklus-Sequenzierungs-kit (Applied Biosystems™)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DAKO EnVision™+ System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
GeneChip™ WT PLUS Reagent Kit (Applied Biosystems™)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Liver Perfusion Kit, mouse and rat	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland
mirVana™ miRNA Isolations-Kit, mit Phenol	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PNGase F	New England Biolabs, Ipswich, USA
ProteoExtract® Transmembrane Protein Extraction Kit	Merck, Darmstadt, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
Revert™ 700 Total Protein Stain for Western Blot Normalization	LI-COR Biosciences – GmbH, Bad Homburg, Deutschland
TissueScan, Mouse Normal cDNA Array	OriGene Technologies, Inc., Rockville, USA
ZR DNA Sequencing Clean-Up Kit	Zymo Research, Irvine, USA

2.1.3 Plasmide

Tabelle 3: Verwendete Plasmide

Plasmid	Kurze Beschreibung
pOG44	Vektor zur Expression der Flp-Rekombinase
pcDNA5/FRT hOAT2	OAT2 des Menschen im pcDNA5/FRT Vektor
pcDNA5/FRT mOat2	OAT2 der Maus im pcDNA5/FRT Vektor

2.1.4 TaqMan Genexpressionsassays

Tabelle 4: Verwendete TaqMan Genexpressionsassays

Gen	Spezies	Assay-ID
<i>hACTB</i> (β -Actin)	Mensch	HS99999903_m1
<i>hSLC22A7</i> (Solute Carrier 22A7)	Mensch	Hs00198527_m1
<i>hSLC22A9</i> (Solute Carrier 22A9)	Mensch	Hs00971067_m1
<i>mActb</i> (β -Actin)	Maus	Mm02619580_g1
<i>mHsd17b6</i> (Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 6)	Maus	Mm00457343_m1
<i>mLcn2</i> (Lipocalin 2)	Maus	Mm01324470_m1
<i>mSlc22a7</i> , Exon 4-5	Maus	Mm00460672_m1
<i>mSlc22a7</i> , Exon 1-2	Maus	Mm00460669_g1
<i>mSlc22a7</i> , Exon 9-10	Maus	Mm01281500_g1
<i>mSult2a1</i> / <i>mSult2a2</i> (Sulfotransferase family 2A)	Maus	Mm04205656_mH

Alle hier genannten TaqMan Genexpressionsassays wurden von Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA (Applied Biosystems™) bezogen.

2.1.5 RNA-Microarrays

Tabelle 5: Verwendete RNA-Microarrays

RNA-Microarray	Spezies
GeneChip™ Human Transcriptome Array 2.0 (Applied Biosystems™)	Mensch
Clariom™ S Assay HT, mouse (Applied Biosystems™)	Maus

2.1.6 Antikörper

Tabelle 6: Verwendete Antikörper

Primäre Antikörper	Bezugsquelle	Verdünnung	Target Retrieval Solution pH-Wert
Anti- <i>SLCO1B3</i> (OATP1B3)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland	WB: 1:100 IF: 1:50 IHC: 1:50	pH 6
Anti- <i>SLC22A7</i> (OAT2) Abnova	Abnova, Taipeh, Taiwan	WB: 1:50 IF: 1:50 IHC: 1:50	pH 9
Anti- <i>SLC22A7</i> (OAT2) Invitrogen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	WB: 1:1000 IF: 1:100 IHC: 1:100	pH 6
Anti- <i>SLC22A7</i> (OAT2) Proteintech	Proteintech Group, Inc., Rosemont, USA	WB: 1:50 IF: 1:50 IHC: 1:50	pH 9
Anti- <i>SLC22A7</i> (OAT2) Bioss	Bioss Antibodies Inc. Woburn, USA	WB: 1:50 IF: 1:50 IHC: 1:50	pH 6
Anti- <i>SLC22A7</i> (OAT2) Eurogentec (nicht kommerziell)	Eurogentec, Seraing, Belgien	WB: 1:50 IF: 1:50 IHC: 1:50	pH 6
CGR Anti- <i>SLC22A3</i> (OCT3) (nicht kommerziell)	Peptide Specialty Laboratories, Heidelberg, Deutschland (Nies et al. 2009)	WB: 1:3000 IF: 1:100 IHC: 1:100	pH 6
ESL 42.5 Anti- <i>SLCO1B1</i> (OATP1B1) (nicht kommerziell)	Peptide Specialty Laboratories, Heidelberg, Deutschland (König et al. 2000)	WB: 1:100 IF: 1:100 IHC: 1:100	pH 6
GNG-59 Anti- <i>SLC10A1</i> (NTCP) (nicht kommerziell)	Peptide Specialty Laboratories, Heidelberg, Deutschland (Kojima et al. 2003)	WB: 1:100 IF: 1:100 IHC: 1:100	pH 6
KEN Anti- <i>SLC22A1</i> (OCT1) (nicht kommerziell)	Peptide Specialty Laboratories, Heidelberg, Deutschland (Nies et al. 2008)	WB: 1:3000 IF: 1:300 IHC: 1:300	pH 6
REP5045 Anti- <i>SLC22A9</i> (OAT7)	Eurogentec, Seraing, Belgien	WB: 1:500 IF: 1:50	pH 6

(nicht kommerziell)	(Emami Riedmaier et al. 2016)	IHC: 1:50	
SPA Anti- <i>SLCO2B1</i> (OATP2B1) (nicht kommerziell)	Peptide Specialty Laboratories, Heidelberg, Deutschland (Kopplow et al. 2005)	WB: 1:5000 IF: 1:300 IHC: 1:300	pH 6
Sekundäre Antikörper			
Sekundäre Antikörper	Bezugsquelle	Verdünnung	
Anti-Kaninchen IgG (aus Ziege), Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	IF: 1:300	
Dako Anti-Kaninchen IgG-HRP (aus Schwein)	Agilent Technologies, Santa Clara, USA	WB: 1:5000	
Dako EnVision+ HRP Rabbit Single Reagent	Agilent Technologies, Santa Clara, USA	IHC: unverdünnt	

2.1.7 Radioaktiv markierte Substanzen

Tabelle 7: Verwendete radioaktiv markierte Substanzen

Substanz	Bezugsquelle
Atorvastatin acid [³ H(G)] sodium salt Spezifische Aktivität: 20 Ci / mmol	American Radiolabeled Chemicals, Inc., St. Louis, USA
Bilirubin [10- ³ H] Spezifische Aktivität: 10 Ci / mmol	American Radiolabeled Chemicals, Inc., St. Louis, USA
CCK-8 (sulfated) propionylated [propionyl- ³ H(N)] Spezifische Aktivität: 80 Ci / mmol	American Radiolabeled Chemicals, Inc., St. Louis, USA
Estrone sulfate, ammonium salt-, [6,7- ³ H(N)] Spezifische Aktivität: 50 Ci / mmol	PerkinElmer Inc., Waltham, USA
Everolimus [³ H(G)] Spezifische Aktivität: 5 Ci / mmol	American Radiolabeled Chemicals, Inc., St. Louis, USA
Fluvastatin [³ H(G)] sodium salt Spezifische Aktivität: 20 Ci / mmol	American Radiolabeled Chemicals, Inc., St. Louis, USA
Guanosine 3',5'-[8- ³ H] cyclic monophosphate (cGMP) Spezifische Aktivität: 25 Ci / mmol	American Radiolabeled Chemicals, Inc., St. Louis, USA
Harnsäure [8- ¹⁴ C] Spezifische Aktivität: 54 mCi / mmol	American Radiolabeled Chemicals, Inc., St. Louis, USA

Metformin [biguanido- ¹⁴ C] hydrochloride Spezifische Aktivität: 107 mCi / mmol	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, Deutschland
Montelukast [³ H(G)] Spezifische Aktivität: 10 Ci / mmol	American Radiolabeled Chemicals, Inc., St. Louis, USA
Omeprazol [¹⁴ C] Spezifische Aktivität: 12,7 mCi / mmol	Byk Gulden Lomberg Chemische Fabrik GmbH, Konstanz, Deutschland
Pantoprazol [¹⁴ C] Spezifische Aktivität: 14,9 mCi / mmol	Byk Gulden Lomberg Chemische Fabrik GmbH, Konstanz, Deutschland
Pravastatin [³ H(G)] sodium salt Spezifische Aktivität: 5 Ci / mmol	American Radiolabeled Chemicals, Inc., St. Louis, USA
Prostaglandin E2, [5,6,8,11,12,14,15- ³ H(N)] Spezifische Aktivität: 180 Ci / mmol	PerkinElmer Inc., Waltham, USA
Rosuvastatin calcium [³ H(G)] Spezifische Aktivität: 10 Ci / mmol	American Radiolabeled Chemicals, Inc., St. Louis, USA
Simvastatin acid [³ H(G)] sodium salt Spezifische Aktivität: 10 Ci / mmol	American Radiolabeled Chemicals, Inc., St. Louis, USA
Sorafenib, p-toluenesulfonate salt, [³ H] Spezifische Aktivität: 2,7 Ci / mmol	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, Deutschland
Sunitinib malate [³ H(G)] Spezifische Aktivität: 12,5 Ci / mmol	American Radiolabeled Chemicals, Inc., St. Louis, USA
Taurocholic acid [³ H(G)] Spezifische Aktivität: 5 Ci / mmol	PerkinElmer Inc., Waltham, USA
Taxol [³ H(G)] (Paclitaxel) Spezifische Aktivität: 19,6 Ci / mmol	American Radiolabeled Chemicals, Inc., St. Louis, USA
Tetrahydrobiopterin, L-[6,7- ³ H] Hydrochlorid Spezifische Aktivität: 60 Ci / mmol	American Radiolabeled Chemicals, Inc., St. Louis, USA
Xanthin [8- ³ H] Spezifische Aktivität: 21 Ci / mmol	Moravek, Inc., Brea, USA
4-Acetamidophenol [2,6- ³ H] Spezifische Aktivität: 50 Ci / mmol	American Radiolabeled Chemicals, Inc., St. Louis, USA
5-Fluoruracil [6- ³ H] Spezifische Aktivität: 27 Ci / mmol	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, Deutschland

2.1.8 Puffer / Lösungen

Tabelle 8: Verwendete Puffer und Lösungen

Puffer / Lösung	Substanz	Menge / Gewicht	Endkonzentration
APS (10 %)	APS	1 g	10 %
	H ₂ O (MilliQ)	ad 10 ml	
Elektrophoresepuffer (10 x)	Tris-Base	150 g	0,25 M
	Glycin	720 g	1,92 M
	SDS (20 %)	250 ml	1 %
	H ₂ O (MilliQ)	ad 5000 ml	
Gewebelysepuffer	KCl	9,32 g	500 mM
	Tris (1M) pH 8,3	25 ml	100 mM
	Gelatine	25 mg	0,1 mg / ml
	TritonX-100	2,5 ml	1 %
	Tween20	2,5 ml	1 %
	H ₂ O (MilliQ)	ad 250 ml	
	Proteinase K <i>immer frisch zugeben</i>	<i>Frisch zugeben</i>	500 µg / ml
Homogenisierungspuffer	KCl	2,795 g	150 mM
	HEPES (1 M) pH 7,4	2,5 ml	10 mM
	EDTA (0,5 M)	500 µl	1 mM
	H ₂ O (MilliQ)	ad 250 ml	
	DTT	<i>Frisch zugeben</i>	1 mM
	Pefablock	<i>Frisch zugeben</i>	0,2 mM
Lämmli-Puffer (5 x)	SDS	10 g	10 %
	Tris (1 M) pH 6,8	30,6 ml	0,306 M
	2-Mercaptoethanol	25 ml	25 %
	Bromphenolblau Natriumsalz	100 mg	0,1 %
	H ₂ O (MilliQ)	ad 75 ml	
	Glycerol	25 ml	25 %

Lysepuffer Pterine	Trichloressigsäure	8,18 g	0,2 M
	Ascorbinsäure	2,2 g	50 mM
	DTE	250,65 mg	6,5 mM
	EDTA (0,5 M)	500 µl	1 mM
	H ₂ O (MilliQ)	ad 250 ml	
Magermilch (5 %)	Magermilchpulver	10 g	5 %
	TBST (1 x)	ad 200 ml	
Mowiol	Mowiol 4-88	2,4 g	3,37 M
	Glycerol	6 g	21,7 %
	<i>1 Stunde Rühren bei Raumtemperatur Dann Zugabe:</i>		
	H ₂ O (MilliQ)	6 ml	
	<i>1 Stunde Rühren bei Raumtemperatur Dann Zugabe:</i>		
	Tris-HCl (0,2 M) pH 8,5	12 ml	0,1 M
	<i>2 Stunden bei 50 °C inkubieren</i>		
NaPi-Puffer (0,1 M)	<u>Lösung 1:</u>		
	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	6,9 g	0,1 M
	H ₂ O (MilliQ)	ad 500 ml	
	<u>Lösung 2:</u>		
	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	8,9 g	0,1 M
	H ₂ O (MilliQ)	ad 500 ml	
	<i>Lösung 2 mit Lösung 1 auf pH 7,3 einstellen</i>		
NaPi-Puffer (0,5 mM)	NaPi-Puffer (0,1 M)	250 µl	0,5 mM
	H ₂ O (MilliQ)	ad 50 ml	
Natriumcitrat-Lösung (3,2 %)	Natriumcitrat-Dihydrat	8 g	3,2 %
	H ₂ O (MilliQ)	250 ml	
PMSF (100 mM)	PMSF	17,42 mg	100 mM
	Ethanol, 100 %	1 ml	
SDS (0,2 %)	SDS (10 %)	10 ml	0,2 %
	H ₂ O (MilliQ)	ad 500 ml	

SDS (10 %)	SDS	50 g	10 %
	H ₂ O (MilliQ)	ad 500 ml	
SDS (20 %)	SDS	100 g	20 %
	H ₂ O (MilliQ)	ad 500 ml	
TAE-Puffer (50 x)	Tris-Base	242 g	2 M
	EDTA (0,5 M, pH 8)	100 ml	50 mM
	Essigsäure (100 %)	57,1 ml	5,71 %
	H ₂ O (MilliQ)	ad 1000 ml	
	<i>pH mit Essigsäure auf 8,0 einstellen</i>		
TBE-Puffer (10 x)	Tris-Base	218 g	0,9 M
	Borsäure	111,3 g	0,9 M
	EDTA (0,5 M, pH 8)	10 ml	2,5 mM
	H ₂ O (MilliQ)	ad 2000 ml	
TBS (10 x)	NaCl	400 g	1,369 M
	KCl	10 g	0,027 M
	Tris-Base	16,93 g	0,25 M Tris
	Tris-HCl	175 g	
	H ₂ O (MilliQ)	ad 5000 ml	
TBST (1 x) für Immunblots	TBS (10 x)	500 ml	0,025 M Tris
	H ₂ O (MilliQ)	4500 ml	
	50 % TWEEN 20	10 ml	0,1 %
TBST (1 x) für IHC	TBS (10 x)	200 ml	0,025 M Tris
	H ₂ O (MilliQ)	1800 ml	
	TWEEN 80	2 ml	0,1 %
Towbin-Puffer	Tris-Base	6,06 g	25 mM
	Glycin	28,4 g	192 mM
	Methanol, 100 %	200 ml	10 %
	H ₂ O (MilliQ)	ad 2000 ml	

Transportpuffer	NaCl	8,3 g	142 mM
	HEPES	2,98 g	12,5 mM
	KCl	370 mg	5 mM
	Glucose	900 mg	5 mM
	CaCl ₂	220 mg	1,5 mM
	MgSO ₄	144 mg	1,2 mM
	KH ₂ PO ₄	136 mg	1 mM
	H ₂ O (MilliQ)	ad 1000 ml	
Tris (0,5 M) pH 6,8	Tris-Base	928 mg	0,5 M Tris
	Tris-HCl	38,19 g	
	H ₂ O (MilliQ)	ad 500 ml	
Tris (1,5 M) pH 8,8	Tris-Base	69,03 g	1,5 M Tris
	Tris-HCl	28,4 g	
	H ₂ O (MilliQ)	ad 500 ml	
0,1 % Ameisensäure in Acetonitril / H₂O (1:1)	H ₂ O (MilliQ)	250 ml	
	Acetonitril	250 ml	
	Ameisensäure	500 µl	0,1 %
100 bp Marker	100 bp DNA-Leiter (0,5 µg / µl)	60 µl	0,1 µg / µl
	6 x BPB	50 µl	1 x
	H ₂ O (MilliQ)	ad 300 µl	
50 % TWEEN 20	TWEEN 20	250 g	50 %
	H ₂ O (MilliQ)	227,3 ml	
6x BPB	Ficoll 400, 15 %	8 ml	12 %
	TBE-Puffer (10 x)	1 ml	1 x
	Bromphenolblau Natriumsalz	10 mg	1,45 mM
	Xylencyanol	10 mg	1,86 mM
	H ₂ O (MilliQ)	ad 10 ml	

2.1.9 Zellkulturmedien

Tabelle 9: Verwendete Zellkulturmedien

Bezeichnung / Medium	Komponente	Menge	Endkonzentration
Kulturmedium	DMEM high Glucose	500 ml	
	FCS	55 ml	10 %
	Penicillin-Streptomycin (10 000 U/mL)	5,5 ml	1 %
	entweder oder oder	G418-BC (50 mg / ml) Hygromycin B (50 mg / ml) Zeocin (100 mg / ml)	8,8 ml 1,1 ml 0,55 ml
Einfriermedium	Kulturmedium ohne antibiotische Zusätze	2 ml	40 %
	FCS	2 ml	40 %
	DMSO	1 ml	20 %
Hepatozyten Aussaatmedium	DMEM low Glucose	500 ml	
	FCS	27,5 ml	5 %
	Penicillin-Streptomycin (10 000 U/mL)	5,3 ml	1 %
Hepatozyten Kulturmedium	William's E Medium, no glutamine	500 ml	
	L-Glutamin 200 mM	5,1 ml	1 % (2 mM)
	Penicillin-Streptomycin (10 000 U/mL)	5,1 ml	1 %

2.1.10 Zelllinien

Es wurden transfizierte parentale embryonale Nierenzellen 293 des Menschen (human embryonic kidney, HEK293 Zellen) mit Flp-In™ System sowie gewöhnliche HEK293 Zellen verwendet. Die genauere Beschreibung dieser Zelllinien und des Flp-In Systems ist unter Punkt 2.2.1.1 zu finden.

Die verschiedenen für die Experimente genutzten Transporter-exprimierenden Zelllinien sowie die mit dem Leervektor transfizierten Kontrollzelllinien sind in Tabelle 10 aufgeführt. Die hOCT1-exprimierenden Zellen wurden von Prof. Dr. Kathleen M. Giacomini, *Membrane Transporter Functions and Genomics Laboratory, Department of Bioengineering and Therapeutic Sciences, Schools of Pharmacy and*

Medicine University of California San Francisco, USA zur Verfügung gestellt, wobei das Kulturmedium im Gegensatz zu den anderen Zelllinien im Flp-In System 500 µg / µl Hygromycin B enthielt. Alle übrigen, mit Ausnahme der hOAT2- und mOat2-exprimierenden Zelllinien, wurden von Prof. Dr. Anne Nies, Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie, Stuttgart zur Verfügung gestellt.

Tabelle 10: Verwendete Zelllinien

Bezeichnung	Exprimiertes Transportprotein	Zellhintergrund	Antibiotischer Selektionszusatz	Referenz
Flp-293	-	Flp-In-293	Zeocin	(Emami Riedmaier et al. 2016)
Kontrolle	Kontrollzellen (Leervektor)	Flp-In-293 / HEK293	Hygromycin B / G418-BC	(Nies et al. 2011)
hOAT7	hOAT7	Flp-In-293	Hygromycin B	(Emami Riedmaier et al. 2016)
hOAT2	hOAT2	Flp-In-293	Hygromycin B	in dieser Arbeit neu generiert
mOat2	mOat2	Flp-In-293	Hygromycin B	in dieser Arbeit neu generiert
hOCT1	hOCT1	Flp-In-293	Hygromycin B (500 µg / ml)	(Shu et al. 2003)
hOCT3	hOCT3	HEK293	G418-BC	(Nies et al. 2011)
hOATP1B1	hOATP1B1	Flp-In-293	Hygromycin B	(Dickens et al. 2018)
hOATP1B3	hOATP1B3	Flp-In-293	Hygromycin B	noch nicht publiziert
hOATP2B1	hOATP2B1	HEK293	G418-BC	(Nies et al. 2013)
hNTCP	hNTCP	Flp-In-293	Hygromycin B	(Tremmel et al. 2022)

2.1.11 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 11: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Bezugsquelle
Axygen® AxyMats 96 Well Sealing Mat for Deep Well Plate	Corning, Corning, USA
Axygen® 96-well Clear V-Bottom 500 µL Polypropylene Deep Well Plate	Corning, Corning, USA
Cellstar® Zellkulturflasche, 250 ml, 75 cm ²	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Cellstar® Zellkulturplatte, 12 Well	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Cellstar® Zellkulturplatte, 24 Well	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Cellstar® Zellkulturplatte, 6 Well	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Cellstar® Zellkulturschale, 100/20 mm	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Cryo-Etiketten Cryo-Babies 1,28 x 0,50"	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
CryoPure Gefäß 1,8ml weiß	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Deckgläser, rechteckig, 24 x 60 mm	VWR, Darmstadt, Deutschland
Dolphin MCT 2,0 ml RNase / DNase freie Zentrifugenröhrchen	Sorenson BioScience, Salt Lake City, USA
Einmalhandschuhe Peha-soft® nitrile fino powderfree	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Einmalhandschuhe Purple Nitrile*	Kimberly-Clark Professional*, Koblenz, Deutschland
Einmalhandschuhe Purple Nitrile* XTRA*	Kimberly-Clark Professional*, Koblenz, Deutschland
Einmal-Kanülen Nr. 20, 0,40 x 19 mm, 27 g, BD Microlance™	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Eppendorf Combitips advanced®, Biopur®, 2,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Combitips advanced®, Biopur®, 5,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Combitips advanced®, Biopur®, 10 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Safe-Lock Tubes, 1,5 ml, PCR clean	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Eppendorf Safe-Lock Tubes, 2 ml, PCR clean	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Faltenfilter, MN 615, Qualitativ, Mittelschnell (22 s), Glatt	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Filterpapier für Westernblot	Bio-Rad, München, Deutschland
GentleMACS™ C Tubes	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland
GentleMACS™ Perfusers	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland
Lysing Matrix D, 2 mL tube	MP Biomedicals, Santa Ana, USA
MACS® SmartStrainers 100 µm	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland
MicroAmp™ optische Klebefolie (Applied Biosystems™)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
MicroAmp™ optische 96-Well-Reaktionsplatte (Applied Biosystems™)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Microtainer™ Rörchen mit Microgard™ Sicherheitsverschluss für die Kapillarblutentnahme (Polymergel)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Microtome Blades A35	FEATHER Safety Razor Co., Ltd, Osaka, Japan
Mikrotestplatte 96 Well	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Nitrozellulosemembran, 0,45 µm	Bio-Rad, München, Deutschland
Parafilm® M	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Pasteurpipetten, 150 mm, aus Glas	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
PCR Platte, 384-Well, voll gerahmt	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PCR-Platte, 96-Well, starr, mit Halbrand	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pipettenspitzen, Filterspitzen LTS 1000 µl	Mettler-Toledo GmbH, Columbus, USA
Pipettenspitzen, Filterspitzen LTS 20 µl	Mettler-Toledo GmbH, Columbus, USA
Pipettenspitzen, Filterspitzen LTS 200 µl	Mettler-Toledo GmbH, Columbus, USA
Pipettenspitzen GELoader®	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen, MultiGuard® barrier tips, 0,1 – 10 µl	Sorenson BioScience, Salt Lake City, USA
Pipettenspitzen, MultiGuard® barrier tips, 1 – 100 µl	Sorenson BioScience, Salt Lake City, USA
Pipettenspitzen, MultiGuard® barrier tips, 50 – 1250 µl	Sorenson BioScience, Salt Lake City, USA

Präzisionstücher	Kimberly-Clark Professional*, Koblenz, Deutschland
Probenröhrchen für Ultrazentrifuge, 1,5 mL, PP Tube mit Snap-on Cap	Beckman Coulter, Inc., Brea, USA
Probenröhrchen 0.5 ml, farblos, für Schraubverschlüsse	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
PureCoat™ Amine 24-well Zellkulturplatte	Corning, Corning, USA
Röhrchen, 14 ml, PP, 18 / 95 mm, runder Boden	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Röhre 15ml, 120x17mm, PP (15 ml Falcon tube)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Röhre 50ml, 114x28mm, PP (50 ml Falcon tube)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Safeshield steriles Einwegskalpell No. 10	FEATHER Safety Razor Co., Ltd, Osaka, Japan
Schraubdeckelgefäße: Probenröhrchen 1,5 ml, farblos, steril	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Schraubverschlüsse, farblich gemischt	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Schriftbänder für Beschriftungsgerät	Brother International GmbH, Bad Vilbel, Deutschland
Septa for 3500 Dx Genetic Analyzers, 96-well (Applied Biosystems™)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Serologische Pipette, Stripette™, 5 ml	Corning, Corning, USA
Serologische Pipette, Stripette™, 10 ml	Corning, Corning, USA
Serologische Pipette, Stripette™, 15 ml	Corning, Corning, USA
Serologische Pipette, Stripette™, 20 ml	Corning, Corning, USA
Spritze mit Luer-Anschluss ohne Nadel, 1ml, BD PlastiPak™	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Strips of 8 Flat Sealing Caps (4titude)	Azenta, Inc., Chelmsford, USA
SuperFrost Plus™ Adhäsionsobjektträger	Epredia, Kalamazoo, USA
Szinti Vials, Mini POLY-Q, Polyethylene, 6 ml	Beckman Coulter, Inc., Brea, USA
Transferpipette, 3,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Vernichtungsbeutel 200x300mm	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Wischtücher, WYPALL* L20 Extra+	Kimberly-Clark Professional*, Koblenz, Deutschland

Zellkulturkammer, 4 Well auf PCA-Objektträger, ablösbar	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Zellschaber, Cell Lifter	Corning, Corning, USA

2.1.12 Geräte und Hilfsmittel

Tabelle 12: Verwendete Geräte und Hilfsmittel

Bezeichnung	Bezugsquelle
Absaughilfe Vacuboy	Integra Biosciences, Biebertal, Deutschland
Absaugvorrichtung für Zellkultur	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Analysewaage XS205 DualRange Excellence	Mettler-Toledo GmbH, Columbus, USA
Beschriftungsgerät PT-9700PC	Brother International GmbH, Bad Vilbel, Deutschland
CCD-Kamera STELLA	Raytest, Straubenhardt, Deutschland
Dampfgarer DGS 855	Rommelsbacher ElektroHausgeräte GmbH, Dinkelsbühl, Deutschland
Dewar Transportgefäß, blau beschichtet	KGW-Isotherm, Karlsruhe, Deutschland
E-Box CX5 TS	VILBER LOURMAT Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland
Einfrierbox Nalgene® Mr. Frosty	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Elektrophorese-Netzgerät EV231	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
FastPrep-24™ Sample Preparation System	MP Biomedicals, Santa Ana, USA
Flüssigszintillationszähler Hidex 300 SL	Hidex, Mainz, Deutschland
Gelelektrophoresezubehör Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Bio-Rad, München, Deutschland
Gelsystem PerfectBlue Mini L	VWR, Darmstadt, Deutschland
Gelsystem PerfectBlue Mini S	VWR, Darmstadt, Deutschland
GeneChip™ Fluidics Station 450 DX (Applied Biosystems™)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
GeneChip™ Scanner 3000 7G System (Applied Biosystems™)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
GentleMACS™ Octo Dissociator with Heaters	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland
GentleMACS™ Perfusion Sleeves	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland

Glasgefäß zum Waschen von Objektträgern bei Immunfluoreszenz	Glaswerk Wertheim, Wertheim, Deutschland
Handhomogenisator Dounce	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Heizblock Thermomixer Comfort 5355	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Inkubator Galaxy® 170 S (New Brunswick)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Inkubator Heratherm™ IGS 60	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kästchen PerfectWestern Containers	GenHunter, Nashville, USA
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop TCS SP8	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Kryostat Leica CM1850 UV	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Laborglasflaschen DURAN® Original GL 45	DWK Life Sciences GmbH, Wertheim/Main, Deutschland
Magnetrührer Hei-Standard	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Mikroplatten-Reader EnSpire™ Multimode Reader	PerkinElmer Inc., Waltham, USA
Mikroskop CKX31	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Multipette® plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
NanoDrop™ 2000c Mikrovolumen-Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Neubauer Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim vor der Rhön, Deutschland
Odyssey CLx Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences – GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Optima™ MAX-E Ultrazentrifuge	Beckman Coulter, Inc., Brea, USA
pH-Meter Lab 850	Schott® Instruments Analytics / SI Analytics, Mainz, Deutschland
Pipetten Pipet lite LTS	Mettler-Toledo GmbH, Columbus, USA
Pipetten Research® plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe Pipetboy accu	Integra Biosciences, Biebertal, Deutschland
Plate Chameleon V Multitechnology Platereader	Hidex, Mainz, Deutschland
ProFlex™ 96-Well PCR System (Applied Biosystems™)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Rotationsmikrotom Leica RM2255	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Schüttler Belly Dancer	Stovall Life Sciences, Greensboro, USA

Sequenziergerät 3500 Dx (Applied Biosystems™)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sicherheitswerkbank H130	Berner International, Elmshorn, Deutschland
Stromquelle PowerPac 3000	Bio-Rad, München, Deutschland
Tierrohr-Lochzange Typ I	LabArt UG & Co. KG, Waldbüttelbrunn, Deutschland
Tischzentrifuge Mini Microcentrifuge 6766	Corning, Corning, USA
Ultraschall-Homogenisator SONOPLUS HD 200	Bandelin electronic, Berlin, Deutschland
Uniprotect Luftstromschrank THF3378	Ehret GmbH & Co. KG, Emmendingen, Deutschland
Virtual Slide System VS120	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Vortexer lab dancer	IKA®-Werke, Staufen, Deutschland
Vortexer Reax top	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Waage GS4100-2	KERN & Sohn, Balingen, Deutschland
Wasseraufbereitungssystem Milli-Q® Integral 10	Merck, Darmstadt, Deutschland
Wasserbad Waterbath 1000	pfm medical ag, Köln, Deutschland
Wärmethermostat mit Bad JulaboU3-7A mit Einsatz 042	Julabo, Seelbach, Deutschland
Westernblotzubehör Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad, München, Deutschland
Zentrifuge Universal 32	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems™)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.1.13 Software

Tabelle 13: Verwendete Software

Software	Hersteller
Adobe Illustrator	Adobe Systems Software Ireland Limited, San José, USA
AIDA Image Analysis Software	Raytest, Straubenhardt, Deutschland
A plasmid Editor (ApE)	M. Wayne Davis (Davis und Jorgensen 2022)
Citavi 6	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz
EnSpire Manager	PerkinElmer Inc., Waltham, USA
FileMaker Pro 14	Claris International Inc., Santa Clara, USA
Image Studio™ Aquisition Software	LI-COR Biosciences – GmbH, Bad Homburg, Deutschland
LAS X Life Science	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft PowerPoint	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Word	Microsoft Corporation, Redmond, USA
MikroWin 300 SL software	Hidex, Mainz, Deutschland
MikroWin 2000 software	Hidex, Mainz, Deutschland
Nanodrop Software	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
OlyVIA Software	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Prism 5	GraphPad Software, San Diego, USA
Sequencing Analysis Software v5.4	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sequence Detection System v2.4	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
STELLA control software	Raytest, Straubenhardt, Deutschland
3500 Dx Series Software (Sequenziergerät)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
7500/7500 Fast Real-Time PCR Software v2.0	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Stabil transfizierte Zelllinien

Es wurden transfizierte HEK293 Zellen mit Flp-In™ System sowie gewöhnliche HEK293 Zellen ohne dieses System verwendet. Die HEK293 Zelllinie wurde 1977 von Graham und Kollegen etabliert, indem embryonale Nierenzellen des Menschen mit DNA des Adenovirus Typ 5 transformiert wurden (Graham et al. 1977). Das Flp-In System ermöglicht die Generierung verschiedener isogener Zelllinien, welche sich nur in den stabil exprimierten Zielgenen unterscheiden, die alle an derselben Stelle im Genom eingefügt wurden. Die durch die Flp Rekombinase vermittelte DNA Rekombination findet an einer speziellen FRT (Flp Recombination Target) Zielsequenz statt, welche zuvor im Genom der gewünschten Zelllinie integriert wurde. Dadurch unterscheiden sich verschiedene mit der gleichen Ursprungs-Zelllinie generierten isogene Zelllinien nur durch das eingefügte Zielgen, welches ortsspezifisch im Bereich der FRT Sequenz eingefügt wurde. Für die Generierung der hier verwendeten Zelllinien wurde die kommerziell erhältliche Flp-In™-293 Zelllinie (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen™) verwendet.

Für die im Rahmen der Arbeit durchgeführten Experimente wurden sowohl mehrere bereits etablierte Zelllinien, welche ein Transportprotein bzw. einen Leervektor stabil exprimieren, als auch zwei neu etablierte, ein Transportprotein überexprimierende Zelllinien verwendet (s. Tab. 10).

2.2.1.2 Verwendete vorhandene Zelllinien

Es wurden mehrere bereits zuvor am Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie etablierte Zelllinien für die hier beschriebenen Experimente genutzt. Dabei handelte es sich zum einen um Zellen, welche einen Leervektor stabil exprimierten und als Kontrollzellen genutzt werden konnten. Außerdem wurden Zelllinien verwendet, welche die folgenden Transportproteine des Menschen stabil exprimierten: hOAT7, hOCT1 (organischer Kationentransporter 1), hOCT3 (organischer Kationentransporter 3), hOATP1B1 (Organischer Anionentransporter 1B1), hOATP1B3 (Organischer Anionentransporter 1B3), hOATP2B1 (organischer Anionentransporter 2B1), hNTCP (Natrium / Gallensäure Cotransporter). Die Zelllinien waren durch stabile Transfektion von entweder HEK293

Zellen oder von Flp-In-293 Zellen entstanden. Eine Aufzählung aller verwendeten Zelllinien und ihrer Hintergründe findet sich in Tabelle 10.

2.2.1.3 Stabile Transfektion von Flp-In-293 Zellen mit OAT2 des Menschen und der Maus

Es wurden zusätzlich zu den bereits vorhandenen stabil transfizierten Zelllinien noch zwei weitere Zelllinien generiert und etabliert. Hierfür wurden Flp-In-293 Zellen mithilfe des Transfektionsreagenz Lipofectemine 2000 stabil mit hOAT2 bzw. mOat2 transfiziert.

Flp-In-293 Zellen wurden hierfür mit Zeocin (100 µg / ml) kultiviert. 24 Stunden vor der Transfektion wurden pro Well einer 12-Well Platte 200 000 Zellen in Kulturmedium mit Zeocin ausgesät. Zwei Stunden vor der Transfektion wurde das Medium durch Kulturmedium ohne Zeocin ersetzt. Für die Transfektion wurden die Angaben des Herstellers des Transfektionsreagenzes befolgt. Es wurden pro 200 µl Ansatz 2 µg Gesamt-Plasmid DNA bestehend aus Zielgen-Plasmid-DNA im pcDNA5 / FRT Vektor sowie dem Plasmid pOG44 im Verhältnis 1:9 eingesetzt. Der Transfektionsreagenz-Ansatz bestand aus 4 µl Lipofectamine 2000 und 96 µl kaltem DMEM.

Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel mit Kulturmedium ohne antibiotische Zusätze. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit 0,05%igem Trypsin-EDTA abgeerntet und in eine 6-Well Platte umgesetzt. Circa 3 Stunden nach dem Umsetzen erfolgte ein Mediumwechsel, wobei das antibiotikafreie Kulturmedium durch Kulturmedium mit Hygromycin B (50 µg / ml) ersetzt wurde. Das Medium wurde nun alle 2 bis 3 Tage gewechselt, wobei die Hygromycin B Konzentration auf die Endkonzentration von 100 µg / µl gesteigert wurde.

Als einzelne resistente Zellklone im Well unter dem Lichtmikroskop zu erkennen waren, wurden diese gepickt und jeder Klon wurde jeweils in ein Well einer 24-Well Platte umgesetzt. Zum Picken wurden ca. 10 µl 0,05%iges Trypsin-EDTA in eine 20 µl Pipettenspitze aufgezogen, dieses Volumen direkt auf dem Klon auf- und abpipettiert und der Klon so vorsichtig von der Platte abgelöst. Die Zellklone wurden bei Konfluenz immer in ein Well der nächstgrößeren Well-Platte umgesetzt, bis die Zellen letztendlich in einer 10 cm Schale konfluent waren. Es wurden auf diese Weise pro Zelllinie ca. 10 Zellklone generiert. Diese wurden dann auf ihre Expression des Zielgens hin untersucht. Hierfür wurde eine quantitative PCR (qPCR) durchgeführt, um die Expressionsstärke des Zielgens auf RNA Ebene zu untersuchen (s. 2.2.12.2).

Außerdem wurde auch auf Protein Ebene die Expression des Zielgens mittels Immunfluoreszenzfärbungen (s. 2.2.6) und Immunblots (s. 2.2.9) untersucht. Die beiden Zellklone mit der besten Zielgenexpression (Kombination aus qPCR und Immunfluoreszenzfärbung), welche auch nach mehreren Wochen in Kultur stabil blieb, wurden für die hier beschriebenen Experimente verwendet. Diese Zellklone wurden außerdem noch funktionell getestet, indem Transportversuche mit dem prototypischen Substrat cGMP durchgeführt wurden.

2.2.1.4 Routinekultivierung der Zellen

Die Zellen aller Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ vermehrt und zweimal pro Woche bei ca. 80 %iger Konfluenz in einem Verhältnis von ca. 2:10 (Zellsuspension : DMEM) passagiert. Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter der Sicherheitswerkbank H130.

Zum Auftauen von Zellen aus flüssigem Stickstoff, in dem die Zellen gelagert wurden, wurde die Zellsuspension nach vollständigem Auftauen aus den Cryogefäßen in eine Flasche mit Kulturmedium ohne antibiotischen Selektionszusatz gegeben und anschließend im Brutschrank inkubiert. Die Zugabe von antibiotischen Zusätzen erfolgte erst, wenn die Zellen in der Flasche angewachsen waren, also entweder nach einigen Stunden oder am nächsten Tag. Die erste Passage erfolgte, wenn die Zellen zu ca. 80 % konfluent waren.

Für die Passage wurden die Zellen zunächst mittels eines Lichtmikroskops auf Viabilität und Konfluenz überprüft. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen daraufhin zunächst mit 5 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden 2,5 ml 0,05 %iges Trypsin-EDTA zugegeben, auf den Zellen verteilt und wieder abgesaugt. Die Zellen wurden anschließend für ca. 3 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Danach wurden sie durch Klopfen an den Flaschenrand sowie durch Zugabe und anschließendes mehrmaliges Herauf- und Herunterpipettieren von 10 ml Kulturmedium gelöst und resuspendiert. Von der so entstandenen Zellsuspension wurden dann ca. 2 ml entnommen und in eine bereits vorbereitete Zellkulturflasche mit ca. 8 ml Kulturmedium gegeben. Durch leichtes Schwenken wurden die Zellen über den Boden der gesamten Zellkulturflasche verteilt.

In der Regel wurden zwei bis drei Aliquots frisch aufgetauter Zellen während der ersten Passage entnommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung gelagert. Hierfür wurde der Rest der bei der Passage entstandenen Zellsuspension für 5 min bei 1400 rpm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 0,5 ml Kulturmedium ohne antibiotischen Selektionszusatz pro gewünschtem Aliquot aufgenommen. Von dieser Zellsuspension wurden jeweils 0,5 ml in vorbereitete Cryogefäße gegeben, in welche bereits 0,5 ml Einfriermedium vorgelegt worden waren. Die Cryogefäße wurden dann in einer mit 100 % Isopropanol gefüllten Einfrierbox bei -80 °C für 24 h eingefroren. Daraufhin wurden die Cryogefäße in die Gasphase eines Flüssigstickstofftanks überführt und dort bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.1.5 Primäre Leberzelltypen des Menschen

Zur Analyse der Expression verschiedener Transportproteine sowie Komponenten des cGMP Signalweges wurden primäre sinusoidale Endothelzellen sowie Ito-Zellen (*Human Hepatic Stellate Cells*) des Menschen von ScienCell genutzt. Die Zellen wurden nach Herstellerangaben ausgesät. Je nach Angaben des Herstellers wurde nach 1 - 3 Tagen wie in Punkt 2.2.11.1 beschrieben ein Zellpellet für die RNA-Isolation gewonnen.

2.2.1.6 Primäre Hepatozyten aus Mäusen

Zur Isolierung von primären Hepatozyten aus Mäusen der *hOAT7-Knockin* sowie der *mOat2-Knockout* Mauslinie (s. 2.2.2.1) wurde das Liver Perfusion Kit für Mäuse und Ratten von Miltenyi genutzt. Die Reagenzien, Lösungen sowie der Gentle Max Octo Dissociator wurden zunächst nach Kitanleitung vorbereitet. Der Liver Perfuser wurde daraufhin auf den Gentle Max Octo Dissociator gesetzt und mit warmem Pre-Digestion Puffer nach den Vorgaben des Programmes vorgespült, um Luftblasen aus dem System zu spülen. Daraufhin wurde die Maus, deren Hepatozyten isoliert werden sollten, durch zervikale Dislokation unter Isofluran-Narkose getötet und sofort der linke laterale Leberlappen herauspräpariert (s. 2.2.2.5). Der Leberlappen wurde kurz in PBS gespült und sofort in den Liver Perfuser eingesetzt. Es folgten die verschiedenen Perfusions- und Waschschriffe im Gentle Max Octo Dissociator, welche nach Kitanleitung durchgeführt wurden.

Nach Ende der Perfusion wurde der Liver Perfuser vom Gentle Max Octo Dissociator genommen und der darin enthaltene Enzyme Digestion Mix mitsamt des perfundierten Leberlappens in ein C Tube überführt. Dieses wurde auf den Gentle Max Octo Dissociator gesetzt und das Programm zur Freisetzung der Hepatozyten gestartet. Die so entstandene Zellsuspension wurde daraufhin durch einen 100 µm Filter auf Eis in eine 15 ml Röhre gefiltert und das C Tube daraufhin mit DMEM (high Glucose) mit 5 % FCS gewaschen, welches auch auf den Filter gegeben wurde. Die gefilterte Suspension wurde bei 30 g und 4 °C für 5 min abzentrifugiert und das Pellet, welches die Hepatozyten enthielt, sehr vorsichtig mit 10 ml Hepatozyten Aussaatmedium resuspendiert.

Die Zellen wurden mithilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt und anschließend auf mit Rattenkollagen I beschichtete Platten in Hepatozyten Aussaatmedium ausgesät. Es wurden 24-Well Platten für Transportversuche, 6-Well Platten zum Generieren von Zellpellets für Protein- und RNA-Gewinnung und 4-Well Zellkulturkammer Objektträger für Immunfluoreszenzfärbungen verwendet. Die Platten waren am Tag zuvor mit Rattenkollagen I beschichtet worden, indem in jedes Well mindestens 5 µg / cm² Kollagen gegeben wurde. Die Platten wurden dann für 2 h bei 37 °C inkubiert, das Kollagen anschließend abgenommen und die Platten über Nacht unter der Sterilbank getrocknet. Am nächsten Morgen wurden die Platten einmal mit PBS gewaschen und bis zum Aussäen der Zellen bei Raumtemperatur gelagert. Die Zellzahl sowie die Menge an Medium, die für die verschiedenen Platten verwendet wurde, ist in Tabelle 14 angegeben.

Circa 3 h nachdem die Zellen ausgesät worden waren, wurde das Medium in den Wells durch Hepatozyten Kulturmedium ersetzt. Alle Versuche mit den Hepatozyten wurden 24 h nach dem Aussäen der Zellen durchgeführt.

Tabelle 14: Zellzahl und Mediummenge für unterschiedliche Wellplattenformate bei primären Hepatozyten aus Mäusen

Plattengröße	Zellzahl / Well	Mediummenge / Well
6-Well Platte	4 x 10 ⁵ Zellen	2 ml
24-Well Platte	1 x 10 ⁵ Zellen	0,8 ml
4-Well Zellkulturkammer	1 x 10 ⁵ Zellen	0,8 ml

2.2.2 Mäuse

2.2.2.1 Generierung zweier Mauslinien

i Generierung der hOAT7 *Knockin* Mauslinie

Für die Charakterisierung des Transportproteins hOAT7 sollten humanisierte Mäuse generiert werden, welche das Transportprotein hepatozytenspezifisch exprimierten. Hierfür wurde das Cre-Lox System genutzt, welches das gezielte Einfügen und Entfernen von Sequenzen in die oder aus der DNA eines Zielorganismus ermöglicht. Die Cre-Rekombinase interagiert hierbei mit loxP Stellen, welche die Zielsequenz flankieren. Diese Interaktion kann je nach Orientierung der loxP Stellen das Ausschneiden, die Inversion oder die Translokation der von den loxP Stellen flankierten (*flanked by loxP sites*, geflochten) Sequenz zur Folge haben. Die Funktionsweise des Cre-Lox-Systems ist in Abbildung 4 dargestellt.

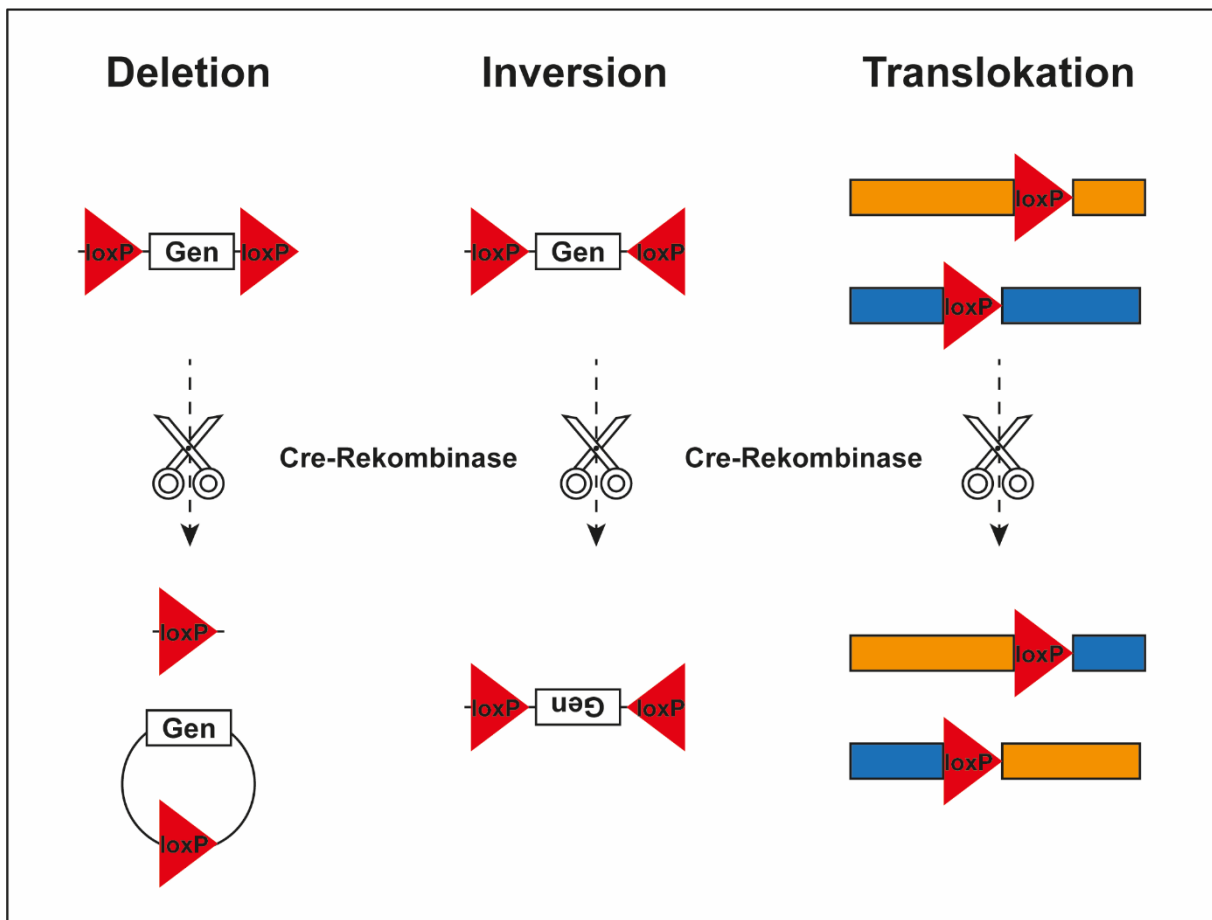


Abbildung 4: Funktionsweise des Cre-Lox-Systems

Abhängig von der Orientierung der loxP-Stellen sorgt die Cre-Rekombinase für das Ausschneiden, die Inversion oder die Translokation der geflochten Sequenz.

Zur Generierung der hepatozytenspezifischen hOAT7-*Knockin* Mäuse wurde zunächst von der Firma Taconic mittels RMCE-Kassettenaustauschverfahren eine Mauslinie im C57BL/6N Hintergrund generiert, deren zugehörige Mäuse die *hSLC22A9* Gensequenz im offenen Leserahmen mit einem vorgeschalteten geflochten Stop-Codon im ROSA26 Genlokus der Maus exprimieren. Gene, welche sich in diesem Lokus befinden, zeigen in allen Geweben und Entwicklungsstadien der Maus eine gleichbleibend starke Expression, weswegen er sich gut zum Einbringen neuer Gene ins Mausgenom eignet (Soriano 1999). Durch das vorgeschaltete Stop-Codon wurde die *hSLC22A9* Gensequenz in diesen Mäusen nicht abgelesen und hOAT7 nicht exprimiert.

Diese Mäuse wurden dann in der Tierhaltung der Abteilung für Pharmakologie, Experimentelle Therapie und Toxikologie der Eberhard Karls Universität Tübingen mit Albumin-Cre Mäusen im C57BL/6N Hintergrund verpaart. Diese Mauslinie exprimiert die Cre-Rekombinase unter der Aktivität des Albumin-Promotors, also nur in den Hepatozyten. Durch zwei aufeinanderfolgende Verpaarungen war es so möglich, Nachkommen zu generieren, welche sowohl die *hSLC22A9* Sequenz mit vorgeschaltetem geflochtenem Stop-Codon in allen Körperzellen als auch die Cre-Rekombinase in den Hepatozyten exprimierten. In diesen Mäusen kam es dann in den Hepatozyten zum Ausschneiden des Stop-Codons durch die Cre-Rekombinase und damit zur hepatozytenspezifischen Expression von hOAT7. Eine schematische Darstellung der Generierung der hOAT7-*Knockin* Mäuse ist in Abbildung 5 gezeigt.

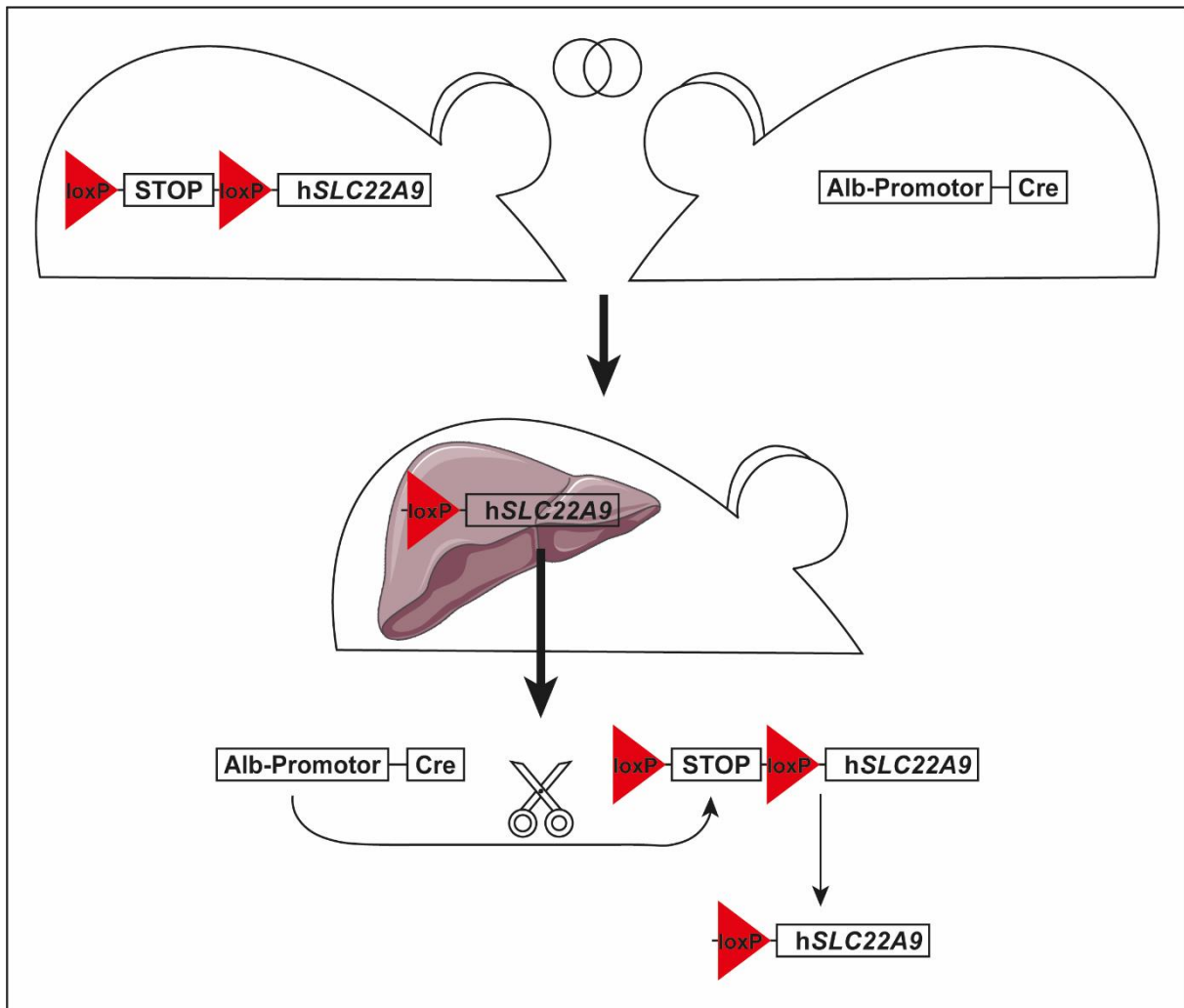


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Generierung der hOAT7-Knockin Mauslinie

Transgene Mäuse, welche ein gefloxtes Stop-Codon gefolgt von der *SLC22A9* Gensequenz des Menschen im ROSA26-Genlokal exprimieren, wurden mit Albumin-Cre Mäusen verpaart, welche die Cre-Rekombinase nach dem Albumin-Promotor exprimieren. In den so entstandenen Nachkommen kam es in den Hepatozyten, in welchen die Cre-Rekombinase exprimiert wird, zum Ausschneiden des Stop-Codons und dadurch zur Expression von hOAT7.

Das Verpaarungsschema zur Generierung der Mauslinie ist in Abbildung 6 gezeigt. Zunächst wurden Mäuse, welche die *hSLC22A9* Sequenz homozygot exprimierten, mit homozygoten Albumin-Cre Mäusen verpaart. Bei dieser Verpaarung entstanden ausschließlich Nachkommen, welche beide Gene heterozygot exprimierten und demnach bereits einen heterozygoten *Knockin* von hOAT7 in den Hepatozyten aufweisen sollten. Diese Mäuse wurden daraufhin in einer zweiten Verpaarung erneut mit Mäusen verpaart, welche die *hSLC22A9* Sequenz homozygot exprimierten. Bei

dieser Verpaarung entstanden die Versuchstiere. Das waren zum einen Kontrolltiere, welche zwar die *hSLC22A9* Sequenz homozygot, aber keine Cre-Rekombinase exprimierten. In diesen Tieren fand also kein Ausschneiden der Stop-Sequenz und damit keine Expression von hOAT7 statt. Zum anderen entstanden Tiere, welche die *hSLC22A9* Sequenz heterozygot oder homozygot, sowie die Cre-Rekombinase heterozygot exprimierten. Diese Tiere wurden als heterozygote bzw. homozygote hOAT7-*Knockin* Tiere bezeichnet und für die Versuche genutzt. Es entstanden außerdem Tiere, welche die *hSLC22A9* Sequenz heterozygot und keine Cre-Rekombinase exprimierten, und für die Versuche nicht genutzt werden konnten.

		Cre		hOAT7	
Verpaarung 1:		tg / tg	wt / wt	x	
		wt / wt	fl / fl		
		wt fl	wt fl	wt fl	wt fl
tg wt		tg / wt fl / wt	tg / wt fl / wt	tg / wt fl / wt	tg / wt fl / wt
tg wt		tg / wt fl / wt	tg / wt fl / wt	tg / wt fl / wt	tg / wt fl / wt
tg wt		tg / wt fl / wt	tg / wt fl / wt	tg / wt fl / wt	tg / wt fl / wt
tg wt		tg / wt fl / wt	tg / wt fl / wt	tg / wt fl / wt	tg / wt fl / wt
100 %:		tg / wt	fl / wt		

		Cre		hOAT7	
Verpaarung 2:		tg / wt	fl / wt	x	
		wt / wt	fl / fl		
		wt fl	wt fl	wt fl	wt fl
tg fl		tg / wt fl / fl	tg / wt fl / fl	tg / wt fl / fl	tg / wt fl / fl
tg wt		tg / wt fl / wt	tg / wt fl / wt	tg / wt fl / wt	tg / wt fl / wt
wt fl		wt / wt fl / fl	wt / wt fl / fl	wt / wt fl / fl	wt / wt fl / fl
wt wt		wt / wt fl / wt	wt / wt fl / wt	wt / wt fl / wt	wt / wt fl / wt
25 %:		tg / wt	fl / fl		
25 %:		tg / wt	fl / wt		
25 %:		wt / wt	fl / fl		
25 %:		wt / wt	fl / wt		

Abbildung 6: Verpaarungsschema für die Generierung der hOAT7-*Knockin* Mauslinie

Für die Generierung der hOAT7-*Knockin* Mauslinie wurden insgesamt 2 Verpaarungen benötigt. Der Albumin-Cre Genotyp (Cre) ist in blau, der hOAT7 Genotyp (hOAT7) in magenta dargestellt. Im ersten Schritt wurden Mäuse, welche die *hSLC22A9* Sequenz homozygot exprimierten, mit homozygoten Albumin-Cre Mäusen verpaart. Diese Mäuse wurden daraufhin im zweiten Schritt erneut mit Mäusen verpaart, welche die *hSLC22A9* Sequenz homozygot exprimierten. Bei dieser Verpaarung entstanden die Versuchstiere in Form von Kontrolltieren, welche zwar die *hSLC22A9* Sequenz homozygot, aber keine Cre-Rekombinase exprimierten, sowie von heterozygoten und homozygoten *Knockin* Tieren, welche die *hSLC22A9* Sequenz heterozygot oder homozygot sowie die Cre-Rekombinase heterozygot exprimierten. Tg = transgen, wt = wildtypisches Allel, fl = gefloxtes Allel.

ii Generierung der mOat2 *Knockout* Mauslinie

Für die Charakterisierung des Transportproteins OAT2 sollte eine Mauslinie generiert werden, welche das Transportprotein mOat2 der Maus nicht mehr exprimiert, also einen globalen *Knockout* für dieses Transportprotein aufwies. Hierfür wurde erneut das Cre-Lox System genutzt (s. Abb. 4).

Zunächst wurde hierfür von der Firma Taconic eine Mauslinie generiert, welche loxP Stellen aufweist, die den Genbereich von Exon 2 bis 6 der *mSlc22a7* Gensequenz flankieren. Hierfür wurde ein Vektor generiert, welcher den geflochtenen Genbereich der *mSLC22a7* Gensequenz, flankiert von Selektionsmarkern, enthielt. Dieser wurde in embryonale Stammzellen der C57BL/6N Mauslinie transfiziert. Nach erfolgreicher homologer Rekombination wurden die Selektionsmarker mittels der Flp-Rekombinase entfernt. Die so entstandene Mauslinie exprimiert weiterhin mOat2, da die geflochte Gensequenz noch nicht durch die Cre-Rekombinase ausgeschnitten worden war. Diese Mäuse wurden dann in der Tierhaltung der Abteilung für Pharmakologie, Experimentelle Therapie und Toxikologie der Eberhard Karls Universität Tübingen mit β -Actin (Actb)-Cre Mäusen im C57BL/6N Hintergrund verpaart. Diese Mauslinie exprimiert die Cre-Rekombinase unter der Aktivität des Actb-Promotors, also global in allen Körperzellen. Durch zwei aufeinanderfolgende Verpaarungen war es so möglich, Nachkommen zu generieren, welche sowohl den geflochtenen Genbereich von Exon 2 bis 6 der *mSlc22a7* Gensequenz als auch die Cre-Rekombinase global exprimierten. In diesen Mäusen kam es dann in allen Zellen zum Ausschneiden des Genbereichs von Exon 2 bis Exon 6 der *mSlc22a7* Gensequenz durch die Cre-Rekombinase. Dieses Ausschneiden verursacht die Deletion der Transmembran-Domänen 2 bis 6 des mOat2 Transportproteins, sowie eine Rasterschub-Mutation von Exon 1 zu allen weiteren Exonen, wodurch es zu einem frühzeitigen Stop-Codon in Exon 8 kommt. Es kann also kein funktionsfähiges Transportprotein mehr entstehen, sodass diese Mäuse einen globalen Funktionsverlust des mOat2 Proteins aufweisen.

Eine schematische Darstellung der Generierung der mOat2-*Knockout* Mäuse ist in Abbildung 7 gezeigt.

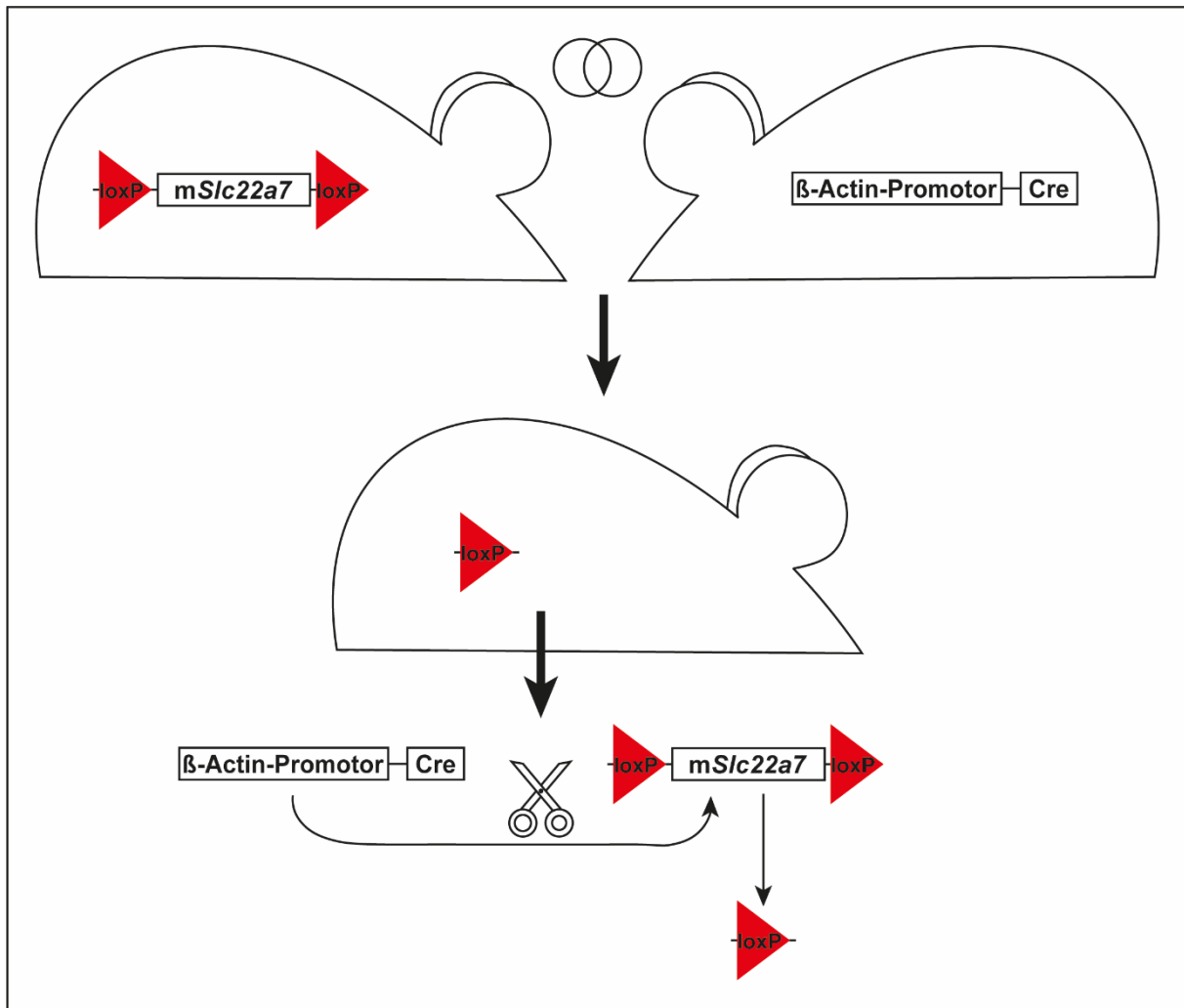


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Generierung der mOat2-Knockout Mauslinie

Transgene Mäuse, in welchen loxP-Stellen vor und nach dem Genbereich von Exon 2 bis 6 der *mSlc22a7* Gensequenz eingefügt worden waren, wurden mit Actb-Cre Mäusen verpaart, welche die Cre-Rekombinase nach dem β -Actin-Promotor exprimieren. In den so entstandenen Nachkommen kommt es in allen Zellen zum Ausschneiden des Genbereichs von Exon 2 bis 6 der *mSlc22a7* Gensequenz und dadurch zu einem globalen *Knockout* von mOat2.

Das Verpaarungsschema zur Generierung der Mauslinie ist in Abbildung 8 gezeigt. Zunächst wurden Mäuse, welche die gefloxtete *mSlc22a7* Gensequenz homozygot exprimierten, mit homozygoten Actb-Cre Mäusen verpaart. Bei dieser Verpaarung entstanden ausschließlich Nachkommen, welche beide Gene heterozygot exprimierten und demnach bereits einen heterozygoten *Knockout* von mOat2 aufwiesen. Diese Mäuse wurden daraufhin in einer zweiten Verpaarung miteinander verpaart, wodurch bereits sowohl homozygote als auch heterozygote mOat2-Knockout

Mäuse entstanden, welche aber größtenteils noch die Cre-Rekombinase exprimierten. Da es sich um einen globalen Knockout handelte, welcher an die Nachkommen der entsprechenden Mäuse weitergegeben wurde, wurde die Cre-Rekombinase nicht mehr benötigt, sobald das *Knockout* Allel einmal erzeugt war. Daher wurde die Cre-Rekombinase durch Verpaarung von heterozygoten *Knockout* Mäusen, welche keine Cre-Rekombinase exprimierten, in einer dritten Verpaarung herausgezüchtet. Bei dieser Verpaarung entstanden dann schließlich die Versuchstiere. Dies waren Kontrolltiere, welche die wildtypische *mSlc22a7* Gensequenz exprimierten, heterozygote *Knockout* Mäuse, welche ein wildtypisches *mSlc22a7* und ein *Knockout* Allel exprimierten, und homozygote *Knockout* Mäuse, welche zwei *Knockout* Allele exprimierten.

		Cre		mOat2	
Verpaarung 1:		tg / tg	wt / wt	wt / wt	x
		wt / wt	fl / fl		
		wt fl	wt fl	wt fl	wt fl
tg wt	tg / wt	tg / wt	tg / wt	tg / wt	tg / wt
	ko / wt	ko / wt	ko / wt	ko / wt	ko / wt
tg wt	tg / wt	tg / wt	tg / wt	tg / wt	tg / wt
	ko / wt	ko / wt	ko / wt	ko / wt	ko / wt
tg wt	tg / wt	tg / wt	tg / wt	tg / wt	tg / wt
	ko / wt	ko / wt	ko / wt	ko / wt	ko / wt
tg wt	tg / wt	tg / wt	tg / wt	tg / wt	tg / wt
	ko / wt	ko / wt	ko / wt	ko / wt	ko / wt
100 %: tg / wt ko / wt					
		Cre		mOat2	
Verpaarung 3:		wt / wt	ko / wt	wt / wt	x
		wt / wt	ko / wt		
		wt ko	wt wt	wt ko	wt wt
wt ko	wt / wt	wt / wt	wt / wt	wt / wt	wt / wt
	ko / ko	ko / wt	ko / ko	ko / wt	ko / wt
wt wt	wt / wt	wt / wt	wt / wt	wt / wt	wt / wt
	wt / ko	wt / wt	wt / ko	wt / wt	wt / wt
wt ko	wt / wt	wt / wt	wt / wt	wt / wt	wt / wt
	ko / ko	ko / wt	ko / ko	ko / wt	ko / wt
wt wt	wt / wt	wt / wt	wt / wt	wt / wt	wt / wt
	wt / ko	wt / wt	wt / ko	wt / wt	wt / wt
50 %: wt / wt ko / wt 25 %: wt / wt ko / ko 25 %: wt / wt wt / wt					

		Cre		mOat2	
Verpaarung 2:		tg / wt	ko / wt	wt / wt	x
		tg / wt	ko / wt		
		tg ko	tg wt	wt ko	wt wt
tg ko	tg / tg	tg / tg	tg / wt	tg / wt	tg / wt
	ko / ko	ko / wt	ko / ko	ko / wt	ko / wt
tg wt	tg / tg	tg / tg	tg / wt	tg / wt	tg / wt
	wt / ko	wt / wt	wt / ko	wt / wt	wt / wt
wt ko	wt / tg	wt / tg	wt / wt	wt / wt	wt / wt
	ko / ko	ko / wt	ko / ko	ko / wt	ko / wt
wt wt	wt / tg	wt / tg	wt / wt	wt / wt	wt / wt
	wt / ko	wt / wt	wt / ko	wt / wt	wt / wt
25 %: tg / wt ko / wt 12,5 %: tg / tg ko / wt 12,5 %: tg / wt ko / ko 12,5 %: tg / wt wt / wt 12,5 %: wt / wt ko / wt ← 6,3 %: tg / tg ko / ko 6,3 %: tg / tg wt / wt 6,3 %: wt / wt ko / ko 6,3 %: wt / wt wt / wt					

Abbildung 8: Verpaarungsschema für die Generierung der mOat2-Knockout Mauslinie

Für die Generierung der mOat2-Knockout Mauslinie wurden insgesamt 3 Verpaarungen benötigt. Der Actb-Cre Genotyp (Cre) ist in blau, der mOat2 Genotyp (mOat2) in magenta dargestellt. Zunächst wurden Mäuse, welche die gefloxtete *mSlc22a7* Gensequenz homozygot exprimierten, mit homozygoten Actb-Cre Mäusen verpaart. Die Nachkommen dieser Verpaarung wurden im zweiten Schritt miteinander verpaart. Die Cre-Rekombinase wurde im dritten Schritt durch Verpaarung von heterozygoten mOat2-Knockout Mäusen, welche keine Cre-Rekombinase exprimierten (gekennzeichnet mit schwarzer Pfeilspitze), herausgezüchtet. Bei dieser Verpaarung entstanden die Versuchstiere in Form von Kontrolltieren, welche die wildtypische *mSlc22a7* Gensequenz exprimierten, sowie heterozygoten und homozygoten mOat2-Knockout Mäusen. Tg = transgen, wt = wildtypisches Allel, fl = gefloxtes Allel.

2.2.2.2 Haltung der Mäuse

Alle Handlungen an Mäusen von Haltung und Zucht bis zu den durchgeführten Experimenten wurden in Übereinstimmung mit den 3R-Prinzipien (Tierversuche reduzieren (reduce), ersetzen (replace) und verbessern (refine)) durchgeführt und waren vom Regierungspräsidium Tübingen bewilligt.

Die Mäuse wurden in der Tierhaltung der Abteilung für Pharmakologie, Experimentelle Therapie und Toxikologie der Eberhard Karls Universität Tübingen in spezifisch pathogenfreier Umgebung gehalten. Dort waren die Tiere einem zwölfstündigen Licht-Dunkel Zyklus ausgesetzt und erhielten Futter und Wasser *ad libitum*. Als Futter wurde in Zuchtkäfigen das Futter Altromin 1318 (Zuchtdiät für Ratten und Mäuse als Hybridpellet) und in Haltungskäfigen das Futter Altromin 1324 (Haltungsdiet für Ratten und Mäuse als 10 mm Pellets) angeboten und die Tiere wurden auf Einstreu gehalten. Weibchen wurden stets in Gruppen von maximal 5 Tieren mit Unterschlupf und Nistmaterial gehalten. Männliche Geschwistertiere wurden ebenfalls in Gruppen von maximal 5 Tieren gehalten, wobei auf einen Unterschlupf verzichtet wurde, um Rangkämpfe zu vermeiden. Kam es trotzdem zu Rangkämpfen oder waren keine männlichen Geschwistertiere verfügbar, wurden männliche Tiere einzeln mit Unterschlupf gehalten.

Zur Verpaarung wurden entweder ein oder zwei Weibchen mit einem Männchen zusammengesetzt und je nach Bedarf an Nachkommen das Männchen nach Feststellen der Trächtigkeit des Weibchens im Zuchtkäfig belassen oder einzeln gesetzt. Jungtiere wurden mit ca. drei Wochen abgesetzt und verblieben noch ca. eine Woche alle zusammen in einem Käfig, bevor sie nach Geschlechtern getrennt wurden und die Ohrmarkierung erfolgte. Waren Jungtiere besonders klein oder schwach, wurde ihnen Milchpulver (im Zuchtkäfig) oder Feuchtfutter (im Absatzkäfig) angeboten, um die Futteraufnahme zu steigern.

Die Identifizierung der Mäuse im jeweiligen Käfig erfolgte über Ohrlochungen. Diese erfolgten ca. eine Woche nach dem Absetzen, bevor die Tiere nach Geschlechtern getrennt in die finalen Haltungskäfige überführt wurden. Ein Tier erhielt maximal zwei Ohrlöcher. Das durch die Lochung entstandene Gewebe wurde aufgehoben und zur Genotypisierung der Mäuse verwendet.

2.2.2.3 Lyse der Ohrbiopsien, Schwanzspitzen sowie Gewebeproben der Mäuse

Die Ohrbiopsien sowie die bei der Präparation von Mäusen zur Nachgenotypisierung abgeschnittenen Schwanzspitzen wurden in Gewebelysepuffer, zu dem 500 µg / ml Proteinase K frisch am Tag der Lyse zugegeben wurden, bei 55°C unter Schütteln im Thermomixer ca. 5 h lysiert. Mit kleinen Stückchen (max. 50 mg) der einzelnen, während der Präparation gewonnen Mausgewebe wurde ebenso verfahren. Abschließend wurde die Proteinase K durch Erhitzen der Proben auf 94 °C und 15-minütige Inkubation inaktiviert und die Proben wurden für 5 min bei 2500 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde im Verhältnis 1:50 (Probe zu Wasser) in nukleasefreiem Wasser verdünnt und diese Verdünnung für die Genotypisierung verwendet.

2.2.2.4 Genotypisierung der Mäuse

Die Genotypisierungs-PCR wurde in einer 96-Well Platte mit einem Volumen von 25 µl pro Well durchgeführt. Als fertiger Master Mix wurde HotStarTaq Master Mix verwendet, zu dem lediglich pro PCR-Reaktion noch 0,2 mM MgCl₂ zugegeben wurden. Es wurden jeweils 1 µM der für die Genotypisierung benötigten Primer und 1 µl der 1:50 Verdünnung des Lysats pro Well eingesetzt. Die Platte wurde in einem PCR-Gerät nach dem Protokoll in Tabelle 15 inkubiert.

Die PCR-Produkte wurden anschließend nach Zugabe von 6x BPB im Verhältnis 1:6 (6x BPB : PCR-Produkt) auf ein 2 %iges Agarose-Gel, zu welchem wenige Tropfen 0,025 %ige Ethidiumbromidlösung zugegeben worden waren, aufgetragen und der Gellauf in TAE-Puffer (1x) wurde gestartet. Als Größenmarker wurde der 100 bp Marker verwendet. Nach Beendigung des Gellaufs wurde die Banden im Gel in der E-Box durch UV-Bestrahlung sichtbar gemacht und dokumentiert. Anhand der verschiedenen Banden wurde der Genotyp der Mäuse bestimmt.

Tabelle 15: Standard-Protokoll für die Routine- sowie Gewebegenotypisierung von hOAT7-Knockin und mOat2-Knockout Mäusen

Schritt Nummer	Temperatur [°C]	Zeit [Min]
1	95	15
2	94	0,5
3	60	0,5
4	72	1
Wiederholung der Schritte 2 – 4 für 35 Zyklen		
5	72	10

Für die Routine- bzw. Nachgenotypisierung von hOAT7-Knockin Mäusen mittels Ohr- bzw. Schwanzspitzenbiopsien wurden zwei verschiedene PCR Reaktionen angesetzt. Zum einen wurde der Albumin-Cre Genotyp (Wildtyp oder Albumin-Cre) bestimmt, zum anderen der hOAT7 Genotyp (Wildtyp oder konditioneller *Knockin*).

Die benötigten Primer für die beiden PCR-Reaktionen finden sich in Tabelle 16.

Zum Nachweis des tatsächlichen *Knockins* in der Leber von hOAT7-Knockin Mäusen wurden Gewebeproben genotypisiert und hierfür zwei verschiedene PCR Reaktionen angesetzt. Zum einen wurde bestimmt, ob ein konditioneller oder ein konstitutiver, also ein tatsächlicher, *Knockin* vorlag. Zum anderen wurde bestimmt, ob beide Allele oder nur eines einen konstitutiven / konditionellen *Knockin* vorwies.

Die benötigten Primer für die beiden PCR-Reaktionen finden sich in Tabelle 16.

Tabelle 16: Primer für Routine- und Gewebegenotypisierung von hOAT7-Knockin Mäusen

Primername	Genotypisierung	Sequenz
alb-cre_20239	Routine-Genotypisierung: Alb-Cre	TGCAAACATCACATGCACAC
alb-cre_20240	Routine-Genotypisierung: Alb-Cre	TTGGCCCCTTACCATAACTG
alb-cre_olMR5374	Routine-Genotypisierung: Alb-Cre	GAAGCAGAAGCTTAGGAAGATGG
1114_1	Routine-Genotypisierung: OAT7	CTCTTCCCTCGTGATCTGCAACTCC
1114_2	Routine-Genotypisierung: OAT7	CATGTCTTTAATCTACCTCGATGG
2584_5 caggs4	Routine-Genotypisierung: OAT7	TGGCAGGCTTGAGATCTGG
3579_152 hGH pA 3'1	Routine-Genotypisierung: OAT7	CCCAAGGCACACAAAAAACC

1114_1	Gewebe genotypisierung I	CTCTTCCCTCGTGATCTGCAACTCC
1114_2	Gewebe genotypisierung I	CATGTCTTTAATCTACCTCGATGG
3224_35 hGH pA 5`1	Gewebe genotypisierung I	TTGGGTCCACTCAGTAGATGC
2584_5 caggs4	Gewebe genotypisierung II	TGGCAGGCTTGAGATCTGG
3579_152 hGH pA 3`1	Gewebe genotypisierung II	CCCAAGGCACACAAAAAACC
3224_35 hGH pA 5`1	Gewebe genotypisierung II	TTGGGTCCACTCAGTAGATGC
25324_1	Gewebe genotypisierung II	AGGATGTGGACCCAGCAG
1260_1	Gewebe genotypisierung II	GAGACTCTGGCTACTCATCC
1260_2	Gewebe genotypisierung II	CCTTCAGCAAGAGCTGGGGAC

Für die Routine- und Nachgenotypisierung von *mOat2-Knockout* Mäusen mittels Ohr- bzw. Schwanzspitzenbiopsien wurden zwei verschiedene PCR Reaktionen angesetzt. Zum einen wurde der *Actb-Cre* Genotyp (Wildtyp oder *Actb-Cre*) bestimmt, zum anderen der *mOat2* Genotyp (Wildtyp, konditioneller oder konstitutiver *Knockout*). Die benötigten Primer für die beiden PCR-Reaktionen finden sich in Tabelle 17.

Zum Nachweis des konstitutiven *Knockouts* in den verschiedenen Geweben von *mOat2-Knockout* Mäusen wurden Gewebeproben genotypisiert und hierfür dieselben zwei verschiedenen PCR Reaktionen wie zur Routine-Genotypisierung der *mOat2-Knockout* Mäuse angesetzt.

Tabelle 17: Primer für Routine- und Gewebegenotypisierung von *mOat2-Knockout* Mäusen

Primernamen	Genotypisierung	Sequenz
ActB-Cre_41457	Genotypisierung: <i>Actb-Cre</i>	TGCAATCCCTTGACACAGA
ActB-Cre_41458	Genotypisierung: <i>Actb-Cre</i>	ACCAGTTTCCAGTCCTTCTGG
ActB-Cre_41833	Genotypisierung: <i>Actb-Cre</i>	GTCCTTACCCAGAGTGCAGGT
25462_23	Genotypisierung: <i>mOat2</i>	GGCAGCAGAGACATGTTGAC
25462_24	Genotypisierung: <i>mOat2</i>	GTACCAGTGGCCAAAGTGC
25461_19	Genotypisierung: <i>mOat2</i>	AAGATAGAGAACTGTGGAAGCC
25461_20	Genotypisierung: <i>mOat2</i>	CCGTTTCAGAAGATTCCCC

2.2.2.5 Präparation der Mäuse

Die Mäusepräparationen wurden im Labor der Abteilung für Pharmakologie, Experimentelle Therapie und Toxikologie der Eberhard Karls Universität Tübingen durchgeführt.

Am Tag der Präparation wurde die Maus zunächst durch intraperitoneale Injektion von ca. 80 mg / kg Körpergewicht Pentobarbital betäubt. Sobald die Maus tief betäubt war, wurde sie gewogen und sofort über einen Nasenkonus durch Inhalationsnarkose mit Isofluran weiter betäubt. Durch Prüfung des Zwischenzehenreflexes wurde bestätigt, dass das Tier empfindungsunfähig war. Anschließend wurde der Maus die Schwanzspitze abgeschnitten und diese für die Nachgenotypisierung aufbewahrt. Die Haut sowie das Bauchfell der Maus wurde mittig aufgeschnitten und zu den Seiten aufgeklappt. Der Brustkorb wurde eröffnet und die Maus durch einen Schnitt in die Herzspitze entblutet. Das Blut wurde sofort mit einer 1 ml Spritze, in die 100 µl 3,2 % Natriumcitrat-Lösung vorgelegt worden war, aufgefangen und in ein Röhrchen zur Plasmagewinnung (Microtainer Röhrchen) gegeben. Dieses wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann bei 4 °C und 10 000 g für 5 min zentrifugiert. Das Plasma, welches sich im Röhrchen oberhalb des Polymergels sammelte, wurde in ein Cryogefäß überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -80 °C gelagert. Das Herz der Maus wurde herausgeschnitten und die Isofluran-Betäubung gestoppt. Nach und nach wurden nun die folgenden Organe entfernt, kurz in PBS gewaschen, im Falle von Magen und Darmabschnitten mit PBS durchgespült und in flüssigem Stickstoff schockgefrostet: Herz, Milz, Nieren, Oberschenkelmuskel, Hoden / Ovar, Ösophagus, Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum und Gehirn. Die Nieren wurden im Falle von *mOat2-Knockout* Mäusen vor dem Einfrieren zusammen gewogen. Die Leber wurde ebenfalls entnommen, gewogen und anschließend in die einzelnen Leberlappen aufgeteilt: Lobus Dexter (rechter Leberlappen), Lobus Sinister (linker Leberlappen), Lobus Medialis, Lobus Quadratus, Lobus Caudatus. Der linke Leberlappen wurde wiederum in zwei Hälften geschnitten und die untere Hälfte sowie die anderen Leberlappen in flüssigem Stickstoff schockgefrostet, während die obere Hälfte in 4 % Formaldehyd gegeben, bei 4 °C fixiert und bis zur weiteren Verwendung gelagert wurde. Nach der Präparation wurden die schockgefrosteten Organe bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.3 Transportversuche

2.2.3.1 Aussäen der Zellen für Transportversuche

Jeweils 2 Tage vor den Transportversuchen wurden pro Well einer Poly-Amin-beschichteten 24-Well Platte (PureCoat Amine) 400 000 Zellen der Transporter-exprimierenden Zelllinien in Kulturmedium ohne antibiotische Zusätze ausgesät. Zum Zeitpunkt der Transportversuche waren die Zellen konfluent.

2.2.3.2 Influx Transportversuch mit radioaktiv markierten Substraten

Zur Messung der Aufnahme von Substanzen in die Transporter-exprimierenden Zelllinien wurden Influx Transportversuche mit radioaktiv markiertem Substrat durchgeführt.

Für solche Experimente, wie beispielsweise zeit- und konzentrationsabhängige Transporte sowie Inhibitionsversuche, wurde die zu transportierende Substanz im Transportpuffer zur gewünschten Konzentration verdünnt und je nach Experiment wurden noch weitere Substanzen, wie beispielsweise Inhibitoren des jeweiligen Transportproteins, zugegeben. Die zu transportierende Substanz wurde in einer geringen Menge radioaktiv markiert eingesetzt und mit nicht radioaktiv markierter Substanz ergänzt. Die Lösung wurde daraufhin auf 37 °C erwärmt und die Transportversuche wurden ebenfalls bei 37 °C durchgeführt.

Die Zellen wurden einmal mit Transportpuffer gewaschen und anschließend für 10 min mit jeweils 800 µl Transportpuffer pro Well der 24-Well Platte im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der Transportpuffer abgenommen, mit 250 µl Substanzlösung pro Well ersetzt und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurde die Lösung von den Zellen abgenommen und die Zellen wurden drei Mal mit jeweils 250 µl eiskaltem Transportpuffer pro Well gewaschen. Anschließend wurden 500 µl 0,2 % SDS pro Well zugegeben und die Zellen unter Schütteln vom Boden der Platte abgelöst. Zur Lyse der Zellen wurde die SDS-Lösung daraufhin ca. 10 Mal auf- und abpipettiert. 400 µl der Zellsuspension wurden daraufhin in ein Szintillationsgefäß überführt und mit 5 ml des Szintillations-Cocktails Aqua Safe 300 Plus gemischt. Die Radioaktivität des Gemischs wurde anschließend im Flüssigszintillationszähler Hidex 300 SL gemessen.

Die Proteinkonzentration der Zellysate der einzelnen Wells wurde mittels

Proteinbestimmung nach Smith (s. 2.2.8.4) bestimmt und die Radioaktivität der Wells auf diese bezogen.

2.2.3.3 Efflux Transportversuch mit radioaktiv markierten Substraten

Um die Abgabe von aufgenommenen Substanzen aus den Transporter-exprimierenden Zellen ins umliegende Medium zu messen, wurden die Zellen mit der radioaktiv markierten zu transportierenden Substanz vorbeladen und der Efflux der Substanz mittels Messung der Radioaktivität im Transportpuffer zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen. Die zu transportierende Substanz wurde im Transportpuffer zur gewünschten Konzentration verdünnt. Dabei wurde die Substanz in einer geringen Menge radioaktiv markiert eingesetzt und mit nicht radioaktiv markierter Substanz ergänzt. Die Lösung wurde daraufhin auf 37 °C erwärmt und die Transportversuche wurden ebenfalls bei 37 °C durchgeführt.

Die Zellen wurden einmal mit Transportpuffer gewaschen und anschließend für 10 min mit jeweils 800 µl Transportpuffer pro Well der 24-Well Platte im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden 250 µl Substanzlösung pro Well auf die Zellen gegeben und diese bei 37 °C im Brutschrank für eine Stunde zur Vorbeladung inkubiert. Nach Ende der Vorbeladungszeit wurden die Zellen zwei Mal mit jeweils 250 µl Transportpuffer pro Well gewaschen und anschließend wurden 350 µl warmer Transportpuffer pro Well zugegeben, in welchen zuvor je nach Experiment noch weitere Substanzen, wie beispielsweise Inhibitoren des jeweiligen Transportproteins zugegeben worden waren. Nach den gewünschten Inkubationszeiten wurden jeweils 100 µl des Transportpuffers von den Zellen abgenommen, in ein Szintillationsgefäß pipettiert und mit 5 ml des Szintillations-Cocktails Aqua Safe 300 Plus gemischt. Die Radioaktivität des Gemischs wurde anschließend im Flüssigszintillationszähler Hidex 300 SL gemessen, um die Konzentration der zu der jeweiligen Inkubationszeit von den Zellen abgegebenen Substanz zu bestimmen.

Am Ende aller Inkubationszeiten wurde der Rest des Überstandes von den Zellen abgenommen und es wurde wie bei den Influx Transportversuchen vorgegangen, um die Konzentration der noch in den Zellen verbliebenen zu transportierenden Substanz und die Proteinkonzentration der Zelllysate zu bestimmen. Die Radioaktivität der Überstände und der Zellen wurde für die Auswertung auf die Proteinkonzentration bezogen.

2.2.3.4 Influx Transportversuch mit nicht radioaktiv markiertem Substrat

Waren Substanzen nicht radioaktiv markiert vorhanden, wurde die intrazelluläre Substratmenge nach der Inkubationszeit massenspektrometrisch bestimmt. Diese Methode wurde für die Transportversuche mit verschiedenen Substanzen, wie beispielsweise den Pterinen, genutzt.

Die Transportversuche wurden dafür wie in Punkt 2.2.3.2 beschrieben durchgeführt. Nach dem dreimaligen Waschen der Zellen mit jeweils 250 µl eiskaltem Transportpuffer pro Well zum Abstoppen des Transportes wurden noch zwei Waschschriffe mit jeweils 500 µl eiskaltem PBS durchgeführt, um zu verhindern, dass im Transportpuffer enthaltene Substanzen die Messung im Massenspektrometer störten.

Anstelle von 0,2 % SDS wurden im Falle der Pterine pro Well 250 µl „Lysepuffer für Pterine“ und im Falle aller anderen getesteten Substanzen 250 µl 0,1 % Ameisensäure in Acetonitril / H₂O (1:1) zugegeben und die Zellen mit einer Pipettenspitze vom Boden der Wells abgeschabt. Die Zelllösung der einzelnen Wells wurde dann in Schraubdeckelgefäße überführt und einem dreimaligen Einfrier- / Auftauprozess unterzogen, bei dem die Schraubdeckelgefäße abwechselnd in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und im Wasserbad bei 37 °C wieder aufgetaut wurden. Um die Zellen abschließend aufzuschließen, wurden die Lösungen für jeweils 9 s mit einem Ultraschall-Homogenisator bei 4 °C bearbeitet. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 13 000 g und 4 °C für 5 min. Jeweils 150 µl des Überstandes wurden daraufhin in eine Axygen 96-Well Platte überführt und die Substratkonzentrationen mithilfe von Dr. Ute Hofmann in der Abteilung für Analytik des Dr. Margarete Fischer-Bosch-Instituts für Klinische Pharmakologie massenspektrometrisch bestimmt.

Im Falle der Pterine konnten die Zelllysate zur Bestimmung der Proteinkonzentration der einzelnen Wells nicht genutzt werden, da der Lysepuffer die Proteinbestimmung nach Smith störte. Daher wurden bei jedem Transportversuch pro Zelllinie 6 Wells der 24-Well Platte zusätzlich ausgesät. Diese Zellen wurden wie oben beschrieben mit 500 µl 0,2 % SDS pro Well lysiert und eine Proteinbestimmung der Zelllysate durchgeführt. Der Mittelwert der Proteinkonzentration einer jeden Zelllinie wurde gebildet und die im Transportversuch gemessenen Substratkonzentrationen auf die Proteinkonzentration der jeweiligen Zelllinie bezogen.

Im Falle der anderen Substanzen wurde die Proteinkonzentration der Zelllysate der

einzelnen Wells mittels Proteinbestimmung nach Smith (s. 2.2.8.4) bestimmt und die Substratkonzentration der Zellen auf diese bezogen.

2.2.4 Herstellung von Gefrier-Gewebeschnitten

2.2.4.1 Schneiden von Mäuseleber für Immunfluoreszenzfärbungen

Für die Fertigung von Gefrier-Gewebeschnitten von Mäuselebern wurde stets der linke Leberlappen der Maus verwendet (s. 2.2.2.5) und im auf -20 °C vorgekühlten Kryostaten in einem Tropfen Einbettmedium (Cryochrome) eingebettet. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Einbettmedium die zu schneidende Fläche des Gewebes nicht berührt und das Gewebe nicht antaut. Für das Anschneiden des Gewebes wurde die Schnittdicke auf $10\text{ }\mu\text{m}$ eingestellt. Dann wurden $4\text{ }\mu\text{m}$ dicke Gewebeschnitte hergestellt und auf Adhäsionsobjektträger transferiert. Diese wurden entweder gleich für Immunfluoreszenzfärbungen verwendet oder bei -80 °C für maximal 14 Tage bis zur Färbung gelagert.

2.2.4.2 Schneiden von Mäusenieren für H&E-Färbungen und RNA-Isolation

Für die Fertigung von Gefrier-Gewebeschnitten von Mäusenieren für die Isolation von RNA wurde zunächst der Kryostat abgetaut und dieser sowie alle für die Fertigung der Schnitte benötigten Instrumente mit Dekontaminationslösung zur Nukleaseentfernung (RNase Away) komplett gereinigt und auf -20 °C vorgekühlt. Die zu schneidende Niere wurde dann im vorgekühlten Kryostaten in einem Tropfen Einbettmedium senkrecht eingebettet und mit einer Schnittdicke von $10\text{ }\mu\text{m}$ angeschnitten. Für die H&E-Färbungen zum Überprüfen des ausreichenden Anschneidens wurden wie oben beschrieben $4\text{ }\mu\text{m}$ dicke Gewebeschnitte hergestellt.

Anschließend wurden ca. 50 $10\text{ }\mu\text{m}$ dicke Schnitte der Niere angefertigt, welche mit einer vorgekühlten Pinzette in ein Lysing Matrix D Röhrchen für den FastPrep Homogenisator überführt wurden, in welches jeweils $600\text{ }\mu\text{l}$ Lyse Puffer des *mirVana* miRNA-Isolationskits vorgelegt worden war. Die Schnitte wurden entweder bei -80 °C im Puffer gelagert oder direkt für die RNA-Isolation eingesetzt.

2.2.5 Herstellung von FFPE Gewebelöcken und Mikrotomschnitten

2.2.5.1 Herstellung von FFPE Gewebelöcken

Für die Herstellung von Formalin-fixiertem Paraffin-eingebettetem (*formalin-fixed paraffin-embedded*; FFPE) Lebergewebe der Maus wurde bei der Präparation der Maus eine Hälfte des linken Leberlappens in 4 % Formaldehyd gegeben und darin bei 4 °C für mindestens 7 Tage fixiert. Daraufhin erfolgte das Entwässern des Gewebes in einem Gewebeeinfiltrationsautomaten der Abteilung für Pathologie des Robert-Bosch-Krankenhauses. Das entwässerte Gewebe wurde daraufhin in Paraffin eingebettet und die Paraffinblöcke wurden bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.5.2 Herstellung von Gewebeschnitten aus FFPE Blöcken

Gewebeschnitte aus FFPE-eingebettetem Lebergewebe der Maus wurden mit einem Rotationsmikrotom angefertigt. Hierzu wurde der FFPE Gewebelöck zunächst für ca. eine Stunde bei -20 °C vorgekühlt und mit einer Schnittdicke von 10 µm angeschnitten. 3 µm dicke Gewebeschnitte wurden hergestellt, auf Adhäsionsobjektträger transferiert und in einem Inkubator (Heratherm) bei 56 °C über Nacht getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.6 Immunfluoreszenzfärbungen und Fluoreszenzmikroskopie

2.2.6.1 Immunfluoreszenzfärbungen von Zellen und Gefrier-Gewebeschnitten

Zum Nachweis von Transportproteinen in Zellen bzw. in Gefrierschnitten von Mausgewebe wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt.

Für die Immunfluoreszenzfärbung von Zelllinien oder primären Hepatozyten aus Mäusen wurden die Zellen zunächst in jeweils ein Well einer 4-Well Zellkulturkammer auf einem Objektträger ausgesät und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Die Zellkulturkammer auf dem Objektträger war vor Aussaat der Zelllinien mit Poly-L-Lysin beschichtet worden. Dafür wurde der Boden der Wells mit Poly-L-Lysin-Lösung (0,01 %) bedeckt und die Kammer daraufhin bei 37 °C für 30 min inkubiert. Anschließend wurde das Poly-L-Lysin abgesaugt, die Wells wurden einmal mit PBS gewaschen und die Kammer wurde trocken bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert. Vor Aussaat der primären Hepatozyten wurde die Zellkulturkammer auf dem Objektträger mit Rattenkollagen I beschichtet (s. 2.2.1.6).

Gefrier-Gewebeschnitte wurden vor der Immunfluoreszenzfärbung für 1 h bei

Raumtemperatur getrocknet.

Die Zellen bzw. die Gewebeschnitte auf den Objektträgern wurden für 10 min bei -20 °C in eiskaltem Methanol fixiert. Anschließend wurden die Objektträger einmal kurz und zweimal für jeweils 5 min mit PBS gewaschen, in eine feuchte Kammer überführt und für 1 h mit dem primären Antikörper in der angegebenen Verdünnung (s. Tab. 6) inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Objektträger erneut einmal kurz und zweimal für jeweils 5 min mit PBS gewaschen und in der feuchten Kammer für 1 h mit dem sekundären Antikörper (Anti-Kaninchen IgG (aus Ziege), Alexa Fluor 488, s. Tab. 6) inkubiert. Zu dieser Antikörperlösung wurde zur Kernfärbung noch 1 µM TO-PRO™-3 Iodid oder 9 µM Hoechst 34580 zugegeben. Nach der Inkubation wurden die Objektträger wiederum einmal kurz und zweimal für jeweils 5 min mit PBS gewaschen, in eine trockene, dunkle Kammer gelegt und für 30 min getrocknet. Anschließend wurde pro Objektträger ein Deckglas mithilfe von Mowiol auf dem Objektträger befestigt und die Zellen bzw. Gewebeschnitte wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie betrachtet.

2.2.6.2 Fluoreszenzmikroskopie

Die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen erfolgte mit einem Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop. Zur Detektion der Kernfärbung mit TO-PRO™-3 Iodid wurde der Laser mit der Wellenlänge 638 nm, zur Detektion der Kernfärbung mit Hoechst 34580 der Laser mit der Wellenlänge 405 nm verwendet. Die Detektion der Färbung des Zielproteins erfolgte mit einer Anregung von 488 nm. Die Bildgröße betrug immer 184,52 µm x 184,52 µm und der Bildausschnitt wurde für beide Wellenlängen vom Laser jeweils sechsmal gescannt. Vor der ersten Aufnahme wurde die Laserkraft so eingestellt, dass die Kontrollzellen bzw. die Gewebeschnitte der Kontrollmäuse keine oder nur eine sehr geringe grüne Färbung aufwiesen und während der Auswertung nicht verändert, um die Intensität der Färbung in den unterschiedlichen Zelllinien bzw. im Gewebe unterschiedlicher Mäuse vergleichen zu können. Von jeder Zelllinie wurden mehrere Ausschnitte analysiert, um ein repräsentatives Gesamtbild zu generieren.

2.2.7 Histologische und immunhistochemische Färbungen

2.2.7.1 Hämatoxylin-Eosin (H&E) Färbung von Gefrier-Gewebeschnitten

Nach der Präparation von Gefrier-Gewebeschnitten für die RNA-Isolation aus Nierengewebe der Maus wurde durch H&E-Färbung überprüft, ob die Schnitte ausschließlich der Nierenrinde entstammten. Hierfür wurden die Objektträger zunächst für 15 min in 4 % Formaldehyd fixiert und anschließend unter fließendem Leitungswasser für ca. 1 min gewässert. Daraufhin wurden die Objektträger in filtrierter Hämatoxylinlösung für 5 min gefärbt und überschüssige Lösung wurde anschließend für ca. 5 min unter fließendem Leitungswasser abgewaschen. Die Objektträger wurden für ca. 1 min in Eosin Y und anschließend kurz in destilliertes Wasser getaucht. Es folgte die aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 96 % und 100 % Ethanol), wobei die Objektträger in den 70 %igen Ethanol nur kurz eingetaucht, im 96 %igen und 100 %igen hingegen jeweils 3 min inkubiert wurden. Anschließend wurden die Objektträger für 1 min in Neo-Clear inkubiert und anschließend zum Lufttrocknen unter den Laborabzug gelegt. Auf jedem Objektträger wurde jeweils ein Deckglas mit dem Einbettmedium Neomount befestigt und die Färbung unter dem Lichtmikroskop analysiert.

2.2.7.2 Immunhistochemische Färbungen von FFPE-Gewebeschnitten

Transportproteine in FFPE-Gewebeschnitten der Mausleber wurden durch immunhistochemische Färbungen nachgewiesen. Hierzu wurde das Dako EnVision+ System nach Herstellerangaben verwendet.

Die Objektträger wurden zunächst für 30 min in Neo-Clear inkubiert. Es folgte die absteigende Alkoholreihe (100 %, 96 %, 70 % Ethanol) mit einer Inkubationszeit von jeweils 3 min. Die Objektträger wurden anschließend drei Mal für jeweils 3 min in TBST (1x) gespült. Zur Antigen-Demaskierung wurden die Objektträger für 30 min in der vorgewärmten Target Retrieval Solution, welche abhängig vom primären Antikörper entweder auf pH 6 oder pH 9 eingestellt worden war (s. Tab. 6), im Wasserdampf inkubiert. Die Objektträger wurden drei Mal für jeweils 3 min in TBST (1x) gespült und in einer feuchten Kammer mit Peroxidase Blocking Solution für 5 min inkubiert. Die Objektträger wurden erneut drei Mal für jeweils 3 min in TBST (1x) gespült und anschließend mit dem Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung (s. Tab. 6, verdünnt in Antibody Diluent Solution) in der feuchten Kammer über Nacht bei 4 °C

inkubiert. Es folgten erneut 3 Waschschritte von jeweils 3 min mit TBST (1x), woraufhin die Objektträger mit dem Sekundärantikörper (Dako Peroxidase markiertes Polymer HRP Kaninchen) für 30 min in der feuchten Kammer inkubiert wurden und anschließend erneut drei Mal für jeweils 3 min in TBST (1x) gewaschen wurden. Die Objektträger wurden dann in der feuchten Kammer mit Substrat / Chromogen Lösung für 10 min inkubiert und anschließend unter fließendem Leitungswasser für ca. 3 min gespült. Für die Kernfärbung mit filtrierter Hämatoxylinlösung wurden die Objektträger für ca. 15 s in die Lösung getaucht und anschließend für ca. 5 min mit fließendem Leitungswasser gespült. Es folgte die aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 96 % und 100 % Ethanol) mit einer Inkubationszeit von jeweils 3 min. Anschließend wurden die Objektträger für 5 min in Neo-Clear inkubiert und dann trocken getupft. Auf jedem Objektträger wurde ein Deckglas mit dem Einbettmedium Neomount befestigt. Die Färbung wurde unter dem Lichtmikroskop analysiert und an einem Slide Scanner (Olympus) mit 20facher Vergrößerung eingescannt.

2.2.8 Gewinnung von Proteinen aus Zellen und Gewebe und Proteinbestimmung nach Smith

2.2.8.1 Gewinnung von Membranprotein aus Zellen

Transporter-exprimierende Zellen wurden zunächst in Zellkulturschalen von 10 cm Durchmesser bis zum Erreichen von 80 - 100 % Konfluenz vermehrt. Die Zellen wurden dann abgeschabt und die Zellsuspension wurde bei 600 rpm und Raumtemperatur für 15 min zentrifugiert (Hettich Universal 32). Das Pellet wurde daraufhin in 1 ml 0,5 mM NaPi-Puffer mit 100 µM PMSF als Proteaseinhibitor resuspendiert und die Zellen wurden durch Sonifizieren für 15 s im Ultraschall-Homogenisator aufgeschlossen. Die Lösung wurde dann bei 14 000 rpm und 4 °C für 1 h zentrifugiert (Eppendorf 5415 R). Das Pellet mit den Membranproteinen wurde in 100 µl 0,5 mM NaPi-Puffer mit 100 µM PMSF resuspendiert, die Proteinkonzentration mittels Proteinbestimmung nach Smith (s. 2.2.8.4) bestimmt und die Lösung bei -80°C gelagert.

2.2.8.2 Gewinnung von Gesamtprotein aus Lebergewebe der Maus

Zur Gewinnung von Gesamtprotein aus Mausleber wurde der rechte Leberlappen verwendet, von dem ein kleines Gewebestück mit einem Gewicht von 50 mg bis

200 mg bei -20 °C im Kryostat abgeschnitten wurde. Das Gewebestück wurde daraufhin in ein Lysing Matrix D Röhrchen für den FastPrep Homogenisator überführt, in welches bereits 1 ml Homogenisierungspuffer vorgelegt worden war, und im FastPrep Homogenisator bei 6 m / s in drei Zyklen à 20 s zerkleinert. Falls das Gewebestückchen noch nicht vollständig homogenisiert war, wurde das Gemisch in einen Dounce Homogenisator überführt und dort durch ca. 5 Hübe mit dem Pistill weiter homogenisiert. Es folgte die Proteinbestimmung nach Smith (s. 2.2.8.4) und die Lagerung des Homogenats bei -80 °C.

2.2.8.3 Gewinnung von Transmembranproteinen aus Lebergewebe der Maus

Für Proteomanalysen wurden Transmembranproteine aus dem Lobus Quadratus der Mausleber mit dem Proteoextract Transmembrane Kit nach Herstellerangaben gewonnen.

Hierfür wurde ein 25 – 50 mg schweres Gewebestück bei -20 °C im Kryostat abgeschnitten und in ein Lysing Matrix D Röhrchen für den FastPrep Homogenisator überführt, in welches bereits 1,5 ml eiskalter Extraktionspuffer 1 (mit Proteaseinhibitor) vorgelegt worden war. Das Gewebestückchen wurde anschließend im FastPrep Homogenisator bei 6 m / s in drei Zyklen à 20 s zerkleinert und für 10 min bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 1000 g und 4 °C für 5 min. Der Überstand, der den Zytosolproteinanteil enthielt, wurde verworfen und das Pellet in 5 ml kaltem PBS resuspendiert, worauf erneut ein Zentrifugationsschritt bei 1000 g und 4 °C für 5 min erfolgte. Das Pellet wurde in 200 µl Extraktionspuffer 2B (mit Proteaseinhibitor) resuspendiert und die Lösung wurde bei 16 000 g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Die Proteinkonzentration des Überstands, welcher das angereicherte Transmembranprotein enthielt, wurde mittels Proteinbestimmung nach Smith (s. 2.2.8.4) bestimmt und das Homogenat bei -80 °C gelagert.

2.2.8.4 Proteinbestimmung nach Smith

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Proben wurde nach der Methode von Smith durchgeführt (Smith et al. 1985). Hierfür wurden 6 BSA-Eichpunkte (0, 200, 400, 600, 800, 1000 µg / ml) erstellt. Die Proteinbestimmung erfolgte stets als Doppelbestimmung.

Für den Nachweis von Transportproteinen mittels Immunblot bzw. Proteom-Analysen

wurden Zelllysate und Gewebelysate jeweils 1:10 und 1:100 in einer 96-Well Platte verdünnt. Zelllysat aus Transportversuchen wurde unverdünnt eingesetzt. Zu den Lysaten wurde Smith-Reagenz (4 % Kupfer(II)-Sulfatlösung und Bicinchoninsäure im Verhältnis 1:50) zugegeben und die Platte für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 570 nm in einem Mikroplatten-Reader.

2.2.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Immunblot

Zum Nachweis und zur Quantifizierung von Transportproteinen in den Transporter-exprimierenden Zelllinien sowie in Mausgewebe wurden Immunblots durchgeführt.

Membranprotein aus Zellen und Gesamtprotein aus Geweben wurde hierfür zunächst mit 0,5 mM NaPi-Puffer auf die Konzentration 1 µg / µl eingestellt und mittels Lämmli-Puffer (5 x) denaturiert. Außerdem wurden für die quantitativen Immunblots der hOAT7-*Knockin* Mauslinie fünf Eichpunkte hergestellt. Hierfür wurde Protein aus der Leber einer 8 Wochen alten homozygoten hOAT7-*Knockin*-Maus genutzt. Die Proteinkonzentrationen der Eichpunkte betragen 2 µg / µl, 1,5 µg / µl, 1 µg / µl, 0,5 µg / µl und 0,25 µg / µl. Alle Proben wurden nach Zugabe des Lämmli-Puffers für 30 min bei 37 °C inkubiert.

Für nicht-quantitative Immunblots mit deglykosyliertem und glykosyliertem (Kontrolle) Protein aus Zellen und Geweben wurde zur Deglykosylierung das PNGase F Kit von NEB genutzt. Jeweils 30 µg des Proteins wurden nach Herstellerangaben in einem Ansatz von insgesamt 30 µl mit 4 µl PNGase F durch eine ca. 20 stündige Inkubation bei 37 °C deglykosyliert. Für die glykosylierte Kontrollprobe wurde ebenso verfahren, allerdings wurde hier keine PNGase F zugegeben. Die Zugabe des Lämmli-Puffers (5°x) erfolgte nach der Deglykosylierung.

Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden jeweils 10 µl der Probe oder des Eichpunktes auf ein 10 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen (Zusammensetzung s. Tab 18 u. 19), wodurch pro Probe 10 µg Protein und für die Eichpunkte 20 µg, 15 µg, 10 µg, 5 µg und 2,5 µg eingesetzt wurden. Als Proteinmarker wurde Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ verwendet. Die Elektrophorese erfolgte zunächst bei 130 V, um die Proben im Sammelgel zu sammeln, und wurde dann bei 160 V für 1 h fortgeführt.

Für den Immunblot wurde die Tank-Blotting Methode verwendet. Hierfür wurden zunächst das Gel, jeweils zwei in Towbin-Puffer eingeweichte Filterpapiere und Schwämme und eine Nitrozellulosemembran (0,45 µm) in einem Sandwichhalter platziert und dieser in den Blottingeinsatz in einer mit Towbin-Puffer gefüllten Kammer überführt. Die Proteinbanden wurden anschließend für 1 h bei 370 mA auf Eis vom Gel auf die Membran transferiert. Die Membran wurde anschließend mit Ponceau S Lösung gefärbt, um den Transfer der Proteine auf die Membran zu kontrollieren. Anschließend wurde sie mit destilliertem Wasser gespült und mit TBST (1x) entfärbt. Im Falle der quantitativen Immunblots wurde anstelle der Ponceau S Färbung eine Gesamtproteinfärbung mit dem Revert 700 Total Protein Stain Kit nach Herstellerangaben durchgeführt und mittels des Odyssey-Systems und der Image Studio Aquisition Software die Gesamtproteinmenge jeder Spur bestimmt.

Die Membran wurde anschließend für 1 h bei Raumtemperatur in Magermilchlösung inkubiert, um freie Bindungsstellen zu blockieren und dann mit dem primären Antikörper in gewünschter Verdünnung in TBST (1x) (s. Tab. 6) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Es folgten drei 10minütige Waschschrte mit TBST (1x) und die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Dako Anti-Kaninchen IgG-HRP) für 1 h bei Raumtemperatur. Die Membran wurde erneut dreimal für jeweils 10 min mit TBST (1x) gewaschen, anschließend in SuperSignal™ West Dura Extended Lösung für 5 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur entwickelt und mit der CCD-Kamera STELLA und der Software AIDA Image Analysis Software analysiert. Im Falle der quantitativen Immunblots wurde die Menge des Zielproteins jeder Probe auf die Intensität der Gesamtproteinfärbung bezogen und so die relative Proteinexpression bestimmt.

Tabelle 18: Herstellung eines 10 % Polyacrylamid-Trenngels

Bestandteil	Menge
30 % Acrylamid	8,3 ml
H ₂ O (MilliQ)	9,95 ml
Tris (1,5 M) pH 8,8	6,22 ml
10 % SDS	250 µl
TEMED	25 µl
10 % APS	250 µl

Tabelle 19: Herstellung eines Sammelgels

Bestandteil	Menge
30 % Acrylamid	1,35 ml
H ₂ O (MilliQ)	6,1 ml
Tris (1,5 M) pH 8,8	2,5 ml
10 % SDS	100 µl
TEMED	10 µl
10 % APS	100 µl

2.2.10 Proteomanalysen mit Lebergewebe aus Mäusen

Zum Nachweis des mOat2 Proteins in Lebergewebe wurden die angereicherten Transmembranproteine je einer weiblichen, 8 Wochen alten Kontroll- sowie homozygoten mOat2-*Knockout* Maus durch das Proteome Center Tübingen analysiert. Der Transmembranproteinextrakt wurde dort mittels SDS-PAGE Gelelektrophorese aufgetrennt und tryptisch verdaut. Die Proteomanalyse erfolgte dann massenspektrometrisch.

2.2.11 RNA Isolation aus Zellen und Geweben

2.2.11.1 Aufarbeitung von Zellen für die RNA Isolation

Zur Aufarbeitung von RNA aus Zellen wurden diese zunächst in einer 10 cm Schale bis zur Konfluenz kultiviert, dann mit 0,05 % Trypsin-EDTA abgeerntet und die Zellsuspension wurde bei 1400 rpm und Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert. Das so entstandene Zellpellet wurde in 1 ml PBS gewaschen und in einem RNase-freien Röhrchen in der Tischzentrifuge für ca. 1 min zentrifugiert. Das so entstandene Pellet

wurde bei -80 °C bis zum Tag der RNA-Isolation gelagert, an welchem es in 600 µl Lyse Puffer des *mirVana* miRNA-Isolationskits aufgenommen wurde.

2.2.11.2 Aufarbeitung von Mausgewebe für die RNA Isolation

Zur Gewinnung von RNA aus Mäuseleber wurde ein kleines Gewebestück (50 – 200 mg) des rechten Leberlappens bei -20 °C im Kryostat abgeschnitten und in ein Lysing Matrix D Röhrchen für den FastPrep Homogenisator überführt, in welches bereits 600 µl Lyse Puffer des *mirVana* miRNA-Isolationskits vorgelegt worden waren. Zur Isolation von RNA aus Nierengewebe wurden 50 zuvor angefertigte 10 µm dicke Nierenschnitte der Maus (s. 2.2.4.2) genutzt.

Die Gewebestückchen bzw. die Nierenschnitte wurden im FastPrep Homogenisator bei 6 m / s in drei Zyklen à 20 s zerkleinert. Das Homogenat wurde daraufhin in ein RNase-freies Röhrchen überführt und es wurde mit der RNA-Isolation begonnen.

2.2.11.3 RNA Isolation mithilfe des *mirVana* miRNA Isolationskits

Die RNA-Isolation aus Zellen sowie Mausgewebe wurde mittels des *mirVana* miRNA-Isolationskits nach Herstellerangaben durchgeführt. Zu der Zell- bzw. Gewebelösung (s. 2.2.11.2) wurde miRNA Homogenat-Additiv Lösung gegeben und das Gemisch für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Acid-Phenol : Chloroform (125:24) zugegeben und das Gemisch für 5 min bei Raumtemperatur und 10 000 g zentrifugiert, um die organische und die wässrige Phase zu trennen. Die RNA-enhaltende wässrige Phase wurde in ein neues RNase-freies Röhrchen überführt und mit 100 % Ethanol vermengt. Das Gemisch wurde für 30 s bei 10 000 g und Raumtemperatur über eine Filtersäule zentrifugiert. Anschließend wurden mehrere Waschschriffe mit zwei verschiedenen Waschpuffern durchgeführt, wobei der Puffer jeweils auf die Säule gegeben und diese für 30 s bei 10 000 g und Raumtemperatur zentrifugiert wurde. Abschließend wurde die RNA mit auf 95 °C erwärmtem, nukleasefreiem Wasser eluiert und ihre Konzentration am NanoDrop Mikrovolumen-Spektralphotometer bestimmt.

2.2.12 Gewinnung von cDNA aus RNA und Real Time PCR

2.2.12.1 cDNA Synthese aus RNA mittels des cDNA high capacity Kit

Zur cDNA Synthese aus RNA wurde das High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit nach Herstellerangaben verwendet. Die RNA-Proben wurden dabei mit nukleasefreiem Wasser so verdünnt, dass die Konzentration im Gesamtansatz von 20 µl 2 µg betrug. Die synthetisierte cDNA wurde 1:10 (cDNA : nukleasefreies Wasser) verdünnt und so entweder direkt in der qPCR eingesetzt oder bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.12.2 Quantitative PCR (qPCR)

Zur Bestimmung der Expressionsstärke eines Zielgens von stabil transfizierten Zellen oder Mausgeweben auf RNA Ebene wurden qPCRs (*RealTime* PCRs) mit genspezifischen TaqMan Genexpressionsassays im 7900HT Fast Echtzeit PCR-System durchgeführt. Diese Methode beruht auf einer Steigerung eines Fluoreszenzsignals mit steigender Anzahl an amplifizierter Zielgensequenz und ermöglicht dadurch ungleich der klassischen PCR-Reaktion nicht nur die Amplifikation des Zielgens, sondern auch die Quantifizierung seiner ursprünglich in der PCR eingesetzten Menge. Für jede Probe wurden zwei TaqMan Assays durchgeführt, von denen einer die Expressionsstärke des Zielgens und einer die des Haushaltsgens, auf welche die Expressionsstärke des Zielgens bezogen wurde, bestimmen sollte. Im Falle der stabil transfizierten Zelllinien und der Mausgewebe der *mOat2-Knockout* Mauslinie wurden die TaqMan Assays für *hSLC22A7* und *mSlc22a7* (s. Tab. 4) verwendet. Im Falle der Mausgewebe der *hOAT7-Knockin* Mauslinie wurde der TaqMan Assay für *hSLC22A9* (s. Tab. 4) verwendet. Für die Zelllinien wurde *hACTB* (β-Aktin des Menschen), für Gewebeproben beider Mauslinien *mActb* (β-Aktin der Maus) als TaqMan Assay für das Haushaltsgen verwendet. Für jeden Assay wurde ein Reaktionsmix in ein Well einer 384-Well Platte pipettiert, welcher aus 8 µl Master Mix (2x TaqMan Master Mix, TaqMan Genexpressionsassay (20 x), nukleasefreies Wasser) und 2 µl der 1:10 verdünnten cDNA (s. 2.2.12.1) bestand. Für jede Zell- bzw. Gewebeprobe wurden sowohl der Zielgen- als auch der Haushaltsgen-Assay in Doppelbestimmung wie in Tabelle 20 beschrieben durchgeführt.

Tabelle 20: Standard-Protokoll für hier durchgeführte TaqMan Assays

Schritt Nummer	Temperatur [°C]	Zeit
1	50	2 min
2	95	10 min
3	95	15 s
4	60	1 min
Wiederholung der Schritte 3 – 4 für 40 Zyklen		

Am Ende der Reaktion wurde der von der Software automatisch generierte Schwellenwert betrachtet und wenn nötig noch manuell angepasst, so dass er unterhalb der linearen und der Plateau-Phase und innerhalb der exponentiellen Phase der Amplifikation lag. Der PCR-Zyklus, bei dem die Fluoreszenzstärke der Reaktion den Schwellenwert erreicht, also die Fluoreszenzstärke des Hintergrundes übersteigt, wird als C_T -Wert bezeichnet, auf dem die Bestimmung der relativen Expressionsstärke basiert. Daher stellt der Schwellenwert eine essentielle Komponente in der Auswertung dar. Mittels der $\Delta\Delta C_T$ -Methode wurde anschließend der relative Expressionsunterschied zwischen transfizierten und Kontrollzellen bzw. zwischen *Knockout / Knockin* und Kontrollmäusen berechnet. Hierfür wurde zunächst die Differenz zwischen den C_T -Werten des Ziel- und des Haushaltsgens jeder Probe berechnet (ΔC_T). Dafür wurde der Mittelwert der beiden C_T -Werte der Doppelbestimmung genutzt. Als nächster Schritt wurde dann der Mittelwert der ΔC_T Werte der Kontrollzellen bzw. -mäuse gebildet und dieser von allen bestimmten ΔC_T Werten abgezogen, um die $\Delta\Delta C_T$ -Werte für alle Proben zu bilden. Um dann den relativen Expressionsunterschied zu berechnen, wurden die $\Delta\Delta C_T$ -Werte in die Formel: $2^{-\Delta\Delta C_T}$ eingesetzt.

2.2.12.3 Analyse der Genexpression von *mSlc22a7* in verschiedenen Mausgeweben

Zur Analyse der Expression von *mSlc22a7* in verschiedenen Mausgeweben wurde der TissueScan Mouse Normal cDNA Array von Origene mithilfe des *mSlc22a7* TaqMan Assays nach Herstellerangaben durchgeführt. Es handelt sich hierbei um eine bereits vorbereitete 96-Well Platte, in welcher sich genau definierte Mengen cDNA von 36 verschiedenen Mausgeweben unterschiedlicher Organe und Entwicklungsstadien befinden. Das relative Expressionslevel der einzelnen Gewebe wurde mithilfe der Formel: 2^{-C_T} bestimmt.

2.2.13 Sequenzierung der *mSlc22a7* cDNA in Kontroll- und *mOat2-Knockout* Mäusen

Um zu überprüfen, ob der Genbereich von Exon 2 bis Exon 6 der *mSlc22a7* Gensequenz in den *mOat2-Knockout* Mäusen erfolgreich ausgeschnitten worden war, wurde cDNA aus Lebergewebe einer Kontroll- und einer homozygoten *Knockout*-Maus gewonnen und die *mSlc22a7* mRNA sequenziert.

2.2.13.1 Amplifikation der *mSlc22a7* mRNA mittels PCR

Für die Sequenzierung sollten zunächst große Teile der *mSlc22a7* mRNA mittels PCR amplifiziert werden. Hierfür wurden zwei PCR-Reaktionen angesetzt. Die Primer der ersten Reaktion sorgten für eine Amplifikation der Exone 1-6, wobei noch ein Stück des Exons 7 mit amplifiziert wurde. Die Primer der zweiten Reaktion sorgten für eine Amplifikation der Exone 8-9, wobei jeweils ein Stück der Exone 7 und 10 mit amplifiziert wurden. Da durch die gentechnische Veränderung der homozygoten *mOat2-Knockout* Mäuse der Genbereich von Exon 2 bis 6 ausgeschnitten sein sollte, wurde bei der Amplifikation der Exone 1-6 ein klarer Unterschied im PCR-Produkt der Kontroll- und der *mOat2-Knockout* Maus erwartet, während bei der Amplifikation der Exone 8-9 kein Unterschied erwartet wurde. Die Primer-Sequenzen beider PCR-Reaktionen sowie die erwarteten Bandengrößen bei Kontroll- und *Knockout* Maus sind in Tabelle 21 gezeigt.

Tabelle 21: Primersequenzen für die Amplifikation der *mSlc22a7*-mRNA

PCR-Reaktion 1: Amplifikation Exons 1 - 6	
Primersequenz Vorwärts, for30	5'-GTA GCA AGC AGG TTG ACC GAT CC
Primersequenz Rückwärts, rev1279	5'-GAG ACG CAC AAG GAA GAA GAC CG
Bandengröße Kontrolltier	1250 bp
Bandengröße hom <i>Knockout</i>	588 bp
PCR-Reaktion 2: Amplifikation Exons 8 - 9	
Primersequenz Vorwärts, for1162	5'-TTA CTA CGG CCT GAC TCT GGA CG
Primersequenz Rückwärts, rev1746	5'-CTG CCT TCT ATT TCC AGC TAC TTG
Bandengröße Kontrolltier	528 bp
Bandengröße hom <i>Knockout</i>	528 bp

Die PCR-Reaktionen wurden in einer 96-Well Platte mit einem Volumen von 25 µl pro Well durchgeführt. Als fertiger Master Mix wurde HotStarTaq Master Mix verwendet, zu dem pro PCR-Reaktion noch 0,2 mM MgCl₂ zugegeben wurden. Es wurden jeweils 1 µM der jeweiligen für die Genotypisierung benötigten Primer und 1 µl der 1:10 verdünnten cDNA (s. Punkt 2.2.12.1) pro Well eingesetzt. Die Platte wurde in einem PCR-Gerät nach dem Protokoll in Tabelle 22 inkubiert.

Tabelle 22: PCR-Protokoll für die Amplifikation von *mSlc22a7* aus Kontroll- und *mOat2-Knockout* Mäusen

Schritt Nummer	Temperatur [°C]	Zeit [Min]
1	95	15
2	94	1
3	68	1
4	72	3
Wiederholung der Schritte 2 – 4 für 35 Zyklen		
5	72	10

2.2.13.2 Gel-Elution

Für die Sequenzierung der PCR-Produkte aus den *mSlc22a7*-Amplifizierungs PCR-Reaktionen wurden diese nach Zugabe von 6x BPB im Verhältnis 1:6 (6x BPB : PCR-Produkt) auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen, der Gellauf wurde in TAE-Puffer (1x) durchgeführt und die Banden im Gel wurden in der E-Box durch UV-Bestrahlung sichtbar gemacht und dokumentiert. Die Banden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und eine Gel-Elution wurde durchgeführt, um die amplifizierte *mSlc22a7* cDNA aufzureinigen. Hierfür wurde das QIAquick Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben verwendet. Pro Volumen des Gels wurden 3 Volumen des Puffers QG zugegeben und das Gel wurde daraufhin bei 50 °C im Puffer für 10 min bis zur kompletten Auflösung inkubiert. Nach der Zugabe eines Gelvolumens Isopropanol (100 %) wurde die Lösung auf eine Säule gegeben und bei 17 900 g und Raumtemperatur für 1 min zentrifugiert. 500 µl des Puffers QC wurden auf die Säule pipettiert und diese erneut zentrifugiert. Anschließend wurden 750 µl des Puffers PE auf die Säule pipettiert und diese wiederum zentrifugiert, worauf eine Zentrifugation der trockenen Säule erfolgte. Zur Elution der DNA wurden dann 50 µl EB-Puffer auf die Mitte der Membran pipettiert, die Säule wurde erneut zentrifugiert und die Konzentration des DNA-Eluats am NanoDrop Mikrovolumen-Spektralphotometer bestimmt.

2.2.13.3 Sequenzier-Reaktion

Zum Ansetzen der Sequenzier-Reaktion wurde das BigDye Terminator Version 3.1 Zyklus-Sequenzierungskit nach Herstellerangaben verwendet. In einer 96-Well Platte wurde pro DNA-Eluat für jeden der vier Primer (Primersequenzen s. Tab. 21) eine Sequenzier-Reaktion angesetzt. Hierfür wurden ca. 40 ng DNA-Eluat, 3,2 pmol Primer zusammen mit BigDye Premix und 5x Sequencing Puffer pipettiert und die Reaktion wurde in einem PCR-Gerät wie in Tabelle 23 beschrieben durchgeführt.

Tabelle 23: PCR-Protokoll für Sequenzier-Reaktionen

Schritt Nummer	Temperatur [°C]	Zeit
1	96	1 min
2	96	10 s
3	50	5 s
4	60	4 min
Wiederholung der Schritte 2 – 4 für 25 Zyklen		

2.2.13.4 Aufreinigung der Sequenzier-Reaktion und Sequenzierung

Zur Aufreinigung des DNA-Eluats für die Sequenzierung wurde das ZR DNA Sequencing Clean-Up Kit nach Herstellerangaben verwendet. Hierfür wurde die gesamte Sequenzierreaktion mit dem Sequencing Binding Puffer vermischt, die Lösung wurde auf eine Säule gegeben und diese Säule bei 13 000 rpm und Raumtemperatur für 30 s zentrifugiert. Es folgte ein Waschschriff mit dem Sequencing Wash Puffer. Die aufgereinigte DNA wurde mit nukleasefreiem Wasser aus der Säule gelöst und 5 µl davon wurden daraufhin mit 15 µl nukleasefreiem Wasser in eine 96-Well Platte für Sequenzierungen pipettiert. Die Platte wurde mit speziellen Septa verschlossen und die Sequenzierung im Sequenziergerät im *rapid Assay* durchgeführt. Die Auswertung der Sequenzierung erfolgte daraufhin mit der Sequencing Analysis Software V5.4.

2.2.14 RNA-Microarrays

Um die Expression verschiedener Komponenten des cGMP Signalweges in den verschiedenen Zelltypen der Leber zu untersuchen, wurde mit primären sinusoidalen Endothelzellen und Ito-Zellen des Menschen von Sciencell der GeneChip™ Human Transcriptome Array 2.0 durchgeführt. Um die Auswirkungen der gentechnischen Veränderungen der beiden neu generierten Mauslinien auf die Genexpression der

jeweiligen Mauslinie zu untersuchen, wurde mit Gewebe von Kontroll- und homozygoten *mOat2-Knockout* bzw. *hOAT7-Knockin* Mäusen der Clariom S Assay HT (Maus) durchgeführt. Die Durchführung und Auswertung der RNA-Microarrays erfolgten mit Unterstützung von Dr. Elke Schäffeler und Dr. Stefan Winter (Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie). Hierfür wurde aus den Primärzellen bzw. dem Mausgewebe RNA isoliert (s. 2.2.11.3) und aus dieser wurden mit dem GeneChip WT PLUS Reagent Kit nach Herstellerangaben mit Biotin markierte, codogene Einzelstrang DNA-Fragmente gewonnen, welche daraufhin auf den jeweiligen Transkriptom Array hybridisiert wurden. Der Array wurde nach der Hybridisierung in der GeneChip Fluidics Station 450 DX nach Herstellerangaben gewaschen und gefärbt, die Fluoreszenz im GeneChip Scanner 3000 7G System gemessen und mittels der AGCC 4.0 Software analysiert.

2.2.15 Klinische Chemie mit Plasma von Mäusen

Von beiden Mauslinien wurden folgende Laborparameter durch das Zentrallabor des Robert-Bosch-Krankenhauses bestimmt: Alkalische Phosphatase (ALP), Aspartat-Aminotransferase (AST), Alanin-Aminotransferase (ALT), γ -Glutamyltransferasen (γ -GT), Lactatdehydrogenase (LDH), Albumin, Gesamtprotein, Bilirubin, Kreatinin, Triglyceride, Harnsäure, Harnstoff.

2.2.16 Statistische Auswertung

Experimente, deren Stichprobengröße drei oder mehr betrug, wurden statistisch mit Prism 5 (GraphPad) ausgewertet. Hierfür wurde der Welch t-Test verwendet und die Daten wurden als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Wurden mehr als zwei Vergleiche innerhalb eines Datensatzes durchgeführt, wurde die Bonferroni-Korrektur angewendet, um zu verhindern, dass die Wahrscheinlichkeit für einen Fehler 1. Art zu groß wurde. Hierfür wurden die P-Werte mit der Anzahl der innerhalb des Datensatzes durchgeführten Vergleiche multipliziert. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als statistisch signifikant bezeichnet und in Abbildungen mit * (oder # oder +) gekennzeichnet (** / ## / ++: $P < 0,01$; *** / ### / +++: $P < 0,001$).

3 Ergebnisse

3.1 Der organische Anionentransporter 2

OAT2 ist ein Transportprotein, welches endogene sowie exogene Substanzen durch die Zellmembranen transportiert. Im Menschen ist der Transporter vorrangig in Leber und Niere exprimiert (Sun et al. 2001), doch welche Funktion er dort erfüllt, ist größtenteils noch nicht geklärt. Zur funktionellen Charakterisierung des Transporters wurden im Rahmen dieser Arbeit Experimente in Zellkultur mit hOAT2- bzw. mOat2-exprimierenden Zelllinien sowie in Mäusen mittels einer neu generierten mOat2-*Knockout* Mauslinie durchgeführt.

3.1.1 *In vitro* Charakterisierung von humanem und murinem OAT2 mittels stabil transfizierter Zelllinien

3.1.1.1 Generierung und Charakterisierung von hOAT2- und mOat2-exprimierenden Zelllinien

Zur funktionellen *in vitro* Charakterisierung wurden mittels des FlpIn Systems HEK293 Zelllinien generiert, welche entweder hOAT2 oder mOat2 stabil exprimierten (s. Abb. 9). Als Kontrollzellen wurden HEK293 Zellen verwendet, welche stabil mit dem Leervektor transfiziert worden waren.

Mittels Immunfluoreszenzfärbung mit einem Anti-SLC22A7 Antikörper (Invitrogen) konnte eine deutlich membranassoziierte Färbung sowohl in den hOAT2- als auch in den mOat2-exprimierenden Zellen nachgewiesen werden. Die Kontrollzellen zeigten keine solche Färbung, aber eine deutliche Kernfärbung, welche in Aussehen und Intensität mit der Kernfärbung der Transporter-transfizierten Zelllinien vergleichbar war (s. Abb. 9 A, B u. C).

Auch per Immunblot konnte sowohl in glykosyliertem als auch in deglykosyliertem Membranprotein der Kontrollzellen keine Proteinbande nachgewiesen werden. Dahingegen zeigten die glykosylierten Membranproteinextrakte der beiden Transporter-exprimierenden Zelllinien eine ca. 75 kDa große Proteinbande. In den deglykosylierten Membranproteinextrakten war ebenfalls eine Proteinbande nachweisbar, deren Größe nun allerdings mit leicht über 50 kDa geringer war als in den glykosylierten Proben (s. Abb. 9 D u. E).

Mithilfe einer qPCR-Analyse mit aus den Zellen gewonnener cDNA und dem jeweiligen TaqMan Assay konnte eine starke relative mRNA Expression des jeweiligen

Transportergens in den hOAT2- bzw. mOat2-exprimierenden Zelllinien nachgewiesen werden, während in den Kontrollzellen keine solche Expression detektiert wurde (s. Abb. 9 F u. G).

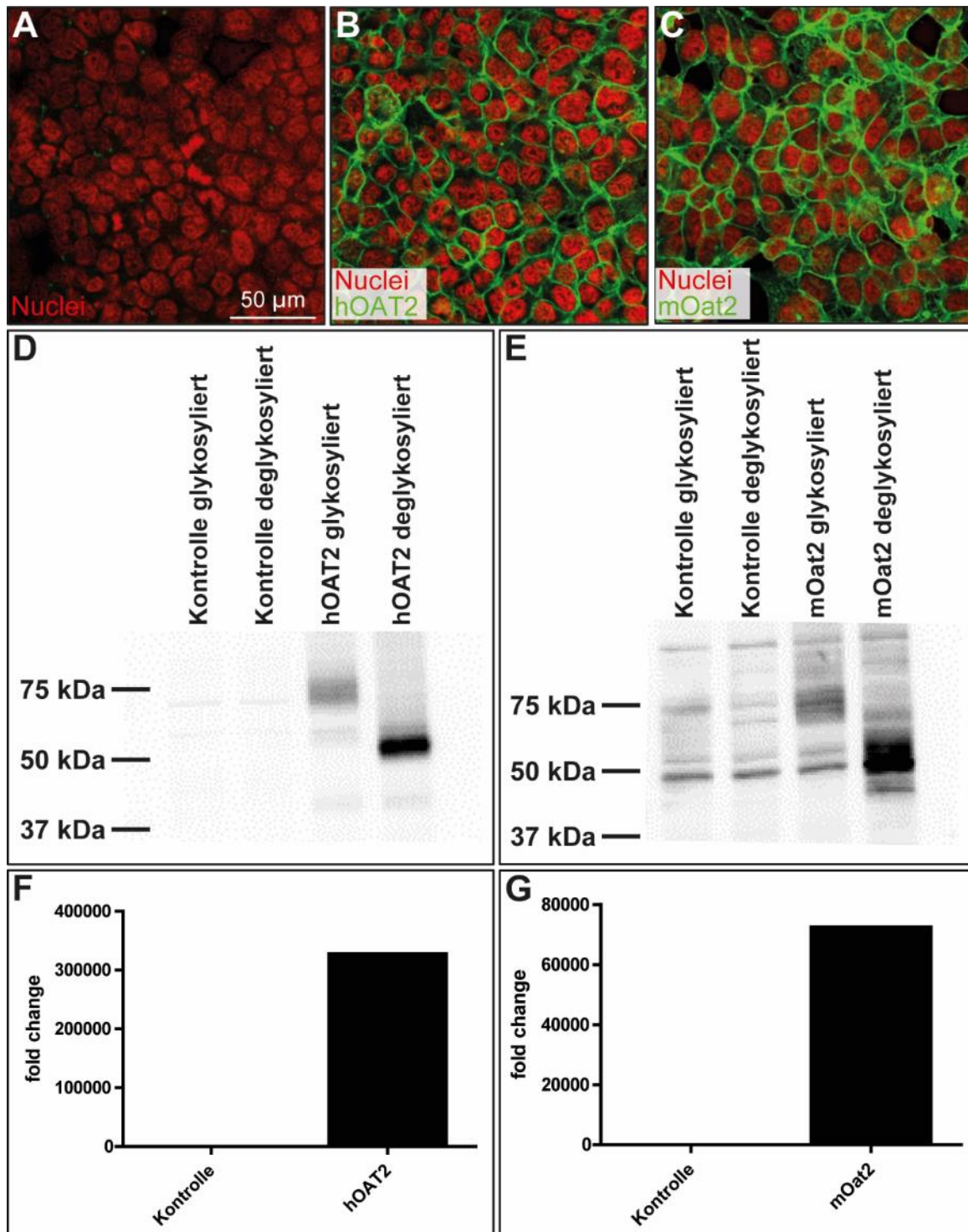


Abbildung 9: Stabil transfizierte Zelllinien exprimieren hOAT2 und mOat2
Mittels stabiler Transfektion von HEK293 Zellen wurden Zelllinien generiert, welche hOAT2 bzw. mOat2 exprimierten. Als Kontrollzellen wurden mit dem Leervektor stabil transfizierte Zellen verwendet. Die Transporter-exprimierenden Zelllinien zeigten nach

Immunfluoreszenzfärbung mit einem Anti-*SLC22A7* Antikörper (Invitrogen, Verdünnung: 1:100) eine deutliche Färbung im Bereich der Zellmembran (B, C), welche in den Kontrollzellen nicht nachzuweisen war (A). Die Immunblot-Analyse von glykosyliertem sowie deglykosyliertem Membranprotein mit einem Anti-*SLC22A7* Antikörper (Invitrogen, Verdünnung 1:1000) zeigte in den Transporter-exprimierenden Zelllinien, nicht jedoch in den Kontrollzellen, Proteinbanden bei 75 kDa (glykosyliert) bzw. ca. 50 kDa (deglykosyliert) (D, E). Eine qPCR-Analyse mit einem *hSLC22A7* (Hs00198527_m1), *mSlc22a7* (Mm00460672_m1), *hACTB* (HS99999903_m1) und *mActb* (Mm02619580_g1) TaqMan Assay ergab eine starke *hSLC22A7* bzw. *mSlc22a7* mRNA Expression in den hOAT2- bzw. mOat2-exprimierenden Zellen, während in den Kontrollzellen keine mRNA Expression nachgewiesen werden konnte (F, G).

3.1.1.2 Funktionelle Charakterisierung der hOAT2 und mOat2-exprimierenden Zelllinien anhand prototypischer Substrate

i cGMP als prototypisches Substrat von hOAT2 und mOat2

cGMP wurde bereits als prototypisches Substrat mit hoher Spezifität und Affinität zu hOAT2 beschrieben (Cropp et al. 2008), allerdings wurde bisher nicht untersucht, ob auch mOat2 cGMP transportiert. In der Literatur sind ebenfalls verschiedene hOAT2-Inhibitoren beschrieben (Shen et al. 2015), welche unter anderem den Transport von cGMP durch hOAT2 hemmen können. Zur weiteren Untersuchung des Transportes von cGMP durch hOAT2, sowie zur Klärung, ob auch mOat2 cGMP transportieren kann, wurden verschiedene Transportversuche mit den in dieser Arbeit generierten hOAT2- bzw. mOat2-exprimierenden Zelllinien und cGMP durchgeführt.

Zunächst sollten die zwei zuvor in der Literatur beschriebenen (Khamdang et al. 2002; Shen et al. 2015) hOAT2-Inhibitoren Ketoprofen und Bromsulfophthalein (BSP) auf ihre inhibitorische Wirksamkeit hin untersucht werden. Hierfür wurden für jede der beiden Substanzen 3 Konzentrationen anhand der bereits publizierten Daten gewählt und ein Transportversuch mit den hOAT2-exprimierenden Zellen und cGMP durchgeführt (s. Abb. 10). Während in den Kontrollzellen keine intrazelluläre cGMP Aufnahme beobachtet wurde, zeigten die hOAT2-exprimierenden Zellen einen deutlichen Anstieg von intrazellulärem cGMP nach 10 Minuten in Abwesenheit der Inhibitoren. Wurden die Zellen mit cGMP und einer der beiden niedrigeren Konzentrationen von Ketoprofen und BSP inkubiert, war ebenfalls noch ein Anstieg in der intrazellulären cGMP Konzentration nach der Inkubationszeit erkennbar, dieser war allerdings in allen Fällen signifikant geringer als in den Zellen, welche ohne

Inhibitor inkubiert wurden und sank mit steigender Inhibitorkonzentration. Wurde die jeweils höchste Konzentration von Ketoprofen (1000 μM) oder BSP (100 μM) eingesetzt, war nur noch ein minimaler Transport von cGMP zu beobachten. Daher wurde in den nachfolgend beschriebenen Experimenten mit diesen Konzentrationen gearbeitet, wenn der Transport durch hOAT2 inhibiert werden sollte.

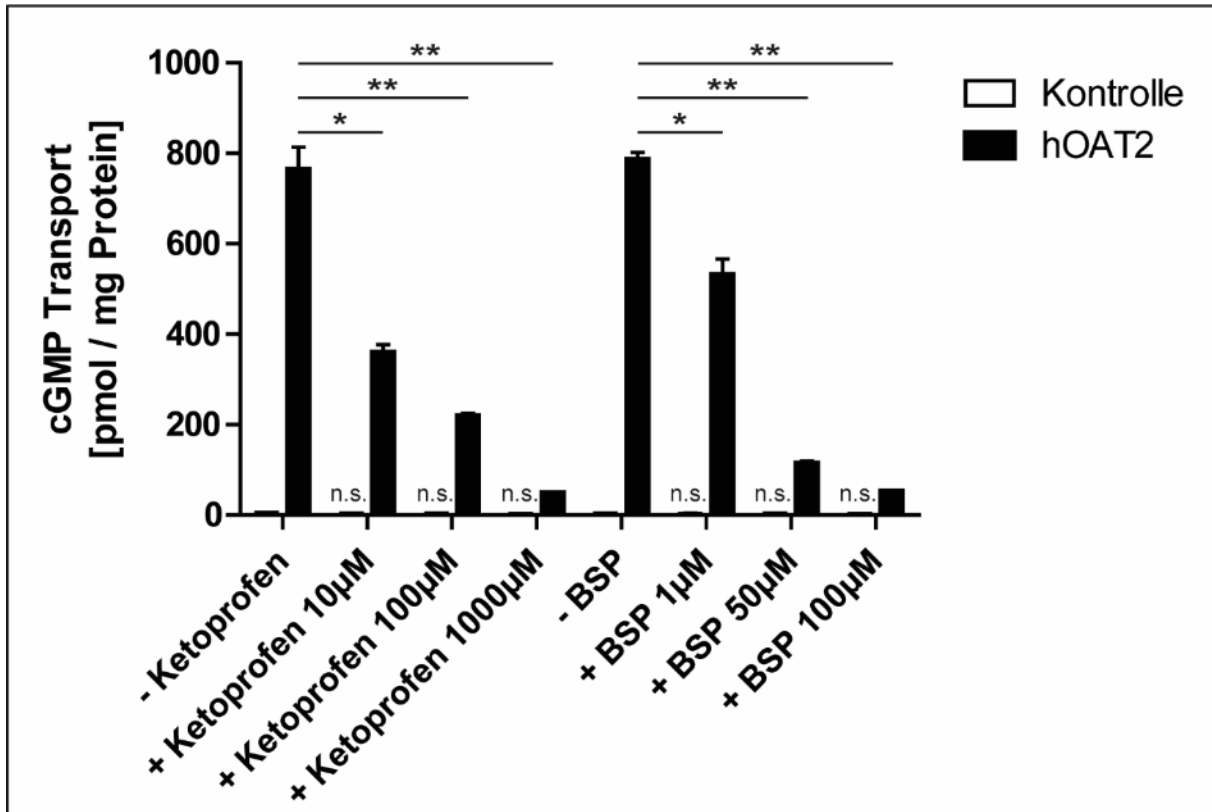


Abbildung 10: Ketoprofen und BSP inhibieren den hOAT2-vermittelten cGMP Transport in hOAT2-exprimierenden Zelllinien

Zur Analyse der inhibitorischen Wirkung von Ketoprofen und BSP wurden hOAT2-exprimierende HEK293 Zellen bzw. Kontrollzellen mit 2 μM cGMP sowie verschiedenen Konzentrationen der beiden Substanzen für jeweils 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die intrazelluläre cGMP Konzentration gemessen. Der Versuch wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt. Für die statistische Auswertung wurden für die Kontrollzelllinie sowie für die hOAT2-exprimierenden Zellen die intrazellulären cGMP Konzentrationen unter Zugabe der verschieden konzentrierten Inhibitoren jeweils gegen die intrazelluläre cGMP Konzentration in Abwesenheit der Inhibitoren getestet.

Um den cGMP Transport durch hOAT2 näher zu untersuchen und zu testen, ob auch mOat2 in der Lage ist, cGMP zu transportieren, wurden Transportversuche mit den hOAT2- und mOat2-exprimierenden Zelllinien sowie der Kontrollzelllinie mit cGMP durchgeführt. Zum einen wurde eine Gesamtkonzentration von 2 μM cGMP eingesetzt, zum anderen eine deutlich geringere Konzentration von 5 nM, welche ungefähr der humanen Plasmakonzentration von cGMP entspricht (Zhao et al. 2020). Zusätzlich wurde der cGMP Transport auch in Anwesenheit eines hOAT2 / mOat2-Inhibitors (Ketoprofen oder BSP) gemessen, um zu zeigen, dass ein beobachteter intrazellulärer cGMP Anstieg in den Transporter-exprimierenden Zelllinien auch spezifisch auf hOAT2 bzw. mOat2 zurückzuführen war. Die Ergebnisse des Transportversuches sind in Abbildung 11 gezeigt.

Bei einer cGMP Konzentration von 2 μM konnte sowohl in den hOAT2- als auch in den mOat2-exprimierenden Zellen ein Anstieg in der intrazellulären cGMP Konzentration nach 1 sowie nach 10 Minuten beobachtet werden, wobei die intrazelluläre cGMP Konzentration in beiden Zelllinien nach 10 Minuten deutlich höher war als nach 1 Minute (s. Abb. 11 A / A'). Die Kontrollzellen zeigten lediglich eine im Vergleich zu den Transporter-transfizierten Zellen sehr geringe intrazelluläre cGMP Konzentration, der Unterschied zu den hOAT2- bzw. mOat2-exprimierenden Zellen war für beide Zeitpunkte signifikant. Im Vergleich zu der hOAT2-exprimierenden Zelllinie war die intrazelluläre cGMP Konzentration in den mOat2-exprimierenden Zellen nach 1 und 10 Minuten Inkubation mit cGMP deutlich geringer, der cGMP Transport durch mOat2 war also deutlich sichtbar, aber weniger stark ausgeprägt als der durch hOAT2. In Anwesenheit eines hOAT2 / mOat2-Inhibitors war der intrazelluläre cGMP Spiegel nach beiden Inkubationszeiten jeweils signifikant niedriger als der der Zellen, welche nur mit cGMP inkubiert worden waren und nur minimal höher als der der Kontrollzellen. Der beobachtete cGMP Transport ließ sich demnach durch die Inhibition von hOAT2 bzw. mOat2 hemmen.

Bei einer cGMP Konzentration von 5 nM konnten sehr ähnliche Ergebnisse beobachtet werden (s. Abb. 11 B / B'). Die intrazelluläre cGMP Konzentration der Transporter-exprimierenden Zelllinien war nach beiden Inkubationszeiten ebenfalls signifikant höher als die der Kontrollzellen, wobei die cGMP Konzentration ebenfalls mit steigender Inkubationszeit anstieg. Der cGMP Transport durch mOat2 war weniger stark ausgeprägt als durch hOAT2, was sich durch eine deutlich niedrigere intrazelluläre Konzentration von cGMP in den mOat2- im Vergleich zu den hOAT2-

exprimierenden Zellen nach beiden Inkubationszeiten äußerte. Der Transport von cGMP durch hOAT2 und mOat2 konnte durch die Zugabe eines hOAT2 / mOat2-Inhibitors gehemmt werden.

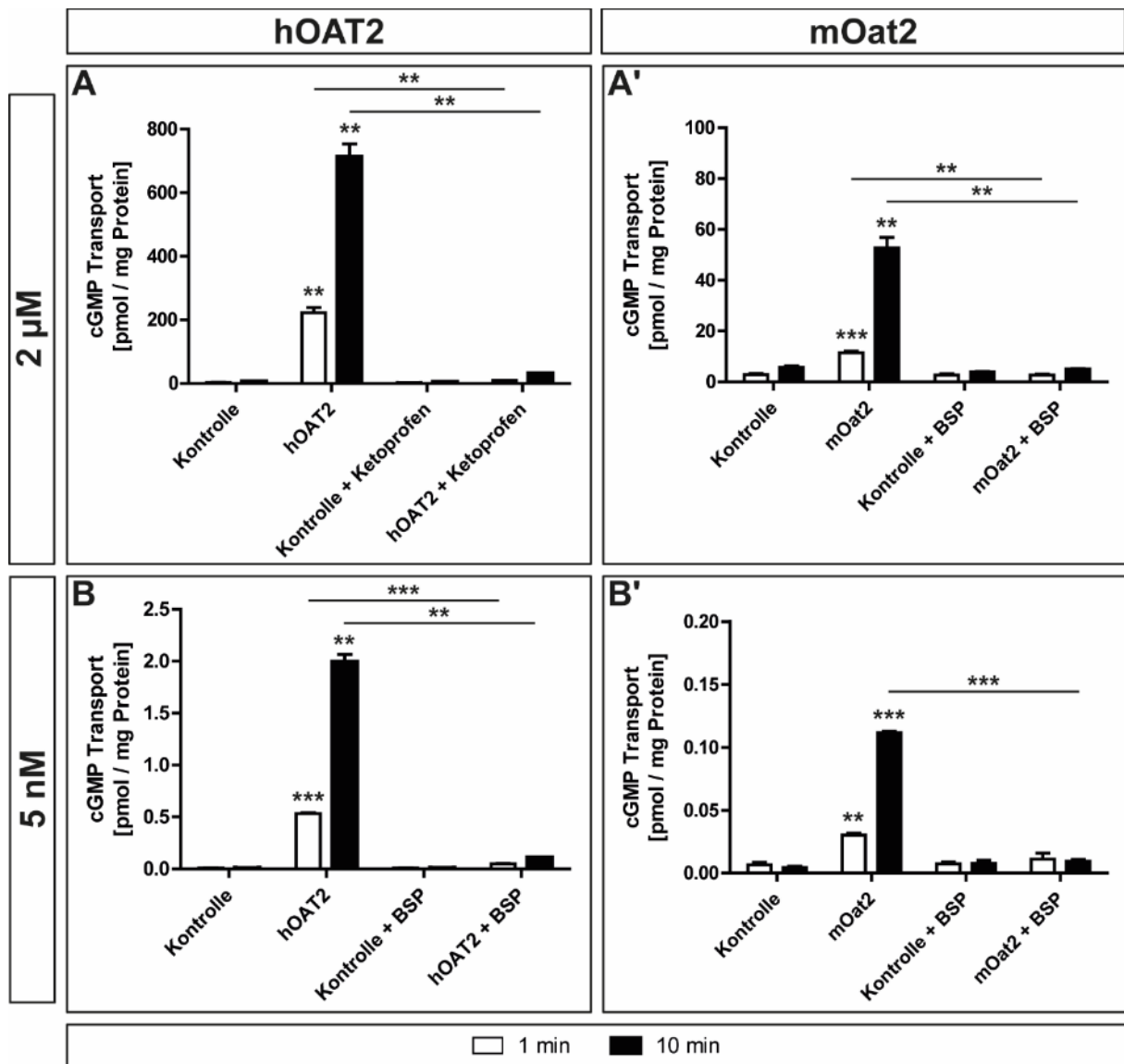


Abbildung 11: hOAT2 und mOat2 transportieren cGMP

hOAT2- bzw. mOat2-exprimierende HEK293 Zellen bzw. Kontrollzellen wurden mit cGMP (2 µM in A und A' oder 5 nM in B und B') in Abwesenheit sowie in Anwesenheit eines hOAT2 / mOat2-Inhibitors (1000 µM Ketoprofen oder 100 µM BSP) für 1 und 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die intrazelluläre cGMP Konzentration gemessen. Die Versuche wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt.

Signifikante Unterschiede sind mit gekennzeichnet (*), wenn nicht durch Linien anders gekennzeichnet, wurde gegen die Kontrollzellen getestet.

Zur umfassenden Charakterisierung des cGMP Transportes durch hOAT2 und mOat2 wurden zeit- und konzentrationsabhängige Transportversuche mit cGMP durchgeführt (s. Abb. 12).

Für beide Zelllinien ließ sich ein deutlicher, zeitabhängiger Anstieg der intrazellulären cGMP Konzentration der Transporter-exprimierenden Zelllinie beobachten, die Kontrollzellen zeigten nur einen marginalen Anstieg. Der Anstieg der intrazellulären cGMP Konzentration der hOAT2-exprimierenden Zellen (s. Abb. 12 A) zeigte mit steigender Inkubationszeit eine eintretende Sättigung, welche bei den mOat2-exprimierenden Zellen (s. Abb. 12 B) nicht beobachtet werden konnte. Wie bereits bei den oben beschriebenen Transportversuchen beobachtet, war erneut der cGMP Transport durch mOat2 weniger stark ausgeprägt als durch hOAT2.

Für beide Zelllinien ließ sich auch ein deutlicher konzentrationsabhängiger Anstieg in der intrazellulären cGMP Konzentration der Transporter-exprimierenden Zelllinie beobachten (s. Abb. 12 C). Dieser Anstieg wurde mit steigenden Konzentrationen schwächer, die eintretende Sättigung war allerdings in den hOAT2-exprimierenden Zellen stärker zu beobachten als in den mOat2-exprimierenden Zellen. Die Kontrollzellen zeigten mit steigender eingesetzter cGMP Konzentration nur einen marginalen Anstieg der intrazellulären cGMP Konzentration. Der konzentrationsabhängige cGMP Transport durch mOat2 war erneut weniger stark ausgeprägt als der durch hOAT2. Es wurden folgende kinetischen Konstanten bestimmt (s. Abb. 12 D): K_m -Wert hOAT2 $104,7 \pm 6,3 \mu\text{M}$, K_m -Wert mOat2 $1333 \pm 252,4 \mu\text{M}$, V_{max} -Wert hOAT2 $4888 \pm 80,18 \text{ pmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, V_{max} -Wert mOat2 $3457 \pm 412,3 \text{ pmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

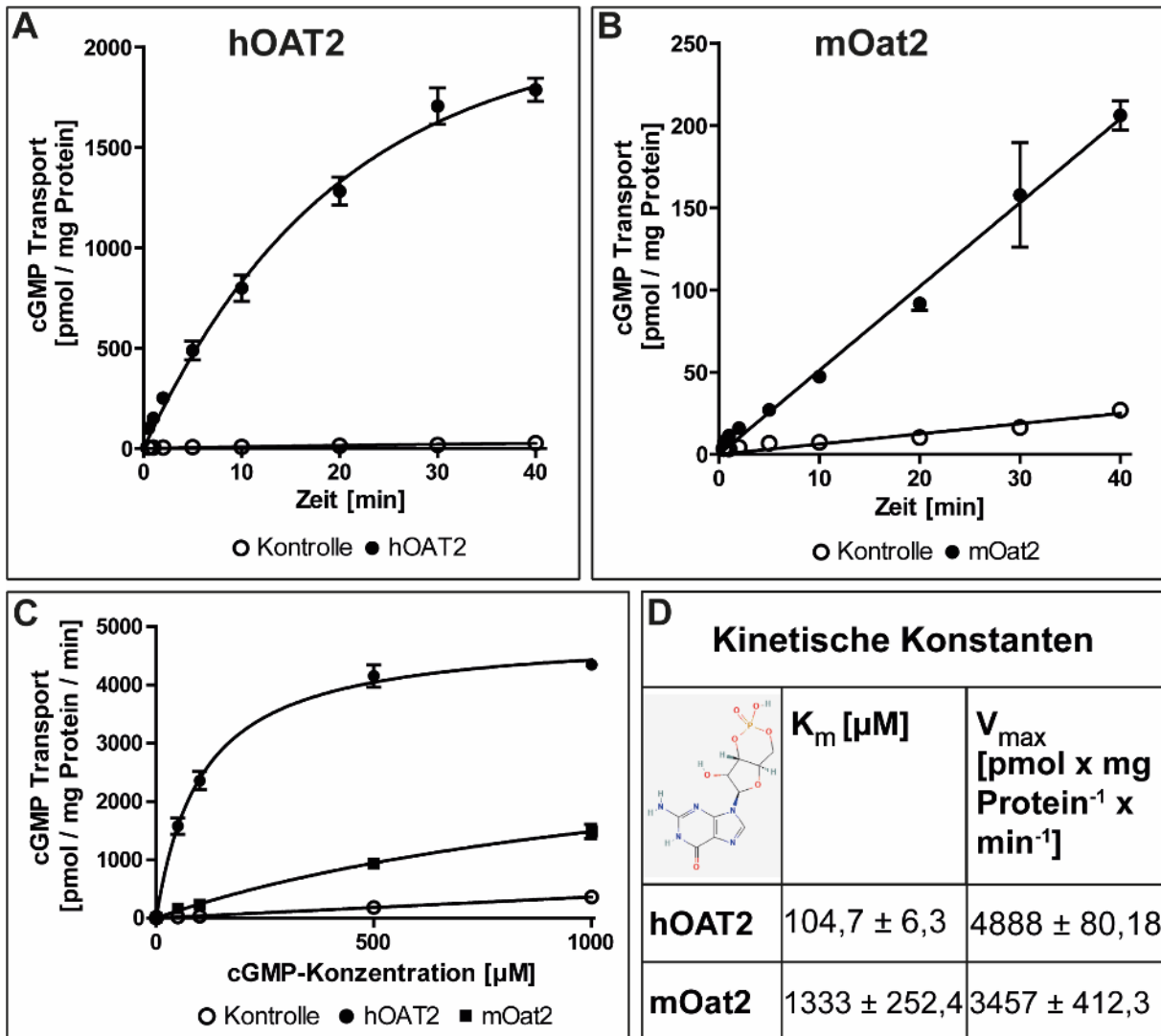


Abbildung 12: Zeit- und konzentrationsabhängiger cGMP Transport durch hOAT2 und mOat2

hOAT2- bzw. mOat2-exprimierende HEK293 Zellen bzw. Kontrollzellen wurden mit $2 \mu\text{M}$ cGMP für 30 s, 1 min, 2 min, 5 min, 10 min, 20 min, 30 min und 40 min inkubiert (A, B). Für die konzentrationsabhängigen Transportversuche (C) wurde eine Inkubationszeit im linearen Anstieg der zeitabhängigen Transporte von 5 Minuten und die folgenden cGMP Konzentrationen gewählt: $0,5 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$, $500 \mu\text{M}$ und $1000 \mu\text{M}$. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde jeweils die intrazelluläre cGMP Konzentration gemessen. Die Versuche wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt und die kinetischen Konstanten K_m und V_{max} bestimmt (D). cGMP Strukturformel: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cyclic-guanosine-monophosphate#section=2D-Structure>

Um zu überprüfen, ob cGMP durch hOAT2 bidirektional transportiert werden kann, wurde eine Messung des Effluxes von cGMP mit der hOAT2-exprimierenden und der Kontrollzelllinie durchgeführt (s. Abb. 13).

In Abwesenheit eines Inhibitors wurde in den hOAT2-exprimierenden Zellen ein zeitabhängiger Anstieg in der cGMP Konzentration im Überstand gemessen. In Anwesenheit des Inhibitors wurde dieser Anstieg nicht beobachtet (s. Abb. 13 A). Die intrazelluläre cGMP Konzentration (s. Abb. 13 B) war in den Kontrollzellen sowohl mit als auch ohne Inhibitorbehandlung sehr niedrig. In den hOAT2-exprimierenden Zellen wurden sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit des Inhibitors hohe intrazelluläre cGMP Konzentrationen gemessen. Dennoch war eine signifikante Steigerung der intrazellulären cGMP Konzentration in den mit Inhibitor behandelten im Vergleich zu den ohne Inhibitor behandelten hOAT2-exprimierenden Zellen zu beobachten.

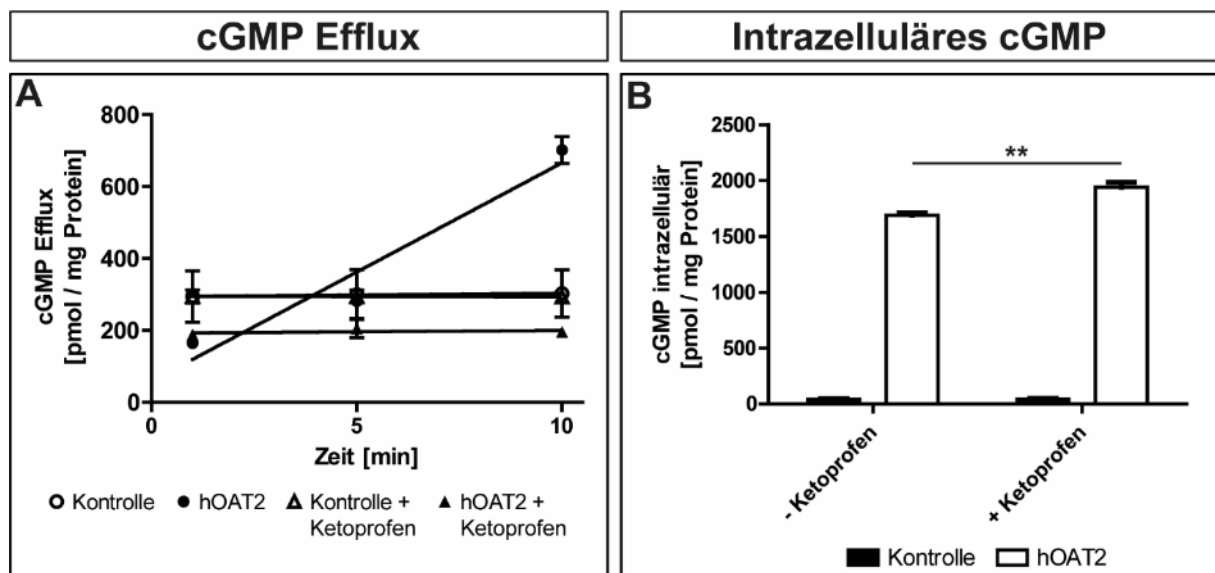


Abbildung 13: Bidirektionaler Transport von cGMP durch hOAT2

hOAT2-exprimierende HEK293 Zellen und Kontrollzellen wurden für 1 Stunde mit cGMP (2 μ M) vorbeladen und anschließend mit neuem Puffer oder neuem Puffer und dem hOAT2-Inhibitor Ketoprofen versetzt. Die cGMP Konzentration im Überstand wurde nach 1, 5 und 10 Minuten gemessen (A). Nach Ablauf der 10 Minuten wurde außerdem die intrazelluläre cGMP Konzentration bestimmt (B). Die Versuche wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt. Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet (*).

Um zu untersuchen, ob außer hOAT2 noch weitere sinusoidale Aufnahmetransporter in der humanen Leber cGMP transportieren können, wurden cGMP Transportversuche mit Zelllinien, die jeweils einen der für den Anzeinstofftransport hauptverantwortlichen 8 humanen sinusoidalen Aufnahmetransporter exprimierten, sowie der Kontrollzelllinie durchgeführt.

Alle Zelllinien wurden zunächst mittels Immunfluoreszenz mit einem jeweils gegen den von der Zelllinie exprimierten Transporter gerichteten Antikörper im Vergleich zu den Kontrollzellen gefärbt, um die Expression des jeweiligen Transporters in jeder der Zelllinien nachzuweisen. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz sind in Abbildung 14 A-H dargestellt. Jede der 8 Zelllinien zeigte eine deutliche Färbung des jeweiligen Transporters in den Zellmembranen, während die Kontrollzellen keine Färbung der 8 Transporter erkennen ließen.

Im Transportversuch mit cGMP zeigten nur die hOAT2-exprimierenden Zellen einen signifikanten Anstieg in der intrazellulären cGMP Konzentration im Vergleich zu den Kontrollzellen (s. Abb. 14 I). Die intrazelluläre cGMP Konzentration war hierbei, wie schon zuvor beobachtet (s. Abb. 11), nach 10 Minuten deutlich höher als nach 1 Minute Inkubationszeit. Keine der anderen 7 Zelllinien zeigte einen Anstieg der intrazellulären cGMP Konzentration. Lediglich die hOCT1- und die hOCT3-exprimierenden Zellen zeigten nach 10 Minuten Inkubation eine signifikante Reduktion der intrazellulären cGMP Konzentration im Vergleich zu den 10 Minuten inkubierten Kontrollzellen. Die hOAT2-exprimierende Zelllinie war demnach von allen untersuchten Zelllinien die einzige, welche einen Transport von cGMP zeigte.

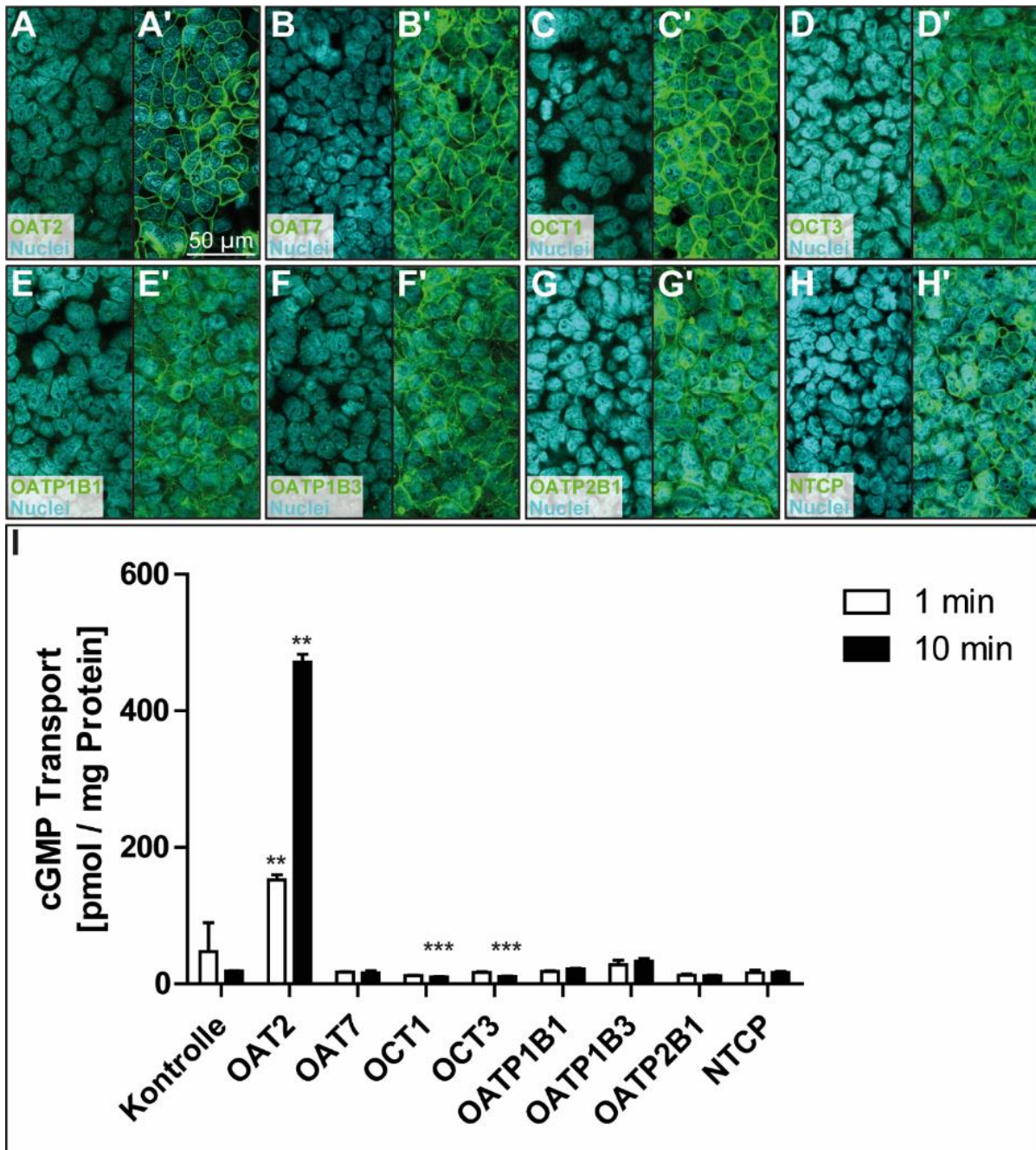


Abbildung 14: hOAT2 transportiert cGMP als einziger sinusoidaler Aufnahmetransporter

Es wurden Immunfluoreszenzfärbungen und Transportversuche mit 8 Zelllinien, welche jeweils einen sinusoidalen Aufnahmetransporter exprimierten, und der Kontrollzelllinie durchgeführt. Die Färbungen der Transporter-exprimierenden Zellen (A', B', C', D', E', F', G', H') und der Kontrollzelllinie (A, B, C, D, E, F, G, H) wurden mit Antikörpern, welche gegen die von den Zelllinien exprimierten Transporter gerichtet waren (s. Tab. 6), durchgeführt. Die Zellkerne wurden mittels Hoechst 34580 angefärbt (Nuclei, blaue Färbung). Für den Transportversuch wurden die Zellen mit 10 µM cGMP für 1 und 10 Minuten inkubiert und anschließend die intrazellulären cGMP Konzentrationen gemessen. Die Versuche wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt (I). Signifikante Unterschiede (getestet gegen die Kontrollzellen) sind gekennzeichnet (*).

ii Xanthin als prototypisches Substrat von hOAT2

Xanthin wurde von Yamada und Kollegen als prototypisches Substrat von hOAT2 erwähnt (Yamada et al. 2014), der zeit- und konzentrationsabhängige Transport dieses Substrates durch hOAT2 wurde allerdings bisher nicht gezeigt. Zur umfassenden Untersuchung des Transportes von Xanthin durch hOAT2, sowie zur Klärung, ob auch mOat2 Xanthin transportieren kann, wurden verschiedene Transportversuche mit den hOAT2- bzw. mOat2-exprimierenden Zelllinien und Xanthin durchgeführt.

Zunächst wurde ein Transportversuch durchgeführt, um zu testen, ob beide Transporter-exprimierenden Zelllinien Xanthin transportieren (s. Abb. 15 A). Die hOAT2-exprimierenden Zellen zeigten nach beiden Inkubationszeiten einen signifikanten Anstieg der intrazellulären Xanthin Konzentration im Vergleich zu den Kontrollzellen, wobei die Xanthin Konzentration nach 10 Minuten höher war als nach 1 Minute. Die mOat2-exprimierenden Zellen zeigten keinen Anstieg der intrazellulären Xanthin Konzentration im Vergleich zu den Kontrollzellen, mOat2 zeigte demnach keinen Xanthin Transport.

Da nur hOAT2 Xanthin transportierte, wurde nur hierfür die Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit bestimmt (s. Abb. 15 B-D). Die hOAT2-exprimierenden Zellen zeigten einen deutlichen, zeitabhängigen, die Kontrollzellen nur einen marginalen Anstieg der intrazellulären Xanthin Konzentration (s. Abb. 15 B). Der Anstieg in den hOAT2-exprimierenden Zellen zeigte mit steigender Inkubationszeit eine eintretende Sättigung. Die hOAT2-exprimierenden Zellen zeigten außerdem einen konzentrationsabhängigen Anstieg in der intrazellulären Xanthin Konzentration, welcher mit steigender Konzentration schwächer wurde (s. Abb. 15 C). Die Kontrollzellen zeigten einen nur marginalen Anstieg in der intrazellulären Xanthin Konzentration. Es wurden folgende kinetischen Konstanten bestimmt (s. Abb. 15 D): K_m -Wert: $211,9 \pm 71,7 \mu\text{M}$, V_{max} -Wert: $1006 \pm 141,2 \text{ pmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

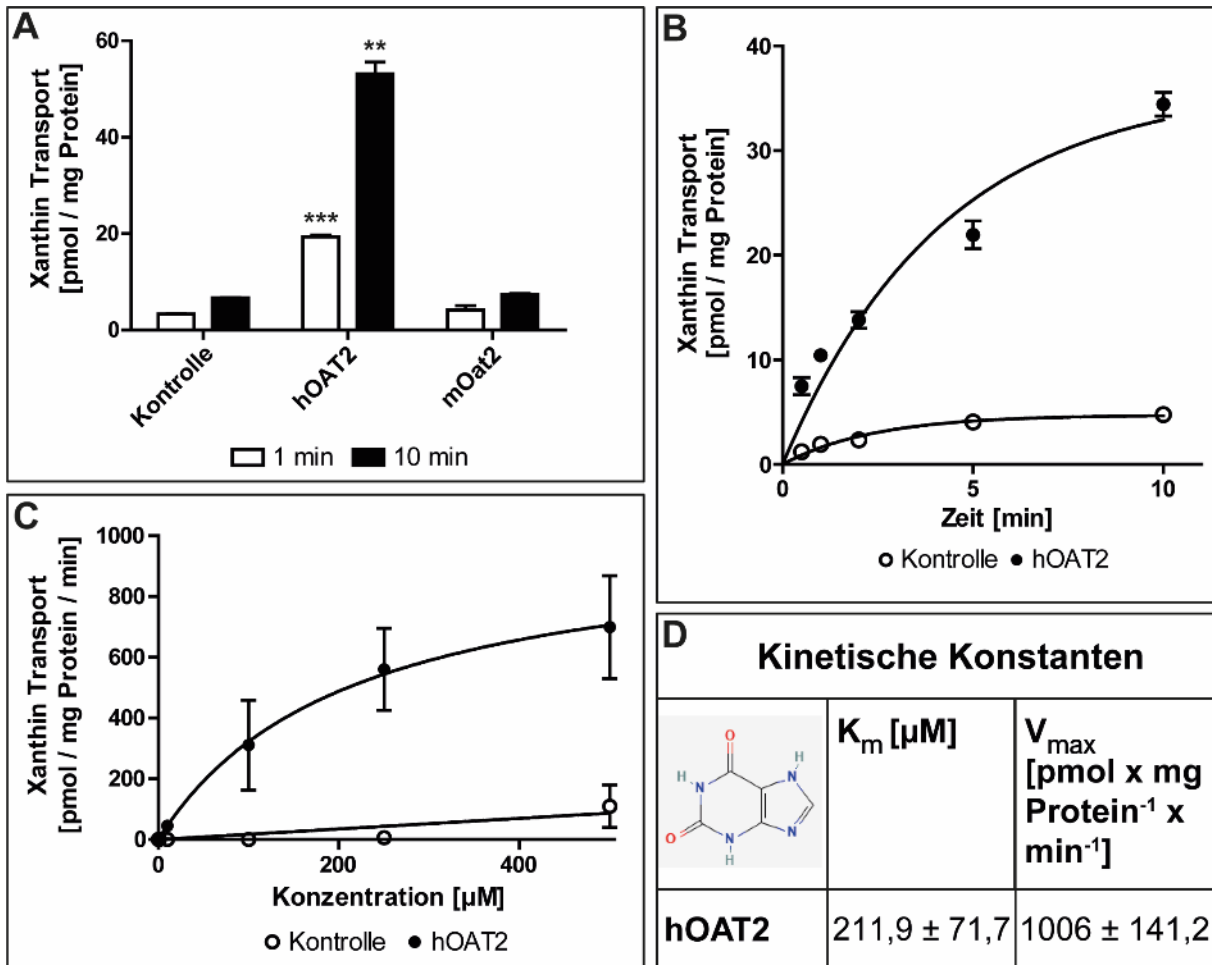


Abbildung 15: hOAT2, aber nicht mOat2 transportiert Xanthin zeit- und konzentrationsabhängig

hOAT2- bzw. mOat2-exprimierende HEK293 Zellen bzw. Kontrollzellen wurden mit 1 µM Xanthin für 1 und 10 Minuten inkubiert und anschließend die intrazellulären Xanthin Konzentrationen gemessen. Der Versuch wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt (A). Die Zellen wurden außerdem mit 1 µM Xanthin für 30 s, 1 min, 2 min, 5 min und 10 min inkubiert und anschließend die intrazellulären Xanthin Konzentrationen gemessen (B). Weiterhin wurden die Zellen für 1 Minute mit den folgenden Xanthin Konzentrationen inkubiert: 0,1 µM, 1 µM, 10 µM, 100 µM, 250 µM und 500 µM und nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die intrazelluläre Xanthin Konzentration gemessen (C). Die in B und C gezeigten Versuche wurden zweimal jeweils als Dreifachbestimmung durchgeführt. Mithilfe der Ergebnisse aus C wurden die kinetischen Konstanten K_m und V_{max} bestimmt (D). Signifikante Unterschiede (getestet gegen die Kontrollzellen) sind gekennzeichnet (*). Xanthin Strukturformel: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1188#section=2D-Structure>

Um herauszufinden ob außer hOAT2 noch weitere sinusoidale Aufnahmetransporter in der humanen Leber Xanthin transportieren können, wurden Xanthin Transportversuche mit Zelllinien, die jeweils einen der der für den Arzneistofftransport hauptverantwortlichen 8 humanen sinusoidalen Aufnahmetransporter exprimierten (s. Abb. 14 A-H), sowie der Kontrollzelllinie durchgeführt. Einzig die hOAT2-exprimierenden Zellen zeigten hierbei einen im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikanten Anstieg der intrazellulären Xanthin Konzentration (s. Abb. 16). Hierbei war die intrazelluläre Xanthin Konzentration nach 10 Minuten deutlich höher als nach 1 Minute. Die anderen 7 Zelllinien zeigten keinen Anstieg der intrazellulären Xanthin Konzentration nach 1 oder 10 Minuten. Wie schon zuvor für cGMP als Substrat beschrieben, war von allen untersuchten Zelllinien die hOAT2-exprimierende Zelllinie die einzige, welche einen Transport von Xanthin ermöglichte.

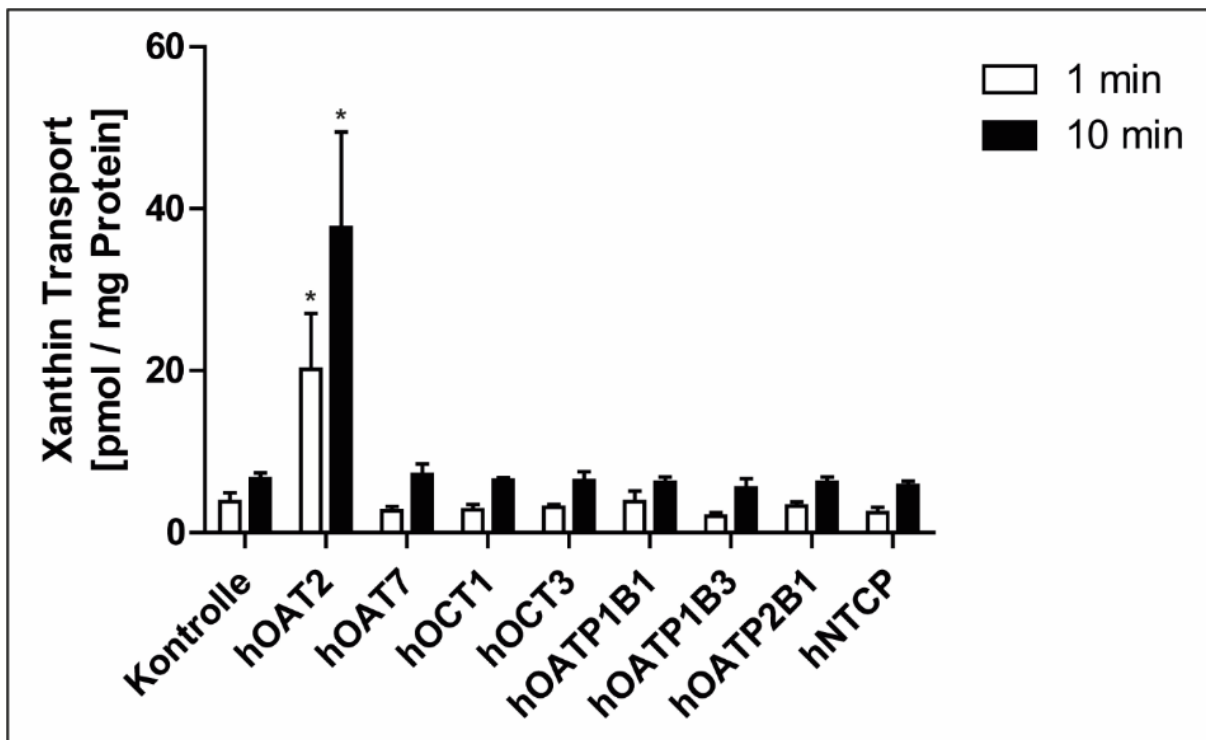


Abbildung 16: hOAT2 transportiert Xanthin als einziger sinusoidaler Aufnahmetransporter

Transporter-exprimierende HEK293 Zellen sowie Kontrollzellen wurden mit 1 μ M Xanthin für 1 und 10 Minuten inkubiert und anschließend die intrazellulären Xanthin Konzentrationen bestimmt. Der Versuch wurde zweimal als Dreifachbestimmung durchgeführt. Signifikante Unterschiede (getestet gegen die Kontrollzellen) sind gekennzeichnet (*).

3.1.1.3 Identifizierung neuer endogener hOAT2 / mOat2 Substrate

Zur Identifizierung neuer endogener Substrate für die Transportproteine hOAT2 und mOat2 wurden Transportversuche mit den hOAT2- bzw. mOat2-exprimierenden Zelllinien sowie der Kontrollzelllinie und verschiedenen Pterinen durchgeführt. Da zuvor schon gezeigt wurde, dass die in der Niere exprimierten organischen Anionentransporter OAT1 und OAT3 Dihydrobiopterin und Tetrahydrobiopterin transportieren und damit vermutlich die Aufnahme der Substanzen in die Niere vermitteln (Ohashi et al. 2016; Ohashi et al. 2017), vermuteten wir, dass OAT2 diese Aufgabe in der Leber übernimmt. Es wurden die 5 Pterine Neopterin, Dihydroneopterin, Biopterin, Dihydrobiopterin und Tetrahydrobiopterin in Abwesenheit sowie in Anwesenheit des hOAT2 / mOat2-Inhibitors BSP getestet (s. Abb. 17).

Zusammengefasst konnten mittels des Transportversuches zeitabhängige Anstiege sowohl der intrazellulären Neopterin-, Biopterin- und Dihydrobiopterin Konzentrationen von hOAT2- und mOat2-exprimierenden Zellen als auch der intrazellulären Dihydroneopterin- und Tetrahydrobiopterin Konzentrationen von hOAT2-exprimierenden Zellen nachgewiesen werden. Dieser Neopterin-, Biopterin- und Dihydrobiopterin Transport durch hOAT2- und mOat2-exprimierende Zellen sowie der Dihydroneopterin- und Tetrahydrobiopterin Transport durch hOAT2-exprimierende Zellen konnte in allen Fällen durch den hOAT2 / mOat2-Inhibitor BSP gehemmt werden. Die genauen Ergebnisse für die einzelnen Substanzen sind nachfolgend beschrieben.

Für Neopterin (s. Abb. 17 A) zeigten die hOAT2-exprimierenden Zellen nach 1 und 10 Minuten, die mOat2-exprimierenden Zellen nach 10 Minuten einen signifikanten Anstieg der intrazellulären Konzentration im Vergleich zu den Kontrollzellen, wobei die intrazelluläre Neopterin Konzentration in den mOat2-exprimierenden Zellen deutlich geringer war als in den hOAT2-exprimierenden Zellen. Wurden die Transporter-exprimierenden Zellen mit Inhibitor inkubiert, zeigten die hOAT2-Zellen einen signifikanten Rückgang der intrazellulären Neopterin Konzentration im Vergleich zur Abwesenheit des Inhibitors nach 1 und 10 Minuten, die mOat2-Zellen nur nach 10 Minuten Inkubationszeit.

Für Dihydroneopterin (s. Abb. 17 B) zeigten die hOAT2-exprimierenden Zellen, aber nicht die mOat2-exprimierenden Zellen, einen signifikanten Anstieg der intrazellulären Konzentration im Vergleich zu den Kontrollzellen nach 1 und 10 Minuten. Wurden die hOAT2-exprimierenden Zellen mit Inhibitor inkubiert, zeigten sie einen signifikanten

Rückgang der intrazellulären Dihydroneopterin Konzentration im Vergleich zur Abwesenheit des Inhibitors nach 1 und 10 Minuten Inkubationszeit.

Für Biopterin (s. Abb. 17 C) zeigten die hOAT2- und die mOat2-exprimierenden Zellen einen signifikanten Anstieg in der intrazellulären Konzentration im Vergleich zu den Kontrollzellen nach 1 und 10 Minuten, wobei die intrazelluläre Neopterin Konzentration in den mOat2-exprimierenden Zellen deutlich geringer war als in den hOAT2-exprimierenden Zellen. Wurden die Transporter-exprimierenden Zellen mit Inhibitor inkubiert, zeigten sie bei beiden Zelllinien einen signifikanten Rückgang der intrazellulären Biopterin Konzentration im Vergleich zur Abwesenheit des Inhibitors nach 1 und 10 Minuten Inkubationszeit.

Für Dihydrobiopterin (s. Abb. 17 D) zeigten die hOAT2- und die mOat2-exprimierenden Zellen einen signifikanten Anstieg der intrazellulären Konzentration im Vergleich zu den Kontrollzellen nach 10 Minuten, nicht aber nach 1 Minute Inkubationszeit. Die intrazelluläre Dihydrobiopterin Konzentration war hierbei in den mOat2-exprimierenden Zellen deutlich geringer als in den hOAT2-exprimierenden Zellen. Wurden die Transporter-exprimierenden Zellen mit Inhibitor inkubiert, zeigten sie einen signifikanten Rückgang der intrazellulären Dihydrobiopterin Konzentration im Vergleich zur Abwesenheit des Inhibitors nach 10 Minuten, nicht aber nach 1 Minute Inkubationszeit.

Für Tetrahydrobiopterin (s. Abb. 17 E) zeigten nur die hOAT2-exprimierenden Zellen, aber nicht die mOat2-exprimierenden Zellen einen signifikanten Anstieg der intrazellulären Konzentration im Vergleich zu den Kontrollzellen nach 10 Minuten, nicht aber nach 1 Minute Inkubationszeit. Die mOat2-exprimierenden Zellen zeigten nach 1 Minute, nicht aber nach 10 Minuten eine signifikante Reduktion in der intrazellulären Tetrahydrobiopterin Konzentration im Vergleich zu den Kontrollzellen. Wurden die hOAT2-exprimierenden Zellen mit Inhibitor inkubiert, zeigten sie einen signifikanten Rückgang der intrazellulären Tetrahydrobiopterin Konzentration im Vergleich zur Abwesenheit des Inhibitors nach 1 und 10 Minuten Inkubationszeit.

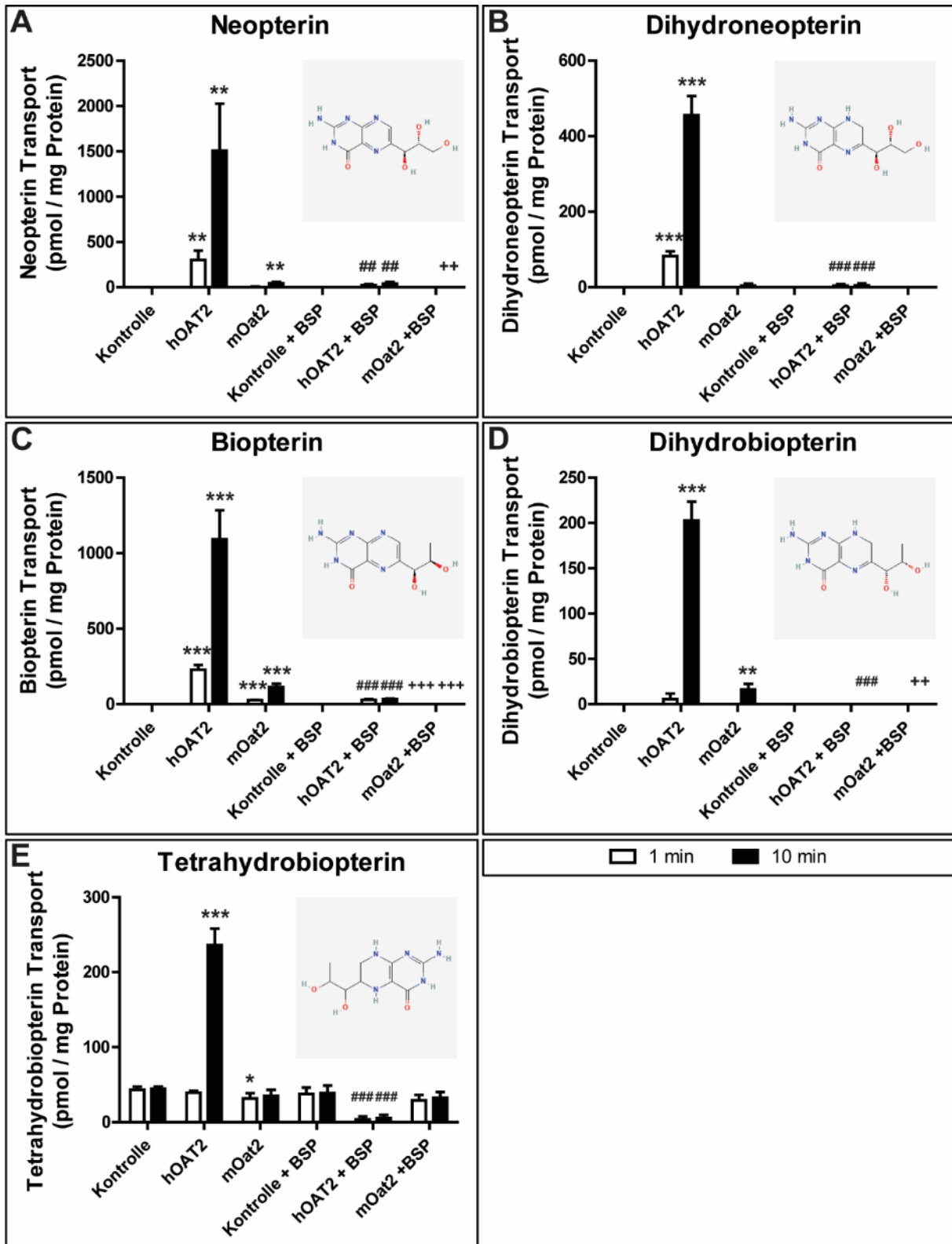


Abbildung 17: hOAT2 und mOat2 transportieren verschiedene Pterine
 hOAT2- bzw. mOat2-exprimierende HEK293 Zellen bzw. Kontrollzellen wurden entweder nur mit dem jeweiligen Pterin (10 μ M) oder mit dem jeweiligen Pterin und dem hOAT2 / mOat2-Inhibitor BSP (100 μ M) für 1 und 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die intrazelluläre Konzentration des jeweiligen Pterins mittels Massenspektrometrie gemessen. Die Versuche wurden jeweils zweimal als Dreifachbestimmung durchgeführt. Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet

(* = getestet gegen Kontrollzellen, # = getestet gegen hOAT2-exprimierende Zellen ohne BSP, + = getestet gegen mOat2-exprimierende Zellen ohne BSP).
Strukturformeln:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/135398721#section=2D-Structure>,

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/135398602#section=2D-Structure>,

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/135449517#section=2D-Structure>,

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/135398687#section=2D-Structure>,

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/135402045#section=2D-Structure>

Da Neopterin eine klinisch wichtige Rolle in der Immunreaktion des Menschen spielt und in Patienten mit Autoimmunkrankheiten oder Krebsleiden erhöhte Neopterinspiegel gemessen wurden (Asano et al. 1997; Kohlmeier 2015; Prasanna et al. 2017), sollte der Neopterin Transport durch hOAT2 umfassend charakterisiert werden. Hierfür wurden zeit- und konzentrationsabhängige Transportversuche durchgeführt (s. Abb. 18). Die hOAT2-exprimierenden Zellen zeigten einen deutlichen, zeitabhängigen Anstieg der intrazellulären Neopterin Konzentration, welcher mit steigender Inkubationszeit eine Sättigung erreichte, die Kontrollzellen zeigten einen solchen Anstieg nicht (s. Abb. 18 A).

Für den konzentrationsabhängigen Transportversuch wurden Neopterin Konzentrationen bis 50 μM gewählt, höhere Konzentrationen konnten aufgrund der begrenzten Löslichkeit von Neopterin in DMSO nicht getestet werden. Die hOAT2-exprimierenden Zellen zeigten einen deutlichen, konzentrationsabhängigen Anstieg der intrazellulären Neopterin Konzentration, allerdings konnte mit den getesteten Konzentrationen keine Sättigung des Transportes erreicht werden (s. Abb. 18 B). Die Kontrollzellen zeigten keinen Anstieg in der intrazellulären Neopterin Konzentration. Aufgrund der nicht erreichten Sättigung konnten mithilfe des konzentrationsabhängigen Transportversuches keine kinetischen Konstanten für hOAT2 bestimmt werden. Es ist davon auszugehen, dass der K_m -Wert über der höchsten getesteten Konzentration von 50 μM liegt.

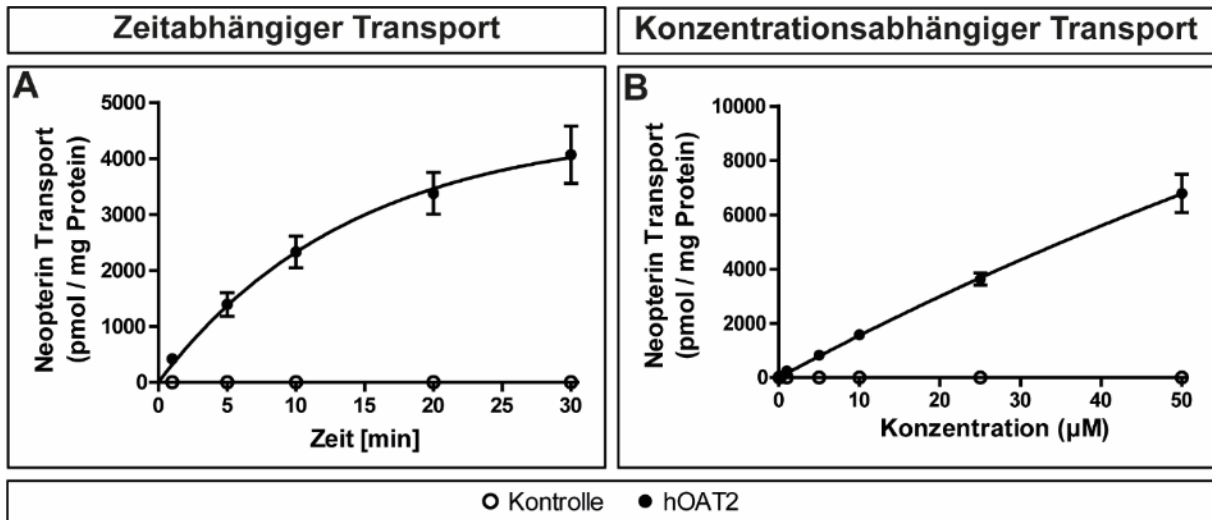


Abbildung 18: Zeit- und konzentrationsabhängiger Transport von Neopterin durch hOAT2

hOAT2-exprimierende HEK293 Zellen bzw. Kontrollzellen wurden mit 10 µM Neopterin für 1 min, 5 min, 10 min, 20 min und 30 min inkubiert (A). Die Zellen wurden außerdem für 5 Minuten mit den folgenden Neopterin Konzentrationen inkubiert: 0,1 µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM und 50 µM (B). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die intrazelluläre Neopterin Konzentration mittels Massenspektrometer bestimmt. Die Versuche wurden jeweils zweimal als Dreifachbestimmung durchgeführt.

3.1.2 Zelltypspezifische hepatische Expression von hOAT2, anderen cGMP Transportproteinen und wichtigen cGMP Signalwegkomponenten

hOAT2 scheint der einzige hepatische sinusoidale Aufnahmetransporter für cGMP im Menschen zu sein (s. Abb. 14). Welche Rolle hOAT2 aber im cGMP Signalweg spielt und welchen Stellenwert das Transportprotein in diesem Signalweg einnimmt, ist bisher nicht geklärt. Zur Untersuchung des cGMP Signalweges in humaner Leber wurde die Expression von cGMP Signalwegkomponenten und cGMP Transportproteinen in drei verschiedenen Leberzelltypen untersucht. Hierfür wurde mithilfe von Human Transcriptome 2.0 Arrays eine genomweite Genexpressionsanalyse von primären humanen sinusoidalen Endothelzellen sowie Ito-Zellen durchgeführt und die mRNA Expressionsdaten für verschiedene cGMP Signalwegkomponenten wurden aus den beiden Datensätzen extrahiert. Diese Zelltypen weisen beide eine Beteiligung am cGMP Signalweg der Leber auf und wurden daher für diesen Versuch als Vertreter der nicht-parenchymalen Leberzellen ausgewählt (Franko et al. 2018; Gracia-Sancho et al. 2021; Hall et al. 2019). Für die Analyse der Expression in primären humanen Hepatozyten wurden öffentlich zugängliche Daten eines Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays verwendet (Hart et al.

2010) (s. Abb. 19). Waren die log₂-Werte größer als 3, wurde von einer relevanten Expression des zugehörigen Gens ausgegangen.

Die Transkripte drei verschiedener Guanylatzyklasen, welche die Generierung von cGMP vermitteln, konnten in allen Zelltypen nachgewiesen werden. In den Ito-Zellen und in den sinusoidalen Endothelzellen konnten außerdem die Transkripte von 7 verschiedenen cGMP-degradierenden Phosphodiesterasen (PDEs) nachgewiesen werden, während in den Hepatozyten nur PDE3B, PDE9A und PDE11A exprimiert wurden.

Die Ito-Zellen und die sinusoidalen Endothelzellen wiesen mRNA von drei Untereinheiten der zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanäle (*cyclic nucleotide-gated channel*, CNG), die Hepatozyten lediglich die von CNGA1 auf. Die mRNA der cGMP-abhängigen Proteinkinasen PRKG1 und PRKG2 konnte wiederum nur in Ito-Zellen und sinusoidalen Endothelzellen nachgewiesen werden.

Die Transkripte des cGMP Effluxtransporters MRP4 (*ABCC4*) sowie des Aufnahmetransporters hOAT2 (*SLC22A7*) wurden in allen drei Zelltypen nachgewiesen, die Ito-Zellen und sinusoidalen Endothelzellen wiesen zusätzlich noch die Expression des Effluxtransporters MRP5 (*ABCC5*) auf.

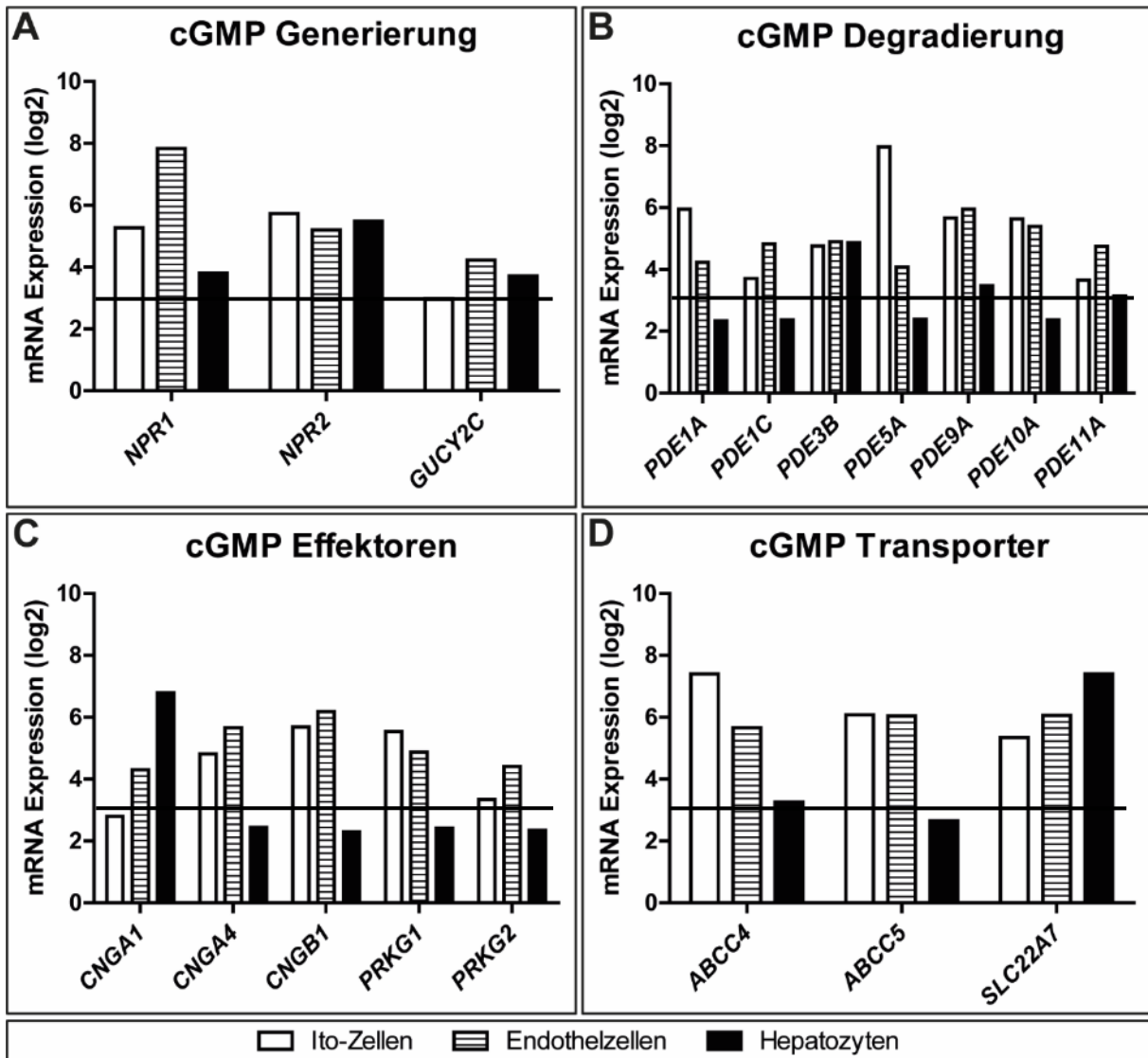


Abbildung 19: Zelltypspezifische Expression von Komponenten des cGMP Signalwegs in der Leber

Die mRNA Expression verschiedener cGMP Signalwegkomponenten und cGMP Transporter wurde in humanen primären Ito-Zellen und sinusoidalen Endothelzellen mittels Microarrays bestimmt. Pro Zelltyp wurde ein Microarray durchgeführt. Die so generierten Daten wurden mit von Hart und Kollegen beschriebenen RNA-Microarray Daten von primären humanen Hepatozyten verglichen (Hart et al. 2010). Es wurde die mRNA Expression verschiedener Gene, welche im Rahmen der cGMP Generierung (A, Guanylatzyklasen (*NPR*, *GUCY*)), der cGMP Degradierung (B, Phosphodiesterasen (*PDE*)) und des cGMP Transportes (D) eine Rolle spielen, sowie verschiedener cGMP Effektorgene (C, zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle (*CNG*), cGMP-abhängige Proteinkinasen, *PRKG*) untersucht. Waren die log₂-Werte größer als 3 (schwarze Linie), wurde von einer relevanten Expression des zugehörigen Gens ausgegangen.

3.1.3 *In vivo* Charakterisierung von mOat2 mittels einer neu generierten globalen mOat2-Knockout Mauslinie

3.1.3.1 Systematische Analyse der Expression von *Slc22a7* der Maus

Die Expression von *Slc22a7* der Maus wurde umfassend durch qPCR mithilfe des TissueScan Mouse Normal cDNA Arrays untersucht (s. Abb. 20). Hierbei handelt es sich um eine präparierte qPCR-Platte, in welcher sich definierte Mengen cDNA aus verschiedenen Mausgeweben und Organen befinden. Die stärkste *mSlc22a7* mRNA Expression wurde für das Leber- und Nierengewebe detektiert. Eine ungleich schwächere, aber dennoch erkennbare *mSlc22a7* mRNA Expression ließ sich in Hodengewebe finden. Die Expression in Hodengewebe war 19fach geringer als im Lebergewebe. In allen anderen Geweben wurde keine *mSlc22a7* mRNA detektiert.

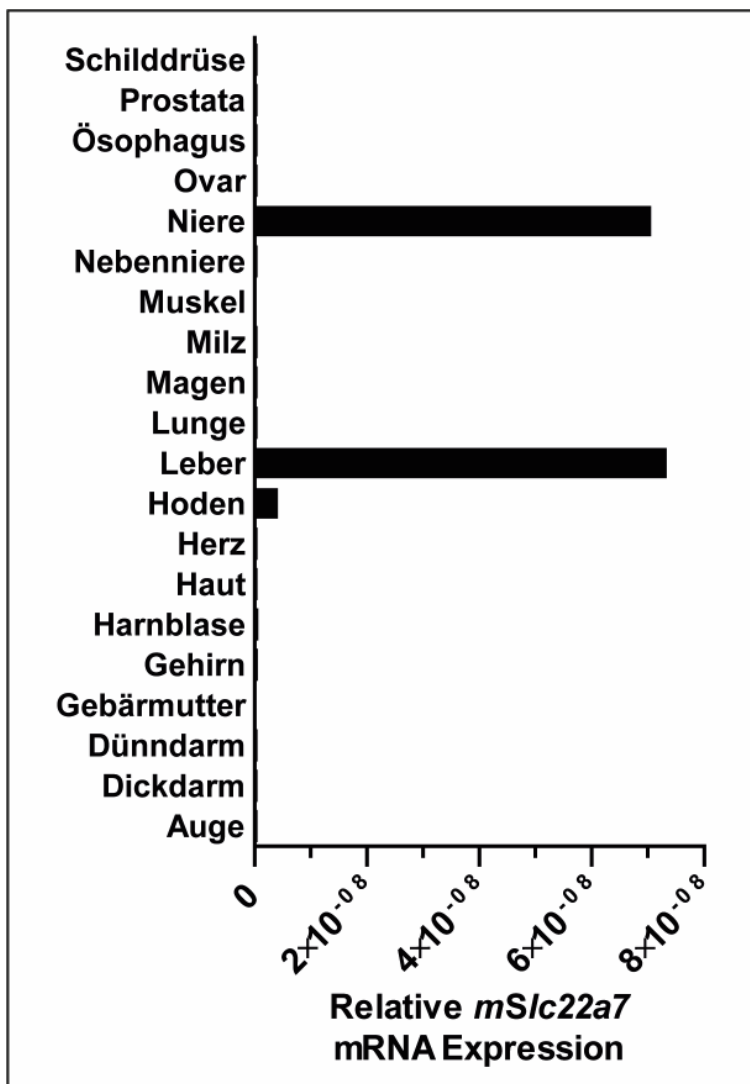


Abbildung 20: Gewebespezifische Expression von *mSlc22a7* in der Maus.

Eine qPCR mit dem *mSlc22a7* TaqMan Assay (Mm00460672_m1) wurde mit cDNA aus verschiedenen Mausgeweben und Organen durchgeführt. Die relative *mSlc22a7* mRNA Expression wurde mithilfe der Formel: 2^{-Ct} bestimmt.

3.1.3.2 Generierung und Etablierung der Mauslinie

Um die physiologische Rolle von OAT2 im Organismus zu untersuchen, wurde eine Mauslinie mit einem globalen Funktionsverlust von mOat2 etabliert (*mOat2-Knockout*). Hierfür wurde das Cre-Lox System genutzt, welches in Abschnitt 2.2.2.1 und Abbildung 4 schematisch erklärt wird. Die genaue Vorgehensweise bei der Generierung der Mauslinie ist ebenfalls in Abschnitt 2.2.2.1 beschrieben und eine schematische Darstellung in Abbildung 7 gezeigt.

Um die neu generierte Mauslinie zu charakterisieren, wurden jeweils 2-4 männliche und weibliche Kontrolltiere sowie heterozygote und homozygote *mOat2-Knockout* Tiere im Alter von 8, 16 und 24 Wochen begutachtet, gewogen, getötet und Blut sowie die Organe für verschiedene Analysen entnommen. Insgesamt wurden so 62 Tiere für die Charakterisierung der Mauslinie verwendet. Die Größe der einzelnen Versuchsgruppen ist in Tabelle 24 gezeigt. Da die Gruppengrößen mit teilweise nur 2 Tieren pro Gruppe relativ klein waren, wurde bei den mit dieser Mauslinie durchgeführten Versuchen keine statistische Auswertung durchgeführt. Die Tendenzen sind dennoch klar zu erkennen.

Tabelle 24: Größe der einzelnen Versuchsgruppen bei der Charakterisierung der mOat2-Knockout Mauslinie

Für die Charakterisierung der mOat2-Knockout Mauslinie wurden Blut und Organe von jeweils 2-4 Kontrolltieren bzw. heterozygoten sowie homozygoten *Knockout* Tieren im Alter von 8, 16 und 24 Wochen entnommen und für verschiedene Analysen verwendet. Dies geschah für das männliche sowie das weibliche Geschlecht, was eine Gesamtanzahl von 62 verwendeten Tieren ergab.

Alter der Tiere	Geschlecht der Tiere	Genotyp der Tiere	Anzahl Tiere
8 Wochen	Männchen	Kontrolltiere	4
		Heterozygoter KO	4
		Homozygoter KO	3
	Weibchen	Kontrolltiere	4
		Heterozygoter KO	4
		Homozygoter KO	2
16 Wochen	Männchen	Kontrolltiere	4
		Heterozygoter KO	4
		Homozygoter KO	2
	Weibchen	Kontrolltiere	4
		Heterozygoter KO	4
		Homozygoter KO	3
24 Wochen	Männchen	Kontrolltiere	3
		Heterozygoter KO	4
		Homozygoter KO	2
	Weibchen	Kontrolltiere	3
		Heterozygoter KO	4
		Homozygoter KO	4

3.1.3.3 Phänotypische Charakterisierung der Mauslinie

Für eine erste phänotypische Charakterisierung der Mauslinie wurden Körpergewicht und Lebergewicht der Mäuse sowie der Anteil des Lebergewichts am gesamten Körpergewicht bestimmt und die verschiedenen Versuchsgruppen hinsichtlich dieser Größen miteinander verglichen (s. Abb. 21).

Körper- sowie Lebergewicht stiegen mit zunehmendem Alter der Tiere unabhängig vom Genotyp der Versuchsgruppen an. Generell ließ sich trotz einiger geringfügiger Schwankungen in Körpergewicht, Lebergewicht oder Anteil des Lebergewichts am Körpergewicht weder bei den männlichen noch bei den weiblichen Tieren zu keinem der gewählten Zeitpunkte ein deutlicher Unterschied zwischen Kontrolltieren, heterozygoten *Knockout* Tieren und homozygoten *Knockout* Tieren erkennen.

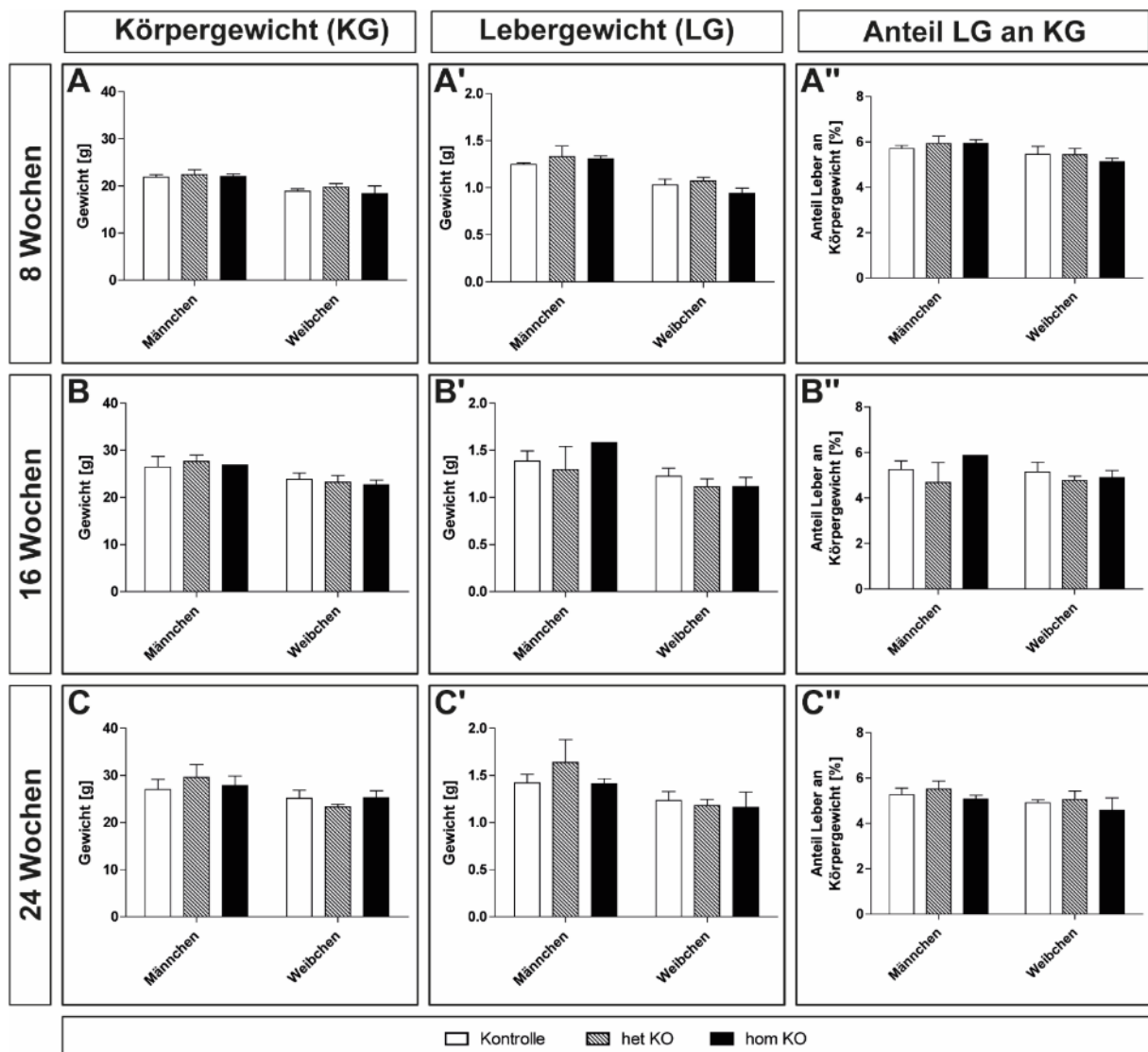


Abbildung 21: mOat2-Knockout Mäuse zeigen keine Auffälligkeiten in Körper- und Lebergewicht

Für eine erste phänotypische Charakterisierung der Mauslinie wurden Körpergewicht, Lebergewicht sowie der Anteil des Lebergewichts am gesamten Körpergewicht von jeweils 2-4 (s. Tab. 24) männlichen und weiblichen Kontrolltieren bzw. heterozygoten (het KO) sowie homozygoten mOat2-Knockout (hom KO) Tieren im Alter von 8, 16 und 24 Wochen bestimmt.

Die Lebern der Mäuse der verschiedenen Versuchsgruppen wurden daraufhin auf morphologische Unterschiede zwischen den Genotypen untersucht (s. Abb. 22). Die Lebern der Tiere wurden zunächst makroskopisch begutachtet. Hier konnten keine Unterschiede zwischen den Lebern der Kontrolltiere und denen der heterozygoten bzw. homozygoten mOat2-Knockout Tiere gefunden werden (exemplarisch gezeigt an 8 Wochen alten Tieren in Abb. 22 A).

FFPE-Gewebeschnitte des linken Leberlappens der 8 Wochen alten Kontroll- bzw. homozygoten mOat2-Knockout Tiere wurden daraufhin von der Abteilung für Mauspathologie der Universität Tübingen einer H&E-Färbung unterzogen und hinsichtlich ihrer Histologie begutachtet. Es ließen sich keine Unterschiede in der Leberhistologie zwischen den Kontrolltieren und den homozygoten mOat2-Knockout-Tieren erkennen (exemplarisch an jeweils einem Kontroll- bzw. homozygoten Knockout Tier gezeigt in Abb. 22 B u. C).

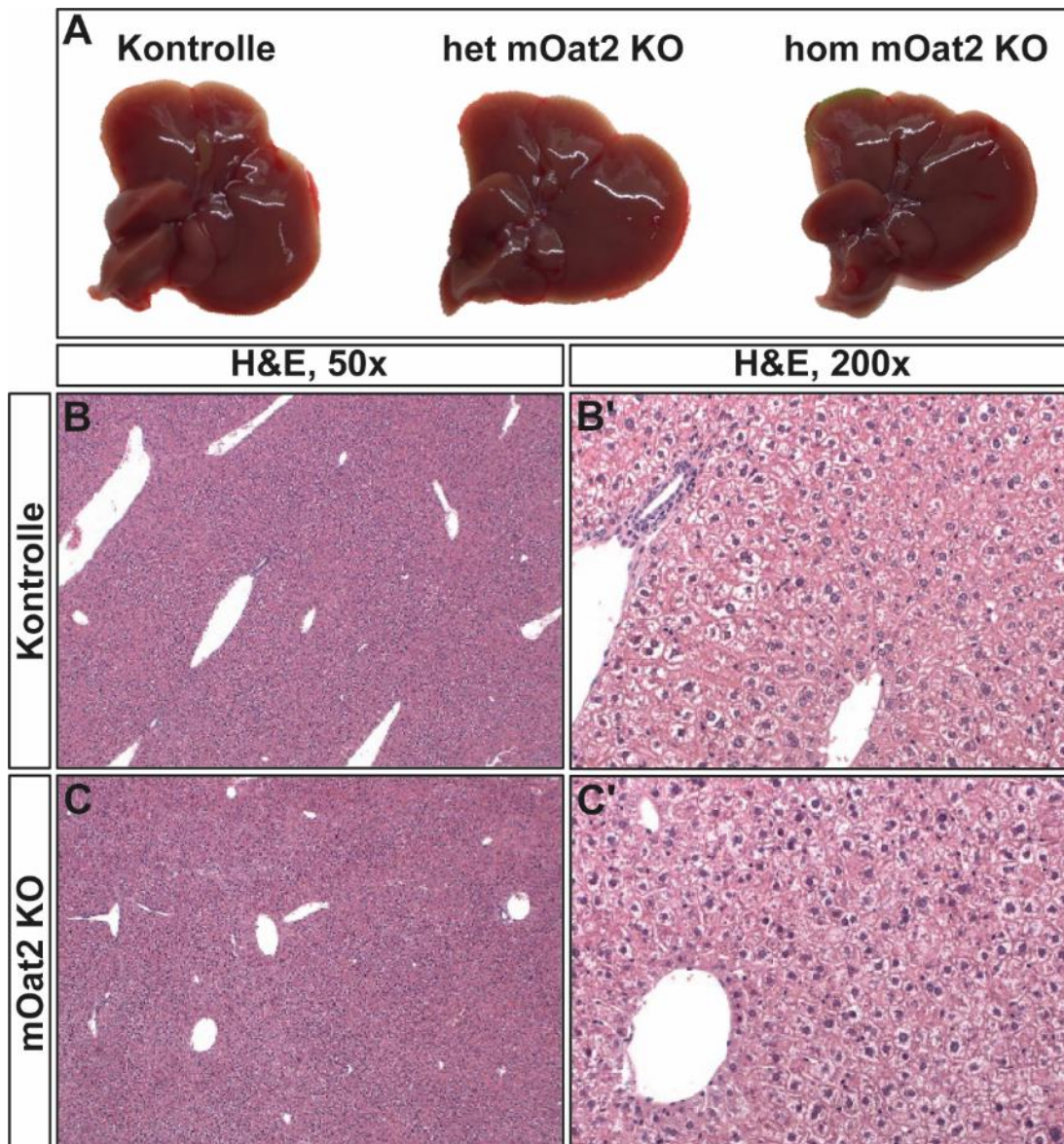


Abbildung 22: Unauffällige Leberhistologie bei mOat2-Knockout Mäusen
 Lebern von jeweils 2-4 (s. Tab. 24) männlichen und weiblichen Kontrolltieren bzw. heterozygoten (het mOat2 KO) sowie homozygoten (hom mOat2 KO) mOat2-Knockout Tieren im Alter von 8, 16 und 24 Wochen wurden entnommen und hinsichtlich ihrer Morphologie begutachtet (A, 8 Wochen alte Tiere). Aus dem linken Leberlappen der 8 Wochen alten Kontroll- bzw. homozygoten mOat2-Knockout Tieren wurden FFPE-Gewebeschnitte hergestellt, mit welchen von der Abteilung für Mauspathologie der Universität Tübingen eine H&E-Färbung durchgeführt wurde (B, C, Bilder zur Verfügung gestellt von der Abteilung für Mauspathologie der Universität Tübingen).

3.1.3.4 Klinische Chemie von Kontroll- und mOat2-Knockout Mäusen

Zur weiteren Charakterisierung der mOat2-Knockout Mauslinie wurde vor der Organentnahme Citratplasma aus den Mäusen der verschiedenen Versuchsgruppen gewonnen. Im Citratplasma wurden im Zentrallabor des Robert-Bosch-Krankenhauses daraufhin 12 verschiedene Plasma-Parameter von den männlichen und weiblichen 8 Wochen alten Kontroll- und homozygoten mOat2-Knockout Mäusen bestimmt (s. Abb. 23). Als Parameter waren Gesamtprotein, Albumin, Kreatinin, Harnstoff, Harnsäure, Triglyceride, Bilirubin, Aspartat-Aminotransferase, Alanin-Aminotransferase, Laktat-Dehydrogenase, γ -Glutamyltransferase sowie alkalische Phosphatase gewählt worden. Bei beiden Geschlechtern ließ sich für keinen der bestimmten Parameter ein Unterschied zwischen Kontroll- und homozygoten mOat2-Knockout Mäusen erkennen.

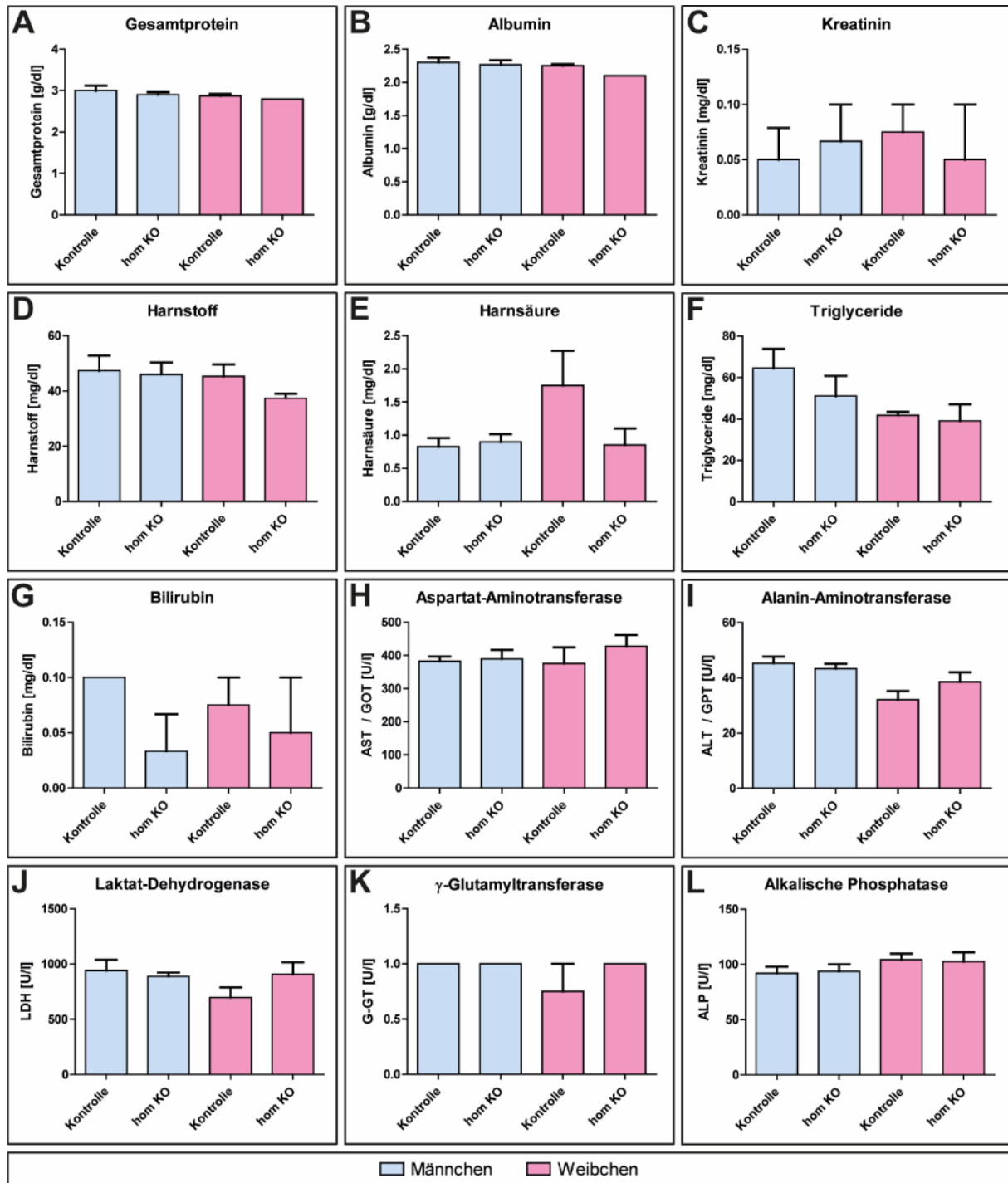


Abbildung 23: Unauffällige klinisch-chemische Parameter bei mOat2-Knockout Mäusen

Citratplasma wurde von jeweils 2-4 (s. Tab. 24) männlichen (blau) und weiblichen (rosa) Kontrolltieren bzw. homozygoten mOat2-Knockout (hom KO) Tieren im Alter von 8 Wochen entnommen und im Zentrallabor des Robert-Bosch-Krankenhauses 12 verschiedene Laborparameter mit diesem bestimmt.

3.1.3.5 Umfassende Charakterisierung der Mauslinie mittels verschiedener molekularbiologischer Methoden

Um die neu generierte *mOat2-Knockout* Mauslinie umfassend zu charakterisieren, wurden die Organe der Mäuse der verschiedenen Versuchsgruppen für unterschiedliche Analysen eingesetzt. Die Mauslinie wurde so auf DNA, RNA sowie Proteinebene mit verschiedenen molekularbiologischen Methoden auf ihre *mOat2* Expression untersucht.

i Charakterisierung der Mauslinie auf DNA Ebene

Um zu überprüfen, ob die *mOat2-Knockout* Mäuse wie erwartet den konstitutiven *Knockout* von *mOat2* aufwiesen, wurden verschiedene Gewebe genotypisiert. Die Ergebnisse der Gewebegenotypisierung sind exemplarisch am Beispiel jeweils einer männlichen, 8 Wochen alten Kontroll-, heterozygoten *Knockout* und homozygoten *Knockout* Maus in Abbildung 24 dargestellt. Es wurden für jedes Gewebe zwei PCR Reaktionen angesetzt, welche zum einen der Bestimmung des *Actb-Cre*-Genotyps und zum anderen der Bestimmung des *mOat2*-Genotyps dienen sollten.

Alle Gewebe der Kontrollmäuse konnten mittels beider PCRs als wildtypisch für *Actb-Cre* und *mOat2* bestimmt werden. Die Gewebe der heterozygoten *Knockout*-Mäuse zeigten ebenfalls die wildtypische *Actb-Cre* Bande, für *mOat2* zeigten alle Gewebe sowohl die Wildtyp als auch die *Knockout* Bande. Die homozygoten *Knockout* Mäuse wiesen in allen Geweben den *Actb-Cre*-Wildtyp und den *mOat2-Knockout* auf.

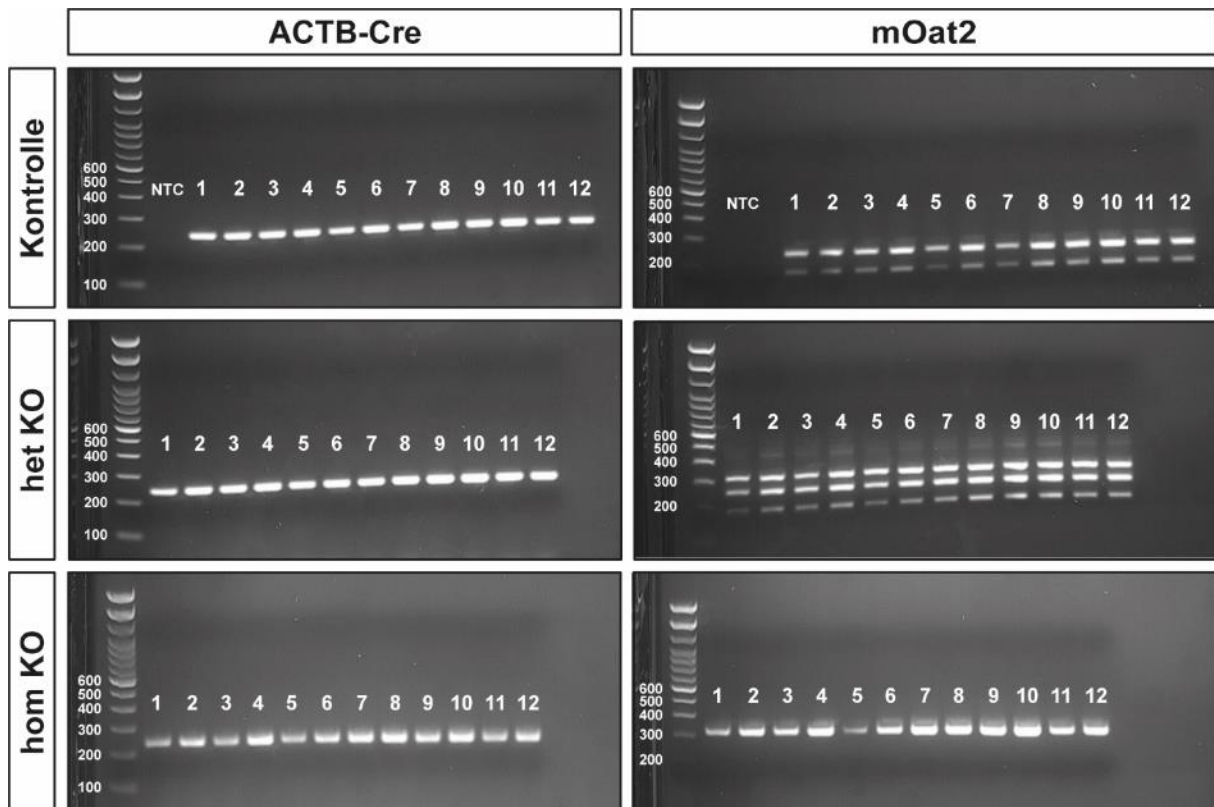


Abbildung 24: Genotypisierung verschiedener Gewebe von mOat2-Knockout Mäusen

Lysate von 12 unterschiedlichen, bei der Präparation von jeweils einer männlichen 8 Wochen alten Kontroll-, heterozygoten und homozygoten mOat2-Knockout Maus (het KO und hom KO) gewonnenen Geweben wurden mithilfe von zwei PCR-Reaktionen genotypisiert. Bei der PCR-Reaktion zur Bestimmung des Actb-Cre-Genotyps (Wildtyp: Bande bei 241 bp, Actb-Cre: Bande bei 187 bp) zeigten die Gewebe aller drei Mäuse einen wildtypischen Genotyp. Bei der PCR zur Bestimmung des mOat2-Genotyps (Wildtyp: Banden bei 253 und 181 bp, *Knockout*: Bande bei 313 bp) zeigten alle Gewebe der Kontrollmäuse einen wildtypischen Genotyp, alle Gewebe der heterozygoten mOat2-Knockout Mäuse den wildtypischen und den *Knockout* Genotyp und alle Gewebe der homozygoten mOat2-Knockout Mäuse den *Knockout* Genotyp. 1 = Herz, 2 = Milz, 3 = Niere, 4 = Hoden, 5 = Muskel, 6 = Ösophagus, 7 = Magen, 8 = Duodenum, 9 = Jejunum, 10 = Ileum, 11 = Gehirn, 12 = Leber; NTC = Wasserkontrolle (*non template control*).

ii Charakterisierung der Mauslinie auf RNA Ebene

Um nachzuweisen, dass in *mOat2-Knockout* Mäusen keine *mSlc22a7* mRNA mehr exprimiert wird, wurde die Expression von *mSlc22a7* mRNA in der Leber mittels qPCR bestimmt. Die auf die *Actb* Expression bezogenen relativen *mSlc22a7* Expressionsunterschiede der 8, 16 und 24 Wochen alten Kontroll- sowie heterozygoten und homozygoten *mOat2-Knockout* Mäuse sind in Abbildung 25 gezeigt.

Die männlichen sowie die weiblichen Kontrollmäuse zeigten im Alter von 8, 16 und 24 Wochen eine deutliche Expression von *mSlc22a7* mRNA. Die heterozygoten *mOat2-Knockout* Mäuse zeigten zwischen den Geschlechtern und dem Alter der Mäuse schwankende relative Expressionsunterschiede, die teilweise höher, meistens aber niedriger waren als die der Kontrollmäuse. Die homozygoten *mOat2-Knockout* Mäuse zeigten keine *mSlc22a7* mRNA Expression.

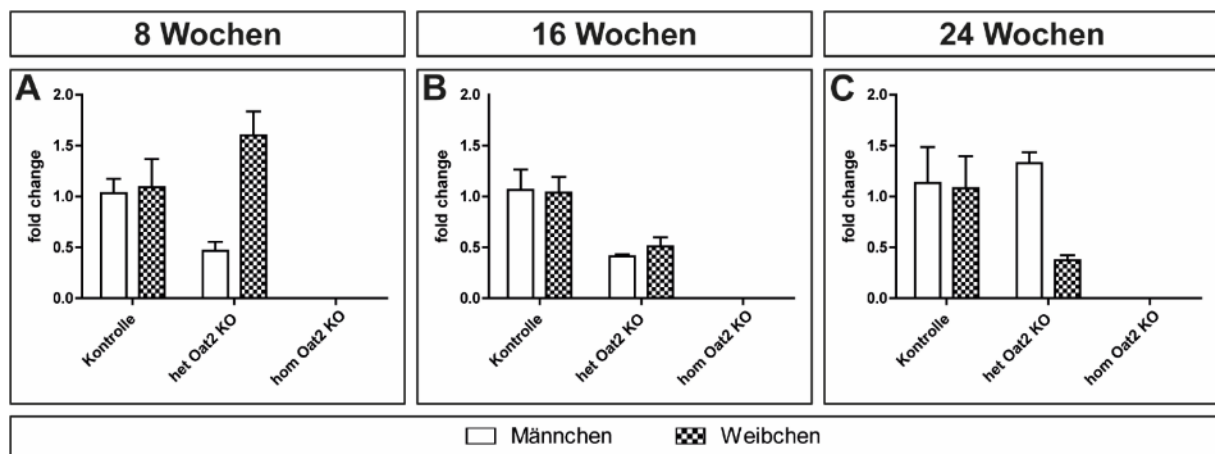


Abbildung 25: Homozygote *mOat2-Knockout* Mäuse zeigen keine hepatische *mSlc22a7* mRNA Expression

RNA wurde aus Lebergewebe von jeweils 2-4 (s. Tab. 24) männlichen und weiblichen Kontrolltieren bzw. heterozygoten (het *mOat2* KO) sowie homozygoten (hom *mOat2* KO) *mOat2-Knockout* Tieren im Alter von 8 (A), 16 (B) und 24 (C) Wochen gewonnen und cDNA daraus synthetisiert. Eine qPCR mit dem *mSlc22a7* (Exon 4-5, Mm00460672_m1) und dem *mActb* TaqMan Assay (Mm02619580_g1) wurde durchgeführt. Die *mSlc22a7* mRNA Expression wurde für jede Probe auf die *mActb* mRNA Expression bezogen und der relative Expressionsunterschied (fold change) bestimmt.

Da die *mOat2-Knockout* Mäuse in allen Geweben eine fehlende Expression von *mSlc22a7* mRNA aufweisen sollten, wurde auch mit aus Nierengewebe gewonnener mRNA eine qPCR zur Bestimmung der *mSlc22a7* Expression durchgeführt (s. Abb. 26). Hierfür wurde Nierengewebe der 8 Wochen alten männlichen und weiblichen Kontroll- sowie homozygoten *mOat2-Knockout* Mäuse verwendet. Wie schon im Lebergewebe (s. Abb. 25) beobachtet, zeigten die Kontrollmäuse auch im Nierengewebe eine deutliche *mSlc22a7* mRNA Expression. Die homozygoten *mOat2-Knockout* Mäuse zeigten keine *mSlc22a7* mRNA Expression.

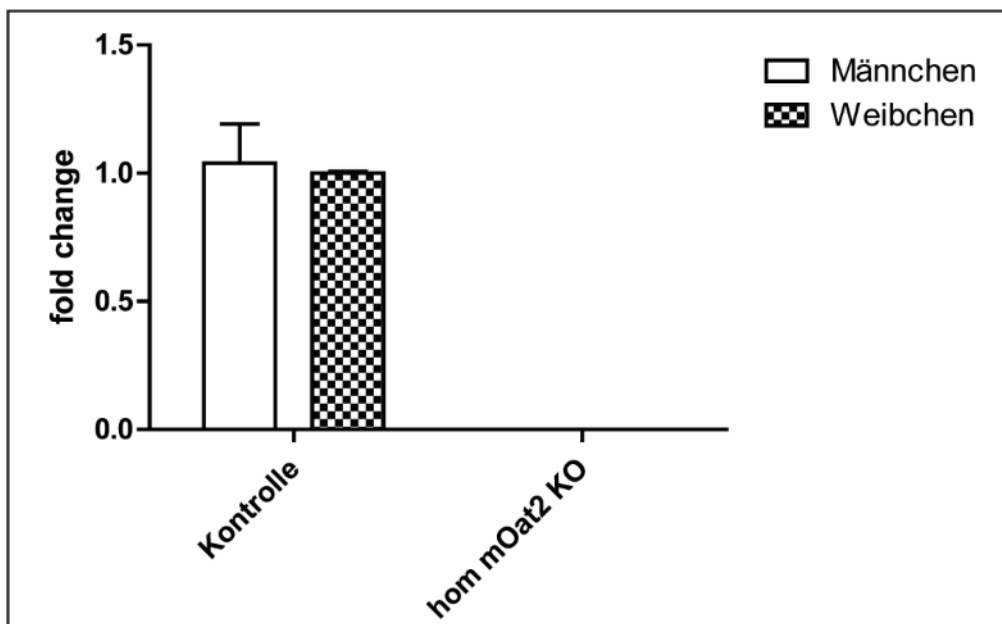


Abbildung 26: Fehlende renale *mSlc22a7* mRNA Expression in 8 Wochen alten homozygoten *mOat2-Knockout* Mäusen

RNA wurde aus Nierengewebe von jeweils 2-4 (s. Tab. 24) männlichen und weiblichen Kontroll- bzw. homozygoten *mOat2 Knockout* (hom *mOat2* KO) Mäusen im Alter von 8 Wochen gewonnen und cDNA daraus synthetisiert. Eine qPCR mit dem *mSlc22a7* (Exon 4-5, Mm00460672_m1) und dem *mActb* (Mm02619580_g1) TaqMan Assay wurde durchgeführt. Die *mSlc22a7* mRNA Expression wurde für jede Probe auf die *mActb* mRNA Expression bezogen und der relative Expressionsunterschied (fold change) bestimmt.

Da durch die Generierung der *mOat2-Knockout* Mauslinie der Genabschnitt von Exon 2 bis 6 der *mSlc22a7* Gensequenz durch die Cre-Rekombinase deletiert werden sollte, wurde mit einer weiteren qPCR geklärt, ob noch andere Exone in den *mOat2-Knockout* Tieren exprimiert werden. Hierfür wurde RNA aus Lebergewebe der 8 Wochen alten männlichen und weiblichen Kontroll- und homozygoten *mOat2-Knockout* Mäuse verwendet. Es wurden qPCRs mit dem *mSlc22a7* (Exon 1-2), dem *mSlc22a7* (Exon 9-10) und dem *mActb* TaqMan Assay durchgeführt, um sowohl Bereiche vor als auch nach der in den *Knockout*-Mäusen ausgeschnittenen Gensequenz abzudecken (s. Abb. 27). Die weiblichen sowie männlichen Kontrollmäuse zeigten mit beiden TaqMan Assays eine deutliche *mSlc22a7* mRNA Expression. Die homozygoten *mOat2-Knockout* Mäuse zeigten keine Expression der mRNA der Exone 1-2, allerdings konnte eine deutliche Expression der Exone 9-10 bestimmt werden, wobei der relative Expressionsunterschied sogar höher war als der der Kontrolltiere.

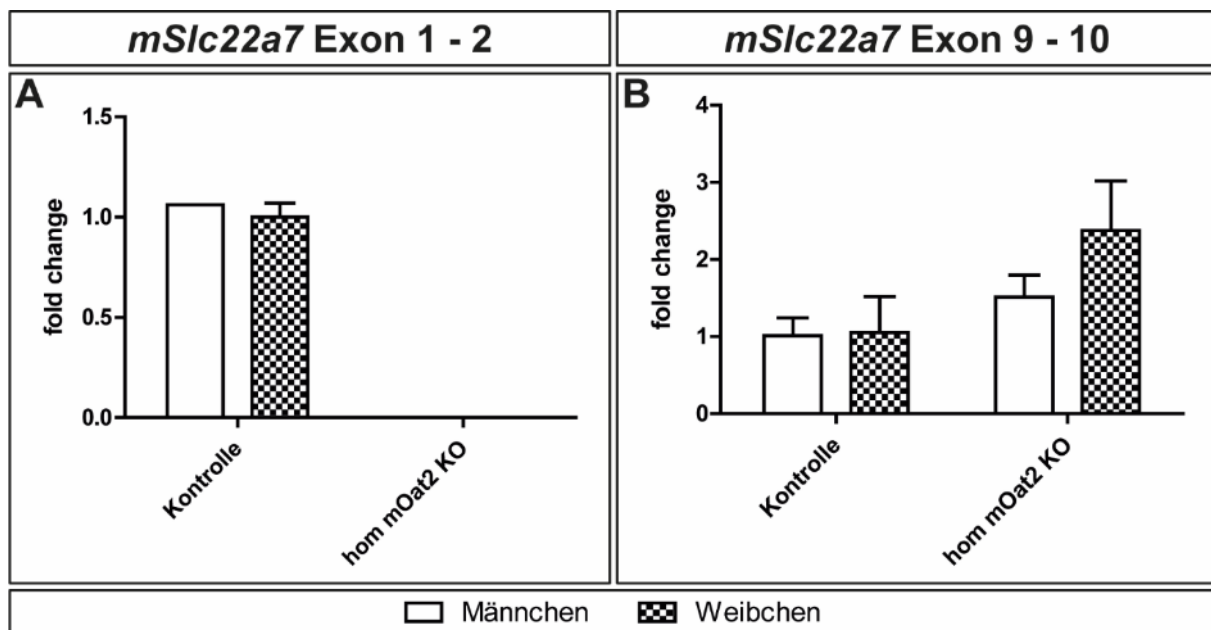


Abbildung 27: Hepatische mRNA Expression verschiedener *mSlc22a7*-Exone in *mOat2-Knockout* Mäusen

RNA wurde aus Lebergewebe von jeweils 2-4 (s. Tab. 24) männlichen und weiblichen Kontrolltieren bzw. homozygoten *mOat2-Knockout* (hom *mOat2* KO) Tieren im Alter von 8 Wochen gewonnen und cDNA daraus synthetisiert. Eine qPCR mit dem *mSlc22a7* (Exon 1-2, Mm00460669_g1) (A), dem *mSlc22a7* (Exon 9-10, Mm01281500_g1) (B) und dem *mActb* (Mm02619580_g1) TaqMan Assay wurde durchgeführt. Die *mSlc22a7* mRNA Expression wurde für jede Probe auf die *mActb* mRNA Expression bezogen und der relative Expressionsunterschied (fold change) bestimmt.

Aufgrund der unerwarteten Expression von *mSlc22a7* Exon 9-10 mRNA in homozygoten *mOat2-Knockout* Mäusen sollte überprüft werden, dass der Genbereich von Exon 2 bis Exon 6 der *mSlc22a7* Gensequenz in den *mOat2-Knockout* Mäusen erfolgreich deletiert worden war. Dafür wurde aus Lebergewebe jeweils einer 8 Wochen alten, weiblichen Kontroll- und homozygoten *mOat2-Knockout* Maus RNA gewonnen, aus welcher wiederum cDNA synthetisiert wurde, um das *mSlc22a7* Gen im Kontroll- sowie im *Knockout*-Zustand zu sequenzieren. Mit zwei PCR-Reaktionen wurden zum einen die Exone 1-6 und ein Teil von Exon 7 und zum anderen die Exone 8-9 und jeweils ein Teil der Exone 7 und 10 amplifiziert (Primer s. Tab. 21). Wie erwartet ergab die Amplifikation der Exone 1-6 beim Kontrolltier eine Bandengröße von ca. 1250 bp und beim homozygoten *Knockout* Tier nur eine Bandengröße von ca. 588 bp (s. Abb. 28 A). Die erwarteten Bandengrößen der PCR-Produkte bei der Amplifikation der Exone 8-9 von 528 bp bei Kontroll- sowie *mOat2-Knockout* Maus konnte ebenfalls beobachtet werden.

Die cDNA wurde aus den vier Banden eluiert und sequenziert. Die Nukleotidsequenzen von Kontroll- und *mOat2-Knockout* Maus, welche mittels Sequenzierung ermittelt wurden, sind, verglichen mit der Referenzsequenz der *mSlc22a7* cDNA, in Abbildung 28 B u. C gezeigt. Die Sequenz der cDNA aus dem Kontrolltier stimmte mit der Referenzsequenz überein (s. Abb. 28 B). Im homozygoten *mOat2-Knockout* Tier (s. Abb. 28 C) stimmten die ermittelte Nukleotidsequenz und die Referenz Sequenz für Exon 1 und für Exon 7-10 überein. Wie erwartet gab es jedoch im Bereich der Exone 2-6 keine Übereinstimmungen der Sequenzen.

Abbildung 28: Sequenzierung der *mSlc22a7* Transkripte in Kontroll- und *mOat2-Knockout* Mäusen

Aus dem Lebergewebe jeweils einer 8 Wochen alten, weiblichen Kontroll- (*mOat2* WT) und homozygoten *mOat2 Knockout* (*mOat2* KO) Maus wurde RNA gewonnen und cDNA synthetisiert, um die entstandenen *mSlc22a7* Transkripte im Kontroll- sowie im *Knockout*-Zustand zu sequenzieren. Die Exone 1-6 und ein Teil von Exon 7 wurden mit einer PCR-Reaktion amplifiziert. Dabei entstanden Sequenzen in der Länge von 1250 bp beim Kontrolltier und 588 bp beim *Knockout* Tier (A). Die Exone 8-9 und jeweils ein Teil der Exone 7 und 10 der *mSlc22a7* Gensequenz wurden ebenfalls mittels PCR-Reaktion amplifiziert. Die cDNAs aller PCR Produkte wurden aus den Banden eluiert und Sequenzierreaktionen mit den Primern der Amplifikations-PCR-Reaktionen (s. Tab. 21; gekennzeichnet in magenta (Primersequenzen Vorwärts) und rot (Primersequenzen Rückwärts)) durchgeführt. Die so ermittelten Nukleotidsequenzen (untere Sequenz in B und C) der Kontroll- (B) und homozygoten *Knockout* (C) Maus wurden mit der Referenzsequenz der *mSlc22a7* cDNA (NM-144856) verglichen (obere Sequenz in B und C).

Da die Sequenzierung der *mSlc22a7* Transkripte von Kontroll- und homozygoter *mOat2-Knockout* Maus die erwarteten Ergebnisse zeigte, wurde daraufhin von der Nukleotidsequenz auf die Aminosäuresequenz eines möglichen entstehenden Proteins in den *mOat2-Knockout* Mäusen geschlossen und diese mit der Aminosäuresequenz des wildtypischen *mOat2* Proteins verglichen (s. Abb. 29). Im Vergleich zur Aminosäuresequenz des wildtypischen *mOat2* Proteins war die vorhergesagte Aminosäuresequenz des *mOat2-Knockout* Proteins stark verkürzt, da die Exone 2-6 fehlten und es in Exon 7 zu einer Rasterschub-Mutation und damit zu einem frühzeitigen Translationsende in Exon 8 kam.



Abbildung 29: Vorhergesagte mOat2-Aminosäuresequenz in homozygoten mOat2-Knockout Mäusen unterscheidet sich stark von der in Kontrollmäusen Die Aminosäuresequenz (untere Sequenz) von wildtypischem mOat2 Protein (A, NP_6659105) sowie die Aminosäuresequenz, welche bei Translation der *mSlc22a7*-Nukleotidsequenz (obere Sequenz) einer homozygoten mOat2-Knockout Maus entstehen würde (B), sind gezeigt.

iii Charakterisierung der Mauslinie auf Proteinebene

Um die *mOat2-Knockout* Mauslinie auf Proteinebene charakterisieren zu können, wurden zunächst vier kommerziell erhältliche Antikörper getestet, welche laut Herstellerangaben hOAT2 und mOat2 binden konnten. Die Antikörper werden nachfolgend Abnova, Invitrogen, Proteintech und Bioss Antikörper genannt. Die Bindestellen des Abnova Antikörpers sind vom Hersteller nicht angegeben, die der anderen drei Antikörper sind in Abbildung 30 gezeigt. Alle drei Antikörper sind gegen die Aminosäuresequenz von humanem OAT2 gerichtet, im Bereich der Bindestellen weist diese allerdings in allen drei Fällen eine starke Ähnlichkeit mit murinem Oat2 auf, sodass auch von einer Bindung mit dem Mausprotein auszugehen ist. Während der Invitrogen und der Bioss Antikörper ihre Bindestellen im C-Terminus des hOAT2 / mOat2-Proteins aufweisen, befindet sich die Bindestelle des Proteintech Antikörpers in einer großen extrazellulären Schleife unweit des N-Terminus des hOAT2 / mOat2 Proteins.

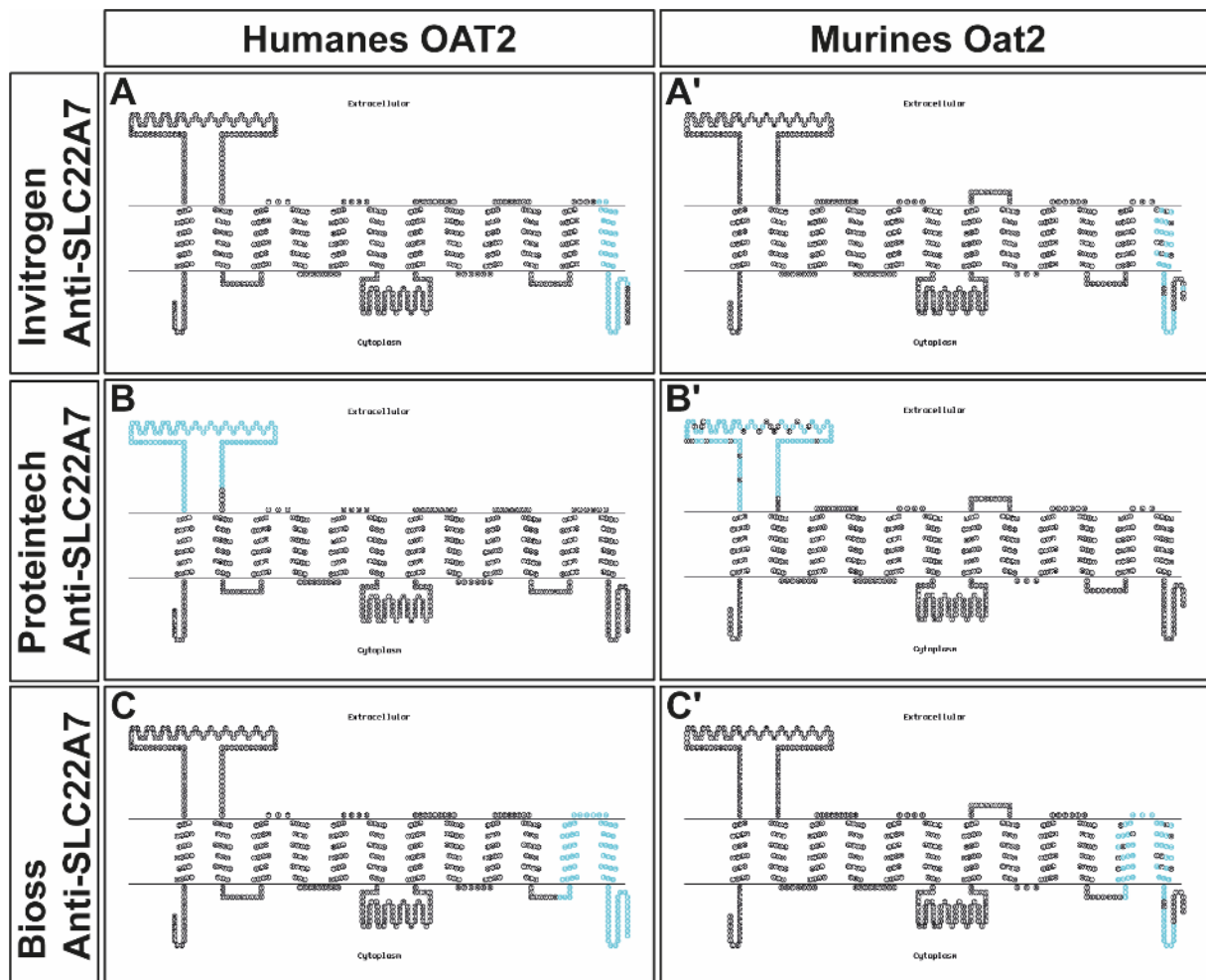


Abbildung 30: Bindestellen verschiedener kommerziell erhältlicher hOAT2 / mOat2 Antikörper

Die Bindestellen von drei kommerziell erhältlichen hOAT2 / mOat2 Antikörpern (Invitrogen, Proteintech und Bioss Anti-*SLC22A7*) in hOAT2 (A, B, C) und mOat2 (A', B', C') sind in blau dargestellt. Zum Erstellen der Topologiemodelle und zur Kennzeichnung der Antikörper-Bindestellen wurde das Programm TOPO2 genutzt, (www.sacs.ucsf.edu/TOPO2/), wobei die Informationen zur vorhergesagten Position der Transmembransegmente UniProt entstammten (Q9Y694, *SLC22A7* human, <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9Y694/entry>; Q91WU2, *Slc22a7* mouse, <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q91WU2/entry>).

Die vier Antikörper sollten nachfolgend auf ihre Fähigkeit hin getestet werden, mOat2 in Mausgewebe nachzuweisen. Dafür wurde Gesamtprotein aus Lebergewebe von Kontroll- sowie heterozygoten und homozygoten mOat2-*Knockout* Mäusen gewonnen und damit Immunblots mit den verschiedenen Antikörpern durchgeführt (s. Abb. 31 A-D). Erwartet wurde eine spezifische mOat2-Bande in den Kontroll- und heterozygoten mOat2-*Knockout* Tieren, welche in den homozygoten mOat2-*Knockout* Tieren fehlen sollte. Die Höhe der Banden wurde je nach Glykosylierungsgrad zwischen 50 und 75 kDa erwartet, so wie sie zuvor auch in der mOat2-exprimierenden Zelllinie nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 9 E). Entgegen den Erwartungen konnte mit keinem der vier Antikörper eine spezifische mOat2-Bande in den Proteinlysaten der Kontroll- bzw. heterozygoten mOat2-*Knockout* Tiere festgestellt werden. Alle Antikörper ergaben lediglich in allen drei Proteinlysaten gleich ausgeprägte unspezifische Banden auf unterschiedlichen Höhen.

Als weitere Methode, um mOat2 im Mausgewebe mit den vier Antikörpern nachzuweisen, wurden immunhistochemische Färbungen mit FFPE-Gewebeschnitten von Kontroll- sowie heterozygoten und homozygoten mOat2-*Knockout* Mäusen und den 4 verschiedenen Antikörpern durchgeführt (s. Abb. 31 E-H). Keiner der vier Antikörper war in der Lage, eine spezifische membrangebundene Färbung von mOat2 in den Kontroll- sowie heterozygoten mOat2-*Knockout* Mäusen zu erzeugen. Die Färbungen der Kontroll- sowie heterozygoten und homozygoten mOat2-*Knockout* Mäuse wiesen bei allen Antikörpern kaum Unterschiede auf.

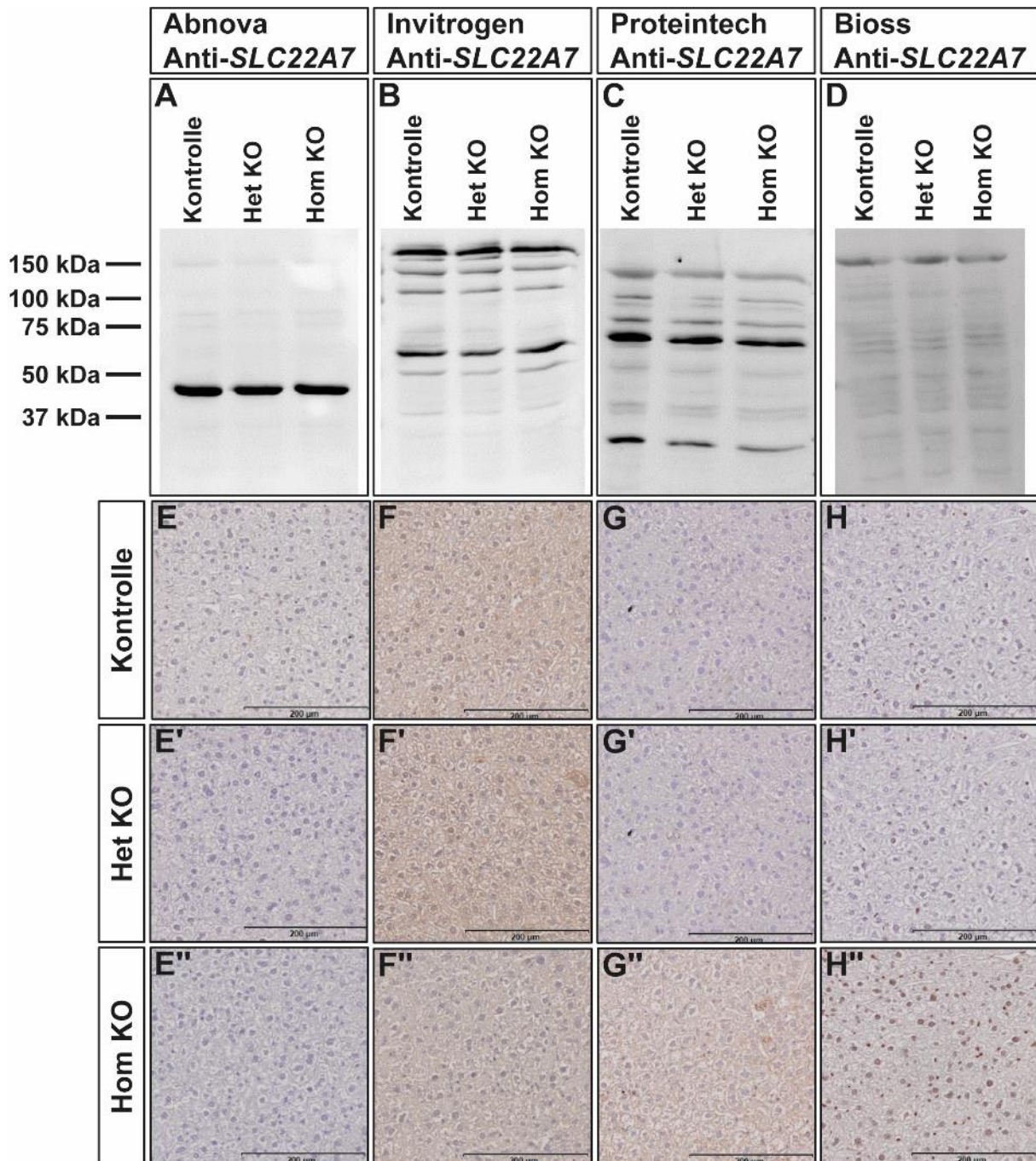


Abbildung 31: Kommerziell erhältliche hOAT2 / mOat2 Antikörper können mOat2 in Mausgewebe nicht nachweisen

Vier kommerziell erhältliche hOAT2 / mOat2 Antikörper (Abnova, Invitrogen, Proteintech und Bioss Anti-SLC22A7, s. Tab. 6) wurden für den Nachweis von mOat2-Protein in Mausgewebe evaluiert. Durchgeführt wurden Immunblots mit Gesamtprotein aus Lebergewebe von 8 Wochen alten Kontroll- sowie heterozygoten (het KO) und homozygoten (hom KO) mOat2-*Knockout* Mäusen (A-D) sowie immunhistochemische Färbungen mit FFPE-Leberschnitten dieser Mäuse (E-H").

Da ein Nachweis von mOat2 in murinem Lebergewebe mit verschiedenen kommerziell erhältlichen Antikörpern nicht möglich war, wurden Proteomanalysen mit Transmembranproteinextrakt aus Lebergewebe durchgeführt. Mittels dieser Analyse konnte im Lebergewebe der Kontrollmaus unter allen anderen detektierten Transmembranproteinen ($n = 2674$) auch mOat2 nachgewiesen werden (s. Abb. 32). Im Lebergewebe der homozygoten mOat2-*Knockout* Maus konnte das mOat2-Protein hingegen nicht detektiert werden.

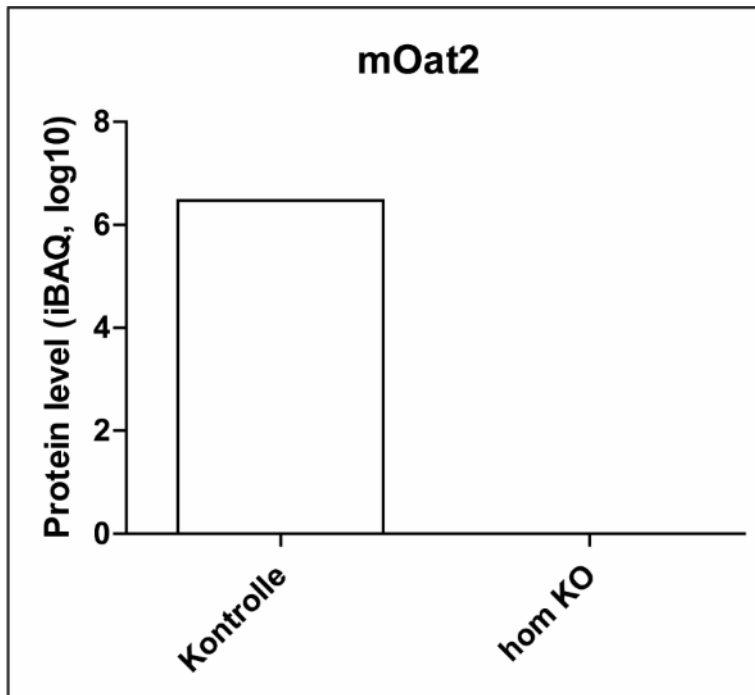


Abbildung 32: Nachweis der mOat2 Proteinexpression im Lebergewebe von wildtypischen Mäusen sowie des Expressionsverlustes in mOat2-*Knockout* Mäusen mittels Proteomanalyse

Aus Lebergewebe jeweils einer weiblichen, 8 Wochen alten Kontroll- und homozygoten mOat2-*Knockout* Maus wurde Transmembranproteinextrakt gewonnen. Mit diesem wurde durch das Proteome Center Tübingen eine Proteomanalyse mittels Massenspektrometrie durchgeführt, wofür der Extrakt zunächst mittels SDS-PAGE Gelelektrophorese aufgetrennt und tryptisch verdaut wurde.

3.1.3.6 Genomweite Genexpressionsanalyse mittels RNA-Microarrays

Um die Auswirkungen des *Knockouts* von mOat2 auf die Genexpression zu untersuchen, wurden mit Leber- und Nierengewebe von Kontroll- und homozygoten mOat2-*Knockout* Mäusen genomweite Genexpressionsanalysen mittels RNA-Microarrays durchgeführt.

Die Ergebnisse der Analysen für das Lebergewebe sind in Abbildung 33 A dargestellt. Es konnte nur ein signifikanter Unterschied zwischen der Genexpression der Kontroll- und *Knockout*-Mäuse beobachtet werden. Dieser bestand in einer verringerten Expression der murinen Sulfotransferase 2 A 1 (*mSult2a1*) in den weiblichen mOat2-*Knockout* Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen. Die Expression von *mSlc22a7* mRNA war zwar in den *Knockout*-Mäusen ebenfalls verringert, allerdings war dieser Unterschied statistisch nicht signifikant.

Die verringerte *mSult2a1* mRNA Expression konnte durch qPCR bestätigt werden, da auch hier die weiblichen mOat2-*Knockout* Mäuse im Vergleich zu den Kontrollmäusen eine verringerte *mSult2a1* mRNA Expression in der Leber zeigten (s. Abb 33 B). Dieser Unterschied war in den männlichen mOat2-*Knockout* Mäusen nicht zu beobachten. Anhand der zuvor beschriebenen Proteomanalyse von Transmembranproteinen konnte auch auf Proteinebene eine leicht reduzierte Expression von mSult2a1 in der homozygoten mOat2-*Knockout* Maus im Vergleich zur Kontrollmaus beobachtet werden (s. Abb. 33 C).

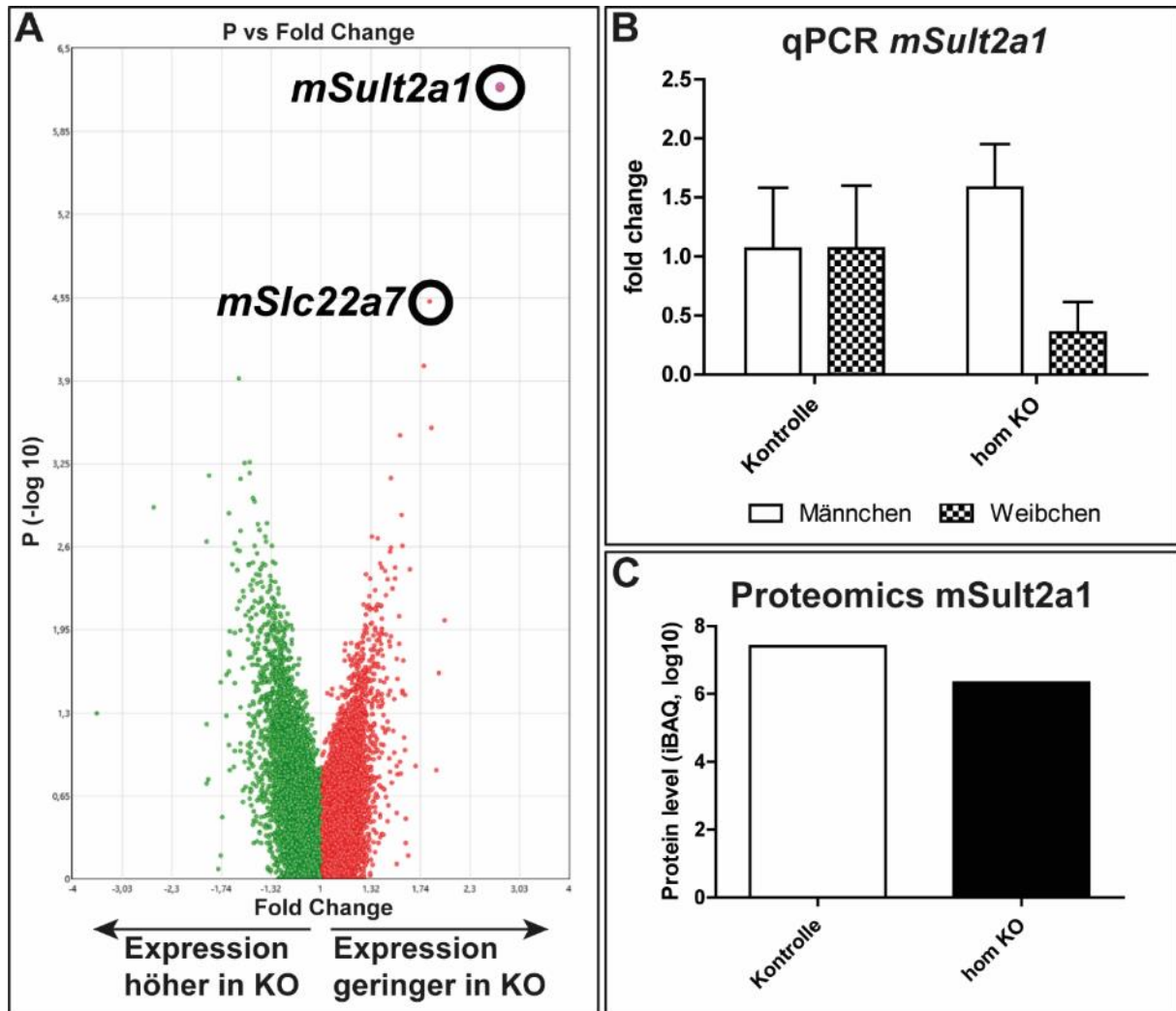


Abbildung 33: Unterschied in der hepatischen *mSult2a1* mRNA Expression in weiblichen *mOat2-Knockout* Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen

Aus dem Lebergewebe von jeweils 2 männlichen und weiblichen, 8 Wochen alten Kontroll- sowie homozygoten *mOat2-Knockout* (KO) Mäusen wurde RNA gewonnen und für die Analyse der Genexpression mittels eines RNA-Microarrays (Clariom S Assay HT (Maus)) genutzt. Die Ergebnisse der Kontroll- und homozygoten *Knockout* Mäuse wurden miteinander verglichen (A). Eine qPCR mit dem *mSult2a1* / *mSult2a2* (Mm04205656_mH) und dem *mActb* (Mm02619580_g1) TaqMan Assay und der für den RNA-Microarray genutzten RNA wurde durchgeführt und der relative Expressionsunterschied (fold change) bestimmt (B). Proteomanalysen wurden von Transmembranproteinen jeweils einer weiblichen Kontroll- und homozygoten *mOat2-Knockout* Maus vom Proteome Center Tübingen durchgeführt (C).

Die genomweite Expressionsanalyse in der Niere ist in Abbildung 34 gezeigt. Durch den RNA-Microarray konnte einzig eine signifikante Reduktion in der *mSlc22a7* mRNA Expression der homozygoten *mOat2-Knockout* Mäuse im Vergleich zu der der Kontrollmäuse beobachtet werden. Andere signifikante Unterschiede der renalen mRNA Expression konnten zwischen den Kontroll- und homozygoten *mOat2-Knockout*-Mäusen nicht festgestellt werden.

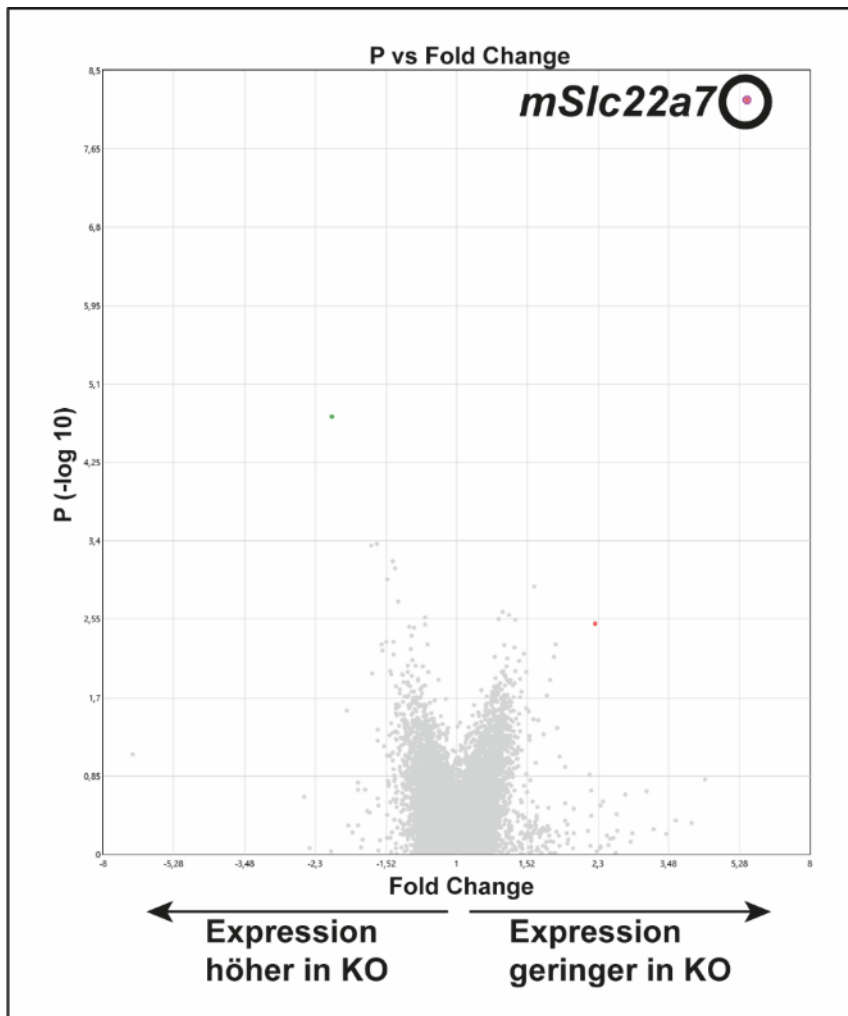


Abbildung 34: *mOat2-Knockout* Mäuse zeigen verglichen mit Kontrollmäusen keine Unterschiede in der renalen Genexpression

Aus Nierengewebe von jeweils 2-4 (s. Tab. 24) 8 Wochen alten, männlichen und weiblichen Kontroll- sowie homozygoten *mOat2-Knockout* (KO) Mäusen gewonnene RNA wurde für die Analyse der Genexpression mittels eines RNA-Microarrays (Clariom S Assay HT (Maus)) genutzt und die Ergebnisse der Kontroll- und homozygoten *mOat2-Knockout* Mäuse wurden miteinander verglichen.

3.1.3.7 Isolation primärer muriner Hepatozyten zur Charakterisierung von mOat2

Zum Testen möglicher Anwendungsmethoden für die neu generierte *mOat2-Knockout* Mauslinie sollten primäre Hepatozyten aus Mäusen dieser Linie mithilfe des Miltenyi Liver Perfusion Kits isoliert und kultiviert werden. Hierfür wurde jeweils eine 14 Wochen alte Kontroll- und homozygote *mOat2-Knockout* Maus verwendet. Die optische Analyse der Zellen mithilfe eines Lichtmikroskops (s. Abb. 35 A-B) ergab, dass die Zellen beider Mäuse gut angewachsen und größtenteils binukleär waren, was ein typisches Merkmal für Hepatozyten darstellt. Zwischen den Zellen der Kontroll- und denen der homozygoten *mOat2-Knockout* Maus war optisch kein Unterschied auszumachen.

Eine mit den Zellen durchgeführte qPCR (s. Abb. 35 C) ergab eine deutliche *mSlc22a7* mRNA Expression in den Hepatozyten, welche aus der Kontrollmaus isoliert worden waren. In den aus der homozygoten *mOat2-Knockout* Maus isolierten Hepatozyten konnte keine *mSlc22a7* mRNA Expression nachgewiesen werden.

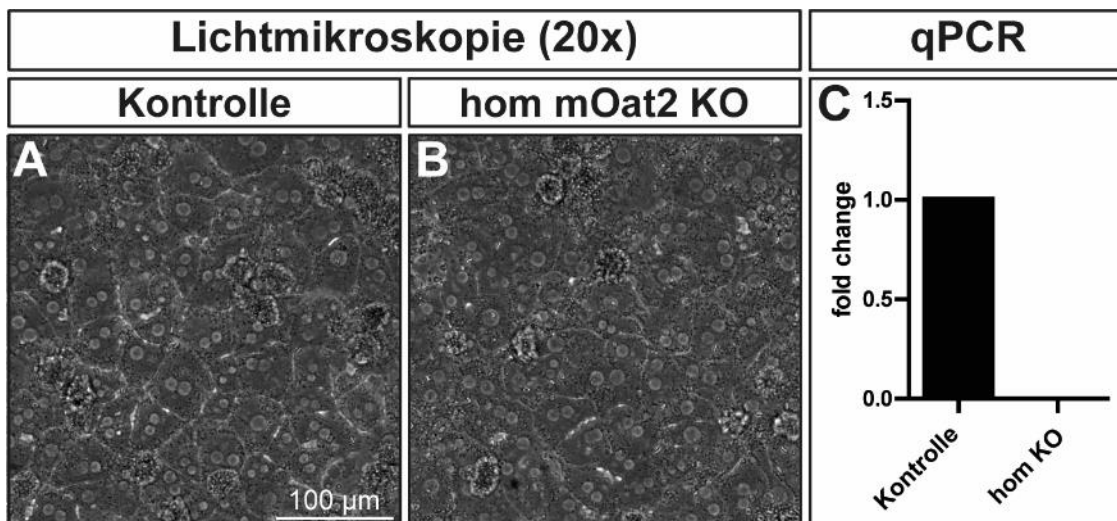


Abbildung 35: Isolation primärer Hepatozyten aus Kontroll- und *mOat2-Knockout* Mäusen

Das Miltenyi Liver Perfusion Kit wurde genutzt, um primäre murine Hepatozyten aus jeweils einer 14 Wochen alten Kontroll- und homozygoten *mOat2-Knockout* (hom *mOat2* KO) Maus zu isolieren. Die isolierten und auf Kollagen-beschichteten Platten ausgesäten Zellen wurden am nächsten Tag unter dem Lichtmikroskop betrachtet und fotografiert (A, B). Anschließend wurde mit aus den Zellen gewonnener RNA eine qPCR mit dem *mSlc22a7* (Exon 4-5, Mm00460672_m1) und dem *mActb* (Mm02619580_g1) TaqMan Assay durchgeführt, wobei die *mSlc22a7* mRNA Expression für jede Probe auf die *mActb* mRNA Expression bezogen wurde (fold change = relativer Expressionsunterschied) (C).

3.2 Der organische Anionentransporter 7

Der humane organische Anionentransporter 7 (hOAT7) ist ein bisher nur wenig erforschtes, in der Leber vorkommendes Membrantransportprotein, welches wie hOAT2 in der Lage ist, Substanzen über Zellmembranen zu transportieren. Anders als für hOAT2 sind allerdings für hOAT7 bisher nur sehr wenige Substrate in der Literatur beschrieben (Emami Riedmaier et al. 2016; Shin et al. 2007). Mit den hier beschriebenen *in vitro* Versuchen in Zellkultur und *in vivo* Experimenten in einem neu generierten Mausmodell sollte daher eine umfassende Charakterisierung von hOAT7 vorgenommen werden.

3.2.1 *In vitro* Charakterisierung von hOAT7 mittels stabil transfizierter Zelllinien

3.2.1.1 Testung möglicher endogener und exogener Substrate mithilfe einer hOAT7-exprimierenden Zelllinie

Bisher wurden für hOAT7 lediglich die konjugierten Steroide Estronsulfat und DHEAS sowie die kurzkettige Fettsäure Butyrat als endogene Substrate und Pravastatin als exogenes Substrat beschrieben (Emami Riedmaier et al. 2016; Mathialagan et al. 2018; Shin et al. 2007). Mittels *in vitro* Transportversuchen einer hOAT7-exprimierenden Zelllinie sollten in vorangegangenen Arbeiten am Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie neue hOAT7-Substrate identifiziert werden. Die membrangebundene Expression des hOAT7 Transportproteins in der hOAT7-exprimierenden Zelllinie wurde mittels Immunfluoreszenz mit einem Antikörper gegen hOAT7 (Rep5045 Anti-*SLC22A9*) überprüft (s. Abb. 14 B-B'). Daraufhin wurden verschiedenste endogene Substanzen sowie Arzneistoffe in Transportversuchen mit Kontroll- und hOAT7-exprimierenden Zellen durchgeführt (s. Tab. 25). Die Substanzen waren dabei entweder radioaktiv markiert oder unmarkiert, wobei die intrazelluläre Konzentration der unmarkierten Substanzen in den Zellen nach dem Transportversuch mittels Massenspektrometer in der Abteilung für Analytik des Dr. Margarete Fischer-Bosch-Instituts für Klinische Pharmakologie bestimmt wurde. Die Daten wurden von Frau Dr. Ute Hofmann und Prof. Anne Nies zur Verfügung gestellt. Trotz einer Vielzahl an Transportversuchen konnte kein neues hOAT7-Substrat identifiziert werden.

Tabelle 25: Testung verschiedener endogener und exogener Substanzen als mögliche Substrate für hOAT7

Mittels einer Zelllinie, welche hOAT7 in der Zellmembran exprimiert (OAT7), und einer Kontrollzelllinie (Kontrolle), wurden Transportversuche mit verschiedenen endogenen Substanzen sowie Arzneistoffen durchgeführt. Die Substanzen wurden entweder radioaktiv markiert (RA) oder unmarkiert eingesetzt. Bei unmarkierten Substanzen wurde die Menge der während des Transportversuchs in die Zellen aufgenommenen Substanz mittels Massenspektrometrie (MS) bestimmt. Die Daten sind, bis auf die Ergebnisse des Estronsulfat Transportes mit $n = 9$, Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3-6 Ansätzen / Versuchen.

Endogene Substanzen								
Substanz	Substanz-klasse	Messmethode	Konzentration	Zeit (min)	Kontrolle (pmol/mg Protein)	OAT7 (pmol/mg Protein)	Substrat	Referenz
Estron-sulfat	Hormon-metabolit	RA	100 nM	1	0,67 \pm 0,08	1,23 \pm 0,18	Ja	Emami Riedmaier et al. 2016
				10	0,97 \pm 0,09	2,31 \pm 0,44		
Bilirubin	Häm-metabolit	RA	1 μ M	5	54,6 \pm 5,4	38,2 \pm 4,7	Nein	IKP
				10	113,2 \pm 12,3	93,3 \pm 27,5		
cGMP	Sekundärer Botenstoff	RA	2 μ M	1	1,62 \pm 0,21	0,64 \pm 0,12	Nein	IKP
				5	1,65 \pm 0,22	1,06 \pm 0,22		
Prostaglandin E ₂	Gewebs-hormon	RA	5 nM	1	0,017 \pm 0,002	0,017 \pm 0,002	Nein	IKP
				5	0,022 \pm 0,002	0,017 \pm 0,001		
Taurocholat	Gallensäure	RA	200 nM	1	0,51 \pm 0,01	0,39 \pm 0,04	Nein	IKP
				5	0,47 \pm 0,10	0,50 \pm 0,04		
Xanthin	Purin-metabolit	RA	1 μ M	1	4,97 \pm 0,41	4,87 \pm 0,15	Nein	IKP
				5	5,93 \pm 0,19	6,05 \pm 0,08		
Tetrahydrobiopterin	Kofaktor von Hydroxylasen	RA	1 μ M	1	0,72 \pm 0,03	0,57 \pm 0,07	Nein	IKP
				5	1,08 \pm 0,12	1,08 \pm 0,14		
Deoxycholat	Gallensäure	MS	10 μ M	1	2123 \pm 94	2105 \pm 223	Nein	IKP
				10	3826 \pm 185	3173 \pm 154		
Chenodeoxycholat	Gallensäure	MS	10 μ M	1	2362 \pm 72	2159 \pm 131	Nein	IKP
				10	3901 \pm 361	2925 \pm 174		
Cholat	Gallensäure	MS	10 μ M	1	29,0 \pm 1,3	43,5 \pm 16,6	Nein	IKP
				10	88,0 \pm 7,2	135,4 \pm 14,5		
Lithocholat	Gallensäure	MS	10 μ M	1	3826 \pm 16	3754 \pm 126	Nein	IKP
				10	7752 \pm 286	6989 \pm 147		

Glycolitho- cholot	Gallensäure	MS	10 µM	1	616 ± 61	634 ± 58	Nein	IKP
				10	2726 ± 60	3152 ± 278		
Glycoche- nodeoxy- cholot	Gallensäure	MS	10 µM	1	71,1 ± 4,8	90,7 ± 5,6	Nein	IKP
				10	83,0 ± 19,8	92,8 ± 17,5		
Glycocholot	Gallensäure	MS	10 µM	1	17,7 ± 2,4	24,0 ± 10,2	Nein	IKP
				10	23,9 ± 0,2	27,9 ± 4,9		
6β-Hydroxy- -cortisol	Hormonme- tabolit	MS	10 µM	1	19,5 ± 5,2	16,3 ± 2,2	Nein	IKP
				10	79,3 ± 7,0	103,8 ± 3,5		
Hydro- cortison	Hormon	MS	10 µM	1	439 ± 56	538 ± 22	Nein	IKP
				10	462 ± 10	519 ± 21		
Leukotrien B₄	Gewebshor- mon	MS	10 µM	1	816 ± 63	712 ± 47	Nein	IKP
				10	1289 ± 123	1258 ± 69		
Leukotrien E₄	Gewebshor- mon	MS	10 µM	1	96,3 ± 19,4	88,4 ± 6,3	Nein	IKP
				10	92,4 ± 6,0	91,5 ± 8,0		
Lipoxin B₄	Gewebshor- mon	MS	10 µM	1	28,6 ± 5,1	42,3 ± 19,2	Nein	IKP
				10	63,7 ± 11,8	76,9 ± 19,4		
Lipoxin A₄	Gewebshor- mon	MS	10 µM	1	21,3 ± 1,2	24,1 ± 2,3	Nein	IKP
				10	54,0 ± 2,7	62,3 ± 9,6		
5(S),6(R),15 (R)-Lipoxan A₄	Gewebshor- mon	MS	10 µM	1	39,2 ± 5,9	45,2 ± 1,4	Nein	IKP
				10	91,9 ± 13,0	78,6 ± 6,5		
Prostaglan- din E₂	Gewebshor- mon	MS	10 µM	1	13,3 ± 1,8	13,6 ± 1,6	Nein	IKP
				10	21,7 ± 14,8	30,8 ± 28,3		
Thrombo- xan B₂	Gewebshor- monmeta- bolit	MS	10 µM	1	20,0 ± 1,1	22,7 ± 10,4	Nein	IKP
				10	13,0 ± 2,5	13,7 ± 2,1		
Testosteron	Hormon	MS	10 µM	1	330 ± 5	292 ± 16	Nein	IKP
				10	337 ± 16	386 ± 23		
Progeste- ron	Hormon	MS	10 µM	1	1817 ± 44	1845 ± 108	Nein	IKP
				10	2791 ± 188	3212 ± 188		
L-Thyroxin	Hormon	MS	10 µM	1	471 ± 50	517 ± 38	Nein	IKP
				10	1529 ± 103	2337 ± 392		
Triiodo-L- Thyronin	Hormon	MS	10 µM	1	464 ± 32	621 ± 99	Nein	IKP
				10	1902 ± 509	2425 ± 327		
Harnsäure	Purinmeta- bolit	RA	25 µM	1	14,8 ± 1,4	12,2 ± 1,6	Nein	Emami Riedmaier et al. 2016
				5	23,1 ± 5,0	25,5 ± 8,7		

Arzneistoffe								
Substanz	Stoffgruppe (nach Rote Liste)	Messmethode	Konzentration	Zeit (min)	Kontrolle (pmol/mg Protein)	OAT7 (pmol/mg Protein)	Substrat	Referenz
5-Fluorouracil	Zytostatikum (Antimetabolit)	RA	0,5 µM	1	2,48 ± 0,25	2,37 ± 0,04	Nein	Emami Riedmaier et al. 2016
				5	3,36 ± 0,18	3,18 ± 0,02		
Atorvastatin	Lipidsenker (HMG-CoA-Reduktasehemmer)	RA	1 µM	1	12,4 ± 3,1	16,7 ± 1,2	Nein	Emami Riedmaier et al. 2016
				5	18,9 ± 0,4	23,8 ± 2,1		
Rosuvastatin	Lipidsenker (HMG-CoA-Reduktasehemmer)	RA	64 nM	2	0,24 ± 0,01	0,29 ± 0,01	Nein	IKP
				5	0,32 ± 0,003	0,35 ± 0,01		
Fluvastatin	Lipidsenker (HMG-CoA-Reduktasehemmer)	RA	1 µM	1	52,8 ± 15,4	47,4 ± 11,3	Nein	Emami Riedmaier et al. 2016
				5	110,9 ± 26,2	92,8 ± 16,6		
Metformin	Antidiabetikum (Biguanid)	RA	5 µM	1	3,18 ± 0,68	2,73 ± 0,72	Nein	IKP
				5	4,29 ± 0,19	4,18 ± 0,14		
Montelukast	Mittel bei obstruktiven Atemwegserkrankungen	RA	25 nM	1	4,69 ± 0,15	5,14 ± 0,20	Nein	IKP
				5	7,16 ± 0,65	7,72 ± 1,03		
Omeprazol	Ulkuetherapeutikum (Protonenpumpenhemmer)	RA	10 µM	1	123 ± 8	112 ± 2	Nein	IKP
				5	163 ± 9	147 ± 3		
Paclitaxel	Zytostatikum (Mitose-Inhibitor)	RA	25 nM	1	1,45 ± 0,09	1,33 ± 0,03	Nein	Emami Riedmaier et al. 2016
				5	2,70 ± 0,06	2,68 ± 0,07		
Pantoprazol	Ulkuetherapeutikum (Protonenpumpenhemmer)	RA		1	138 ± 11	115 ± 5	Nein	IKP
				5	96 ± 4	86 ± 2		
Pravastatin	Lipidsenker (HMG-CoA-Reduktasehemmer)	RA	1 µM	0,5	0,76 ± 0,10	1,37 ± 0,46	Ja	Emami Riedmaier et al. 2016
				2	0,81 ± 0,14	1,53 ± 0,50		

Simvastatinsäure	Lipidsenker (HMG-CoA-Reduktasehemmer) aktiver Metabolit	RA	1 µM	1	60,7 ± 7,0	80,4 ± 7,7	Nein	Emami Riedmaier et al. 2016
				5	101,4 ± 14,3	117,4 ± 18,4		
Simvastatinlacton	Lipidsenker (HMG-CoA-Reduktasehemmer)	RA	1 µM	1	46,5 ± 1,7	49,4 ± 2,7	Nein	Emami Riedmaier et al. 2016
				5	49,7 ± 1,8	58,3 ± 6,3		
Sorafenib	Antineoplastisches Mittel (Proteinkinase-Inhibitor)	RA	100 nM	1	51,9 ± 2,1	38,7 ± 6,6	Nein	Neul et al. unpublished
				5	75,2 ± 1,8	59,3 ± 1,7		
Sunitinib	Antineoplastisches Mittel (Proteinkinase-Inhibitor)	RA	100 nM	1	10,1 ± 0,2	7,7 ± 0,8	Nein	IKP
				5	18,8 ± 0,5	17,4 ± 0,9		
Everolimus	Selektives Immunsuppressivum, antineoplastisches Mittel (mTOR-Kinase-Inhibitor)	RA	100 nM	1	0,63 ± 0,02	0,52 ± 0,02	Nein	IKP
				5	0,72 ± 0,01	0,58 ± 0,02		
Paracetamol	Analgetikum, Antipyretikum	RA	100 nM	1	0,50 ± 0,06	0,39 ± 0,003	Nein	IKP
				5	0,28 ± 0,01	0,22 ± 0,02		
Crizotinib	Antineoplastisches Mittel (ALK-Inhibitor)	MS	10 µM	1	2714 ± 131	2293 ± 332	Nein	IKP
				10	6362 ± 438	5294 ± 127		
Dasatinib	Antineoplastisches Mittel (BCR-ABL-Tyrosinkinase-Inhibitor)	MS	10 µM	1	1254 ± 98	1236 ± 40	Nein	IKP
				10	2868 ± 91	2675 ± 32		
Filgotinib	Selektives Immunsuppressivum (JAK-Inhibitor)	MS	10 µM	1	257 ± 12	260 ± 35	Nein	IKP
				10	258 ± 27	230 ± 10		
Fostamatinib	Antihämorrhagikum (SYK-Tyrosinkinase-Inhibitor)	MS	10 µM	1	26,9 ± 1,4	29,2 ± 17,5	Nein	IKP
				10	19,3 ± 5,0	22,6 ± 3,7		

Ibrutinib	Antineoplastisches Mittel (BTK-Inhibitor)	MS	10 μ M	1	1354 \pm 60	1322 \pm 135	Nein	IKP
				10	1765 \pm 95	2042 \pm 10		
Idelalisib	Antineoplastisches Mittel (Pi3K-Inhibitor)	MS	10 μ M	1	278 \pm 25	272 \pm 3	Nein	IKP
				10	290 \pm 32	317 \pm 40		
Vemurafenib	Antineoplastisches Mittel (BRAF-Serin-Threoninkinase-Inhibitor)	MS	10 μ M	1	208 \pm 20	238 \pm 28	Nein	IKP
				10	1319 \pm 63	1228 \pm 55		
Vismodegib	Antineoplastisches Mittel (Hedgehog-Signalweg-Inhibitor)	MS	10 μ M	1	1420 \pm 216	1347 \pm 10	Nein	IKP
				10	1902 \pm 274	2195 \pm 61		

3.2.2 *In vivo* Charakterisierung von hOAT7 mittels eines neu generierten humanisierten Mausmodells (leberspezifische hOAT7-Knockin Mauslinie)

3.2.2.1 Generierung und Etablierung der Mauslinie

Zur umfassenden Untersuchung der physiologischen Rolle von hOAT7 im Organismus sollte ein Mausmodell generiert werden. Da es kein Ortholog von hOAT7 in der Maus gibt, wurde ein humanisiertes Mausmodell etabliert, welches sich durch einen leberspezifischen Funktionsgewinn des humanen Transportproteins hOAT7 auszeichnet. Zur Generierung dieser leberspezifischen hOAT7-Knockin Mauslinie wurde erneut das Cre-Lox System genutzt, welches in Abschnitt 2.2.2.1 und Abbildung 4 schematisch erklärt wird. Die genaue Vorgehensweise bei der Generierung der Mauslinie ist ebenfalls in Abschnitt 2.2.2.1 beschrieben und eine schematische Darstellung in Abbildung 5 dargestellt.

Um die neu generierte Mauslinie zu charakterisieren, wurden jeweils 4 männliche bzw. weibliche Kontrolltiere sowie heterozygote und homozygote hOAT7-Knockin Tiere im Alter von 8, 16 und 24 Wochen begutachtet, gewogen, getötet und Blut sowie die Organe für verschiedene Analysen entnommen. Insgesamt wurden so 72 Tiere für die Charakterisierung der Mauslinie verwendet.

3.2.2.2 Phänotypische Charakterisierung der Mauslinie

Wie schon für die mOat2-Knockout Mauslinie wurden auch für die hOAT7-Knockin Mauslinie im Rahmen einer ersten phänotypischen Charakterisierung Körpergewicht und Lebergewicht der Mäuse sowie der Anteil des Lebergewichts am gesamten Körpergewicht bestimmt und die verschiedenen Versuchsgruppen hinsichtlich dieser Größen miteinander verglichen (s. Abb. 36).

Wie auch bei den mOat2-Knockout Mäusen stiegen Körper- sowie Lebergewicht mit zunehmendem Alter der Tiere unabhängig vom Genotyp der Versuchsgruppen an. Die 8 Wochen alten homozygoten hOAT7-Knockin Männchen zeigten einen signifikanten Anstieg des Leber- und Körpergewichts im Vergleich zu den männlichen Kontrolltieren. Dieser Anstieg ließ sich aber weder bei den weiblichen Tieren noch bei den männlichen 16 und 24 Wochen alten Tieren beobachten. Weitere signifikante Unterschiede in Körpergewicht, Lebergewicht oder Anteil des Lebergewichts am Körpergewicht zwischen Kontrolltieren und heterozygoten bzw. homozygoten hOAT7-Knockin Tieren waren nicht zu beobachten.

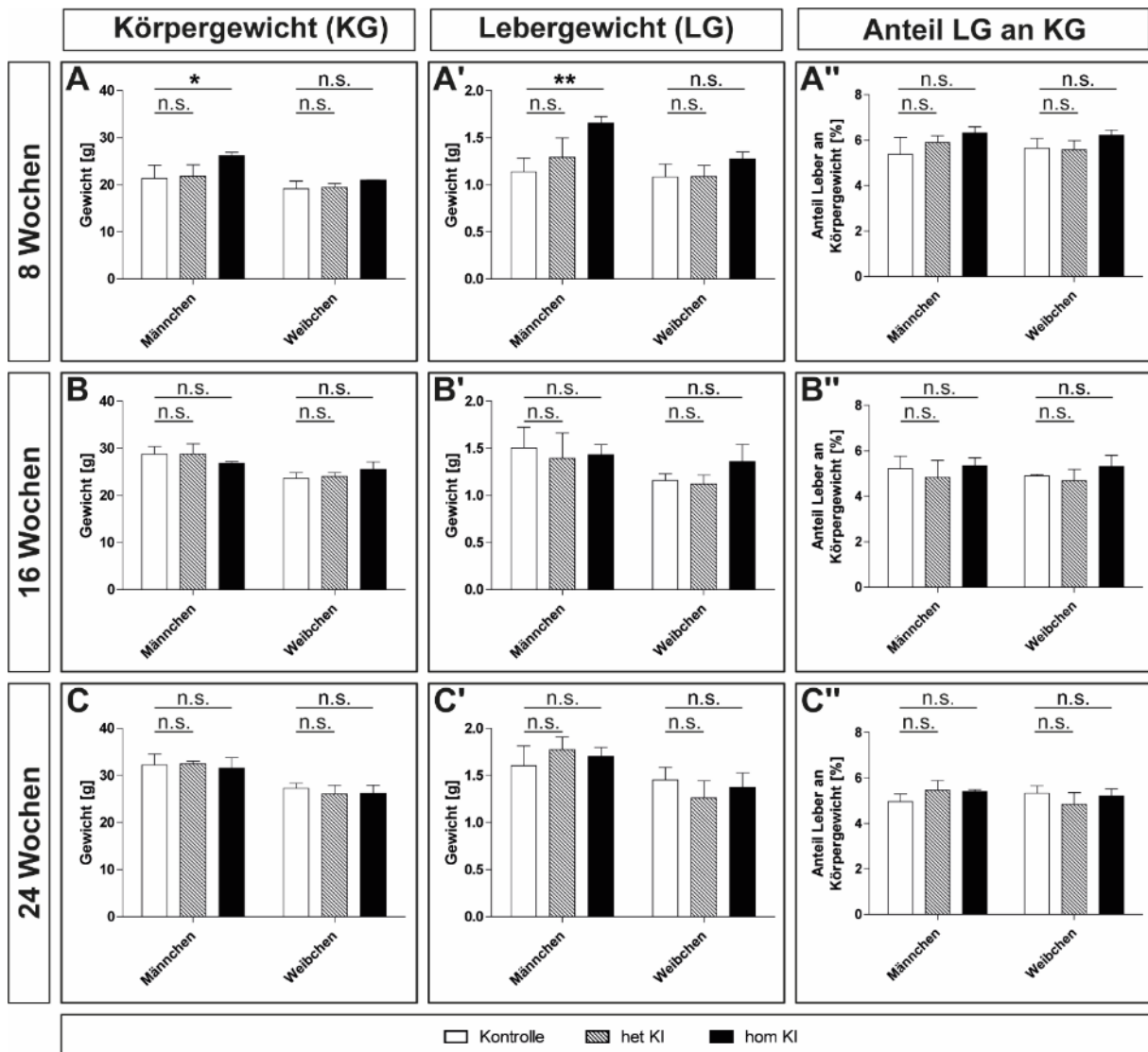


Abbildung 36: hOAT7-Knockin Mäuse zeigen keine Auffälligkeiten im Körper- und Lebergewicht

Für eine erste phänotypische Charakterisierung der Mauslinie wurden Körpergewicht, Lebergewicht sowie der Anteil des Lebergewichts am gesamten Körpergewicht von jeweils 4 männlichen und weiblichen Kontrolltieren bzw. heterozygoten (het KI) sowie homozygoten (hom KI) hOAT7-Knockin Tieren im Alter von 8, 16 und 24 Wochen bestimmt. Signifikante Unterschiede sind mit *, nicht signifikante Unterschiede mit n.s. gekennzeichnet.

Die Lebern der Mäuse der verschiedenen Versuchsgruppen wurden daraufhin wie auch schon bei der *mOat2-Knockout* Mauslinie auf morphologische Unterschiede zwischen den Genotypen hin untersucht. Die Lebern der Tiere wurden zunächst makroskopisch begutachtet, wobei keine Unterschiede zwischen den Lebern der Kontrolltiere und der heterozygoten bzw. homozygoten *hOAT7-Knockin* Tiere auffielen. FFPE-Gewebeschnitte des linken Leberlappens der 8 Wochen alten Kontroll- bzw. homozygoten *hOAT7-Knockin* Mäuse wurden daraufhin von der Abteilung für Mauspathologie der Universität Tübingen einer H&E-Färbung unterzogen und hinsichtlich ihrer Histologie begutachtet. Auch bei dieser Begutachtung konnten keine Unterschiede zwischen der Leberhistologie der Kontrolltiere und der der homozygoten *hOAT7-Knockin*-Tiere festgestellt werden (exemplarisch gezeigt an jeweils einer Kontroll- bzw. homozygoten *hOAT7-Knockin* Maus in Abb. 37 A - B').

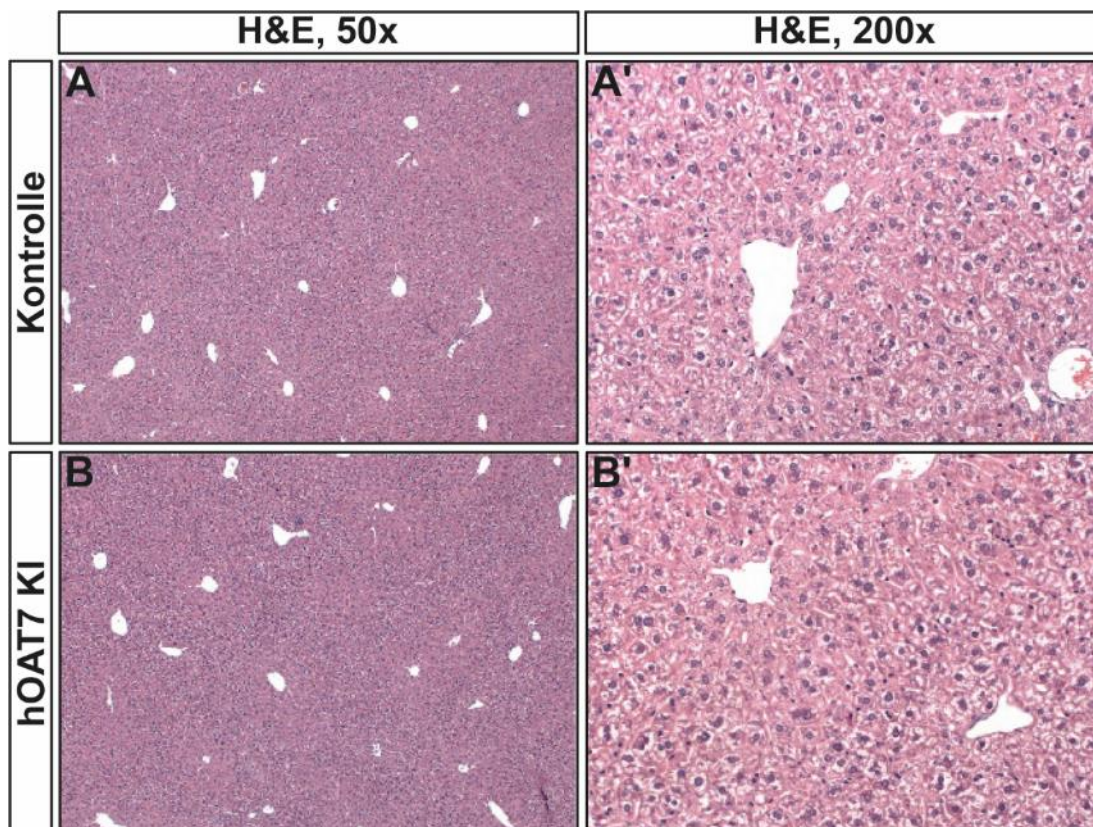


Abbildung 37: Unauffällige Leberhistologie bei *hOAT7-Knockin* Mäusen

Lebern von jeweils 4 männlichen und weiblichen Kontrolltieren sowie homozygoten *hOAT7-Knockin* (*hom hOAT7 KI*) Tieren im Alter von 8 Wochen wurden entnommen und aus dem linken Leberlappen FFPE-Gewebeschnitte hergestellt. Damit wurde von der Abteilung für Mauspathologie der Universität Tübingen eine H&E-Färbung durchgeführt (Bilder zur Verfügung gestellt von der Abteilung für Mauspathologie der Universität Tübingen).

3.2.2.3 Klinische Chemie von Kontroll- und hOAT7-Knockin Mäusen

Zur weiteren Charakterisierung der hOAT7-Knockin Mauslinie wurden im Zentrallabor des Robert-Bosch-Krankenhauses 12 verschiedene Parameter im Citratplasma der männlichen und weiblichen 8 Wochen alten Kontroll- und homozygoten hOAT7-Knockin Mäuse bestimmt (s. Abb. 38). Als Parameter waren Gesamtprotein, Albumin, Kreatinin, Harnstoff, Harnsäure, Triglyceride, Bilirubin, Aspartat-Aminotransferase (AST), Alanin-Aminotransferase (ALT), Laktat-Dehydrogenase (LDH), γ -Glutamyltransferase sowie alkalische Phosphatase gewählt worden. In den männlichen homozygoten hOAT7-Knockin Mäusen fiel als einziger Unterschied zu den Kontrollmäusen ein moderater, aber doch signifikanter Anstieg des Triglyceridspiegels auf. In den weiblichen homozygoten hOAT7-Knockin Mäusen konnten signifikante Reduktionen der AST, ALT und LDH Spiegel im Vergleich zu den Kontrollmäusen beobachtet werden, wobei die Unterschiede nicht übermäßig stark waren. Weitere signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und homozygoten hOAT7-Knockin Mäusen konnten nicht identifiziert werden.

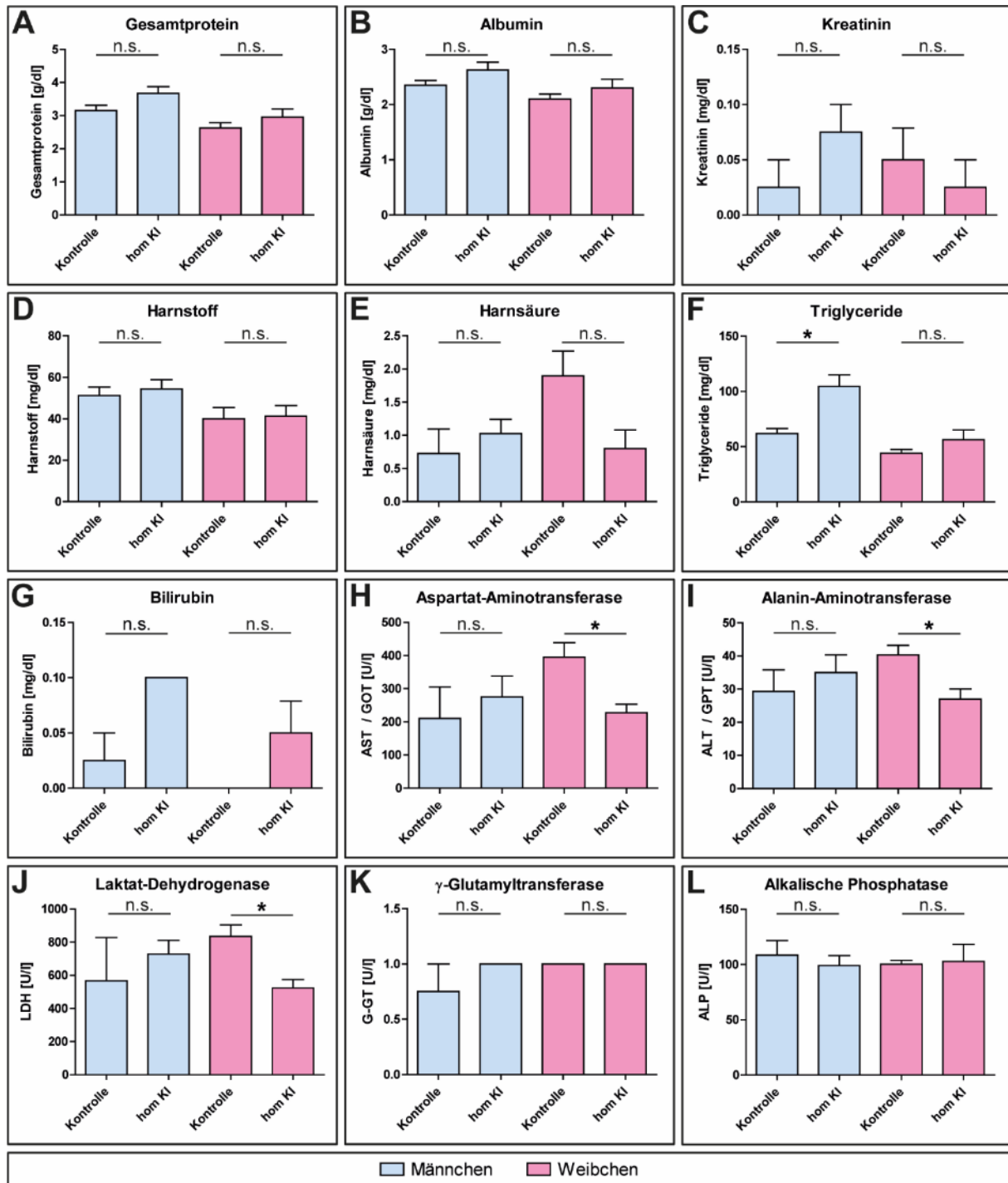


Abbildung 38: Klinisch-chemische Parameter von hOAT7-Knockin Mäusen

Citratplasma wurde von jeweils 4 männlichen (blau) und weiblichen (rosa) Kontrolltieren bzw. homozygoten hOAT7-Knockin (hom KI) Tieren im Alter von 8 Wochen entnommen und im Zentrallabor des Robert-Bosch-Krankenhauses wurden 12 verschiedene Laborparameter mit diesem bestimmt. Signifikante Unterschiede sind mit *, nicht signifikante Unterschiede mit n.s. gekennzeichnet.

3.2.2.4 Umfassende Charakterisierung der Mauslinie mittels verschiedener molekularbiologischer Methoden

Um die neu generierte hOAT7-*Knockin* Mauslinie umfassend zu charakterisieren, wurden, wie zuvor auch schon für die mOat2-*Knockout* Mauslinie, mit den Organen der Mäuse der verschiedenen Versuchsgruppen unterschiedliche Analysen durchgeführt. So konnte die Mauslinie mittels verschiedener molekularbiologischer Methoden auf DNA, RNA sowie Proteinebene auf ihre hOAT7 Expression untersucht werden.

i Charakterisierung der Mauslinie auf DNA Ebene

Zur Überprüfung, ob die hOAT7-*Knockin* Mäuse wie erwartet ausschließlich im Lebergewebe hOAT7 exprimierten, wurden verschiedene Gewebe genotypisiert. Hierbei wurden für jedes Gewebe zwei PCR Reaktionen angesetzt. Zum einen sollte bestimmt werden, ob ein konditioneller oder ein konstitutiver, also ein tatsächlicher, *Knockin* vorlag. Zum anderen wurde bestimmt, ob beide oder nur eines der beiden Allele einen konstitutiven / konditionellen *Knockin* aufwiesen. Die Ergebnisse der Gewebegenotypisierung sind exemplarisch am Beispiel jeweils einer männlichen, 8 Wochen alten Kontroll- sowie heterozygoten und homozygoten hOAT7-*Knockin* Maus in Abbildung 39 dargestellt. Alle Gewebe der Kontrollmäuse konnten mittels beider PCRs als homozygote Träger des konditionellen hOAT7-*Knockins* identifiziert werden. Die heterozygoten *Knockin* Mäuse zeigten den konstitutiven *Knockin* ausschließlich im Lebergewebe, alle anderen Gewebe zeigten nur den konditionellen *Knockin*. Außerdem konnte in den heterozygoten *Knockin* Mäusen der konditionelle bzw. konstitutive *Knockin* nur auf einem Allel nachgewiesen werden, das andere Allel zeigte den wildtypischen Genotyp. Die homozygoten hOAT7-*Knockin* Mäuse zeigten wie die heterozygoten *Knockin* Mäuse den konstitutiven *Knockin* ausschließlich im Lebergewebe, während alle anderen Gewebe nur den konditionellen *Knockin* aufwiesen. Allerdings war der konditionelle / konstitutive *Knockin* in diesen Mäusen auf beiden Allelen zu finden.

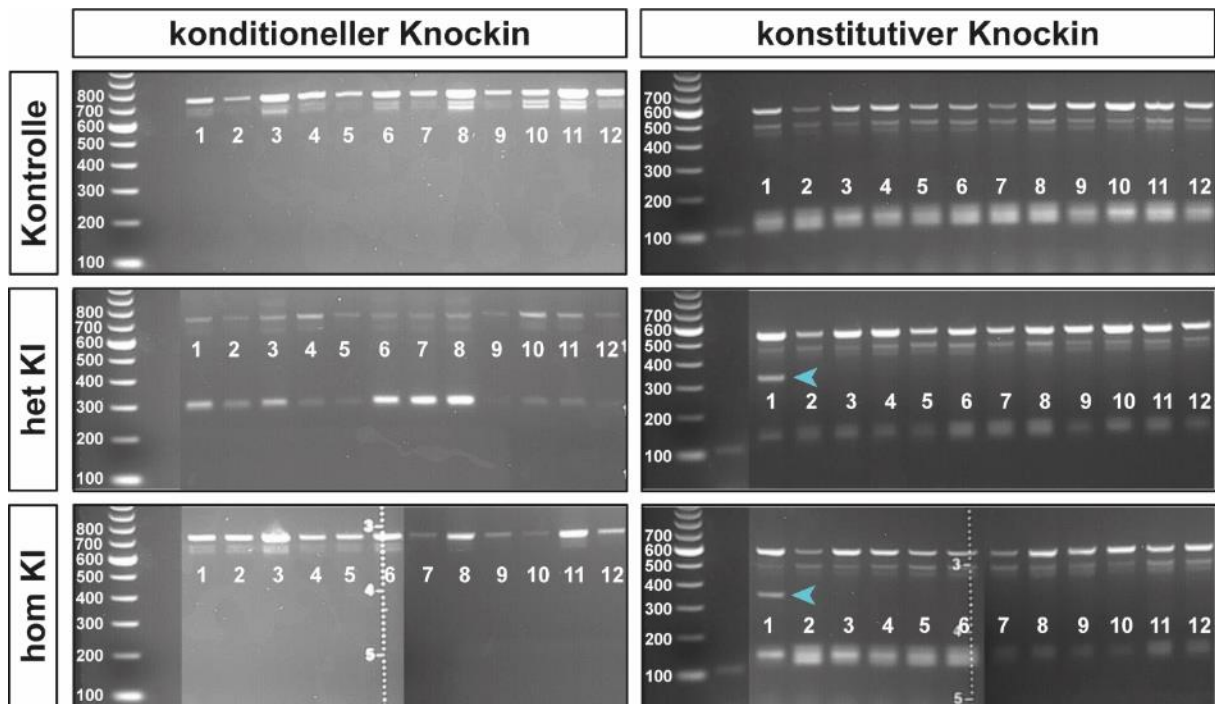


Abbildung 39: Genotypisierung verschiedener Gewebe von hOAT7-Knockin Mäusen

Lysate von 12 unterschiedlichen bei der Präparation von jeweils einer männlichen 8 Wochen alten Kontroll- sowie heterozygoten und homozygoten hOAT7-Knockin Maus (het KI und hom KI) gewonnenen Geweben wurden mithilfe von zwei PCR-Reaktionen genotypisiert. Zum einen wurde überprüft, ob ein konditioneller (Banden bei 492 u. 454 bp) oder konstitutiver *Knockin* (Bande bei 330 bp, blaue Pfeilspitzen) vorlag (Überschrift: konstitutiver *Knockin*, Kontrollbande bei 585 bp). Zum anderen wurde analysiert, ob beide oder nur eines der beiden Allele diesen *Knockin* aufwiesen (Überschrift: konditioneller *Knockin*; Wildtyp: Bande bei 299 bp, konditioneller / konstitutiver *Knockin*: Bande bei 744 bp).

1 = Leber, 2 = Niere, 3 = Milz, 4 = Ösophagus, 5 = Magen, 6 = Duodenum, 7 = Jejunum, 8 = Ileum, 9 = Muskel, 10 = Hoden, 11 = Gehirn, 12 = Herz.

ii Charakterisierung der Mauslinie auf RNA Ebene

Um nachzuweisen, dass in hOAT7-Knockin Mäusen *hSLC22A9* mRNA exprimiert wird, wurde eine qPCR mit Lebergewebe von Mäusen der verschiedenen Versuchsgruppen mit dem *hSLC22A9* und dem *mActb* TaqMan Assay durchgeführt. Die auf die *Actb* Werte bezogenen relativen Expressionsunterschiede der männlichen und weiblichen 8, 16 und 24 Wochen alten Kontroll- sowie heterozygoten und homozygoten hOAT7-Knockin Mäuse sind in Abbildung 40 dargestellt. Die männlichen sowie die weiblichen Kontrollmäuse zeigten im Alter von 8, 16 und 24 Wochen keine Expression von *hSLC22A9* mRNA. Die heterozygoten und die homozygoten hOAT7-

Knockin Mäuse zeigten zwischen den Geschlechtern und dem Alter der Mäuse variierende relative *hSLC22A9* mRNA Expressionsunterschiede, die im Vergleich zu den Kontrollmäusen für alle Zeitpunkte und Geschlechter signifikant erhöht waren. Tendenziell zeigten die homozygoten *hOAT7-Knockin* Mäuse eine gesteigerte *hSLC22A9* mRNA Expression im Vergleich zu den heterozygoten *hOAT7-Knockin* Mäusen.

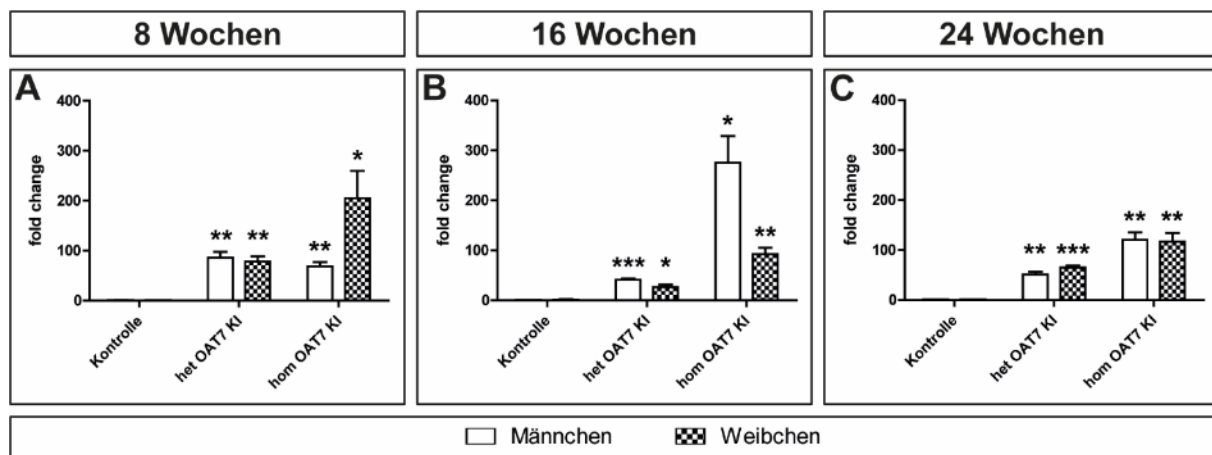


Abbildung 40: Hepatische *hSLC22A9* mRNA Expression in *hOAT7-Knockin* Mäusen

RNA wurde aus Lebergewebe von jeweils 4 männlichen und weiblichen Kontrolltieren bzw. heterozygoten (het OAT7 KI) sowie homozygoten *hOAT7-Knockin* (hom OAT7 KI) Tieren im Alter von 8 (A), 16 (B) und 24 (C) Wochen gewonnen und cDNA daraus synthetisiert. Eine qPCR mit dem *hSLC22A9* (Hs00971067_m1) und dem *mActb* (Mm02619580_g1) TaqMan Assay wurde durchgeführt, die *hSLC22A9* Expression für jede Probe auf die *mActb* Expression bezogen und der relative Expressionsunterschied (fold change) bestimmt. Signifikante Unterschiede (getestet gegen die jeweiligen Kontrolltiere) sind gekennzeichnet (*).

iii Charakterisierung der Mauslinie auf Proteinebene

Zum Nachweis von *hOAT7*-Protein in den heterozygoten und homozygoten *hOAT7-Knockin* Mäusen wurden mit einem gegen *hOAT7* gerichteten Antikörper zunächst Immunblots mit glykosyliertem und deglykosyliertem Gesamtprotein aus Lebergewebe von jeweils einer männlichen und weiblichen, 16 Wochen alten Kontroll- sowie heterozygoten und homozygoten *hOAT7-Knockin* Maus durchgeführt (s. Abb. 41). Sowohl im glykosylierten als auch im deglykosylierten Proteinextrakt der Kontrollmäuse beider Geschlechter konnte keine Proteinbande nachgewiesen werden. Dahingegen zeigten die glykosylierten Proteinextrakte der heterozygoten und homozygoten männlichen wie weiblichen *hOAT7-Knockin* Mäuse eine etwa 75 kDa

große Proteinbande. In den deglykosylierten Proteinextrakten der heterozygoten und homozygoten männlichen und weiblichen *Knockin* Mäuse war ebenfalls eine Proteinbande nachweisbar, deren Größe nun allerdings mit etwas über 50 kDa geringer war als in den glykosylierten Proben.

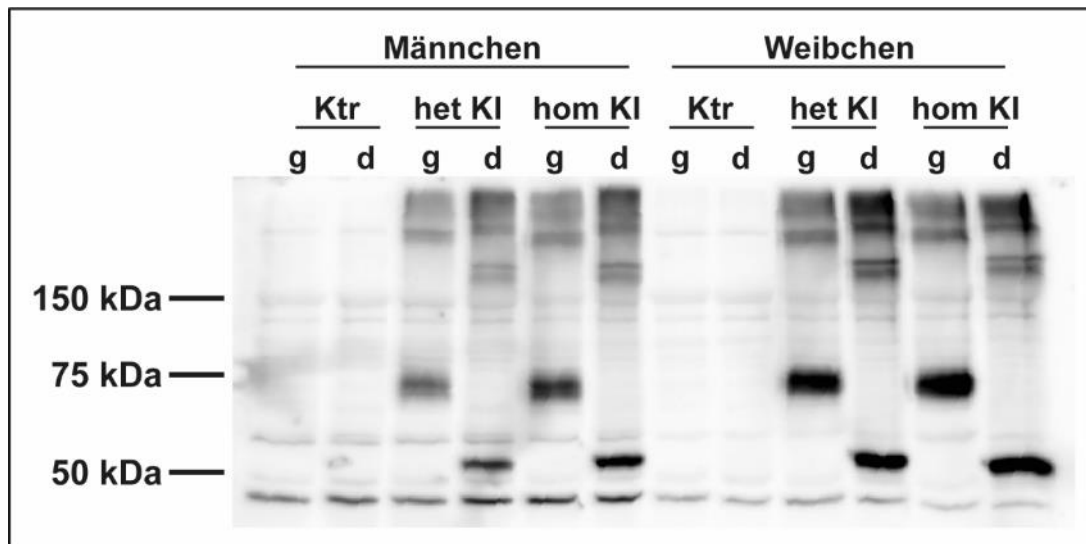


Abbildung 41: Nachweis der hOAT7 Proteinexpression in hOAT7-*Knockin* Mäusen mittels Immunblot

Mit glykosyliertem (g) und deglykosyliertem (d) aus Lebergewebe von jeweils einer männlichen und weiblichen, 16 Wochen alten Kontroll- (Ktr) sowie heterozygoten (het KI) und homozygoten (hom KI) hOAT7-*Knockin* Maus gewonnenen Gesamtprotein wurde ein Immunblot mit einem gegen hOAT7 gerichteten Antikörper (REP5045 Anti-*SLC22A9*, Verdünnung: 1:50) durchgeführt.

Zur Quantifizierung des in den heterozygoten und homozygoten hOAT7-*Knockin* Mäusen nachgewiesenen hOAT7-Proteins wurden erneut Immunblots mit dem gegen hOAT7 gerichteten Antikörper (REP5045 Anti-*SLC22A9*) und aus Lebergewebe der Mäuse der verschiedenen Versuchsgruppen gewonnenem Gesamtprotein durchgeführt (s. Abb. 42). Unabhängig vom Alter zeigten weder männliche noch weibliche Kontrollmäuse eine hOAT7 Proteinexpression. Die heterozygoten und die homozygoten hOAT7-*Knockin* Mäuse zeigten eine deutliche hOAT7 Proteinexpression, welche in fast allen Fällen vom heterozygoten zum homozygoten hOAT7-*Knockin* anstieg. Der Unterschied zwischen der Proteinexpression der Kontrolltiere und der der heterozygoten bzw. homozygoten hOAT7-*Knockin* Tiere war deutlich erkennbar und bis auf zwei Ausnahmefälle immer signifikant. Es fiel außerdem auf, dass die hOAT7 Proteinexpression der heterozygoten und homozygoten hOAT7-*Knockin* Mäuse mit 8 Wochen am stärksten ausgeprägt war, mit 16 und 24 Wochen

zeigten die Tiere eine deutlich verringerte, wenn auch verglichen mit den Kontrolltieren immer noch starke Proteinexpression.

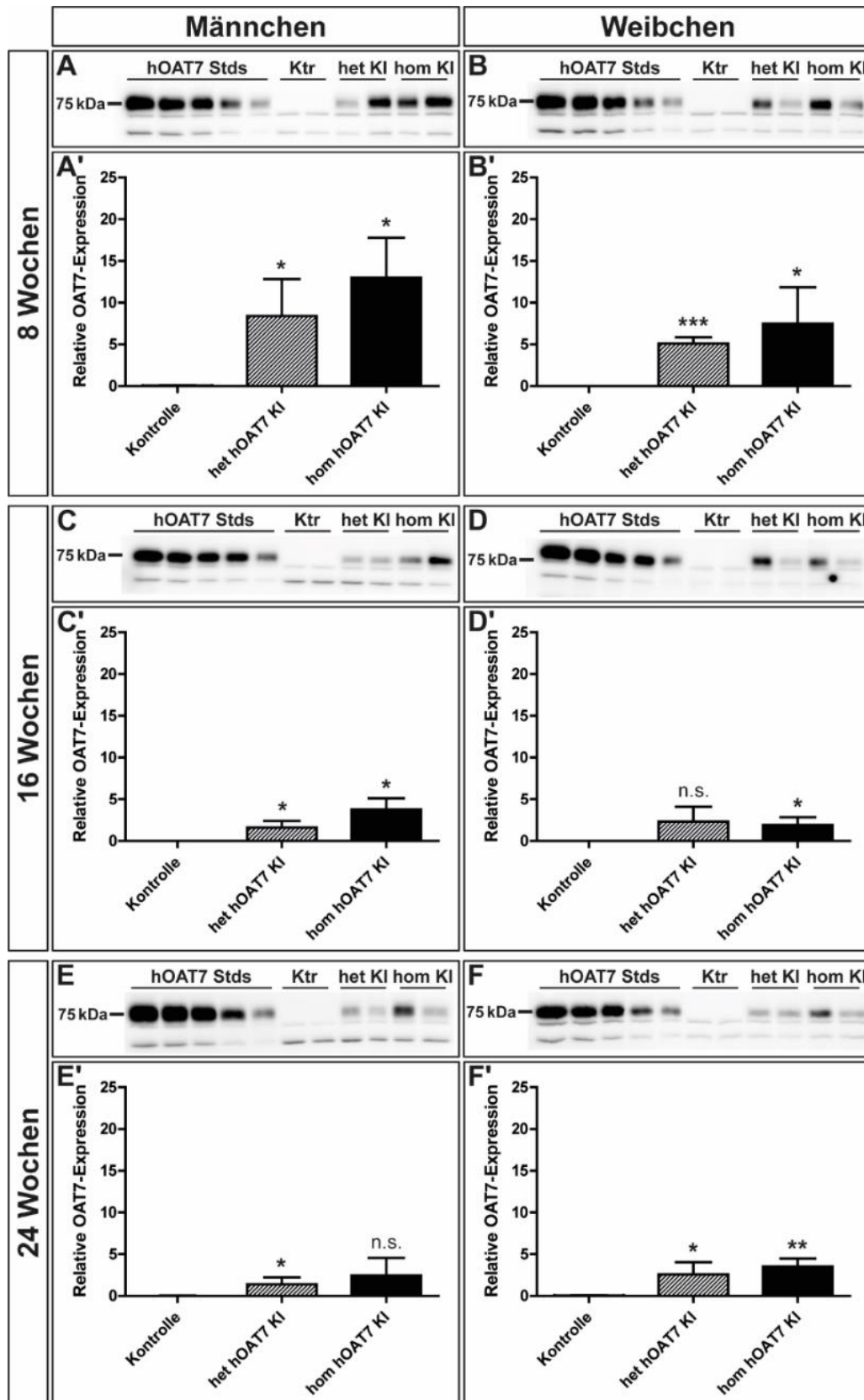


Abbildung 42: Quantifizierung von hOAT-Protein in hOAT7-Knockin Mäusen mittels Immunblot

Immunblots mit einem gegen hOAT7 gerichteten Antikörper (REP5045 Anti-SLC22A9, Verdünnung: 1:50) wurden mit Gesamtproteinextrakt aus Lebergewebe von jeweils 4 männlichen und weiblichen Kontrolltieren (Ktr) bzw. heterozygoten (het KI / het hOAT7 KI) sowie homozygoten (hom KI / hom hOAT7 KI) hOAT7-Knockin Tieren im Alter von 8 (A, B), 16 (C, D) und 24 (E, F) Wochen durchgeführt. Zur Bestimmung des hOAT7 Proteingehalts der Proteinextrakte der einzelnen Mäuse wurden aus Leberprotein einer 8 Wochen alten homozygoten hOAT7-Knockin-Maus gewonnene hOAT7 Eichpunkte der Konzentrationen 20 µg, 15 µg, 10 µg, 5 µg und 2,5 µg mit aufgetragen (hOAT7 Stds, aufgetragen in absteigender Konzentration von links nach rechts). Signifikante Unterschiede (getestet gegen die jeweiligen Kontrolltiere) sind mit *, nicht signifikante Unterschiede mit n.s. gekennzeichnet.

Um den Nachweis von hOAT7 Protein in den heterozygoten und homozygoten hOAT7-Knockin Mäusen auch noch mit einer anderen Methode vorzunehmen und um die Lokalisation des Transportproteins in den Hepatozyten zu klären, wurden mit einem gegen hOAT7 gerichteten Antikörper Immunfluoreszenzfärbungen mit aus Lebergewebe gefertigten Gefriergewebeschnitten (s. Abb. 43) und immunhistochemische Färbungen mit aus Lebergewebe gefertigten FFPE-Gewebeschnitten der Mäuse der verschiedenen Versuchsgruppen (s. Abb. 44) durchgeführt.

Unabhängig von Alter und Geschlecht der Mäuse zeigten die Immunfluoreszenzfärbungen der Kontrolltiere keine hOAT7 Färbung, während die der heterozygoten und homozygoten hOAT7-Knockin Mäuse alle eine deutliche hOAT7 Färbung im Bereich der Zellmembran der Hepatozyten aufwiesen. Hierbei war in fast allen Fällen kein deutlicher Unterschied in der Intensität der Färbung zwischen heterozygoten und homozygoten hOAT7-Knockin Mäusen ersichtlich.

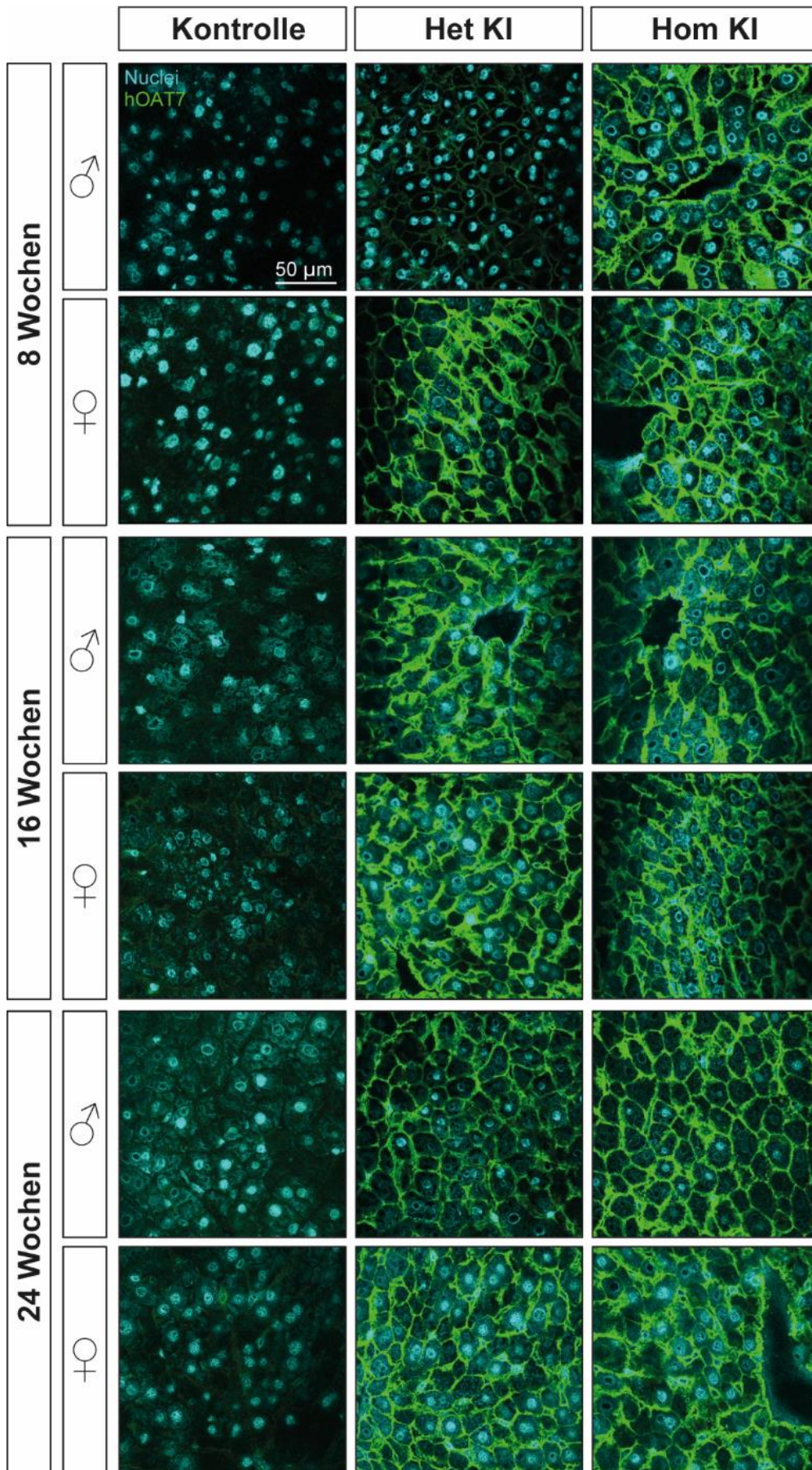


Abbildung 43: Nachweis der hOAT7 Proteinexpression in hOAT7-Knockin Mäusen mittels Immunfluoreszenz

Immunfluoreszenzfärbungen mit aus Lebergewebe gefertigten Gefriergewebeschnitten von jeweils 4 männlichen (♂) und weiblichen (♀) Kontrolltieren bzw. heterozygoten (het KI) sowie homozygoten (hom KI) hOAT7-Knockin Tieren im Alter von 8, 16 und 24 Wochen wurden mithilfe eines gegen hOAT7 gerichteten Antikörpers (REP5045 Anti-*SLC22A9*, Verdünnung: 1:50) durchgeführt (hOAT7, grüne Färbung). Die Zellkerne wurden mittels Hoechst 34580 angefärbt (Nuclei, blaue Färbung). Gezeigt ist exemplarisch jeweils eine Maus pro Versuchsgruppe.

Ebenso wie bei den Immunfluoreszenzfärbungen zeigten die Leberschnitte der Kontrollmäuse in den immunhistochemischen Färbungen unabhängig von Alter und Geschlecht keine hOAT7 Färbung. Die Leberschnitte der heterozygoten und homozygoten hOAT7-Knockin Mäuse wiesen alle eine deutliche hOAT7 Färbung im Bereich der Zellmembran der Hepatozyten auf (s. Abb. 44). Wie schon bei den Immunfluoreszenzfärbungen, war auch bei den immunhistochemischen Färbungen kein deutlicher Unterschied zwischen der Intensität der Färbung der heterozygoten und der der homozygoten hOAT7-Knockin Mäuse ersichtlich.

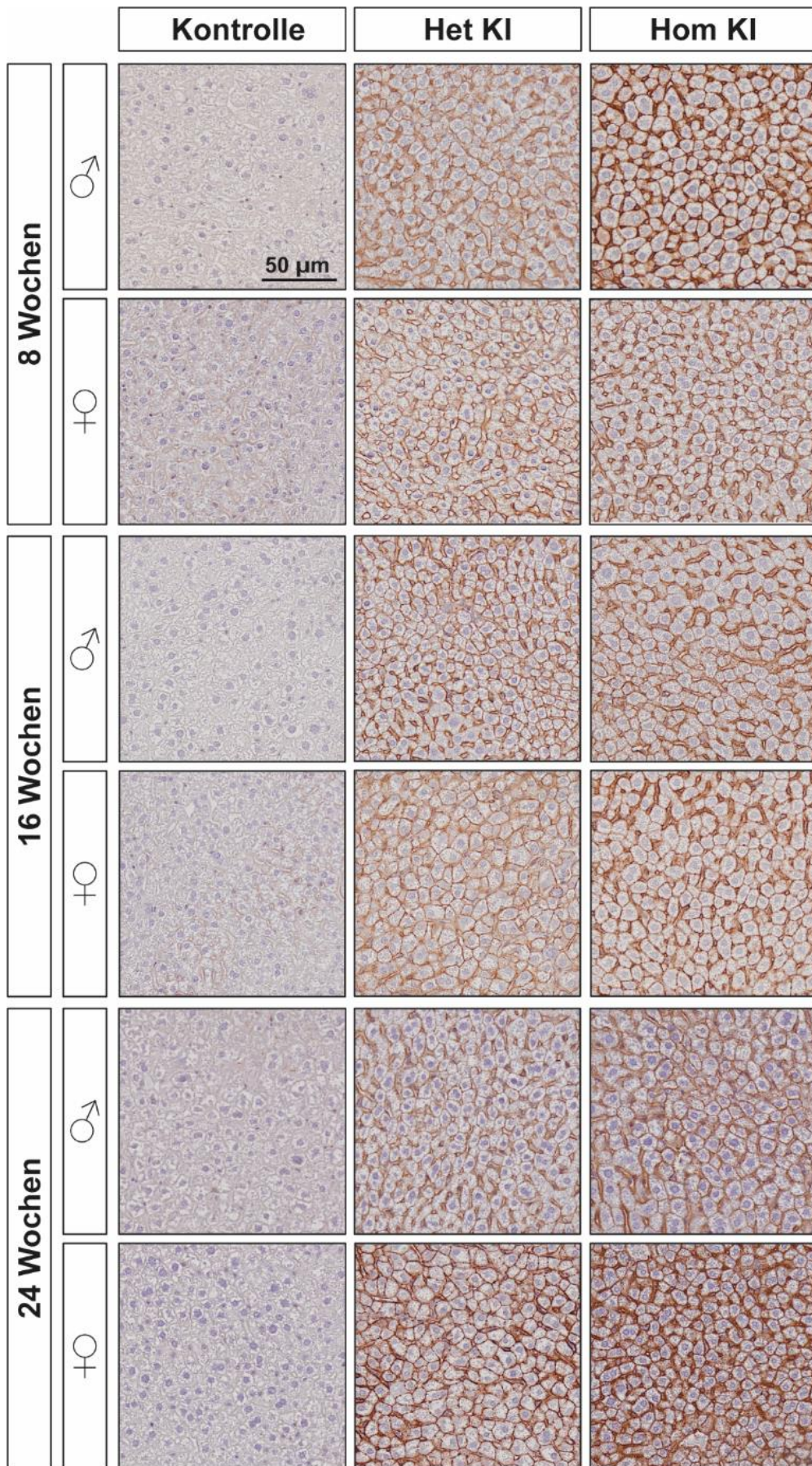


Abbildung 44: Nachweis der hOAT7 Proteinexpression in hOAT7-Knockin Mäusen mittels Immunhistochemie

Immunhistochemische Färbungen mit FFPE-Gewebeschnitten aus Lebergewebe von jeweils 4 männlichen (♂) und weiblichen (♀) Kontrolltieren bzw. heterozygoten (het KI) sowie homozygoten (hom KI) hOAT7-Knockin Tieren im Alter von 8, 16 und 24 Wochen wurden mithilfe eines gegen hOAT7 gerichteten Antikörper (REP5045 Anti-SLC22A9, Verdünnung: 1:50) durchgeführt (braune Färbung). Die Zellkerne wurden mittels Hämatoxylin angefärbt (blaue Färbung). Gezeigt ist exemplarisch jeweils eine Maus pro Versuchsgruppe.

3.2.2.5 Genomweite Genexpressionsanalyse mittels RNA-Microarrays

Um die Auswirkungen des *Knockins* von hOAT7 auf die Genexpression der Mäuse zu untersuchen, wurden mit Lebergewebe von Kontroll- sowie homozygoten hOAT7-Knockin Mäusen genomweite Genexpressionsanalysen mittels RNA-Microarray durchgeführt (s. Abb. 45 A). Es konnten zwei signifikante Unterschiede in der Genexpression zwischen den Kontroll- und hOAT7-Knockin-Mäusen beobachtet werden. Die hOAT7-Knockin Mäuse beider Geschlechter zeigten verglichen mit den Kontrolltieren zum einen eine reduzierte mRNA Expression der murinen Hydroxysteroid 17-Beta Dehydrogenase 6 (*mHsd17b6*) und zum anderen eine gesteigerte mRNA Expression des murinen Lipocalin-2 (*mLcn2*).

Diese Ergebnisse konnten durch qPCRs bestätigt werden, da auch hier die hOAT7-Knockin Mäuse im Vergleich zu den Kontrollmäusen eine verringerte *mHsd17b6* sowie eine erhöhte *mLcn2* mRNA Expression in der Leber zeigten (s. Abb. 45 B-C). Diese Unterschiede waren in beiden Geschlechtern erkennbar, allerdings nur für die männlichen Tiere statistisch signifikant.

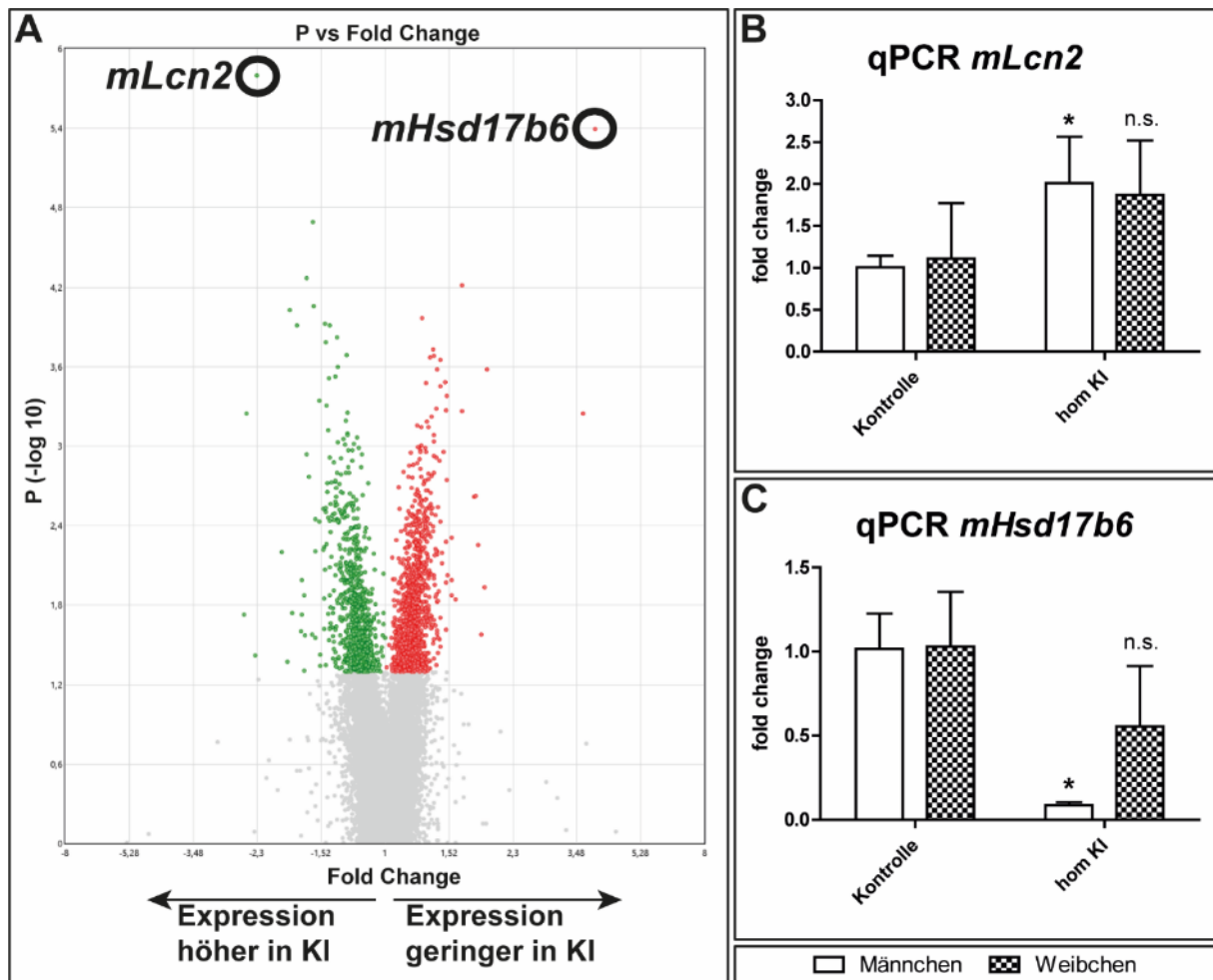


Abbildung 45: Unterschied in der hepatischen *mLcn2* und *mHsd17b6* mRNA Expression in hOAT7-Knockin Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen

RNA aus Lebergewebe von jeweils 4 8 Wochen alten, männlichen und weiblichen Kontroll- sowie homozygoten hOAT7-Knockin (KI) Mäusen wurde für die Analyse der Genexpression mittels eines RNA-Microarrays (Clariom S Assay HT (Maus)) genutzt und die Ergebnisse der Kontroll- und homozygoten hOAT7-Knockin Mäuse wurden miteinander verglichen (A). Die für die RNA-Microarrays genutzte RNA wurde in qPCRs mit dem *mLcn2* (Mm01324470_m1) (B), dem *mHsd17b6* (Mm00457343_m1) (C) und dem *mActb* (Mm02619580_g1) TaqMan Assay eingesetzt. Signifikante Unterschiede (getestet gegen die jeweiligen Kontrolltiere) sind mit *, nicht signifikante Unterschiede mit n.s. gekennzeichnet.

3.2.2.6 Isolation primärer muriner Hepatozyten zur Charakterisierung von hOAT7

Zum Testen möglicher Anwendungsmethoden für die neu generierte hOAT7-*Knockin* Mauslinie sollten primäre Hepatozyten aus Mäusen dieser Linie mithilfe des Miltenyi Liver Perfusion Kits isoliert und kultiviert werden. Die optische Analyse der Zellen mithilfe eines Lichtmikroskops (s. Abb. 46 A-B) ergab, dass die Zellen beider Mäuse gut angewachsen und hepatozytentypisch größtenteils binukleär waren. Zwischen den Zellen der Kontroll- und denen der homozygoten hOAT7-*Knockin* Maus war optisch kein Unterschied auszumachen.

Es wurde außerdem eine Immunfluoreszenzfärbung mit den Zellen der Kontroll- und homozygoten hOAT7-*Knockin* Maus mit einem gegen hOAT7 gerichteten Antikörper durchgeführt. Die ebenfalls durchgeführte Kernfärbung ließ keinen Unterschied zwischen den aus der Kontrollmaus und den aus der homozygoten hOAT7-*Knockin* Maus gewonnenen Zellen erkennen, in beiden Fällen waren viele Zellen binukleär. Während die aus der Kontrollmaus gewonnenen Hepatozyten keine hOAT7 Färbung aufwiesen, konnte in den Zellen, welche aus der homozygoten hOAT7-*Knockin* Maus isoliert worden waren, eine deutliche hOAT7 Färbung im Bereich der Zellmembran beobachtet werden (s. Abb. 46 C-D).

Eine mit den Zellen durchgeführte qPCR (s. Abb. 46 E) ergab eine deutliche *hSLC22A9* mRNA Expression in den Hepatozyten, welche aus der homozygoten hOAT7-*Knockin* Maus isoliert worden waren. In den aus der Kontrollmaus isolierten Hepatozyten konnte keine *hSLC22A9* mRNA Expression nachgewiesen werden.

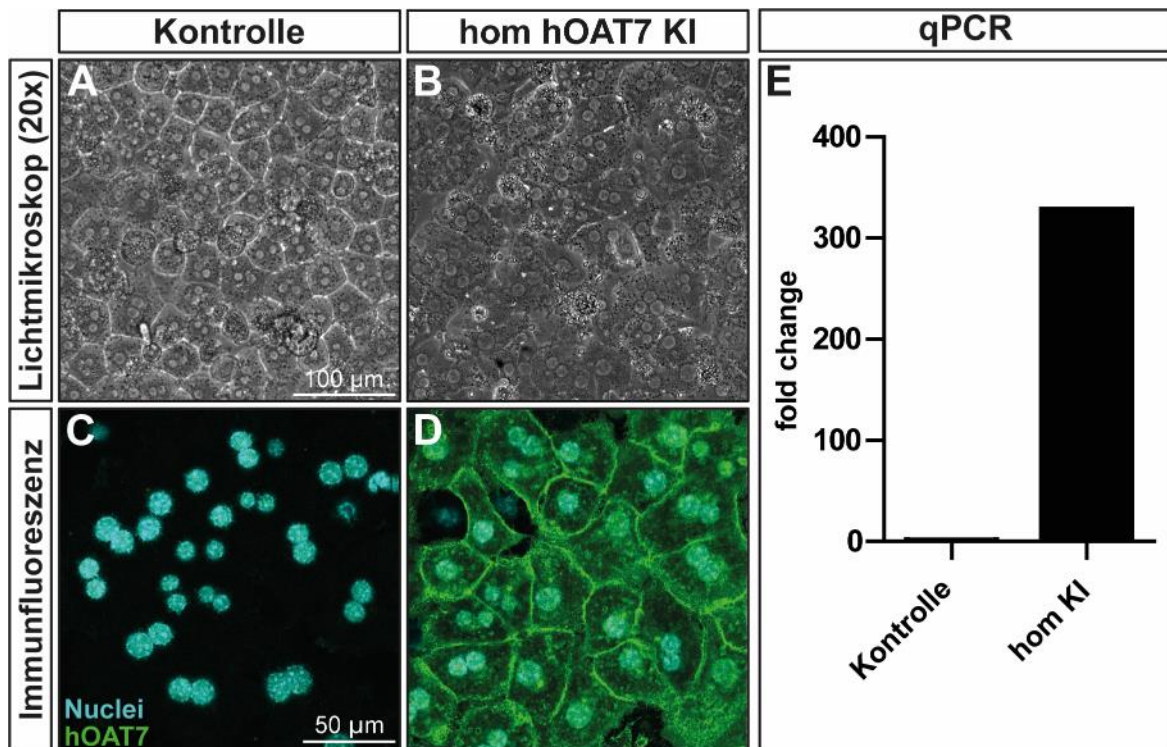


Abbildung 46: Isolation primärer Hepatozyten aus Kontroll- und hOAT7-Knockin Mäusen

Das Miltenyi Liver Perfusion Kit wurde genutzt, um primäre murine Hepatozyten aus jeweils einer 12 Wochen alten Kontroll- sowie homozygoten hOAT7-Knockin (hom hOAT7 KI) Maus zu isolieren. Die isolierten und auf Kollagen-beschichteten Platten ausgesäten Zellen wurden am nächsten Tag unter dem Lichtmikroskop betrachtet und fotografiert (A, B). Zudem wurde mit am Vortag auf Kollagen-beschichteten Objektträgern ausgesäten Zellen eine Immunfluoreszenzfärbung mit einem gegen hOAT7 gerichteten Antikörper (REP5045 Anti-SLC22A9, Verdünnung: 1:50) durchgeführt (C, D) (hOAT7, grüne Färbung). Die Zellkerne wurden mittels Hoechst 34580 angefärbt (Nuclei, blaue Färbung). Mit aus den Zellen gewonnener RNA wurde eine qPCR mit dem *hSLC22A9* (Hs00971067_m1) und dem *mActb* (Mm02619580_g1) TaqMan Assay durchgeführt (E), wobei die *hSLC22A9* mRNA Expression für jede Probe auf die *mActb* mRNA Expression bezogen wurde (fold change = relativer Expressionsunterschied).

4 Diskussion

OAT2 ist ein hauptsächlich in Leber und Niere vorkommendes Membrantransportprotein, welches den Transport einer großen Bandbreite von strukturell sehr unterschiedlichen Substraten über Membranen hinweg vermitteln kann (Sekine et al. 1998; Shen et al. 2017; Sun et al. 2001). Zu den vielen bisher identifizierten Substraten von OAT2 gehören sowohl endogene Substanzen wie auch eine Vielzahl an Arzneistoffen (Shen et al. 2017). Während OAT1 und OAT3 hauptsächlich in der Niere exprimiert sind, deutet die starke Expression von OAT2 in der Leber auf eine Rolle des Transporters in der hepatischen Regulierung von endogenen Substraten und Arzneimitteln hin (Kobayashi et al. 2005). Trotz relativ großen Forschungsinteresses an OAT2 bleibt die physiologische und pharmakologische Rolle des Transportproteins weiterhin im Dunkeln (Shen et al. 2017; Zamek-Gliszczynski et al. 2022), was eine tiefergehende funktionelle Charakterisierung des Transporters nötig macht. Dafür wurden in der vorliegenden Arbeit sowohl *in vitro* Experimente mit hOAT2- und mOat2-exprimierenden Zelllinien durchgeführt als auch ein neues Mausmodell zur Charakterisierung von OAT2 generiert und charakterisiert.

Ähnlich zu OAT2 ist die physiologische sowie die pharmakologische Rolle des ausschließlich im Menschen vorkommenden Membrantransporters hOAT7 noch weitgehend unbekannt. hOAT7 ist hauptsächlich in der Leber exprimiert, was vermuten lässt, dass auch dieser Transporter in der Regulierung endogener Substrate und Arzneistoffe involviert ist. Bisher wurden nur drei endogene Substanzen und ein Arzneistoff als Substrate dieses Transportproteins identifiziert (Emami Riedmaier et al. 2016; Shin et al. 2007). In dieser Arbeit sollte daher ein neues, humanisiertes Mausmodell zur Charakterisierung von OAT7 generiert und charakterisiert werden.

4.1 In vitro Versuche zur funktionellen Charakterisierung von OAT2 und OAT7

4.1.1 Charakterisierung von hOAT2 und mOat2 mithilfe von *in vitro* Versuchen

4.1.1.1 Etablierung der hOAT2- und mOat2-exprimierenden Zelllinien

Rekombinante Zelllinien stellen ein wichtiges und oft benutztes Werkzeug zur Charakterisierung von Transportproteinen dar. Wirtszelllinien werden dafür mit Genen für Transportproteine transfiziert und mit den so entstandenen rekombinanten Zellen Transportversuche durchgeführt, um neue Substrate zu identifizieren oder die Transportfunktion für ein bestimmtes Substrat genauer zu untersuchen. Die stabile Transfektion ist für solche Versuche besser geeignet als die transiente, da es dabei zu einer geringeren Variabilität in der Expression der Transportproteine zwischen verschiedenen Versuchen kommt (Brouwer et al. 2013). Viele wichtige Erkenntnisse über Substratspezifitäten, Arzneistoffwechselwirkungen und Inhibitoren von Membrantransportern wurden bereits mit Transporter-exprimierenden Zelllinien gewonnen (Dvorak et al. 2021). Mit HEK293 Zellen, welche hOCT1, hOCT2, hOCT3 und hMATE stabil exprimierten, konnte beispielsweise herausgefunden werden, dass diese Transportproteine überlappende Substratspezifitäten mit CYP2D6 aufweisen und mit hOAT1 und hOAT3 transfizierte proximale Tubuluszellen können für die Erforschung von Arzneistoffwechselwirkungen und daraus resultierenden Nierenschäden von großem Nutzen sein (Neul et al. 2021; Nieskens et al. 2016).

Zur Charakterisierung von hOAT2 des Menschen und mOat2 der Maus wurden im Rahmen dieser Arbeit hOAT2- und mOat2-exprimierende Zelllinien durch stabile Transfektion von HEK293 Zellen generiert. Die Zellen zeigten in Immunfluoreszenzfärbungen eine deutliche Expression des jeweiligen Transportproteins in der Zellmembran und auch per qPCR- und Immunblot-Analysen konnte die Expression von hOAT2 bzw. mOat2 in den Zellen nachgewiesen werden. Rekombinante, hOAT2-exprimierende Zelllinien wurden bereits in der Literatur beschrieben. Enomoto und Kollegen exprimierten das Protein durch Transfektion in proximalen Tubuluszellen der Maus, transient transfizierte HEK293 Zellen wurden von Cropp und Kollegen zur Identifizierung von hOAT2-Substraten genutzt und auch stabil transfizierte, hOAT2-exprimierende Zelllinien dienten schon der Untersuchung des Transportproteins (Cropp et al. 2008; Enomoto et al. 2002; Fork et al. 2011; Henjakovic et al. 2015; Marada et al. 2015).

mOat2-exprimierende Zelllinien wurden nach unserem Kenntnisstand noch nicht

beschrieben. Die hier etablierte mOat2-exprimierende Zelllinie stellt also ein wichtiges, neues Werkzeug in der Charakterisierung von mOat2 und damit in der Erforschung von speziesspezifischen Unterschieden zwischen hOAT2 und mOat2 dar. Dies ist besonders wichtig, da es sich bei vielen der in der Membrantransporterforschung genutzten präklinischen Mausmodellen um *Knockout* Mauslinien handelt, bei denen das Äquivalent eines humanen Membrantransporters in der Maus ausgeschaltet ist (Jiang et al. 2010). Speziesspezifische Unterschiede in der Expression oder der Transportaktivität der Transportproteine kommen allerdings immer wieder vor. Die Untersuchung der organischen Kationentransporter der Maus mOct1, mOct2, mOct3 und mPmat und der Vergleich mit den Äquivalenten im Menschen ergab so beispielweise trotz großer Sequenzübereinstimmung klare speziesspezifische Unterschiede. Inhibitoren von hOCT3 waren zum Beispiel in der Lage mOct3 zu aktivieren (Meyer et al. 2022; Miura et al. 2017). Auch die beiden Membrantransporter Thiamintransporter 1 (*SLC19A2*) und BSEP (*Bile salt export pump, ABCB11*) zeigen Unterschiede zwischen dem humanen und dem Maus Protein. In beiden Fällen führte das Wissen um die speziesspezifischen Unterschiede nicht dazu, dass ein Mausmodell zur Erforschung des humanen Transportproteins als unbrauchbar erklärt wurde (Fleming et al. 2001; Green et al. 2000). Vielmehr können Ergebnisse, die mit solchen Modellen gewonnen werden, mit dem Wissen über speziesspezifische Unterschiede deutlich besser interpretiert werden, was die Tiermodelle zu noch stärkeren Werkzeugen in der Erforschung der Transportproteine macht. Daher ist es vor der Durchführung präklinischer Experimente mit Mausmodellen von großer Wichtigkeit, auch die Äquivalente der humanen Transportproteine in der Maus zu untersuchen, da unbekannte Unterschiede zwischen den beiden Spezies schnell zu fehlerhafter Interpretation der Ergebnisse führen können (Chu et al. 2012). Die im Rahmen der Arbeit generierte mOat2-exprimierende Zelllinie kann also dazu dienen, Versuche mit den ebenfalls im Rahmen der Arbeit generierten mOat2-*Knockout* Mäusen sinnvoll zu planen und die Ergebnisse korrekt zu interpretieren und in den richtigen Kontext zu setzen.

4.1.1.2 Die Rolle von OAT2 im cGMP Signalweg

i Erkenntnisse aus cGMP Transportversuchen

hOAT2 ist in der Lage, cGMP mit hoher Affinität zu transportieren, wobei es sowohl die Aufnahme als auch den Efflux des sekundären Botenstoffes vermitteln kann (Cropp et al. 2008). Der Transport von cGMP durch mOat2 wurde unseres Wissens nach noch nicht gezeigt.

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Transportversuchen mit hOAT2- und mOat2-exprimierenden Zellen konnte gezeigt werden, dass sowohl hOAT2 als auch mOat2 in der Lage sind, cGMP zu transportieren. Für mOat2 konnte cGMP demnach als neues Substrat identifiziert werden. Dennoch konnte ein speziesspezifischer Unterschied zwischen hOAT2 und mOat2 detektiert werden. Obwohl der Transport von cGMP durch mOat2 sehr deutlich und der Unterschied zwischen den Kontrollzellen und den mOat2-exprimierenden Zellen auch signifikant war, war er in allen durchgeführten Transportversuchen deutlich schwächer als der durch hOAT2, die Affinität von mOat2 für cGMP war also niedriger als die von hOAT2, was sich auch in den unterschiedlichen K_m -Werten zeigt (104,7 μM für hOAT2, 1333 μM für mOat2). Dies könnte darauf hinweisen, dass es in der Maus neben mOat2 noch weitere, im Menschen nicht vorhandene, Transportproteine gibt, welche den Transport von cGMP vermitteln können, und mOat2 in der Maus daher eine geringere Rolle im cGMP Signalweg einnimmt als hOAT2 im Menschen. Für andere Transportproteine konnten ebenfalls bereits unterschiedliche Affinitäten für verschiedene Substrate zwischen humanen und Maus Transportproteinen beobachtet werden. So lässt sich beispielsweise eine deutlich schwächere Aufnahme von Metformin und Thiamin in stabil transfizierte hOCT1-exprimierende als in mOct1-exprimierende Zellen beobachten (Meyer et al. 2020).

Vergleicht man die hier erlangten Ergebnisse mit denen von Mathialagan und Kollegen, welche ebenfalls mit stabil transfizierten, hOAT2-exprimierenden HEK-Zellen Transportversuche durchführten, zeigten die hier generierten Zellen sogar einen stärkeren Transport. Bei gleicher cGMP Konzentration beschreiben Mathialagan und Kollegen nach 4 min einen 30fachen Anstieg in der cGMP Aufnahme im Vergleich zu den Kontrollzellen (Mathialagan et al. 2018), während in den hier beschriebenen Experimenten nach 1 Minute bereits ein ca. 90facher und nach 10 Minuten ein ca. 130facher Anstieg beobachtet werden konnte. Cropp und Kollegen beschreiben den bidirektionalen Transport von cGMP durch hOAT2. Auch in den hier durchgeführten

Transportversuchen konnte sowohl die Aufnahme von cGMP in die hOAT2-exprimierenden Zellen als auch die Abgabe von cGMP durch ebendiese Zellen gezeigt werden. Cropp und Kollegen beschreiben außerdem für hOAT2 einen K_m -Wert von 88 μM (Cropp et al. 2008). Wir konnten mit konzentrationsabhängigen Transportversuchen einen etwas höheren K_m -Wert von 104,7 μM errechnen. Der von uns errechnete K_m -Wert ist fast identisch mit dem von Marada und Kollegen ermittelten Wert von 101 μM (Marada et al. 2015). Sowohl Marada und Kollegen als auch wir verwendeten stabil transfizierte HEK293 Zellen, während Cropp und Kollegen ihre Versuche mit transient transfizierten Zellen durchführten, was eventuell den geringfügigen Unterschied erklären kann. Eine weitere Ähnlichkeit zwischen den von uns generierten Ergebnissen und denen von Marada und Kollegen ist die erst relativ spät eintretende zeitabhängige Sättigung des cGMP Transportes. So konnte erst nach Inkubationszeiten von über 20 Minuten eine langsam eintretende Sättigung des Transportes beobachtet werden (Marada et al. 2015).

Mit Transportversuchen mit Zelllinien, welche jeweils einen der hauptsächlich für den Arzneistofftransport verantwortlichen hepatischen Aufnahmetransporter der sinusoidalen Membran der Hepatozyten exprimierten, konnten wir zeigen, dass hOAT2 der einzige dieser Aufnahmetransporter mit der Fähigkeit ist, den Transport von cGMP zu vermitteln. Eine solche systematische Analyse wurde unseres Wissens nach bisher nicht durchgeführt. Sie ist wichtig, um die Rolle, welche hOAT2 im cGMP Signalweg spielen könnte, besser einzuschätzen. Für mOat2 konnte eine vergleichbare systematische Analyse nicht durchgeführt werden, da Zelllinien, welche die hepatischen Aufnahmetransporter der Maus exprimieren, nicht vorhanden waren. Die Generierung solcher Zelllinien wäre daher von großem Interesse, um zum besseren Verständnis der Rolle von mOat2 im cGMP Signalweg der Maus beizutragen.

Die „*remote sensing and signaling*“ Hypothese besagt, dass Membrantransporter gemeinsam mit anderen am Stoffwechsel beteiligten Proteinen zum reibungslosen Ablauf verschiedener Signalwege und damit zur Kommunikation zwischen Zellen und Organen beitragen. Diese Kommunikation erfolgt durch die Regulierung von kleinen, endogenen Molekülen, welche einen hohen „Grad an Informationen“ aufweisen (Nigam 2015; Nigam und Granados 2022). Ein Beispiel für die „*remote sensing and signaling*“ Hypothese stellt der Uratstoffwechsel dar. Urat wird von einer Vielzahl an Transportproteinen transportiert, von welchen viele in der Niere aber auch manche in

Leber und Darm exprimiert sind. Gemeinsam mit Enzymen, welche in den Purinmetabolismus integriert sind, bilden sie so ein Netzwerk von verschiedenen Proteinen, welche über verschiedene Gewebe hinweg den Uratspiegel steuern. Fehlfunktionen einzelner involvierter Proteine und damit einhergehende veränderte Uratspiegel können dabei zu Krankheiten führen. Der cGMP Signalweg könnte so ebenfalls ein Beispiel für die „*remote sensing and signaling*“ Hypothese sein, da cGMP ein körpereigenes Signalmolekül ist, welches in einer Vielzahl von körpereigenen Prozessen involviert ist und in dessen Generierung, Regulierung und Verteilung im Körper zahlreiche Proteine beteiligt sind. In Übereinstimmung damit wird schon seit längerem diskutiert, dass OAT2 in die Regulation der intra- und extrazellulären cGMP Spiegel und damit in vielen cGMP-abhängigen körpereigenen Prozessen beteiligt ist (Nigam 2018; Wu et al. 2011).

Wir waren in der Lage zu zeigen, dass cGMP sowohl durch hOAT2 als auch durch mOat2 mit hoher Affinität transportiert wird, was eine Rolle beider Membrantransporter im cGMP Signalweg nahelegt. Dass hOAT2 der einzige hepatische cGMP Aufnahmetransporter im Menschen ist, stützt diese Hypothese zusätzlich, da der Verlust der Transportaktivität nicht durch ein anderes Transportprotein kompensiert werden könnte. hOAT2 könnte so zusammen mit MRP-Proteinen, welche in der Lage sind, den Efflux von cGMP aus Zellen zu vermitteln, und anderen cGMP Signalwegkomponenten intra- und extrazelluläre cGMP Spiegel regulieren, damit zur Kommunikation zwischen Organen beitragen und in einer Vielzahl von körpereigenen Prozessen entscheidend beteiligt sein. Zum einen könnten so Prozesse, welche direkt in den Hepatozyten durch cGMP gesteuert werden, durch hOAT2 beeinflusst werden. Ein Beispiel hierfür ist die von Deng und Kollegen beschriebene antiinflammatorische Wirkung von cGMP in den Hepatozyten. Erhöhte cGMP Konzentrationen in den Hepatozyten von Mäusen eines Mausmodells zur Erforschung von Sepsis führten hier zur Aktivierung der Protease TACE (*Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme*) und damit zum Abstoßen des Tumornekrosefaktor-Rezeptors, wodurch die systemische Entzündung gemindert werden konnte (Deng et al. 2015). Die Hepatozyten könnten andererseits aber auch als eine Art Speicher für cGMP dienen. Da hOAT2 in der Lage ist sowohl die Aufnahme als auch die Abgabe von cGMP zu vermitteln, könnte es durch die gezielte Aufnahme von cGMP in die Hepatozyten bzw. dessen Abgabe, Einfluss auf die cGMP Konzentration des Blutes ausüben und damit auch eine Vielzahl von cGMP-gesteuerten Abläufen außerhalb der Leber beeinflussen.

ii Erkenntnisse aus der Analyse der Expression von Komponenten des cGMP Signalwegs in verschiedenen Leberzelltypen

Um näher auf die Rolle von hOAT2 im cGMP Signalweg einzugehen, wurden verschiedene Leberzelltypen hinsichtlich ihrer Expression verschiedener cGMP Signalwegkomponenten und cGMP Transportproteine untersucht. Es wurde mittels Microarrays die RNA Expression verschiedener cGMP Signalwegkomponenten in primären sinusoidalen Endothelzellen und primären Ito-Zellen des Menschen als Vertreter der nicht-parenchymalen Leberzellen bestimmt. Die Expressionswerte des Versuches wurden mit öffentlich zugänglichen Daten eines Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays von primären Hepatozyten des Menschen verglichen (Hart et al. 2010).

Wir konnten den cGMP Effluxtransporter MRP4 auf RNA Ebene in allen drei Zelltypen nachweisen, MRP5 wurde zusätzlich noch in den Ito-Zellen und sinusoidalen Endothelzellen exprimiert. OAT2 wurde in den Hepatozyten stark exprimiert und konnte auch in den anderen beiden Zelltypen nachgewiesen werden. Mittels Proteomanalysen der hauptsächlich vorkommenden Leberzelltypen des Menschen, konnten Ölander und Kollegen ebenfalls eine starke Expression von OAT2 in den Hepatozyten nachweisen (Ölander et al. 2020). Dies könnte darauf hindeuten, dass das Transportprotein maßgeblich an der Regulierung der cGMP Konzentrationen in der Leber beteiligt ist.

Wir konnten drei cGMP-generierende Guanylatzyklasen auf mRNA Ebene in allen drei Zelltypen nachweisen. Die Frage, ob Guanylatzyklasen in Hepatozyten exprimiert sind, wurde bisher nicht eindeutig beantwortet. Verschiedene Studien legen nahe, dass die Guanylatzyklase C bei Leberschäden verstärkt hepatisch exprimiert wird und sich vorteilhaft auf die Regeneration auswirkt. So zeigten Mäuse, welche einen Funktionsverlust der Guanylatzyklase C aufwiesen, eine erhöhte Sterblichkeit nach akuter Leberschädigung im Vergleich zu Kontrollmäusen (Mann et al. 2010). Ebenso konnte in gesunder Rattenleber die Guanylatzyklase C nicht in den Hepatozyten nachgewiesen werden, während sie nach Leberschädigung exprimiert wurde und zur Regeneration beitrug (Laney et al. 1994). Auch die Frage nach der hepatischen Expression der löslichen Guanylatzyklase, welche durch Stickstoffmonoxid aktiviert wird, ist umstritten (Sandner 2018). Während verschiedene Studien die Expression des Enzyms in den Hepatozyten von Ratte und Mensch beschreiben (Billiar et al. 1992; Sarno 2017; Schwabl et al. 2018), konnte dies in anderen Studien nicht nachgewiesen werden (Hall et al. 2019). Auch wir konnten eine Expression der löslichen

Guanylatzyklase für keinen der drei Leberzelltypen nachweisen. Für die lösliche Guanylatzyklase gibt es wie für die Guanylatzyklase C die Vermutung, dass diese zur Regeneration der Leber nach einer Cholestase beiträgt, da eine verstärkte Expression des Enzyms in Hepatozyten der Ratte, welche einer Ligation des Gallenganges unterzogen wurden, beobachtet wurde (Kreisel et al. 2020; Schwabl et al. 2018). Ölander und Kollegen konnten die Proteinexpression der Guanylatzyklase A in Endothelzellen und die der Guanylatzyklase B in Ito Zellen nachweisen. In den Hepatozyten konnten sie keine Guanylatzyklasen finden (Ölander et al. 2020). Unsere Ergebnisse und die bereits existierenden Daten zusammengenommen, ist demnach fraglich, ob Guanylatzyklasen in Hepatozyten im gesunden Leberzustand exprimiert werden. Eine fehlende Expression dieser cGMP-generierenden Enzyme könnte auf eine wichtige Rolle von OAT2 im cGMP Signalweg hindeuten. Der OAT2-vermittelte Transport des sekundären Botenstoffes über die Zellmembran würde in diesem Fall die einzige Möglichkeit darstellen, die intrazelluläre cGMP Konzentration zu kontrollieren.

Der Abbau von cGMP wird von PDEs vermittelt. Wir konnten 7 PDE-Transkripte in den Ito-Zellen und sinusoidalen Endothelzellen, jedoch nur 3 in den Hepatozyten nachweisen. Dies könnte darauf hindeuten, dass auch der cGMP Abbau in den Hepatozyten keinen großen Stellenwert im cGMP Signalweg hat, was ebenfalls die Vermutung stützt, dass OAT2 in den Hepatozyten einen maßgeblichen Teil zur Regulierung der intra- und extrazellulären cGMP Konzentration beiträgt. Auch die Ergebnisse von Ölander und Kollegen unterstreichen diese Hypothese. Hier konnten auf Proteinebene nur fünf der sieben von uns nachgewiesenen PDEs ermittelt werden, wobei diese auch immer nur in einem oder zwei der Zelltypen exprimiert waren. In den Hepatozyten wurde lediglich die Expression der PDE1A und der PDE3B gezeigt (Ölander et al. 2020).

Während wir die RNA Expression von fünf cGMP Effektoren in den Ito-Zellen und den sinusoidalen Endothelzellen nachweisen konnten, wobei es sich um drei CNGs und um zwei cGMP-abhängige Proteinkinasen handelte, wiesen die Hepatozyten lediglich die Expression von CNGA1 auf. Ölander und Kollegen konnten auf Proteinebene von den fünf Proteinen nur die cGMP-abhängige Proteinkinasen PRKG1 in den Endothelzellen und Ito Zellen nachweisen, während sie in den Hepatozyten kein einziges cGMP Effektorprotein zeigen konnten. Dies lässt darauf schließen, dass die

Hepatozyten, wie bereits vermutet, eher passiv auf den cGMP Signalweg einwirken, indem sie als eine Art Speicher für cGMP fungieren, dadurch die cGMP Konzentration im Blut kontrollieren und letzten Endes verschiedene cGMP-vermittelte Prozesse innerhalb und außerhalb der Leber beeinflussen.

4.1.1.3 Charakterisierung der Transportaktivität von hOAT2 / mOat2 für Xanthin

Die Beobachtung, dass Xanthin, ein Zwischenprodukt beim Purinabbau, ein Substrat von hOAT2 ist, wurde bisher nach unserem Kenntnisstand nur durch Yamada und Kollegen beschrieben, wobei der Transport bisher nicht näher charakterisiert ist und keine kinetischen Konstanten bestimmt wurden (Yamada et al. 2014).

Wir konnten mittels Transportversuchen mit Xanthin und hOAT2- bzw. mOat2-exprimierenden Zelllinien reproduzieren, dass hOAT2 Xanthin transportiert. Zusätzlich konnten wir nachweisen, dass dieser Transport sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig erfolgt und zum ersten Mal kinetische Konstanten für dieses Substrat bestimmen. Eine systematische Analyse mittels Transportversuchen mit Xanthin und Zelllinien, welche jeweils einen der hauptsächlich für den Arzneistofftransport verantwortlichen hepatischen Aufnahmetransporter der sinusoidalen Hepatozytenmembran des Menschen exprimierten, konnte außerdem zeigen, dass hOAT2 das einzige dieser Transportproteine ist, welches die Aufnahme von Xanthin vermitteln kann.

Interessanterweise konnten wir außerdem zeigen, dass Xanthin kein Substrat von mOat2 ist. Solche deutlichen speziesspezifischen Unterschiede in der Substratspezifität sind auch für andere Membrantransportproteine schon beschrieben worden. So ergab die Untersuchung speziesspezifischer Unterschiede von MDR1 des Menschen und der Ratte mittels stabil transfizierter Zelllinien deutliche Unterschiede zwischen den Spezies, wobei einige Substanzen nur durch eine der beiden Proteinvarianten transportiert wurden (Booth-Genthe et al. 2006). Auch zwischen Maus und Mensch konnten speziesspezifische Unterschiede in der Transportaktivität von MDR1 beobachtet werden. So wurden die Antiepileptika Phenytoin and Levetiracetam nur durch Mdr1 der Maus und nicht durch MDR1 des Menschen transportiert (Baltes et al. 2007).

Xanthin ist ein Zwischenprodukt beim Purinabbau und die Xanthinoxidase katalysiert die Umwandlung der Substanz in Harnsäure. Dies passiert in der Leber, von wo aus

die Harnsäure für ihre Exkretion zur Niere transportiert wird. Harnsäure wurde bereits mittels stabil transfizierter Zelllinien als Substrat von hOAT2 nachgewiesen (Sato et al. 2010), was nahelegt, dass hOAT2 in die Exkretion von Harnsäure involviert ist, indem es sie aus dem Blut in die Niere aufnimmt. Da Xanthin ebenfalls ein Substrat von hOAT2 ist, scheint das Transportprotein in mehrere Schritte des Purin-Stoffwechsels regulatorisch einzugreifen und damit eine Rolle bei Krankheiten wie der Gicht zu spielen, welche durch verminderte Harnsäureexkretion und zu hohe Harnsäurespiegel (Hyperurikämie) verursacht werden (Gao et al. 2022). Die Tatsache, dass hOAT2 der einzige der untersuchten hepatischen Aufnahmetransporter ist, welcher den Transport von Xanthin vermitteln kann, legt nahe, dass die Rolle von hOAT2 im Purinstoffwechsel von besonderer Wichtigkeit sein könnte, da der Verlust der Transportfunktion von hOAT2 nicht durch andere Transportproteine kompensiert werden kann.

Mäuse sind im Gegensatz zum Menschen nicht darauf angewiesen, Harnsäure in ausreichender Menge ausscheiden zu müssen, da sie diese in der Leber mittels des Enzyms Urikase zu Allantoin umwandeln können. Menschen fehlt dieses Enzym, was die Ausscheidung von Harnsäure über die Niere notwendig macht (Gao et al. 2022; Lu et al. 2018). Harnsäure wurde nach unserem Kenntnisstand noch nicht als Substrat von mOat2 beschrieben und ist Xanthin strukturell sehr ähnlich. Es kann also die Vermutung angestellt werden, dass der Transport von Harnsäure und Xanthin durch mOat2 in der Maus einen deutlich niedrigeren Stellenwert im Purinabbau einnimmt als im Menschen und sein Fehlen daher keine oder keine schwerwiegenden physiologischen Konsequenzen für die Maus hätte. Diese Hypothese wird durch Forschungsergebnisse gestützt, welche unter anderem mithilfe einer Glucose Transporter Typ 9 (Glut9, *Slc2a9*) *Knockout* Mauslinie zeigen, dass tatsächlich dieser Transporter, und damit nicht mOat2, die Hauptrolle im Harnsäuretransport in Leber und Niere der Maus spielt (Preitner et al. 2009; Wang et al. 2022).

4.1.1.4 Identifikation verschiedener Pterine als neue OAT2-Substrate

Biopterin und Neopterin sowie deren Derivate konnten im Rahmen der hier durchgeführten Transportversuche als neue Substrate von OAT2 identifiziert werden. In früheren Studien konnten Ohashi und Kollegen zeigen, dass Tetrahydrobiopterin (BH4) in Ratten, welchen die Substanz intravenös verabreicht wurde, schnell in Leber und Niere aufgenommen wird (Ohashi et al. 2016). Sie konnten außerdem den Transport von Dihydrobiopterin und BH4 durch die in der Niere vorherrschenden organischen Anionentransporter OAT1 und OAT3 zeigen, welcher die schnelle Aufnahme von BH4 in die Niere, nicht aber in die Leber erklären kann (Ohashi et al. 2017). Die Vermutung lag daher nahe, dass OAT2 für die Aufnahme von Biopterin und seinen Derivaten in die Leber verantwortlich ist, weswegen wir Transportversuche mit verschiedenen Pterinen durchführten. Wir konnten zeigen, dass Neopterin, Biopterin und Dihydrobiopterin sowohl durch hOAT2 als auch durch mOat2 transportiert werden, während Dihydroneopterin und Tetrahydrobiopterin Substrate von hOAT2, aber nicht von mOat2 sind. Dass die Pterine zeit- und konzentrationsabhängig durch OAT2 transportiert werden, konnte exemplarisch am Beispiel des Neopterin Transportes durch hOAT2 gezeigt werden.

BH4 ist die biologisch aktive Form des Biopterins. Es wird in nahezu allen Geweben synthetisiert, wobei auch Dihydrobiopterin, Neopterin und Dihydroneopterin entstehen. BH4 ist ein Kofaktor von verschiedenen Enzymen, weswegen es eine wichtige Rolle in einer Vielzahl von körpereigenen Prozessen spielt (Kohlmeier 2015; Thöny et al. 2000).

So ist BH4 beispielsweise essentiell für die Tyrosin-Synthese des Menschen. Daher führen Defekte in Enzymen, welche die Biosynthese von BH4 steuern, und eine damit einhergehende BH4-Defizienz zu einer Phenylketonurie. Dabei handelt es sich um eine Krankheit, welche auf zu hohen Phenylalaninspiegeln und zu niedrigen Tyrosinspiegeln beruht. Dies führt wiederum zu niedrigen Serotonin- und Dopaminspiegeln und dadurch zu Hirnschädigungen, wenn die Krankheit nicht sehr früh diagnostiziert und behandelt wird. Daher werden Neugeborene standardmäßig auf die Krankheit hin getestet (Blau und Burgard 2005; Mütze et al. 2011; Thöny et al. 2000). Die Hauptursache für die Erkrankung ist allerdings nicht eine gestörte Biosynthese von BH4, sondern Defekte in Enzymen, welche an der Phenylalaninsynthese beteiligt sind, wie beispielweise die Phenylalaninhydroxylase. Doch auch in diesem Fall kann BH4 eine wichtige Rolle spielen, da das

Biopterinderivat zusammen mit einer phenylalaninarmen Diät und der Substitution von Tyrosin für die Behandlung der Phenylketonurie eingesetzt wird (Blau und Burgard 2005; Mütze et al. 2011).

In diesem Zusammenhang könnte OAT2 zum einen zumindest in Leber und Niere zur Regulation der intrazellulären BH4 Konzentration und damit zu einem korrekten Phenylalanin / Tyrosin Verhältnis beitragen. Zum anderen könnte das Transportprotein die Aufnahme und Verteilung von BH4, welches zur Behandlung der Phenylketonurie eingesetzt wird, vermitteln und damit in den ADME Vorgängen dieses Medikamentes von großer Bedeutung sein.

BH4 ist außerdem noch in vielen anderen körpereigenen Prozessen maßgeblich beteiligt. Es ist so beispielsweise wichtig für die Melatonin Synthese (Kohlmeier 2015). Da es auch als Kofaktor der Stickstoffmonoxid Synthese fungiert, kann eine BH4-Defizienz zur gestörten Angiogenese sowie Vasodilatation führen (Gruhn et al. 2001; Marinos et al. 2001). Auch eine Rolle von BH4 in der Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer Krankheit, der Parkinson Krankheit und Depression wird diskutiert (Thöny et al. 2000). Der Neopterinspiegel wird dahingegen mit dem Immunsystem in Verbindung gebracht. So zeigen beispielsweise Patienten mit viralen Infektionen, Autoimmunkrankheiten und verschiedenen Krebsleiden erhöhte Neopterinspiegel (Asano et al. 1997; Kohlmeier 2015; Prasanna et al. 2017).

Da BH4 und die anderen Biopterin und Neopterin Derivate in einer großen Vielzahl von körpereigenen Prozessen sowie in der Behandlung der Phenylketonurie eine Rolle spielen, ist ihre Identifikation als neue OAT2-Substrate von großem Interesse, vor allem, da Mechanismen der Aufnahme der Pterine in die Leber bisher noch nicht bekannt sind (Kohlmeier 2015). Die Erkenntnis, dass OAT2 als Transportprotein für diese Substanzen fungiert, legt nahe, dass der Membrantransporter in einige oder alle der oben genannten Prozesse und Krankheitsbilder involviert ist.

Wie auch schon zuvor bei Xanthin, ließen sich bei den Transportversuchen mit den verschiedenen Pterinen speziesspezifische Unterschiede zwischen hOAT2 und mOat2 ausmachen. Neopterin und sein Derivat Dihydroneopterin kommt in hohen Konzentrationen nur in Menschen und Affen, nicht aber in Mäusen, vor, während Biopterin in Menschen und Mäusen in hohen Konzentrationen nachgewiesen werden kann (Amadori et al. 2001; Duch et al. 1984). Zwei der drei Biopterin-Strukturen (Biopterin und Dihydrobiopterin) wurden von mOat2 transportiert, BH4 war allerdings

kein Substrat von mOat2. In Mäusen scheint daher der Transport von BH4 durch mOat2 keine Rolle zu spielen. Neopterin wurde durch mOat2 transportiert, was wahrscheinlich vorrangig an strukturellen Ähnlichkeiten zu den anderen transportierten Pterinen liegen könnte und keine tatsächliche Funktion in der Maus hat, da Neopterin in diesem Organismus nur in sehr geringer Konzentration vorkommt (Amadori et al. 2001).

Auch das Ausmaß des Transportes der drei von hOAT2 und mOat2 transportierten Substanzen zeigte speziesspezifische Unterschiede. Wie auch schon zuvor für cGMP beobachtet, war der Transport der Substanzen durch mOat2 jeweils wesentlich schwächer als der durch hOAT2. Da BH4 durch mOat2 gar nicht transportiert wurde, lässt dies die Vermutung zu, dass die Rolle von hOAT2 in Prozessen, in welchen Biopterin und seine Derivate beteiligt sind, im Menschen deutlich ausgeprägter ist als die von mOat2 in der Maus. Dies könnte beispielsweise durch andere Transportproteine der Maus erklärt werden, welche in diese Prozesse involviert sind und die kein Äquivalent im Menschen aufweisen.

4.1.2 Charakterisierung von hOAT7 mithilfe von *in vitro* Versuchen

Um neue Substrate des Membrantransporters hOAT7 zu identifizieren, wurden eine große Zahl an endogenen und exogenen Substanzen in vorangegangenen Arbeiten am Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie in Transportversuchen mit hOAT7-exprimierenden Zelllinien getestet. Trotz großer Bemühungen konnte allerdings kein neues Substrat für den Membrantransporter identifiziert werden. Dies lässt vermuten, dass hOAT7 anders als die anderen OATs nur ein geringes Substratspektrum hat und die physiologische Rolle des Transportproteins von der der anderen OATs abweichen könnte. Daher scheinen Zelllinien für die Charakterisierung von hOAT7 von weniger großem Nutzen zu sein als für die von Membrantransportern mit größeren Substratspektren. Für eine nähere Untersuchung der physiologischen und auch pharmakologischen Rolle des Transportproteins im Körper scheinen *in vivo* Versuche im präklinischen Tiermodell unverzichtbar zu sein, weswegen im Rahmen dieser Arbeit ein hOAT7-*Knockin* Mausmodell generiert und charakterisiert wurde.

4.2 Mausmodelle zur funktionellen Charakterisierung von OAT2 und OAT7

Zur Klärung der physiologischen Rolle von Membrantransportern sind Tiermodelle zum jetzigen Zeitpunkt unumgänglich, da die vorhandenen Möglichkeiten zur *in vitro* Charakterisierung das Zusammenspiel von verschiedenen Transportproteinen und anderen in körpereigenen Funktionen relevanten Proteinen nicht widerspiegeln können (DeGorter und Kim 2011; Dvorak et al. 2021). Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher zwei neue Mausmodelle zur Charakterisierung der beiden Membrantransporter OAT2 und OAT7 generiert. Dabei handelt es sich zum einen um Mäuse, welche einen globalen *Knockout* von mOat2 aufweisen und zum anderen um humanisierte Mäuse, welche sich durch einen leberspezifischen *Knockin* von hOAT7 auszeichnen. Bisher existierten weder für OAT2 noch für OAT7 präklinische Tiermodelle, weswegen vom internationalen Transporter Konsortium zur Analyse der Rolle von OAT2 in ADME Prozessen bereits die Generierung eines mOat2-*Knockout*-Mausmodells gefordert wurde (Zamek-Gliszczynski et al. 2022).

4.2.1 Eignung von transgenen Mausmodellen zur Charakterisierung von OAT2 und OAT7

Vor der Generierung neuer transgener Mauslinien müssen einige Vorüberlegungen getroffen und Vorversuche durchgeführt werden. Im Falle von *Knockout*-Mausmodellen, wie der mOat2-*Knockout* Mauslinie, ist die Charakterisierung des Mausproteins, dessen Funktion ausgeschaltet werden soll, essentiell, um mögliche Unterschiede zum humanen Ortholog zu identifizieren. So kann frühzeitig entschieden werden, ob ein Mausmodell trotz existierender Unterschiede für die gewünschte Anwendung sinnvoll ist.

Hierfür wurde vor der Generierung der mOat2-*Knockout* Mauslinie eine umfangliche Charakterisierung von mOat2 hinsichtlich seiner Expression in der Maus und seiner Substratspezifität und Transportaktivität durchgeführt.

Die gewebespezifische Expression von mOat2 konnte auf mRNA Ebene in der Leber und etwas schwächer in der Niere gezeigt werden. Damit entspricht die Expression von mOat2 in der Maus der von hOAT2 im Menschen (Hilgendorf et al. 2007; Sun et al. 2001) und frühere Forschungsergebnisse zur Expression von mOat2 konnten so bestätigt werden (Pavlova et al. 2000; Sekine et al. 1998). Wir konnten außerdem eine

schwache mRNA Expression von mOat2 in den Hoden von Mäusen nachweisen, was interessanterweise den Ergebnissen von Fork und Kollegen entspricht, welche eine schwache hOAT2 Expression im menschlichen Hoden beschreiben (Fork et al. 2011). Die Expression von mOat2 in der Maus scheint demnach weitgehend der von hOAT2 im Menschen zu entsprechen und sollte daher die mithilfe eines mOat2-*Knockout* Modells generierten Ergebnisse nicht verfälschen.

Es konnte mithilfe von Transportversuchen nachgewiesen werden, dass mOat2 sowie hOAT2 in der Lage ist, die Aufnahme von cGMP in Zellen zu vermitteln. Ein mOat2-*Knockout* Mausmodell kann daher für die Erforschung des Einflusses von OAT2 auf den cGMP Signalweg genutzt werden und damit ein wertvolles Werkzeug in der Aufklärung der physiologischen Rolle von OAT2 sein. Systematische Analysen der cGMP Transportaktivität der für den Arzneistofftransport hauptverantwortlichen hepatischen Aufnahmetransporter der Maus waren in Vorversuchen nicht möglich, da die dafür notwendigen Zelllinien nicht vorhanden sind. Auch die Frage, ob OAT2 auch in der Maus der einzige hepatische Aufnahmetransporter ist, könnte daher mittels eines mOat2-*Knockout* Mausmodells gelöst werden, beispielsweise durch Messung der cGMP Aufnahme in Hepatozyten, die aus Kontroll- und mOat2-*Knockout* Mäusen isoliert werden.

Zur Untersuchung der Rolle von OAT2 im Purinabbau ist ein mOat2-*Knockout* Mausmodell allerdings wahrscheinlich nicht geeignet, da Xanthin kein Substrat von mOat2 und die Substratspezifität für Harnsäure noch ungeklärt ist. Mäuse sind zudem, wie oben beschrieben, nicht auf die Exkretion von Harnsäure angewiesen. Bei der Aufklärung des Einflusses von OAT2 auf durch Pterine vermittelte Prozesse könnte ein mOat2-*Knockout* Mausmodell hilfreich sein, es wäre aber mit einigen Einschränkungen zu rechnen. mOat2 zeigte zum einen keine Transportaktivität für Dihydroneopterin und BH₄, zum anderen kommt Neopterin in Mäusen, wie oben beschrieben, nur in sehr geringen Konzentrationen vor, wodurch die Übertragbarkeit von Ergebnissen von der Maus auf den Menschen nur bedingt gegeben ist.

Humanisierte Mausmodelle sind transgene Mauslinien, welche wie die hOAT7-*Knockin* Mauslinie eines oder mehrere humane Gene exprimieren. Dadurch werden Probleme in der Interpretation von Ergebnissen vermieden, welche aufgrund von speziesspezifischen Unterschieden des veränderten Gens entstehen, was humanisierte Mausmodelle zu einem exzellenten Werkzeug in der Charakterisierung einzelner Proteine macht (Jiang et al. 2010). Im Falle der hOAT7-*Knockin* Mauslinie

war es demnach nicht nötig, vor der Generierung ein Transportprotein der Maus zu charakterisieren.

In Transportversuchen mit hOAT7-exprimierenden Zelllinien konnten in der Vergangenheit nur wenige Substrate des Membrantransporters identifiziert werden und wir waren ebenfalls nicht in der Lage, neue Substrate zu ermitteln. Gunjača und Kollegen vermuteten eine Rolle von hOAT7 in der Aufnahme des Schilddrüsenhormons Thyroxin in die Hepatozyten, da sie mittels genomweiter Analysen beobachten konnten, dass die Thyroxinspiegel im Serum von Patienten mit einer Variante in einem Intron der *hSLC22A9* Gensequenz im Vergleich zu den anderen Patienten signifikant niedriger waren (Gunjača et al. 2019). Wir konnten allerdings zeigen, dass Thyroxin kein Substrat von hOAT7 ist. Demnach bleibt die Substratsuche sowie die Aufklärung der physiologischen Rolle von hOAT7 weiterhin ergebnislos. Ein hOAT7-*Knockin* Mausmodell stellt daher ein wertvolles Werkzeug in der weiteren Charakterisierung von hOAT7 dar, da es zur Identifikation neuer endogener Substrate von hOAT7 und damit zur Klärung der Rolle von hOAT7 im Körper beitragen kann.

4.2.2 Charakterisierung der mOat2-*Knockout* und hOAT7-*Knockin* Mauslinie

Die Charakterisierung neuer Mauslinien vor ihrer Verwendung in Tierversuchen ist essentiell, da nur so Versuchsergebnisse, welche mit diesen Mauslinien generiert wurden, richtig interpretiert werden können. Die Charakterisierung muss daher erfolgen, um gute wissenschaftliche Ergebnisse zu produzieren und dadurch entsprechend den 3R-Regeln zu handeln (Justice und Dhillon 2016; Rosenthal und Brown 2007). Diese verpflichten Wissenschaftler, welche tierexperimentell arbeiten, dazu, Tierversuche wann immer möglich zu ersetzen (replace), reduzieren (reduce) und verbessern (refine), so dass Schmerzen, Schäden und Leiden bei den Versuchstieren so gering wie möglich gehalten werden (Russel und Burch 1960). Die Ergebnisse einer solchen Charakterisierung können außerdem bereits erste Hinweise auf die Funktion der in der Mauslinie veränderten Proteine geben und damit die zu untersuchenden Fragestellungen und die durchzuführenden Tierversuche definieren oder verfeinern. Aus diesem Grund wurden die beiden neu generierten Mauslinien im Rahmen dieser Arbeit einer umfassenden Charakterisierung mit verschiedenen molekularbiologischen Methoden unterzogen.

Mäuse beider Mauslinien waren in ihrem Aussehen und Verhalten nicht von Kontrollmäusen zu unterscheiden. Die Körpergewichte, Lebergewichte und der prozentuale Anteil des Lebergewichts am Körpergewicht zeigten keine besonderen Auffälligkeiten bei 8, 16 und 24 Wochen alten Mäusen beider Linien. Auch die Pathologie und Histologie der Leber der Mäuse war unauffällig. Ein Vergleich mit Kontrollmäusen erscheint also in Tierversuchen mit diesen beiden Mauslinien sinnvoll, da sich die *Knockout / Knockin* Tiere phänotypisch nicht von diesen zu unterscheiden scheinen.

In beiden Mauslinien konnte die erfolgreiche gentechnische Veränderung nachgewiesen werden. Auf DNA und RNA Ebene konnte einerseits der mOat2 Expressionsverlust in der mOat2-*Knockout* Mauslinie und andererseits die leberspezifische hOAT7 Expression in der hOAT7-*Knockin* Mauslinie gezeigt werden. Obwohl in den mOat2-*Knockout* Mäusen scheinbar noch teilweise mRNA des Genbereichs von Exon 9 bis 10 entsteht, konnte mittels Sequenzierung das erfolgreiche Ausschneiden des Genbereichs von Exon 2 bis 6 gezeigt werden. Auf Proteinebene konnte *in silico* gezeigt werden, dass dieses Ausschneiden eine Verkürzung der Aminosäuresequenz eines möglichen entstehenden Proteins im Vergleich zu wildtypischem mOat2 Protein verursacht und dass daher in mOat2-*Knockout* Mäusen kein funktionales mOat2 Protein mehr entsteht. Per Antikörperbasierten Methoden wie Färbungen oder Immunblot konnte dieser Nachweis nicht erfolgen, da verschiedene kommerziell erwerbliche OAT2 Antikörper zwar in der Lage waren, mOat2 in der mOat2-exprimierenden Zelllinie, nicht aber in Mausgewebe nachzuweisen. Dieses Phänomen könnte unter anderem an posttranslationalen Modifikationen liegen, welche nur im lebenden Tier entstehen und das Protein so maskieren, dass Antikörper nicht binden können (Dodd et al. 2018; Ercan et al. 2017). Mittels Proteomanalysen gelang es uns dennoch, die mOat2 Expression in Kontrollmäusen und die Abwesenheit dieser Expression in mOat2-*Knockout* Mäusen nachzuweisen, womit wir diese Methode für den Proteinnachweis in Mausgewebe etablieren konnten. Im Gegensatz zu mOat2 konnte hOAT7 mit dem hOAT7 Antikörper im Lebergewebe von heterozygoten und homozygoten hOAT7-*Knockin* Mäusen sowohl mit Immunfärbungen als auch mit Immunblots nachgewiesen werden.

Für beide Mauslinien konnte mit den verschiedenen Methoden gezeigt werden, dass heterozygote Mäuse keine gute Versuchsgruppe darstellen, da die Expression von mOat2 bzw. hOAT7 in diesen Mäusen teilweise stark variierte. Manche der

heterozygoten *mOat2-Knockout* Mäuse zeigten eine hohe, fast der der Kontrolltiere gleichende Expression, während andere *mOat2* nur in geringer Menge exprimierten. Teilweise werden im Fall von Tierversuchen mit *Knockout*-Mauslinien heterozygote Tiere als Kontrollen verwendet (Valencak et al. 2020). Dies wird auch vom Jackson Laboratory empfohlen, allerdings nur, wenn heterozygote Tiere sich phänotypisch nicht von den Kontrolltieren unterscheiden (Lambert 2007). Mithilfe der umfassenden Charakterisierung der *mOat2* Expression in heterozygoten *mOat2-Knockout* Mäusen konnten wir feststellen, dass die Verwendung jener Tiere als Kontrolltiere bei dieser Mauslinie nicht sinnvoll wäre. Für die *hOAT7-Knockin* Mauslinie kommt ebenfalls keine Nutzung der heterozygoten Tiere als Versuchstiere in Frage, da diese Tiere eine stark variable hepatische *hOAT7* Expression zeigten.

Die klinisch-chemischen Parameter der 8 Wochen alten *mOat2-Knockout* Tiere zeigten keine Auffälligkeiten, während im Fall der *hOAT7-Knockin* Mauslinie in 8 Wochen alten, weiblichen Tieren eine leichte, aber dennoch signifikante Reduktion der AST-, ALT- und LDH-Werte im Vergleich zu den Kontrolltieren beobachtet werden konnte. Da diese Werte bei Leberschädigung erhöht sind, könnte dies auf einen protektiven Effekt von *hOAT7* auf die Leber hindeuten. *hOAT7* könnte damit beispielsweise eine Rolle in der Entwicklung von HCC spielen und eine erhöhte Konzentration des Transporters könnte sich als protektiv erweisen. Im Gegensatz dazu wurde eine schwache *hOAT2* Expression bereits in früheren Studien mit einem erhöhten Risiko für HCC in Zusammenhang gebracht (Kudo et al. 2014; Yasui et al. 2014). In beiden Mauslinien könnten die Effekte, welche der Verlust von *mOat2* bzw. der Gewinn von *hOAT7* in der Leber auslösen, in älteren Mäusen deutlicher sein, weswegen dieselben Experimente noch mit älteren Mäusen wiederholt werden sollten. Dennoch deutet die Reduktion der AST-, ALT- und LDH-Werte in den weiblichen *hOAT7-Knockin* Mäusen auf eine Beteiligung des Transporters in der Erhaltung der Leberfunktion hin.

Die Elimination oder das Einfügen von Genen in das Mausgenom kann zu einer veränderten Expression von anderen Genen führen. Das Wissen über solche unterschiedlich regulierten Gene in gentechnisch veränderten Mauslinien ist essentiell (Jiang et al. 2010). Zum einen verhindert ein solches Wissen, dass Ergebnisse, welche in Tierversuchen mit den Mauslinien generiert werden, falsch interpretiert werden. Zum anderen können durch die Identifikation von unterschiedlich regulierten Genen

Erkenntnisse über die Funktion des zu untersuchenden Gens gewonnen werden. Aus diesem Grund wurden im Rahmen der umfassenden Charakterisierung der *mOat2-Knockout* und der *hOAT7-Knockin* Mauslinie RNA-Microarrays mit Lebergewebe durchgeführt. In den *mOat2-Knockout* Mäusen fand sich nur ein signifikanter Unterschied zu den Kontrollmäusen. Die Sulfotransferase *Sult2a1* war in weiblichen *Knockout* Mäusen niedriger exprimiert als in Kontrolltieren, was auch auf Proteinebene gezeigt werden konnte. Die *hOAT7-Knockin* Mäuse zeigten, verglichen mit den Kontrolltieren, eine erhöhte Expression von *Lcn2* und eine Reduktion der Expression von *Hsd17b6*. Interessanterweise zeigen diese drei Gene im Menschen alle eine Beteiligung an der Entstehung von HCC.

SULT2A1 ist im Patienten mit HCC deutlich schwächer exprimiert als in gesunden Menschen (He et al. 2022; Huang et al. 2005). Die verringerte Expression von *Sult2a1* in *mOat2-Knockout* Mäusen stützt also die Hypothese, dass diese Mäuse durch den fehlenden Membrantransporter ein erhöhtes Risiko für eine Krebserkrankung der Leber aufweisen könnten.

Sowohl eine erhöhte Expression von *LCN2* als auch eine reduzierte Expression von *HSD17B6*, wie sie in den *hOAT7-Knockin* Mäusen zu beobachten war, wurden im Menschen als prognostischer Risikofaktor für HCC identifiziert (Barsoum et al. 2020; Wu und Jiang 2022). *HSD17B6* ist nicht nur in Patienten mit HCC, sondern auch in Menschen mit Prostatakrebs und Lungenkrebs herunterreguliert und scheint eine wichtige Rolle in der Reaktion des Immunsystems auf die Tumorzellen zu spielen. Eine geringe Expression von *HSD17B6* in Patienten mit HCC kann daher mit einer schlechteren Prognose korreliert werden (Lv et al. 2020; Wu und Jiang 2022). *LCN2* kodiert für ein in vielen Zellen und Geweben exprimiertes Glycoprotein, welches eine Rolle in der Differenzierung der Zellen und in der Apoptose spielt. Erhöhte Konzentrationen des Proteins wurden in verschiedenen Krebsarten wie Brustkrebs und Bauchspeicheldrüsenkrebs und HCC beschrieben (Barsoum et al. 2020; Bauvois und Susin 2018). Allerdings wurde auch ein protektiver Effekt von *LCN2* auf die Entstehung und Entwicklung von HCC beschrieben. *LCN2* soll demnach die Proliferation der Tumorzellen unterdrücken (Lee et al. 2011). Die Rolle des Gens in HCC und anderen Krebsarten scheint daher vielseitig zu sein und ist nicht abschließend geklärt (Bauvois und Susin 2018).

Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse der RNA-Microarrays also die Hypothese, dass OAT2 und OAT7 an der Entstehung von HCC beteiligt sein können.

Allerdings bleibt unklar, ob die Transporter die Entstehung von HCC eher begünstigen oder unterdrücken. Die beiden Mausmodelle stellen daher ein gutes Werkzeug dar, um den Einfluss der beiden Transporter auf die Entstehung dieser Krebsart näher zu erforschen. Hierfür wären RNA-Microarrays von älteren Mäusen und nähere Untersuchungen zur Expression der drei identifizierten veränderten Gene in den Mauslinien von besonderem Interesse.

Mithilfe des Miltenyi Liver Perfusion Kits war es uns möglich, primäre Hepatozyten aus Mäusen der *mOat2-Knockout* und der *hOAT7-Knockin* Mauslinie zu gewinnen und zu kultivieren. Dieses Kit ermöglicht die Isolation von Hepatozyten aus dem toten Tier mittels *ex vivo* Perfusion der Leber und macht so eine *in vivo* Perfusion überflüssig. Es trägt damit zur Verbesserung der tierexperimentellen Arbeit und damit dazu bei entsprechend den 3R-Regeln zu handeln, da den Tieren mögliche Schmerzen, welche durch die Perfusion am lebenden Tier potentiell entstehen könnten, erspart werden. Mittels qPCR und im Falle der *hOAT7-Knockin* Mäuse auch mittels Immunfluoreszenzfärbungen konnte der *mOat2-Knockout* sowie der *hOAT7-Knockin* in den Hepatozyten nachgewiesen werden. Primäre Hepatozyten des Menschen sind aufgrund ihrer Nähe zur physiologischen Situation sehr gut für Studien der Transportaktivität der Leber für bestimmte Substanzen, wie beispielsweise Arzneistoffe, geeignet (Brouwer et al. 2013). Daher stellen die hier isolierten Hepatozyten der *mOat2-Knockout* und *hOAT7-Knockin* Mäuse ein ideales Werkzeug für die Identifikation neuer Substrate von OAT2 und OAT7 und die Untersuchung der Transportaktivität der beiden Transporter unter verschiedenen Bedingungen dar. Auch für die Durchführung von Vorversuchen für Tierversuche zur Pharmakokinetik von OAT2 / OAT7 Substraten würden sich die Hepatozyten perfekt eignen. *hOAT2* und *hOAT7* sind in menschlichen Hepatozyten zwar exprimiert, allerdings ist die Expression in der Leber stärker ausgeprägt (Vildhede et al. 2018). Zur korrekten Interpretation der Ergebnisse von Experimenten, welche mit Hepatozyten aus den Mauslinien durchgeführt wurden, muss daher noch geklärt werden, ob die Hepatozyten auch hier eine geringere Expression der Transportproteine zeigen, wobei die Ergebnisse in diesem Fall dementsprechend angepasst werden müssten, beispielsweise durch Einführung eines Skalierungsfaktors (Bi et al. 2012; Choi et al. 2019).

4.3 Zusammenfassung und Ausblick

Die funktionelle Charakterisierung von Membrantransportproteinen ist essentiell für das Verständnis von körpereigenen sowie pharmakologischen Vorgängen (Fisel et al. 2017). OAT2 und OAT7 sind zwei bisher nur unzureichend charakterisierte Transportproteine und werden interindividuell unterschiedlich exprimiert (Emami Riedmaier et al. 2016; Vildhede et al. 2018). Eine genaue Charakterisierung von OAT2 und OAT7 ist daher nicht nur wichtig für ein besseres Verständnis von körpereigenen Prozessen, wie dem cGMP Signalweg, sondern auch für die Vorhersage des Ansprechens einzelner Patienten auf Arzneistoffe, welche von OAT2 und OAT7 transportiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir mittels zweier neu generierter Zelllinien die Transportaktivität von hOAT2 sowie mOat2 näher untersuchen. Wir konnten zeigen, dass hOAT2 als einziger der hepatischen für die Arzneistoffaufnahme hauptverantwortlichen Transporter in der Lage ist, cGMP und Xanthin zu transportieren. cGMP, aber nicht Xanthin konnte außerdem als neues Substrat für mOat2 identifiziert werden. Weiterhin konnten verschiedene Pterine als neue Substrate von hOAT2 und mOat2 identifiziert werden, wobei speziesspezifische Unterschiede zwischen den beiden Transportern auftraten. Durch die Analyse der zelltypspezifischen Expression verschiedener im cGMP Signalweg involvierter Komponenten konnte außerdem die Hypothese gestärkt werden, dass hOAT2 eine wichtige Rolle im cGMP Signalweg in der Leber einnimmt.

Außerdem konnten wir zwei neue Mauslinien generieren, welche zur Charakterisierung von OAT2 und OAT7 von großem Wert sind. Die *mOat2-Knockout* sowie die *hOAT7-Knockin* Mauslinie wurden mit verschiedensten Methoden umfassend charakterisiert. Damit konnte die Eignung der beiden Mauslinien zur Analyse der beiden Transportproteine gezeigt werden. Zudem konnten bereits erste wertvolle Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von OAT2 und OAT7 an der Erhaltung der Leberfunktionen bzw. an der Entstehung von HCC generiert werden. Mit der Isolierung von primären Hepatozyten mittels *ex vivo* Perfusion der Leber konnte des Weiteren eine einfache und tierschutzgerechte Methode für die Anwendung der Mausmodelle etabliert werden.

Die *mOat2-Knockout* Mäuse könnten zukünftig genutzt werden, um den Einfluss von OAT2 auf den cGMP Signalweg zu untersuchen. Mittels Metabolom Analysen im

Gewebe, Serum oder Urin der Mäuse sowie mit Transportversuchen mit primären Hepatozyten könnten außerdem neue endogene Substrate von OAT2 und OAT7 identifiziert werden, von welchen wiederum mittels Strukturähnlichkeitsanalysen auf Arzneistoffe, welche transportiert werden, geschlossen werden könnte. Darüber hinaus könnten die metabolischen Charakterisierungen beider Mauslinien dazu beitragen, die Rolle von OAT2 und OAT7 in der Entstehung von HCC zu klären.

Literaturverzeichnis

- Amadori, A., Wirleitner, B., Diez-Ruiz, A., Veronesi, A., Chieco-Bianchi, L. & Fuchs, D. (2001). Neopterin Production in SCID Mice Injected with Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Immunobiology* 203 (4), 642–649. doi:10.1016/S0171-2985(01)80013-9
- Asano, T., Nakajima, F., Odajima, K., Tsuji, A., Hayakawa, M. & Nakamura, H. (1997). Urinary Neopterin levels in patients with genitourinary tract malignancies. *The Japanese Journal of Urology* 88 (1), 53–58. doi:10.5980/jpnjurol1989.88.53
- Baltes, S., Gastens, A. M., Fedrowitz, M., Potschka, H., Kaefer, V. & Löscher, W. (2007). Differences in the transport of the antiepileptic drugs phenytoin, levetiracetam and carbamazepine by human and mouse P-glycoprotein. *Neuropharmacology* 52 (2), 333–346. doi:10.1016/j.neuropharm.2006.07.038
- Barsoum, I., Elgohary, M. N. & Bassiony, M. A.A. (2020). Lipocalin-2. A novel diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. *Cancer Biomarkers* 28 (4), 523–528. doi:10.3233/CBM-190084
- Bauvois, B. & Susin, S. (2018). Revisiting Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) in Cancer. Saint or Sinner? *Cancers* 10 (9), 336. doi:10.3390/cancers10090336
- Bi, Y.-A., Kimoto, E., Sevidal, S., Jones, H. M., Barton, H. A., Kempshall, S., Whalen, K. M., Zhang, H., Ji, C., Fenner, K. S., El-Kattan, A. F. & Lai, Y. (2012). In Vitro Evaluation of Hepatic Transporter-Mediated Clinical Drug-Drug Interactions. Hepatocyte Model Optimization and Retrospective Investigation. *Drug Metabolism and Disposition* 40 (6), 1085–1092. doi:10.1124/dmd.111.043489
- Bi, Y.-A., Mathialagan, S., Tylaska, L., Fu, M., Keefer, J., Vildhede, A., Costales, C., Rodrigues, A. D. & Varma, M. V. S. (2018). Organic Anion Transporter 2 Mediates Hepatic Uptake of Tolbutamide, a CYP2C9 Probe Drug. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 364 (3), 390–398. doi:10.1124/jpet.117.245951
- Billiar, T. R., Curran, R. D., Harbrecht, B. G., Stadler, J., Williams, D. L., Ochoa, J. B., Di Silvio, M., Simmons, R. L. & Murray, S. A. (1992). Association between synthesis and release of cGMP and nitric oxide biosynthesis by hepatocytes. *The American Journal of Physiology* 262 (4 Pt 1), C1077-82. doi:10.1152/ajpcell.1992.262.4.C1077
- Blau, N. & Burgard, P. (2005). Disorders of Phenylalanine and Tetrahydrobiopterin Metabolism. In N. Blau (Hrsg.), *Physician's guide to the laboratory diagnosis of metabolic diseases* (2nd corr. ed., S. 25–34). Berlin: Springer.
- Booth-Genthe, C. L., Louie, S. W., Carlini, E. J., Li, B., Leake, B. F., Eisenhandler, R., Hochman, J. H., Mei, Q., Kim, R. B., Rushmore, T. H. & Yamazaki, M. (2006). Development and characterization of LLC-PK1 cells containing Sprague–Dawley rat Abcb1a (Mdr1a). Comparison of rat P-glycoprotein transport to human and mouse. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 54 (1), 78–89. doi:10.1016/j.vascn.2005.12.004
- Brouwer, K. L. R., Keppler, D., Hoffmaster, K. A., Bow, D. A. J., Cheng, Y., Lai, Y., Palm, J. E., Stieger, B. & Evers, R. (2013). In Vitro Methods to Support Transporter Evaluation in Drug Discovery and Development. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 94 (1), 95–112. doi:10.1038/clpt.2013.81

- Brouwer, K. L. R., Evers, R., Hayden, E., Hu, S., Li, C. Y., Meyer zu Schwabedissen, H. E., Neuhoﬀ, S., Oswald, S., Piquette-Miller, M., Saran, C., Sjöstedt, N., Sprowl, J. A., Stahl, S. H. & Yue, W. (2022). Regulation of Drug Transport Proteins—From Mechanisms to Clinical Impact. A White Paper on Behalf of the International Transporter Consortium. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 112 (3), 461–484. doi:10.1002/cpt.2605
- 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. & Superti-Furga, G. (2015). A Call for Systematic Research on Solute Carriers. *Cell* 162 (3), 478–487. doi:10.1016/j.cell.2015.07.022
- Choi, G.-W., Lee, Y.-B. & Cho, H.-Y. (2019). Interpretation of Non-Clinical Data for Prediction of Human Pharmacokinetic Parameters. In Vitro-In Vivo Extrapolation and Allometric Scaling. *Pharmaceutics* 11 (4), 168. doi:10.3390/pharmaceutics11040168
- Choudhuri, S. & Klaassen, C. D. (2006). Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) eﬄux transporters. *International Journal of Toxicology* 25 (4), 231–259. doi:10.1080/10915810600746023
- Chu, X., Bleasby, K. & Evers, R. (2012). Species differences in drug transporters and implications for translating preclinical findings to humans. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 9 (3), 237–252. doi:10.1517/17425255.2013.741589
- Colas, C., Ung, P. M.-U. & Schlessinger, A. (2016). SLC transporters. Structure, function, and drug discovery. *MedChemComm* 7 (6), 1069–1081. doi:10.1039/C6MD00005C
- Cropp, C. D., Komori, T., Shima, J. E., Urban, T. J., Yee, S. W., More, S. S. & Giacomini, K. M. (2008). Organic Anion Transporter 2 (SLC22A7) Is a Facilitative Transporter of cGMP. *Molecular Pharmacology* 73 (4), 1151–1158. doi:10.1124/mol.107.043117
- Davis, M. W. & Jorgensen, E. M. (2022). ApE, A Plasmid Editor. A Freely Available DNA Manipulation and Visualization Program. *Frontiers in Bioinformatics* 2, 403. doi:10.3389/fbinf.2022.818619
- DeGorter, M. K. & Kim, R. B. (2011). Use of Transgenic and Knockout Mouse Models to Assess Solute Carrier Transporter Function. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 89 (4), 612–616. doi:10.1038/clpt.2011.2
- DeGorter, M. K., Xia, C. Q., Yang, J. J. & Kim, R. B. (2012). Drug Transporters in Drug Efficacy and Toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 52 (1), 249–273. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010611-134529
- Deng, M., Loughran, P. A., Zhang, L., Scott, M. J. & Billiar, T. R. (2015). Shedding of the tumor necrosis factor (TNF) receptor from the surface of hepatocytes during sepsis limits inflammation through cGMP signaling. *Science Signaling* 8 (361), ra11-ra11. doi:10.1126/scisignal.2005548
- Dickens, D., Rädisch, S., Chiduzza, G. N., Giannoudis, A., Cross, M. J., Malik, H., Schaeffeler, E., Sison-Young, R. L., Wilkinson, E. L., Goldring, C. E., Schwab, M., Pirmohamed, M. & Nies, A. T. (2018). Cellular Uptake of the Atypical Antipsychotic Clozapine Is a Carrier-Mediated Process. *Molecular Pharmaceutics* 15 (8), 3557–3572. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.8b00547
- Dodd, R. B., Wilkinson, T. & Schofield, D. J. (2018). Therapeutic Monoclonal Antibodies to Complex Membrane Protein Targets. Antigen Generation and Antibody Discovery Strategies. *BioDrugs* 32 (4), 339–355. doi:10.1007/s40259-018-0289-y

- Duch, D. S., Bowers, S. W., Woolf, J. H. & Nichol, C. A. (1984). Biopterin cofactor biosynthesis. GTP cyclohydrolase, neopterin and biopterin in tissues and body fluids of mammalian species. *Life Sciences* 35 (18), 1895–1901. doi:10.1016/0024-3205(84)90541-1
- Dvorak, V., Wiedmer, T., Ingles-Prieto, A., Altermatt, P., Batoulis, H., Bärenz, F., Bender, E., Digles, D., Dürrenberger, F., Heitman, L. H., IJzerman, A. P., Kell, D. B., Kicking, S., Körzö, D., Leippe, P., Licher, T., Manolova, V., Rizzetto, R., Sassone, F., Scarabottolo, L., Schlessinger, A., Schneider, V., Sijben, H. J., Steck, A.-L., Sundström, H., Tremolada, S., Wilhelm, M., Wright Muelas, M., Zindel, D., Steppan, C. M. & Superti-Furga, G. (2021). An Overview of Cell-Based Assay Platforms for the Solute Carrier Family of Transporters. *Frontiers in Pharmacology* 12, 807. doi:10.3389/fphar.2021.722889
- Emami Riedmaier, A., Burk, O., van Eijck, B. A. C., Schaeffeler, E., Klein, K., Fehr, S., Biskup, S., Müller, S., Winter, S., Zanger, U. M., Schwab, M. & Nies, A. T. (2016). Variability in hepatic expression of organic anion transporter 7/SLC22A9, a novel pravastatin uptake transporter. Impact of genetic and regulatory factors. *The Pharmacogenomics Journal* 16 (4), 341–351. doi:10.1038/tpj.2015.55
- Engelhart, D. C., Granados, J. C., Shi, D., Saier Jr, M. H., Baker, M. E., Abagyan, R. & Nigam, S. K. (2020). Systems Biology Analysis Reveals Eight SLC22 Transporter Subgroups, Including OATs, OCTs, and OCTNs. *International Journal of Molecular Sciences* 21 (5). doi:10.3390/ijms21051791
- Enomoto, A., Takeda, M., Shimoda, M., Narikawa, S., Kobayashi, Y., Kobayashi, Y., Yamamoto, T., Sekine, T., Cha, S. H., Niwa, T. & Endou, H. (2002). Interaction of Human Organic Anion Transporters 2 and 4 with Organic Anion Transport Inhibitors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 301 (3), 797–802. doi:10.1124/jpet.301.3.797
- Ercan, E., Eid, S., Weber, C., Kowalski, A., Bichmann, M., Behrendt, A., Matthes, F., Krauss, S., Reinhardt, P., Fulle, S. & Ehrnhoefer, D. E. (2017). A validated antibody panel for the characterization of tau post-translational modifications. *Molecular Neurodegeneration* 12 (1), 1121. doi:10.1186/s13024-017-0229-1
- Europeans Medicines Agency. (2012). Guideline on the investigation of drug interactions.
- Feil, R. & Kemp-Harper, B. (2006). cGMP signalling. From bench to bedside. *EMBO reports* 7 (2), 149–153. doi:10.1038/sj.embor.7400627
- Fisel, P., Nies, A. T., Schaeffeler, E. & Schwab, M. (2017). The importance of drug transporter characterization to precision medicine. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 13 (4), 361–365. doi:10.1080/17425255.2017.1290083
- Fleming, J. C., Steinkamp, M. P., Kawatsuji, R., Tartaglioni, E., Pinkus, J. L., Pinkus, G. S., Fleming, M. D. & Neufeld, E. J. (2001). Characterization of a Murine High-Affinity Thiamine Transporter, Slc19a2. *Molecular Genetics and Metabolism* 74 (1-2), 273–280. doi:10.1006/mgme.2001.3241
- Fork, C., Bauer, T., Golz, S., Geerts, A., Weiland, J., Del Turco, D., Schömig, E. & Gründemann, D. (2011). OAT2 catalyses efflux of glutamate and uptake of orotic acid. *The Biochemical Journal* 436 (2), 305–312. doi:10.1042/BJ20101904
- Franko, A., Kovarova, M., Feil, S., Feil, R., Wagner, R., Heni, M., Königsrainer, A., Ruoß, M., Nüssler, A. K., Weigert, C., Häring, H.-U., Lutz, S. Z. & Peter, A. (2018). cGMP-dependent protein kinase I (cGKI) modulates human hepatic stellate cell activation. *Metabolism* 88, 22–30. doi:10.1016/j.metabol.2018.09.001

- Gao, Y., Yu, Y., Qin, W., Fan, N., Qi, Y., Chen, H., Duan, W. & Joles, J. A. (2022). Uricase-deficient rats with similarly stable serum uric acid to human's are sensitive model animals for studying hyperuricemia. *PLoS ONE* 17 (3), e0264696. doi:10.1371/journal.pone.0264696
- Giacomini, K. M., Huang, S.-M., Tweedie, D. J., Benet, L. Z., Brouwer, K. L. R., Chu, X., Dahlin, A., Evers, R., Fischer, V., Hillgren, K. M., Hoffmaster, K. A., Ishikawa, T., Keppler, D., Kim, R. B., Lee, C. A., Niemi, M., Polli, J. W., Sugiyama, Y., Swaan, P. W., Ware, J. A., Wright, S. H., Wah Yee, S., Zamek-Gliszczyński, M. J. & Zhang, L. (2010). Membrane transporters in drug development. *Nature Reviews Drug Discovery* 9 (3), 215–236. doi:10.1038/nrd3028
- Giacomini, K. M., Yee, S. W., Koleske, M. L., Zou, L., Matsson, P., Chen, E. C., Kroetz, D. L., Miller, M. A., Gozalpour, E. & Chu, X. (2022). New and Emerging Research on Solute Carrier and ATP Binding Cassette Transporters in Drug Discovery and Development. Outlook From the International Transporter Consortium. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 112 (3), 540–561. doi:10.1002/cpt.2627
- Gracia-Sancho, J., Caparrós, E., Fernández-Iglesias, A. & Francés, R. (2021). Role of liver sinusoidal endothelial cells in liver diseases. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 18 (6), 411–431. doi:10.1038/s41575-020-00411-3
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. & Nairn, R. (1977). Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *Journal of General Virology* 36 (1), 59–72. doi:10.1099/0022-1317-36-1-59
- Green, R. M., Hoda, F. & Ward, K. L. (2000). Molecular cloning and characterization of the murine bile salt export pump. *Gene* 241 (1), 117–123. doi:10.1016/S0378-1119(99)00460-6
- Gruhn, N., Aldershvile, J. & Boesgaard, S. (2001). Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation in nitroglycerin-tolerant rats. *European Journal of Pharmacology* 416 (3), 245–249. doi:10.1016/S0014-2999(01)00879-2
- Gunjača, I., Matana, A., Boutin, T., Torlak, V., Punda, A., Polašek, O., Boraska Perica, V., Hayward, C., Zemunik, T. & Barbalčić, M. (2019). Genome-wide association meta-analysis for total thyroid hormone levels in Croatian population. *Journal of Human Genetics* 64 (5), 473–480. doi:10.1038/s10038-019-0586-4
- Guo, Y., Kotova, E., Chen, Z.-S., Lee, K., Hopper-Borge, E., Belinsky, M. G. & Kruh, G. D. (2003). MRP8, ATP-binding Cassette C11 (ABCC11), Is a Cyclic Nucleotide Efflux Pump and a Resistance Factor for Fluoropyrimidines 2',3'-Dideoxycytidine and 9'-(2'-Phosphonylmethoxyethyl)adenine. *Journal of Biological Chemistry* 278 (32), 29509–29514. doi:10.1074/jbc.M304059200
- Hall, K. C., Bernier, S. G., Jacobson, S., Liu, G., Zhang, P. Y., Sarno, R. T., Catanzano, V., Currie, M. G. & Masferrer, J. L. (2019). sGC stimulator praliciguat suppresses stellate cell fibrotic transformation and inhibits fibrosis and inflammation in models of NASH. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116 (22), 11057–11062. doi:10.1073/pnas.1821045116
- Hart, S. N., Li, Y., Nakamoto, K., Subileau, E.-A., Steen, D. & Zhong, X.-b. (2010). A Comparison of Whole Genome Gene Expression Profiles of HepaRG Cells and HepG2 Cells to Primary Human Hepatocytes and Human Liver Tissues. *Drug Metabolism and Disposition* 38 (6), 988–994. doi:10.1124/dmd.109.031831

- He, T., Tao, B., Yi, C., Zhang, C., Zhang, P., Shao, W., Li, Y., Chen, Z., Lu, L., Jia, H., Zhu, W., Lin, J. & Chen, J. (2022). 27-Hydroxycholesterol promotes metastasis by SULT2A1-dependent alteration in hepatocellular carcinoma. *Cancer Science* 113 (8), 2575–2589. doi:10.1111/cas.15435
- Hediger, M. A., Clémenton, B., Burrier, R. E. & Bruford, E. A. (2013). The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series). Introduction. *Molecular Aspects of Medicine* 34 (2-3), 95–107. doi:10.1016/j.mam.2012.12.009
- Henjakovic, M., Hagos, Y., Krick, W., Burckhardt, G. & Burckhardt, B. C. (2015). Human organic anion transporter 2 is distinct from organic anion transporters 1 and 3 with respect to transport function. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 309 (10), F843–F851. doi:10.1152/ajprenal.00140.2015
- Hilgendorf, C., Ahlin, G., Seithel, A., Artursson, P., Ungell, A.-L. & Karlsson, J. (2007). Expression of Thirty-six Drug Transporter Genes in Human Intestine, Liver, Kidney, and Organotypic Cell Lines. *Drug Metabolism and Disposition* 35 (8), 1333–1340. doi:10.1124/dmd.107.014902
- Hofmann, F. (2020). The cGMP system. Components and function. *Biological Chemistry* 401 (4), 447–469. doi:10.1515/hsz-2019-0386
- Hotchkiss, A. G., Berrigan, L. & Pelis, R. M. (2015). Organic anion transporter 2 transcript variant 1 shows broad ligand selectivity when expressed in multiple cell lines. *Frontiers in Pharmacology* 6 (483238), F378. doi:10.3389/fphar.2015.00216
- Huang, L.-R., Coughtrie, M. W.H. & Hsu, H.-C. (2005). Down-regulation of dehydroepiandrosterone sulfotransferase gene in human hepatocellular carcinoma. *Molecular and Cellular Endocrinology* 231 (1-2), 87–94. doi:10.1016/j.mce.2004.10.002
- Huang, K. M., Zavorka Thomas, M., Magdy, T., Eisenmann, E. D., Uddin, M. E., DiGiacomo, D. F., Pan, A., Keiser, M., Otter, M., Xia, S. H., Li, Y., Jin, Y., Fu, Q., Gibson, A. A., Bonilla, I. M., Carnes, C. A., Corps, K. N., Coppola, V., Smith, S. A., Addison, D., Nies, A. T., Bundschuh, R., Chen, T., Lustberg, M. B., Wang, J., Oswald, S., Campbell, M. J., Yan, P. S., Baker, S. D., Hu, S., Burrige, P. W. & Sparreboom, A. (2021). Targeting OCT3 attenuates doxorubicin-induced cardiac injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118 (5), 198. doi:10.1073/pnas.2020168118
- Jacobsson, J. A., Haitina, T., Lindblom, J. & Fredriksson, R. (2007). Identification of six putative human transporters with structural similarity to the drug transporter SLC22 family. *Genomics* 90 (5), 595–609. doi:10.1016/j.ygeno.2007.03.017
- Jedlitschky, G., Burchell, B. & Keppler, D. (2000). The Multidrug Resistance Protein 5 Functions as an ATP-dependent Export Pump for Cyclic Nucleotides. *Journal of Biological Chemistry* 275 (39), 30069–30074. doi:10.1074/jbc.M005463200
- Jiang, X.-L., Gonzalez, F. J. & Yu, A.-M. (2010). Drug-metabolizing enzyme, transporter, and nuclear receptor genetically modified mouse models. *Drug Metabolism Reviews* 43 (1), 27–40. doi:10.3109/03602532.2010.512294
- Justice, M. J. & Dhillon, P. (2016). Using the mouse to model human disease. Increasing validity and reproducibility. *Disease Models & Mechanisms* 9 (2), 101–103. doi:10.1242/dmm.024547
- Kanai, Y., Clémenton, B., Simonin, A., Leuenberger, M., Lochner, M., Weisstanner, M. & Hediger, M. A. (2013). The SLC1 high-affinity glutamate and neutral amino acid transporter family. *Molecular Aspects of Medicine* 34 (2-3), 108–120. doi:10.1016/j.mam.2013.01.001

- Kartenbeck, J. (1996). Absence of the canalicular isoform of the MRP gene-encoded conjugate export pump from the hepatocytes in Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* 23 (5), 1061–1066. doi:10.1053/jhep.1996.v23.pm0008621134
- Khamdang, S., Takeda, M., Noshiro, R., Narikawa, S., Enomoto, A., Anzai, N., Piyachaturawat, P. & Endou, H. (2002). Interactions of Human Organic Anion Transporters and Human Organic Cation Transporters with Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 303 (2), 534–539. doi:10.1124/jpet.102.037580
- Klein, K., Jüngst, C., Mwinyi, J., Stieger, B., Krempler, F., Patsch, W., Eloranta, J. J. & Kullak-Ublick, G. A. (2010). The Human Organic Anion Transporter Genes OAT5 and OAT7 Are Transactivated by Hepatocyte Nuclear Factor-1 α (HNF-1 α). *Molecular Pharmacology* 78 (6), 1079–1087. doi:10.1124/mol.110.065201
- Kobayashi, Y., Ohshiro, N., Shibusawa, A., Sasaki, T., Tokuyama, S., Sekine, T., Endou, H. & Yamamoto, T. (2002). Isolation, characterization and differential gene expression of multispecific organic anion transporter 2 in mice. *Molecular Pharmacology* 62 (1), 7–14. doi:10.1124/mol.62.1.7
- Kobayashi, Y., Ohshiro, N., Sakai, R., Ohbayashi, M., Kohyama, N. & Yamamoto, T. (2005). Transport mechanism and substrate specificity of human organic anion transporter 2 (hOat2 SLC22A7). *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 57 (5), 573–578. doi:10.1211/0022357055966
- Koepsell, H. (2013). The SLC22 family with transporters of organic cations, anions and zwitterions. *Molecular Aspects of Medicine* 34 (2-3), 413–435. doi:10.1016/j.mam.2012.10.010
- Kohlmeier, M. (2015). *Nutrient Metabolism. Structures, Functions, and Genes* (2nd ed.). Burlington: Elsevier Science.
- Kojima, H., Nies, A. T., König, J., Hagmann, W., Spring, H., Uemura, M., Fukui, H. & Keppler, D. (2003). Changes in the expression and localization of hepatocellular transporters and radixin in primary biliary cirrhosis. *Journal of Hepatology* 39 (5), 693–702. doi:10.1016/S0168-8278(03)00410-0
- Kok, L.D.S., Siu, S. S., Fung, K. P., Tsui, S.K.W., Lee, C. Y. & Waye, M.M.Y. (2000). Assignment¹ of liver-specific organic anion transporter (SLC22A7) to human chromosome 6 bands p21.2→p21.1 using radiation hybrids. *Cytogenetic and Genome Research* 88 (1-2), 76–77. doi:10.1159/000015489
- Kölz, C., Schaeffeler, E., Schwab, M. & Nies, A. T. (2021). Genetic and Epigenetic Regulation of Organic Cation Transporters. In L. C. Daws (Hrsg.), *Organic Cation Transporters in the Central Nervous System* (Handbook of Experimental Pharmacology, Bd. 266, 1st ed. 2021, Bd. 266, S. 81–100). Cham: Springer International Publishing; Imprint: Springer.
- König, J., Cui, Y., Nies, A. T. & Keppler, D. (2000). A novel human organic anion transporting polypeptide localized to the basolateral hepatocyte membrane. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 278 (1), G156-G164. doi:10.1152/ajpgi.2000.278.1.G156
- Kopplow, K., Letschert, K., König, J., Walter, B. & Keppler, D. (2005). Human Hepatobiliary Transport of Organic Anions Analyzed by Quadruple-Transfected Cells. *Molecular Pharmacology* 68 (4), 1031–1038. doi:10.1124/mol.105.014605

- Kreisel, W., Schaffner, D., Lazaro, A., Trebicka, J., Merfort, I., Schmitt-Graeff, A. & Deibert, P. (2020). Phosphodiesterases in the Liver as Potential Therapeutic Targets of Cirrhotic Portal Hypertension. *International Journal of Molecular Sciences* 21 (17), 6223. doi:10.3390/ijms21176223
- Kudo, A., Mogushi, K., Takayama, T., Matsumura, S., Ban, D., Irie, T., Ochiai, T., Nakamura, N., Tanaka, H., Anzai, N., Sakamoto, M., Tanaka, S. & Arai, S. (2014). Mitochondrial metabolism in the noncancerous liver determine the occurrence of hepatocellular carcinoma. A prospective study. *Journal of Gastroenterology* 49 (3), 502–510. doi:10.1007/s00535-013-0791-4
- Lambert, R. (2007). Breeding Strategies for Maintaining Colonies of Laboratory Mice. A Jackson Laboratory Resource Manual.
- Laney, D. W., Bezerra, J. A., Kosiba, J. L., Degen, S. J. & Cohen, M. B. (1994). Upregulation of Escherichia coli heat-stable enterotoxin receptor in regenerating rat liver. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 266 (5), G899-G906. doi:10.1152/ajpgi.1994.266.5.G899
- Lee, E.-K., Kim, H.-J., Lee, K.-J., Lee, H.-J., Lee, J.-S., Kim, D.-G., Hong, S.-W., Yoon, Y. & Kim, J.-S. (2011). Inhibition of the proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma cells by lipocalin 2 through blockade of JNK and PI3K/Akt signaling. *International Journal of Oncology* 38 (2). doi:10.3892/ijo.2010.854
- Lin, L., Yee, S. W., Kim, R. B. & Giacomini, K. M. (2015). SLC transporters as therapeutic targets. Emerging opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery* 14 (8), 543–560. doi:10.1038/nrd4626
- Liu, X. (2019). Overview: Role of Drug Transporters Overview: Role of Drug Transporters in Drug Disposition and Its Clinical Significance. In X. Liu & G. Pan (Hrsg.), *Drug Transporters in Drug Disposition, Effects and Toxicity* (Advances in Experimental Medicine and Biology, Bd. 1141, 1st ed. 2019, S. 1–12). Singapore: Springer Nature Singapore.
- Ljubojević, M., Balen, D., Breljak, D., Kušan, M., Anzai, N., Bahn, A., Burckhardt, G. & Sabolić, I. (2007). Renal expression of organic anion transporter OAT2 in rats and mice is regulated by sex hormones. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 292 (1), F361-F372. doi:10.1152/ajprenal.00207.2006
- Lu, J., Hou, X., Yuan, X., Cui, L., Liu, Z., Li, X., Ma, L., Cheng, X., Xin, Y., Wang, C., Zhang, K., Wang, X., Ren, W., Sun, R., Jia, Z., Tian, Z., Mi, Q.-S. & Li, C. (2018). Knockout of the urate oxidase gene provides a stable mouse model of hyperuricemia associated with metabolic disorders. *Kidney International* 93 (1), 69–80. doi:10.1016/j.kint.2017.04.031
- Lv, L., Zhao, Y., Wei, Q., Zhao, Y. & Yi, Q. (2020). Downexpression of HSD17B6 correlates with clinical prognosis and tumor immune infiltrates in hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell International* 20 (1), 1450. doi:10.1186/s12935-020-01298-5
- Ma, Z., Lu, S., Sun, D., Bai, M., Jiang, T., Lin, N., Zhou, H., Zeng, S. & Jiang, H. (2019). Roles of organic anion transporter 2 and equilibrative nucleoside transporter 1 in hepatic disposition and antiviral activity of entecavir during non-pregnancy and pregnancy. *British Journal of Pharmacology* 176 (17), 3236–3249. doi:10.1111/bph.14756
- Maeda, K. & Sugiyama, Y. (2013). Transporter biology in drug approval. Regulatory aspects. *Molecular Aspects of Medicine* 34 (2-3), 711–718. doi:10.1016/j.mam.2012.10.012

- Mann, E. A., Shanmukhappa, K. & Cohen, M. B. (2010). Lack of Guanylate Cyclase C results in increased mortality in mice following liver injury. *BMC Gastroenterology* 10 (1), 375. doi:10.1186/1471-230X-10-86
- Marada, V. V.V.R., Flörl, S., Kühne, A., Müller, J., Burckhardt, G. & Hagos, Y. (2015). Interaction of human organic anion transporter 2 (OAT2) and sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) with antineoplastic drugs. *Pharmacological Research* 91 (5), 78–87. doi:10.1016/j.phrs.2014.11.002
- Marinos, R. S., Zhang, W., Wu, G., Kelly, K. A. & Meininger, C. J. (2001). Tetrahydrobiopterin levels regulate endothelial cell proliferation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 281 (2), H482-H489. doi:10.1152/ajpheart.2001.281.2.H482
- Mathialagan, S., Costales, C., Tylaska, L., Kimoto, E., Vildhede, A., Johnson, J., Johnson, N., Sarashina, T., Hashizume, K., Isringhausen, C. D., Vermeer, L. M. M., Wolff, A. R. & Rodrigues, A. D. (2018). In vitro studies with two human organic anion transporters. OAT2 and OAT7. *Xenobiotica* 48 (10), 1037–1049. doi:10.1080/00498254.2017.1384595
- Mathialagan, S., Bi, Y.-A., Costales, C., Kalgutkar, A. S., Rodrigues, A. D. & Varma, M. V.S. (2020). Nicotinic acid transport into human liver involves organic anion transporter 2 (SLC22A7). *Biochemical Pharmacology* 174, 113829. doi:10.1016/j.bcp.2020.113829
- Meyer, M. J., Tuerkova, A., Römer, S., Wenzel, C., Seitz, T., Gaedcke, J., Oswald, S., Brockmöller, J., Zdrzil, B. & Tzvetkov, M. V. (2020). Differences in Metformin and Thiamine Uptake between Human and Mouse Organic Cation Transporter 1. Structural Determinants and Potential Consequences for Intrahepatic Concentrations. *Drug Metabolism and Disposition* 48 (12), 1380–1392. doi:10.1124/dmd.120.000170
- Meyer, M. J., Schreier, P. C.F., Basaran, M., Vlasova, S., Seitz, T., Brockmöller, J., Zdrzil, B. & Tzvetkov, M. V. (2022). Amino acids in transmembrane helix 1 confer major functional differences between human and mouse orthologs of the polyspecific membrane transporter OCT1. *Journal of Biological Chemistry* 298 (6), 101974. doi:10.1016/j.jbc.2022.101974
- Miura, Y., Yoshikawa, T., Naganuma, F., Nakamura, T., Iida, T., Kárpáti, A., Matsuzawa, T., Mogi, A., Harada, R. & Yanai, K. (2017). Characterization of murine polyspecific monoamine transporters. *FEBS Open Bio* 7 (2), 237–248. doi:10.1002/2211-5463.12183
- Mütze, U., Arélin, M. & Beblo, S. (2011). Klassische Phenylketonurie und Tetrahydrobiopterin (BH4)-responsive Hyperphenylalaninämie. *Kinder- und Jugendmedizin* 11 (05), 243–250. doi:10.1055/s-0038-1629152
- Neul, C., Schaeffeler, E., Sparreboom, A., Laufer, S., Schwab, M. & Nies, A. T. (2016). Impact of Membrane Drug Transporters on Resistance to Small-Molecule Tyrosine Kinase Inhibitors. *Trends in Pharmacological Sciences* 37 (11), 904–932. doi:10.1016/j.tips.2016.08.003
- Neul, C., Hofmann, U., Schaeffeler, E., Winter, S., Klein, K., Giacomini, K. M., Eichelbaum, M., Schwab, M. & Nies, A. T. (2021). Characterization of cytochrome P450 (CYP) 2D6 drugs as substrates of human organic cation transporters and multidrug and toxin extrusion proteins. *British Journal of Pharmacology* 178 (6), 1459–1474. doi:10.1111/bph.15370

- Nies, A. T., Herrmann, E., Brom, M. & Keppler, D. (2008). Vectorial transport of the plant alkaloid berberine by double-transfected cells expressing the human organic cation transporter 1 (OCT1, SLC22A1) and the efflux pump MDR1 P-glycoprotein (ABCB1). *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 376 (6), 449–461. doi:10.1007/s00210-007-0219-x
- Nies, A. T., Koepsell, H., Winter, S., Burk, O., Klein, K., Kerb, R., Zanger, U. M., Keppler, D., Schwab, M. & Schaeffeler, E. (2009). Expression of organic cation transporters OCT1 (SLC22A1) and OCT3 (SLC22A3) is affected by genetic factors and cholestasis in human liver. *Hepatology* 50 (4), 1227–1240. doi:10.1002/hep.23103
- Nies, A. T., Hofmann, U., Resch, C., Schaeffeler, E., Rius, M., Schwab, M. & Urtti, A. (2011). Proton Pump Inhibitors Inhibit Metformin Uptake by Organic Cation Transporters (OCTs). *PLoS ONE* 6 (7), e22163. doi:10.1371/journal.pone.0022163
- Nies, A. T., Niemi, M., Burk, O., Winter, S., Zanger, U. M., Stieger, B., Schwab, M. & Schaeffeler, E. (2013). Genetics is a major determinant of expression of the human hepatic uptake transporter OATP1B1, but not of OATP1B3 and OATP2B1. *Genome Medicine* 5 (1), 1. doi:10.1186/gm405
- Nies, A. T., Damme, K., Kruck, S., Schaeffeler, E. & Schwab, M. (2016). Structure and function of multidrug and toxin extrusion proteins (MATEs) and their relevance to drug therapy and personalized medicine. *Archives of Toxicology* 90 (7), 1555–1584. doi:10.1007/s00204-016-1728-5
- Nies, A. T., König, J., Hofmann, U., Kölz, C., Fromm, M. F. & Schwab, M. (2021). Interaction of Remdesivir with Clinically Relevant Hepatic Drug Uptake Transporters. *Pharmaceutics* 13 (3), 369. doi:10.3390/pharmaceutics13030369
- Nies, A. T., Schaeffeler, E. & Schwab, M. (2022). Hepatic solute carrier transporters and drug therapy. Regulation of expression and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics* 238 (4), 108268. doi:10.1016/j.pharmthera.2022.108268
- Nieskens, T. T. G., Peters, J. G. P., Schreurs, M. J., Smits, N., Woestenenk, R., Jansen, K., van der Made, T. K., Röring, M., Hilgendorf, C., Wilmer, M. J. & Masereeuw, R. (2016). A Human Renal Proximal Tubule Cell Line with Stable Organic Anion Transporter 1 and 3 Expression Predictive for Antiviral-Induced Toxicity. *The AAPS Journal* 18 (2), 465–475. doi:10.1208/s12248-016-9871-8
- Nigam, S. K. (2015). What do drug transporters really do? *Nature Reviews Drug Discovery* 14 (1), 29–44. doi:10.1038/nrd4461
- Nigam, S. K. (2018). The SLC22 Transporter Family. A Paradigm for the Impact of Drug Transporters on Metabolic Pathways, Signaling, and Disease. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 58 (1), 663–687. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010617-052713
- Nigam, S. K. & Granados, J. C. (2022). A Biological Basis for Pharmacokinetics. The Remote Sensing and Signaling Theory. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 112 (3), 456–460. doi:10.1002/cpt.2634
- Ohashi, A., Saeki, Y., Harada, T., Naito, M., Takahashi, T., Aizawa, S., Hasegawa, H. & Clelland, J. D. (2016). Tetrahydrobiopterin Supplementation. Elevation of Tissue Biopterin Levels Accompanied by a Relative Increase in Dihydrobiopterin in the Blood and the Role of Probenecid-Sensitive Uptake in Scavenging Dihydrobiopterin in the Liver and Kidney of Rats. *PLoS ONE* 11 (10), e0164305. doi:10.1371/journal.pone.0164305

- Ohashi, A., Mamada, K., Harada, T., Naito, M., Takahashi, T., Aizawa, S. & Hasegawa, H. (2017). Organic anion transporters, OAT1 and OAT3, are crucial biopterin transporters involved in bodily distribution of tetrahydrobiopterin and exclusion of its excess. *Molecular and Cellular Biochemistry* 435 (1-2), 97–108. doi:10.1007/s11010-017-3060-7
- Ölander, M., Wiśniewski, J. R. & Artursson, P. (2020). Cell-type-resolved proteomic analysis of the human liver. *Liver International* 87 (8), 1315. doi:10.1111/liv.14452
- Paulusma, C. C., Kool, M., Bosma, P. J., Scheffer, G. L., ter Borg, F., Scheper, R. J., Tytgat, G. N., Borst, P., Baas, F. & Elferink, R. O. (1997). A mutation in the human canalicular multispecific organic anion transporter gene causes the Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* 25 (6), 1539–1542. doi:10.1002/hep.510250635
- Pavlova, A., Sakurai, H., Leclercq, B., Beier, D. R., Yu, A. S. L. & Nigam, S. K. (2000). Developmentally regulated expression of organic ion transporters NKT (OAT1), OCT1, NLT (OAT2), and Roct. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 278 (4), F635–F643. doi:10.1152/ajprenal.2000.278.4.F635
- Pizzagalli, M. D., Bensimon, A. & Superti-Furga, G. (2021). A guide to plasma membrane solute carrier proteins. *The FEBS Journal* 288 (9), 2784–2835. doi:10.1111/febs.15531
- Popowski, K., Eloranta, J. J., Saborowski, M., Fried, M., Meier, P. J. & Kullak-Ublick, G. A. (2005). The Human Organic Anion Transporter 2 Gene Is Transactivated by Hepatocyte Nuclear Factor-4 α and Suppressed by Bile Acids. *Molecular Pharmacology* 67 (5), 1629–1638. doi:10.1124/mol.104.010223
- Prasanna, J., Sumadhura, C. & Karunakar, P. (2017). Neopterin as a diagnostic biomarker for diagnosis of inflammatory diseases like periodontitis. *Journal of Oral Research and Review* 9 (1), 45. doi:10.4103/2249-4987.201406
- Preitner, F., Bonny, O., Laverrière, A., Rotman, S., Firsov, D., Da Costa, A., Metref, S. & Thorens, B. (2009). Glut9 is a major regulator of urate homeostasis and its genetic inactivation induces hyperuricosuria and urate nephropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (36), 15501–15506. doi:10.1073/pnas.0904411106
- Rizwan, A. N. & Burckhardt, G. (2007). Organic Anion Transporters of the SLC22 Family. Biopharmaceutical, Physiological, and Pathological Roles. *Pharmaceutical Research* 24 (3), 450–470. doi:10.1007/s11095-006-9181-4
- Roberts, A. G. (2021). The Structure and Mechanism of Drug Transporters. In S. Nagar, U. A. Argikar & D. J. Tweedie (Hrsg.), *Enzyme Kinetics in Drug Metabolism. Fundamentals and Applications* (Methods in Molecular Biology, Bd. 2342, 2nd ed. 2021, S. 193–234). New York, NY: Springer US; Humana.
- Robey, R. W., Pluchino, K. M., Hall, M. D., Fojo, A. T., Bates, S. E. & Gottesman, M. M. (2018). Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. *Nature Reviews Cancer* 18 (7), 452–464. doi:10.1038/s41568-018-0005-8
- Rosenthal, N. & Brown, S. (2007). The mouse ascending. Perspectives for human-disease models. *Nature Cell Biology* 9 (9), 993–999. doi:10.1038/ncb437
- Russel, W. M. S. & Burch, R. L. (1960). *The Principles of Humane Experimental Technique* (Bd. 1). London: Methuen & Co.
- Sabolić, I., Breljak, D. & Smital, T. (2016). Translational Relevance of Animal Models Translational Relevance of Animal Models for the Study of Organic Cation Transporter Function. In G. Ciarimboli, S. Gautron & E. Schlatter (Hrsg.), *Organic Cation Transporters. Integration of Physiology, Pathology, and Pharmacology* (1st ed. 2016, S. 217–242). Cham: Springer International Publishing.

- Sandner, P. (2018). From molecules to patients. Exploring the therapeutic role of soluble guanylate cyclase stimulators. *Biological Chemistry* 399 (7), 679–690. doi:10.1515/hsz-2018-0155
- Sarno, R. T. (2017). *Expression of Soluble Guanylate Cyclase in Rat and Human Hepatocytes*. Master's thesis, Harvard Extension School.
- Sato, M., Mamada, H., Anzai, N., Shirasaka, Y., Nakanishi, T. & Tamai, I. (2010). Renal Secretion of Uric Acid by Organic Anion Transporter 2 (OAT2/SLC22A7) in Human. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 33 (3), 498–503. doi:10.1248/bpb.33.498
- Schinkel, A. H. & Jonker, J. W. (2003). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family. An overview. *Advanced Drug Delivery Reviews* 55 (1), 3–29. doi:10.1016/S0169-409X(02)00169-2
- Schwabl, P., Brusilovskaya, K., Supper, P., Bauer, D., Königshofer, P., Riedl, F., Hayden, H., Fuchs, C. D., Stift, J., Oberhuber, G., Aschauer, S., Bonderman, D., Gnad, T., Pfeifer, A., Uschner, F. E., Trebicka, J., Rohr-Udilova, N., Podesser, B. K., Peck-Radosavljevic, M., Trauner, M. & Reiberger, T. (2018). The soluble guanylate cyclase stimulator riociguat reduces fibrogenesis and portal pressure in cirrhotic rats. *Scientific Reports* 8 (1), 743. doi:10.1038/s41598-018-27656-y
- Sekine, T., Watanabe, N., Hosoyamada, M., Kanai, Y. & Endou, H. (1997). Expression cloning and characterization of a novel multispecific organic anion transporter. *Journal of Biological Chemistry* 272 (30), 18526–18529. doi:10.1074/jbc.272.30.18526
- Sekine, T., Cha, S. H., Tsuda, M., Apiwattanakul, N., Nakajima, N., Kanai, Y. & Endou, H. (1998). Identification of multispecific organic anion transporter 2 expressed predominantly in the liver. *FEBS Letters* 429 (2), 179–182. doi:10.1016/S0014-5793(98)00585-7
- Shen, H., Liu, T., Morse, B. L., Zhao, Y., Zhang, Y., Qiu, X., Chen, C., Lewin, A. C., Wang, X.-T., Liu, G., Christopher, L. J., Marathe, P. & Lai, Y. (2015). Characterization of Organic Anion Transporter 2 (SLC22A7). A Highly Efficient Transporter for Creatinine and Species-Dependent Renal Tubular Expression. *Drug Metabolism and Disposition* 43 (7), 984–993. doi:10.1124/dmd.114.062364
- Shen, H., Lai, Y. & Rodrigues, A. D. (2017). Organic Anion Transporter 2. An Enigmatic Human Solute Carrier. *Drug Metabolism and Disposition* 45 (2), 228–236. doi:10.1124/dmd.116.072264
- Shin, H. J., Anzai, N., Enomoto, A., He, X., Kim, D. K., Endou, H. & Kanai, Y. (2007). Novel liver-specific organic anion transporter OAT7 that operates the exchange of sulfate conjugates for short chain fatty acid butyrate. *Hepatology* 45 (4), 1046–1055. doi:10.1002/hep.21596
- Shin, H. J., Lee, C.-H., Lee, S. S., Song, I.-S. & Shin, J.-G. (2010). Identification of genetic polymorphisms of human OAT1 and OAT2 genes and their relationship to hOAT2 expression in human liver. *Clinica Chimica Acta* 411 (1-2), 99–105. doi:10.1016/j.cca.2009.10.015
- Shitara, Y., Hirano, M., Sato, H. & Sugiyama, Y. (2004). Gemfibrozil and Its Glucuronide Inhibit the Organic Anion Transporting Polypeptide 2 (OATP2/OATP1B1. SLC21A6)-Mediated Hepatic Uptake and CYP2C8-Mediated Metabolism of Cerivastatin: Analysis of the Mechanism of the Clinically Relevant Drug-Drug Interaction between Cerivastatin and Gemfibrozil. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 311 (1), 228–236. doi:10.1124/jpet.104.068536

- Shu, Y., Leabman, M. K., Feng, B., Mangravite, L. M., Huang, C. C., Stryke, D., Kawamoto, M., Johns, S. J., DeYoung, J., Carlson, E., Ferrin, T. E., Herskowitz, I. & Giacomini, K. M. (2003). Evolutionary conservation predicts function of variants of the human organic cation transporter, OCT1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (10), 5902–5907. doi:10.1073/pnas.0730858100
- Simonson, G. D., Vincent, A. C., Roberg, K. J., Huang, Y. & Iwanij, V. (1994). Molecular cloning and characterization of a novel liver-specific transport protein. *Journal of Cell Science* 107 (4), 1065–1072. doi:10.1242/jcs.107.4.1065
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150 (1), 76–85. doi:10.1016/0003-2697(85)90442-7
- Soriano, P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nature Genetics* 21 (1), 70–71. doi:10.1038/5007
- Srimaroeng, C., Perry, J. L. & Pritchard, J. B. (2008). Physiology, structure, and regulation of the cloned organic anion transporters. *Xenobiotica* 38 (7-8), 889–935. doi:10.1080/00498250801927435
- Sun, W., Wu, R. R., van Poelje, P. D. & Erion, M. D. (2001). Isolation of a Family of Organic Anion Transporters from Human Liver and Kidney. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 283 (2), 417–422. doi:10.1006/bbrc.2001.4774
- Szakács, G., Váradi, A., Özvegy-Laczka, C. & Sarkadi, B. (2008). The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discovery Today* 13 (9-10), 379–393. doi:10.1016/j.drudis.2007.12.010
- Tanaka, K., Xu, W., Zhou, F. & You, G. (2004). Role of Glycosylation in the Organic Anion Transporter OAT1. *Journal of Biological Chemistry* 279 (15), 14961–14966. doi:10.1074/jbc.M400197200
- Thöny, B., Auerbach, G. & Blau, N. (2000). Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. *Biochemical Journal* 347 (1), 1–16. doi:10.1042/bj3470001
- Tremmel, R., Nies, A. T., van Eijck, B. A. C., Handin, N., Haag, M., Winter, S., Büttner, F. A., Kölz, C., Klein, F., Mazzola, P., Hofmann, U., Klein, K., Hoffmann, P., Nöthen, M. M., Gaugaz, F. Z., Artursson, P., Schwab, M. & Schaeffeler, E. (2022). Hepatic Expression of the Na⁺-Taurocholate Cotransporting Polypeptide Is Independent from Genetic Variation. *International Journal of Molecular Sciences* 23 (13), 7468. doi:10.3390/ijms23137468
- U.S. Food & Drug Administration. (2020). Clinical Drug Interaction Studies — Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter-Mediated Drug Interactions Guidance for Industry.
- Uddin, M. E., Moseley, A., Hu, S. & Sparreboom, A. (2022). Contribution of membrane transporters to chemotherapy-induced cardiotoxicity. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 130 (S1), 36–47. doi:10.1111/bcpt.13635
- Valencak, T. G., Spellingwimmer, T., Nimphy, R., Reinisch, I., Hoffman, J. M. & Prokesch, A. (2020). Challenging a “Cushy” Life. Potential Roles of Thermogenesis and Adipose Tissue Adaptations in Delayed Aging of Ames and Snell Dwarf Mice. *Metabolites* 10 (5), 176. doi:10.3390/metabo10050176
- van Aubel, R.A.M.H., Smeets, P.H.E., Peters, J.G.P., Bindels, R.J.M. & Russel, F.G.M. (2002). The MRP4/ABCC4 Gene Encodes a Novel Apical Organic Anion Transporter in Human Kidney Proximal Tubules: Putative Efflux Pump for Urinary cAMP and cGMP. *Journal of the American Society of Nephrology* (13 (3)), 595–603.

- Vasiliou, V., Vasiliou, K. & Nebert, D. W. (2008). Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Human Genomics* 3 (3), 281. doi:10.1186/1479-7364-3-3-281
- Veiga-Matos, J., Remião, F. & Motaes, A. (2020). Pharmacokinetics and Toxicokinetics Roles of Membrane Transporters at Kidney Level. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 23, 333–356. doi:10.18433/jpps30865
- Vildhede, A., Kimoto, E., Rodrigues, A. D. & Varma, M. V. S. (2018). Quantification of Hepatic Organic Anion Transport Proteins OAT2 and OAT7 in Human Liver Tissue and Primary Hepatocytes. *Molecular Pharmaceutics* 15 (8), 3227–3235. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.8b00320
- Wang, D.-S., Jonker, J. W., Kato, Y., Kusuvara, H., Schinkel, A. H. & Sugiyama, Y. (2002). Involvement of Organic Cation Transporter 1 in Hepatic and Intestinal Distribution of Metformin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 302 (2), 510–515. doi:10.1124/jpet.102.034140
- Wang, Z., Gao, L., Ren, S., Sun, G., Lin, Y., Wang, S. & Wu, B. (2022). E4BP4 Regulates Hepatic Solute Carrier Family 2 Member 9 and Uric Acid Disposition in Mice. *Drug Metabolism and Disposition* 50 (5), 591–599. doi:10.1124/dmd.121.000790
- Wiedmer, T., Ingles-Prieto, A., Goldmann, U., Steppan, C. M. & Superti-Furga, G. (2022). Accelerating SLC Transporter Research. Streamlining Knowledge and Validated Tools. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 112 (3), 439–442. doi:10.1002/cpt.2639
- Wielinga, P. R., van der Heijden, I., Reid, G., Beijnen, J. H., Wijnholds, J. & Borst, P. (2003). Characterization of the MRP4- and MRP5-mediated Transport of Cyclic Nucleotides from Intact Cells. *Journal of Biological Chemistry* 278 (20), 17664–17671. doi:10.1074/jbc.M212723200
- Wu, W., Dnyanmote, A. V. & Nigam, S. K. (2011). Remote Communication through Solute Carriers and ATP Binding Cassette Drug Transporter Pathways. An Update on the Remote Sensing and Signaling Hypothesis. *Molecular Pharmacology* 79 (5), 795–805. doi:10.1124/mol.110.070607
- Wu, M. & Jiang, L. (2022). Hydroxysteroid 17-Beta Dehydrogenase 6 Is a Prognostic Biomarker and Correlates with Immune Infiltrates in Hepatocellular Carcinoma. *Digestive Diseases and Sciences* 67 (1), 146–158. doi:10.1007/s10620-021-06832-7
- Xu, G., Bhatnagar, V., Wen, G.E.N., Hamilton, B. A., Eraly, S. A. & Nigam, S. K. (2005). Analyses of coding region polymorphisms in apical and basolateral human organic anion transporter (OAT) genes [OAT1 (NKT), OAT2, OAT3, OAT4, URAT (RST)] Rapid Communication. *Kidney International* 68 (4), 1491–1499. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00612.x
- Yamada, A., Maeda, K., Kiyotani, K., Mushiroda, T., Nakamura, Y. & Sugiyama, Y. (2014). Kinetic Interpretation of the Importance of OATP1B3 and MRP2 in Docetaxel-Induced Hematopoietic Toxicity. *CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology* 3 (7), 126. doi:10.1038/psp.2014.23
- Yasui, Y., Kudo, A., Kurosaki, M., Matsuda, S., Muraoka, M., Tamaki, N., Suzuki, S., Hosokawa, T., Ueda, K., Matsunaga, K., Nakanishi, H., Tsuchiya, K., Itakura, J., Takahashi, Y., Tanaka, S., Asahina, Y., Enomoto, N., Arii, S. & Izumi, N. (2014). Reduced Organic Anion Transporter Expression Is a Risk Factor for Hepatocellular Carcinoma in Chronic Hepatitis C Patients. A Propensity Score Matching Study. *Oncology* 86 (1), 53–62. doi:10.1159/000356643

- You, G. & Morris, M. E. (2022). Overview of Drug Transporter Families. In G. You, M. E. Morris & B. Wang (Hrsg.), *Drug Transporters. Molecular Characterization and Role in Drug Disposition* (Wiley Series in Drug Discovery and Development Ser, 3rd ed., S. 1–7). Newark: John Wiley & Sons, Incorporated.
- Zamek-Gliszczynski, M. J., Taub, M. E., Chothe, P. P., Chu, X., Giacomini, K. M., Kim, R. B., Ray, A. S., Stocker, S. L., Unadkat, J. D., Wittwer, M. B., Xia, C., Yee, S. W., Zhang, L. & Zhang, Y. (2018). Transporters in Drug Development. 2018 ITC Recommendations for Transporters of Emerging Clinical Importance. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 104 (5), 890–899. doi:10.1002/cpt.1112
- Zamek-Gliszczynski, M. J., Sangha, V., Shen, H., Feng, B., Wittwer, M. B., Varma, M. V. S., Liang, X., Sugiyama, Y., Zhang, L. & Bendayan, R. (2022). Transporters in Drug Development. International Transporter Consortium Update on Emerging Transporters of Clinical Importance. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 112 (3), 485–500. doi:10.1002/cpt.2644
- Zhao, D., Guallar, E., Vaidya, D., Ndumele, C. E., Ouyang, P., Post, W. S., Lima, J. A., Ying, W., Kass, D. A., Hoogeveen, R. C., Shah, S. J., Subramanya, V. & Michos, E. D. (2020). Cyclic Guanosine Monophosphate and Risk of Incident Heart Failure and Other Cardiovascular Events. The ARIC Study. *Journal of the American Heart Association* 9 (2). doi:10.1161/JAHA.119.013966