

**Der H⁺-Aminosäure-Cotransporter PAT1:
Mechanismus, Spezifität und pharmazeutische Relevanz**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Diplom-Pharmazeutin Linda Metzner

geboren am 26.03.1979 in Halle/Saale

Gutachter:

1. PD Dr. Matthias Brandsch, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2. Prof. Dr. Reinhard H. Neubert, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
3. Prof. Dr. Gerhard Burckhardt, Georg-August-Universität Göttingen

Halle (Saale), 13. August 2007

Tag der Verteidigung: 23. November 2007

urn:nbn:de:gbv:3-000012874

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000012874>]

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einführung	4
2	Die H⁺-Aminosäure-Cotransporter	6
2.1	Historische Aspekte	6
2.2	Struktur	7
2.3	Mechanismus	10
2.4	Lokalisation	12
2.5	Spezifität	12
3	Ergebnisse und Diskussion	14
3.1	Charakterisierung des Prolintransportes an Caco-2-Zellen	14
3.2	Relevanz konservierter Histidinreste in PAT1	16
3.3	Physiologische und pharmazeutisch-relevante Substrate	21
3.4	Inhibitoren	29
3.5	Einordnung von PAT1 in den epithelialen Aminosäuretransport	33
4	Zusammenfassung	38
5	Ausblick	40
6	Literatur	41
7	Anlagen	49
7.1	Transport of pharmacologically active proline derivatives by the human proton-coupled amino acid transporter hPAT1 Metzner, L., Kalbitz, J., Brandsch, M. <i>Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics</i> 309, 28-35, 2004	50
7.2	Influence of a proton gradient on the transport kinetics of the H ⁺ /amino acid cotransporter PAT1 in Caco-2 cells Metzner, L., Brandsch, M. <i>European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics</i> 63, 360-364, 2006	58
7.3	Mutational analysis of histidine residues in the human proton-coupled amino acid transporter PAT1 Metzner, L., Natho, K., Zebisch, K., Dorn, M., Bosse-Doenecke, E., Ganapathy, V., Brandsch, M. <i>Biochemical Journal</i> , 2007, eingereicht	64
7.4	Serotonin, L-tryptophan, and tryptamine are effective inhibitors of the human amino acid transport system PAT1 Metzner, L., Kottra, G., Neubert, K., Daniel, H., Brandsch, M. <i>FASEB Journal</i> 19, 1468-1473, 2005	90
7.5	Substrate specificity of the amino acid transporter PAT1 Metzner, L., Neubert, K., Brandsch, M. <i>Amino Acids</i> 31, 111-117, 2006	96

ABKÜRZUNGEN

APSA	3-Amino-1-propansulfonsäure
BCH	2- <i>endo</i> -Aminobicyclo[2,2,1]heptan-2-carbonsäure
BBMV	<i>brush border membrane vesicles</i>
bp	Basenpaare
Caco-2	humane Kolonkarzinom-Zelllinie
CHDP	cis-4-Hydroxy-D-prolin
CHLP	cis-4-Hydroxy-L-prolin
Da	Dalton
GABA	γ -Aminobuttersäure
GHB	γ -Hydroxybuttersäure
hPAT1	humaner protonen-abhängiger Aminosäuretransporter 1
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRPE	<i>human retinal pigment epithelial</i>
IC ₅₀	Konzentration eines Inhibitors, bei der die spezifische Aufnahme eines Standardsubstrates um 50% gehemmt ist
K _i	Inhibitorkonstante
K _t	Michaelis-Menten-Konstante
J _{a-b}	Transepithelialer Flux von apikaler nach basolateraler Seite
J _{b-a}	Transepithelialer Flux von basolateraler nach apikaler Seite
J _{a-c}	Apikale Substrataufnahme in die Zellmonolayer
J _{b-c}	Basolaterale Substrataufnahme in die Zellmonolayer
LACA	L-Azetidin-2-carbonsäure
MeAIB	α -(Methylamino)isobuttersäure
PEPT1	<i>“low affinity, high capacity”</i> H ⁺ /Di- und Tripeptidsymporter 1
PEPT2	<i>“high affinity, low capacity”</i> H ⁺ /Di- und Tripeptidsymporter 2
[Spezies]	m \triangleq Maus r \triangleq Ratte h \triangleq Mensch
TMD	Transmembrandomänen
V _{max}	Maximalgeschwindigkeit des Transportes
THLP	trans-4-Hydroxy-L-prolin

1 EINFÜHRUNG

Die Überwindung epithelialer Barrieren stellt bei peroralen, transdermalen, inhalativen und ähnlichen Applikationen einen entscheidenden Schritt während der Arzneistoffaufnahme dar. Ein vielversprechender Ansatz für die Beschleunigung dieser Passagen besteht in der Nutzung physiologischer Transportsysteme. Daher gilt der genauen Untersuchung der Lokalisation, des Mechanismus und der Substratspezifität von epithelialen Translokatoren sowie dem Design transportierter Arzneistoffe besonderes Interesse.

Pharmazeutisch-relevante Arzneistofftransporter sind z.B. die Peptidtransporter PEPT1 und PEPT2, die die Absorption bzw. Reabsorption vieler β -Lactamantibiotika vermitteln (Daniel und Adibi 1993; Ganapathy *et al.* 1995; Bretschneider *et al.* 1999; Luckner und Brandsch 2005). Weitere Arzneistofftransporter sind die organischen Kationentransporter (OCT1 - 3), verantwortlich für den Transport von z.B. Cimetidin, Etilefrin und Metformin (Koepsell *et al.* 2003; Müller *et al.* 2005) oder auch die organischen Anionentransporter (OAT1 - 4; nichtsteroidale Antiphlogistika, Virustatika und ähnliche; Burckhardt und Burckhardt 2003). Das P-Glycoprotein steht als Effluxsystem vor allem für amphiphile und lipophile Xenobiotika im Focus vieler Transportstudien (Hoffmeyer *et al.* 2000). Ein spezieller Aspekt solcher Untersuchungen ist der carrier-vermittelte Transport von Arzneistoffen, die erst im Organismus in die aktive Wirkform umgewandelt werden (*Prodrugs*). Die orale Bioverfügbarkeit von Aciclovir, einem bei Herpesinfektionen eingesetzten Virusstatikum, wird durch den aktiven Transport des *Prodrugs* Valaciclovir über den intestinal lokalisierten PEPT1 ermöglicht (Beutner *et al.* 1995; Ganapathy *et al.* 1998).

In dieser Arbeit wurde sich mit einem Aminosäuretransporter beschäftigt, der insbesondere Prolin transportiert. Die intestinale Prolinaufnahme war hinsichtlich treibender Kraft und Spezifität lange ungeklärt. Zunächst wurde sie hauptsächlich dem Na^+ -abhängigen, hoch affinen Transportsystem IMINO zugeschrieben (Munck 1966; Ganapathy *et al.* 1983; Stevens und Wright 1985; Urdaneta *et al.* 1998). Die Annahme solcher ausschließlich Na^+ -getriebener Aminosäuretransportsysteme war lange Zeit vorherrschend. Überraschend waren daher Studien an renalen Bürstensaummembranvesikeln, nach denen der Transport von Prolin und Derivaten nicht Na^+ -abhängig, sondern H^+ -abhängig erfolgte (Røigaard-Petersen und Sheikh 1984; Rajendran *et al.* 1987). Detaillierte Transportuntersuchungen an der humanen intestinalen Zelllinie Caco-2 Anfang der 90er Jahre bewiesen die Existenz des H^+ -abhängigen L-Prolintransportes am Darmepithel (Thwaites *et al.* 1993a, 1995a). Erst 2001 wurde ein

Transportprotein mit eben diesen Eigenschaften aus glutamergen und GABAergen Neuronen des Rattenhirns kloniert, der lysosomale Aminosäuretransporter LYAAT1 (Sagne *et al.* 2001). Kurz danach erfolgten die Klonierung und funktionelle Charakterisierung der protonengekoppelten Aminosäuretransporter der Maus (mPAT1 und mPAT2; Boll *et al.* 2002). Nach der Isolation des humanen hPAT1 aus Caco-2-Zellen wurden auch dessen Primärstruktur und Mechanismus aufgeklärt (Chen *et al.* 2003a).

Zu Beginn dieser Arbeit gab es wenige Informationen zu Spezifität, Verbreitung und Relevanz von PAT1. Die Ziele der vorgelegten Arbeit waren:

- die Aufklärung der Substratspezifität von PAT1
- Transportstudien mit pharmazeutisch-relevanten Substraten
- die Identifizierung nicht-transportierter Inhibitoren
- die Identifizierung essentieller Aminosäurereste des Transportproteins
- die Einordnung von PAT1 in den epithelialen Aminosäure- und Arzneistofftransport.

2 DIE H⁺-AMINOSÄURE-COTRANSPORTER

2.1 Historische Aspekte

Die Interpretation der Daten über den intestinalen Transport von Iminosäuren¹ hinsichtlich der treibenden Kraft und der Speziesdiversität war lange Zeit heftig umstritten (Anderson *et al.* 2004; Thwaites und Anderson 2006). In den Jahren 1985 – 2000 erschienen zahlreiche Arbeiten sowohl zum Na⁺-abhängigen als auch zum H⁺-abhängigen Iminosäuretransport in Darm und Niere. Bereits 1966 beschrieb Munck ein spezifisches Transportsystem für Iminosäuren im Rattendarm (Munck 1966). Scriver fand ein Transportsystem im renalen Tubulus der Ratte, welches Prolin und auch Hydroxyprolin akzeptiert (Scriver 1968). In einer Reihe von Studien an renalen Bürstensaummembranvesikeln (*brush-border-membrane vesicles*; BBMVs) vom Kaninchen konnten in den 80er Jahren prolintransportierende Systeme mit verschiedenen mechanistischen Charakteristika identifiziert werden: Ein hoch affines Na⁺-abhängiges Transportsystem lokalisiert in *pars recta* Membranvesikeln und zwei weitere elektrogene Prolintransportsysteme in *pars convoluta* Membranvesikeln, von denen das eine System Na⁺-unabhängig den Transport von Prolin, Hydroxyprolin, β-Alanin und auch D-Iminosäuren vermittelt (Røigaard-Petersen und Sheikh 1984; Jessen *et al.* 1989; Røigaard-Petersen *et al.* 1989). Das hoch affine Na⁺-abhängige System wurde auch von der Arbeitsgruppe Leibach beschrieben, die den Transport von Prolin und Derivaten an renalen BBMVs des Kaninchen untersuchte (Ganapathy *et al.* 1983). Den renalen H⁺-abhängigen Aminosäuretransport charakterisierten Rajendran und Mitarbeiter als elektrogenen Glycin-H⁺-Symportmechanismus (Rajendran *et al.* 1987).

Im Gegensatz dazu wurde für den intestinalen Prolintransport ein System IMINO beschrieben, welches Na⁺-abhängig L-Prolin und Betain, nicht aber L-Alanin, β-Alanin oder γ-Aminobuttersäure (GABA) transportiert (Stevens und Wright 1985, 1987; Urdaneta *et al.* 1998). Der H⁺-abhängige Aminosäuretransport am Darm wurde von einigen Autoren lange Zeit als Nebeneffekt Na⁺-abhängiger Transporter, so genanntem „*slippage*“ bezeichnet (Stevens 1992) und nur zögerlich eigenständigen Transportproteinen zugeordnet (Stevens *et al.* 1982).

¹Streng genommen handelt es sich bei Prolin chemisch um eine cyclische Aminosäure, die eine sekundäre Aminogruppe enthält und nicht um eine Iminosäure. Die Bezeichnung Iminosäure ist gebräuchlich für Aminosäuren, in denen die freie α-Aminogruppe, -NH₂, durch die Cyclisierung zu einer sekundären umgewandelt wurde. In der chemischen Nomenklatur entspricht eine Iminogruppe dem Strukturelement =NH, welches mit dem benachbarten Kohlenstoffatom über eine C=N Doppelbindung verbunden ist. Die Prolinbiosynthese erfolgt aus Arginin über Ornithin, Glutaminsäure-Semialdehyd und der Prolinorstufe (S)-Pyrrolidin-2-carbonsäure, bei der es sich um eine „echte“ Iminosäure handelt.

D.T. Thwaites publizierte 1993 erstmals Daten zu H⁺-gekoppeltem Na⁺-unabhängigem Transport von L-Prolin und β-Alanin an den humanen intestinalen Modellepithelzellen Caco-2. Die Aufnahme einiger Aminosäuren wie Glycin, Prolin, β-Alanin und der Modellsubstanz α-(Methylamino)isobuttersäure (MeAIB) konnte durch apikale Ansäuerung stimuliert werden und erfolgte mit Affinitätskonstanten im millimolaren Bereich (Thwaites *et al.* 1993a, b, 1995a, b, 1999). Die Unabhängigkeit der Aminosäureaufnahme von Na⁺-Ionen und die Akzeptanz von Glycin und β-Alanin grenzt das System deutlich vom System IMINO ab.

Pharmazeutische Relevanz erlangt das H⁺-abhängige Aminosäuretransportsystem durch die Akzeptanz potentieller bzw. schon etablierter Arzneistoffe, wie einiger GABA-Analoga und D-Cycloserin (Ranaldi *et al.* 1994; Thwaites *et al.* 2000).

2.2 Struktur

Die molekulare Aufklärung des hier bearbeiteten H⁺-abhängigen Aminosäuretransportsystems begann 2001 mit der Klonierung und funktionellen Charakterisierung eines lysosomalen Aminosäuretransporters aus Zellen des Rattenhirns (Sagne *et al.* 2001). Dieser Transporter, rLYAAT1 (*rat lysosomal amino acid transporter 1*), wurde der Familie der Aminosäure/Auxinpermeasen zugeordnet. Mitglieder dieser Familie sind ausschließlich in eukaryotischen Organismen vertreten, vermitteln H⁺-abhängigen Substrattransport und bestehen aus 400 - 500 Aminosäuren, die in 11 Transmembrandomänen (TMD) in der Zellmembran organisiert sind (Young *et al.* 1999). LYAAT1 transportiert lysosomale Proteolyseprodukte wie L-Prolin, L-Alanin und Glycin im Symport mit H⁺-Ionen aus Lysosomen in das Zytosol. Kurz darauf wurden aus intestinale und embryonalem Mäusegewebe durch Sequenz-Ähnlichkeitsanalysen der Aminosäure/Auxinpermeasefamilie niedriger Eukaryoten zwei H⁺-abhängige Aminosäuretransporter isoliert, mPAT1² (*mouse proton-dependent amino acid transporter 1*; ortholog zu rLYAAT1) und mPAT2 (Boll *et al.* 2002). Diese Transporter wurden der Genfamilie SLC36³ zugeordnet. Funktionelle Untersuchungen erfolgten mittels Fluxstudien und elektrophysiologischen Messungen an mPAT1 oder mPAT2 exprimierenden *Xenopus laevis* Oozyten. mPAT1 besteht aus 475 Aminosäuren. Hydropathieanalysen sagen

²Die Abkürzung PAT für *proton-dependent amino acid transporter* ist nicht eindeutig. PAT steht ebenfalls für den *putative anion transporter 1*, für *protein interacting with APP tail 1* (einem potentiellen Transportprotein für das *β-amyloid precursor protein (APP)*) und für *process analytical technique* (eine feststehende Formulierung aus der pharmazeutischen Industrie).

³Nach der funktionellen Charakterisierung und Lokalisierung vieler Transportproteine erfolgte ihre Klassifizierung und ihre Einordnung in Genfamilien der SLC (*solute carrier*) Superfamilie (<http://www.bioparadigms.org/slc/intro.asp>). Diese Superfamilie enthält derzeit 360 Transportproteine in 46 Genfamilien.

ein aus 9 (Chen *et al.* 2003a) oder 11 Domänen bestehendes TMD-Modell des Transportproteins voraus, bei dem der N-Terminus intrazellulär und der C-Terminus extrazellulär lokalisiert sind (Boll *et al.* 2002). Betrachtet man rLYAAT1 und mPAT1 hinsichtlich ihrer treibenden Kraft, Ionenabhängigkeit und Substratspezifität, weisen sie eine auffallend starke Übereinstimmung zu den von Røigaard-Petersen, Thwaites und Ranaldi beschriebenen Systemen auf (siehe 2.1 Historische Aspekte).

Die Klonierung, Lokalisation und funktionelle Charakterisierung des humanen PAT1 erfolgte 2003 aus der Zelllinie Caco-2 (Chen *et al.* 2003a). Die hPAT1 cDNA besteht aus 5585 bp, die für ein Protein von 476 Aminosäuren codiert (Abbildung 1). Die Genfamilie der H⁺-gekoppelten Aminosäuretransporter, SLC36, besteht aus vier Mitgliedern, PAT1 und 2 sowie den sogenannten *orphan* Transportern PAT3 und 4. Alle vier Transportproteine bestehen aus \approx 500 Aminosäuren mit mindestens 48% Identität zueinander (Tabelle 1).

Tabelle 1. **Die H⁺-gekoppelten Aminosäuretransporter der Genfamilie SLC36** (Boll *et al.* 2004; Chen *et al.* 2003b; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>)

Protein	Alias	Gen	Chromosom (<i>human</i>)	Aminosäuren (<i>human</i>)	GenBank Identnummer	Molekulares Gewicht (kDa)
PAT1	LYAAT1 Tramdorin ⁴ 3	SLC36A1	5q33.1	476	AF516142	53,1
PAT2	Tramdorin 1	SLC36A2	5q33.1	483	AY162214	53,2
PAT3	Tramdorin 2	SLC36A3	5q33.1	470	AY162215	51,8
PAT4	LYAAT2	SLC36A4	11q14.3	504	BC047374	56,2

Hydropathieanalysen der PAT1- und 2-Proteine von Mensch und Maus auf Basis des Kyte- und-Doolittle-Algorithmus ergaben Topologiemodelle mit 11 TMD (Boll *et al.* 2002). Das eigene Membrantopologiemodell des humanen PAT1 ist in Abbildung 1 dargestellt. Dafür wurde das Programm TMHMM 2.0, basierend auf dem Hidden-Markov-Modell, verwendet. Diese Methode vereint die Parameter der Aminosäureanordnung, Ladungsausrichtung und Helixlänge (Krogh *et al.* 2001). Neben dem markierten konservierten N-Glykosylierungsmotiv (470-473) befinden sich im PAT1-Protein zwei weitere mögliche N-Glykosylierungsmotive in der zweiten extrazellulären Schleife (174-177 (NGTT); 183-186 (NETV)). Ein potentielles Proteinkinase-C-Erkennungsmotiv ist in der ersten zytoplasmatischen Schleife lokalisiert (blau; 3 - 5). Konservierte Histidinreste (rot; 55, 93, 135) innerhalb

⁴Tramdorin ist eine Bezeichnung für in Transmembrandomänen organisierte Proteine. Innerhalb der SLC36-Familie wurde dieser Begriff zuerst für PAT2 geprägt.

PAT1 – 4 und der Spezies Mensch, Kaninchen, Ratte und Maus und eventuell für die Stabilisierung des hPAT1-Proteins relevante Cysteinreste (grün; 180, 329, 473) sind hervorgehoben.

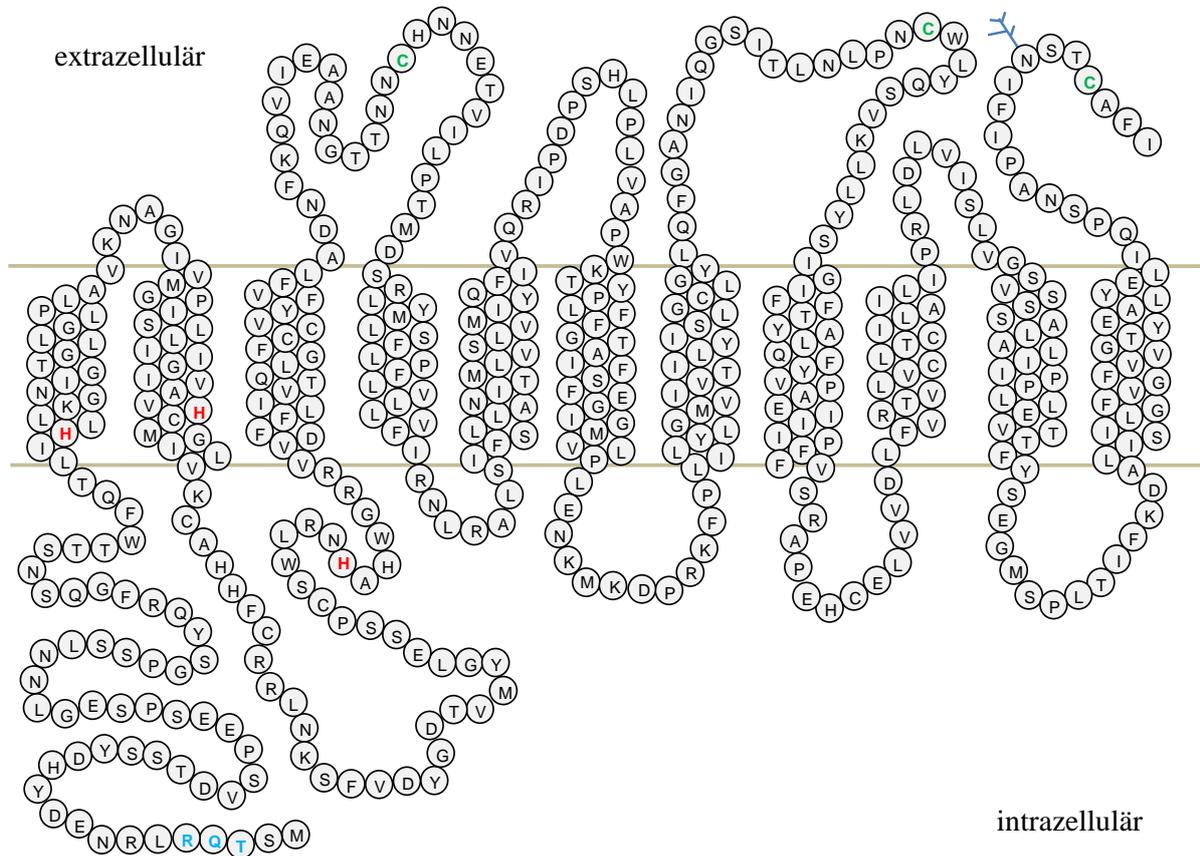


Abbildung 1. **Membrantopologiemodell des humanen PAT1**

Aminosäuren in den Kreisen sind im *one-letter-code* dargestellt. Konservierte Histidinreste, das potentielle Proteinkinase-C-Erkennungsmotiv und Cysteinreste sind hervorgehoben. Die konservierte putative N-Glykosylierungsstelle ist markiert. (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)

2.3 Mechanismus

PAT1 ist ein aktiver⁵, H⁺-gekoppelter Aminosäuretransporter. Durch die Aktivität der am Enterozyten basolateral lokalisierten Na⁺/K⁺-ATPase wird ein nach innen gerichteter Na⁺-Gradient erzeugt, der von dem apikal lokalisierten Na⁺/H⁺-Austauscher (NHE3) zur Aufrechterhaltung eines nach innen gerichteten H⁺-Gradienten genutzt wird. Unter Ausnutzung dieses H⁺-Gradienten transportiert PAT1 im Symport⁶ mit einem H⁺-Ion eine Aminosäure in die Zelle (Boll *et al.* 2002; Chen *et al.* 2003a; Anderson *et al.* 2004). Es handelt sich um einen elektrogenen Transportmechanismus mit einer Stöchiometrie von 1:1 (Boll *et al.* 2002). Abbildung 2 zeigt das Modell dieses tertiär aktiven Transporters am Enterozyten.

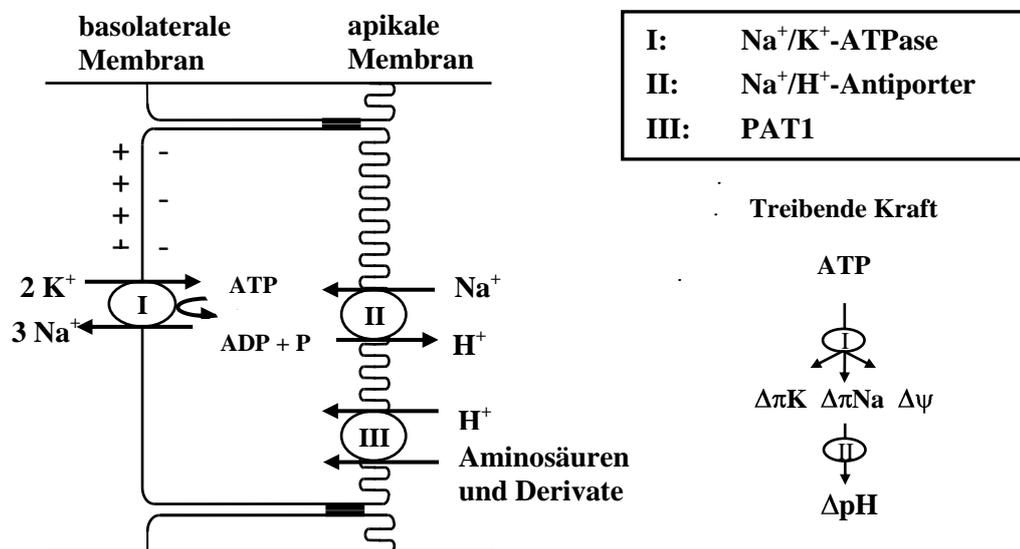


Abbildung 2. Schematische Darstellung des intestinalen Prolintransportes über PAT1

Die Transportaktivität von PAT1 ist unabhängig von der Anwesenheit von Cl⁻-Ionen, jedoch durch die Aktivität des Na⁺/H⁺-Austauschers (NHE3) indirekt abhängig von der Anwesenheit von Na⁺-Ionen. PAT1 ist stark stimuliert durch die Anwesenheit eines nach innen gerichteten

⁵Die Überwindung epithelialer Barrieren erfolgt generell parazellulär durch einfache Diffusion oder transzellulär durch einfache Diffusion, über spezifische Translokatoren oder durch Endozytosen. Der spezifische translokatorvermittelte Transport ist substratspezifisch, sättigbar und weist meist eine spezifische Hemmbarkeit durch Substratanaloga auf. Aktive Transportprozesse erfolgen unter Energieaufwendung und werden in primäre, sekundäre und tertiäre Prozesse untergliedert. Werden Netto-Ladungen durch die Membran transportiert, ist der Transport elektrogen. Der Transport über Translokatoren kann prinzipiell in (i) carrier-vermittelten Transport, (ii) Transport durch Kanäle, (iii) Transport über Pumpen und (iv) Transport durch Poren untergliedert werden. Hierbei handelt es sich um Modellvorstellungen, deren Übergänge fließend sind.

⁶Während eines Symportes werden zwei verschiedene Moleküle/Ionen zusammen in eine Richtung transportiert. Weiterhin unterscheidet man Uniport (Transport eines Moleküles/Iones in eine Richtung) und Antiport (Transport zweier verschiedener Moleküle/Ionen in verschiedene Richtungen). Symport und Antiport können unter dem Oberbegriff Cotransport (gemeinsamer Transport von Molekülen) zusammengefasst werden.

H⁺-Gradienten, wobei ein Transportmaximum bei einem extrazellulären pH-Wert von 5,0 – 5,5 und keine Transportaktivität mehr ab pH 7,0 festgestellt wurde (Boll *et al.* 2002; Chen *et al.* 2003a). Die direkte Abhängigkeit von einem nach innen gerichteten H⁺-Gradienten wurde durch die indirekte Regulation von hPAT1 über NHE3 bewiesen. Die direkte Aktivierung der Adenylatcyclase mittels Forskolin oder dem vasoaktiven intestinalen Peptid (VIP) führte über die Proteinkinase A-vermittelte Phosphorylierung von NHE3 zur Verhinderung der Wiederherstellung eines vorher angelegten pH-Gradienten durch NHE3 und hatte die Hemmung der hPAT1-Aktivität zur Folge (Anderson und Thwaites 2005).

Zur Aufklärung des Mechanismus der H⁺-Bindung während des PAT1-vermittelten Aminosäuretransportes führten Foltz und Mitarbeiter elektrophysiologische Messungen an mPAT1-exprimierenden *Xenopus laevis* Oozyten durch. Glycin diente als Referenzsubstrat. Die Bestimmung der kinetischen Parameter des mPAT1-vermittelten Transportes bei pH 5,0 bzw. pH 6,5 ergab kaum eine Änderung des I_{max}-Wertes (maximal durch ein Substrat ausgelöster Strom in nA); die Affinität eines Substrates zum Transporter stieg jedoch in der Anwesenheit eines stärkeren nach innen gerichteten pH-Gradienten. Es konnte gezeigt werden, dass die H⁺-Bindungsaffinitäten unabhängig von den verwendeten Substraten waren, selbst wenn diese unterschiedliche Affinitäten aufwiesen. Daraus folgte der Schluss, dass es sich beim PAT1-vermittelten Prolintransport um einen geordneten Mechanismus handelt, bei dem zuerst das H⁺-Ion bindet, dann das Substrat (Foltz *et al.* 2005). Weiterhin konnte der mPAT1-vermittelte Efflux von Aminosäuren aus mPAT1-exprimierenden *Xenopus laevis* Oozyten gezeigt werden, der elektrogen durch einen H⁺-Gradienten und hauptsächlich durch die Anwesenheit eines Substratgradienten stimuliert ist. Dieser Efflux erfolgt mit 7-fach erniedrigter Affinität (Foltz *et al.* 2005).

Das zweite Mitglied der Familie der H⁺-gekoppelten Aminosäuretransporter, PAT2, verfügt ebenfalls über die für PAT1 beschriebenen Transportcharakteristika. Auch PAT2 transportiert selektiv Aminosäuren elektrogen, in Anwesenheit eines nach innen gerichteten H⁺-Gradienten in die Zelle, wobei hier hauptsächlich das Membranpotential als primäre treibende Kraft diskutiert wird (Chen *et al.* 2003b; Kennedy *et al.* 2005). Die Anwesenheit von Na⁺- und Cl⁻-Ionen ist für die Transportaktivität nicht essentiell.

Für die weiteren Mitglieder dieser Genfamilie, PAT3 und PAT4, wurden außer der Lokalisation von PAT3 (siehe 2.4 Lokalisation) bisher keine Daten zu Transportmechanismus, Substratspezifität oder Regulation erhoben.

2.4 Lokalisation

Zur Lokalisation der H⁺-gekoppelten Aminosäuretransporter PAT1 - 3 gibt es hauptsächlich Informationen auf mRNA-Ebene, die nicht zwingend die tatsächliche Situation auf der Protein-Ebene wiedergeben.

Die mRNA von PAT1 wurde in hohen Konzentrationen in Dünndarm, Kolon, Niere, Skelettmuskel und Gehirn und in niedrigeren Konzentrationen auch in Lunge, Leber und Milz nachgewiesen (Boll *et al.* 2002; Chen *et al.* 2003a). Spezifizierte Untersuchungen des humanen Gastrointestinaltraktes ergaben maximale mRNA-Konzentrationen in *Jejunum* (Leerdarm) und *Ileum* (Krummdarm) (Anderson *et al.* 2004). Im Gehirn wurde PAT1 primär lysosomal detektiert und ist dort am Export von Proteolyseprodukten beteiligt (Sagne *et al.* 2001). Die Lokalisation des Transportproteins in humanen Epithelzellen zeigten Chen und Mitarbeiter mittels Immunfluoreszenzstudien an intestinalen Caco-2-Zellen. hPAT1 ist dort ausschließlich in der apikalen Membran lokalisiert (Chen *et al.* 2003a). Funktionelle Untersuchungen an PAT1 erfolgten bisher alleinig in Caco-2-Zellen und heterologen Expressionssystemen wie PAT1-exprimierenden *Xenopus laevis* Oozyten bzw. HRPE-Zellen. Aufgrund dieser Daten kann man jedoch schlussfolgern, dass bereits Rajendran, Røigaard-Petersen und Thwaites PAT1 untersuchten (siehe 2.1 Historische Aspekte).

Die mRNA von mPAT2 wurde hauptsächlich in Herz, Lunge, Skelettmuskel und Niere und zu niedrigeren Anteilen in Hoden, Leber und Milz lokalisiert (Boll *et al.* 2002; Chen *et al.* 2003b). Im Gehirn wurde mPAT2-mRNA in neuronalen Zellen des Hirnstammes, Kleinhirnes und in Zellen des Vorderhornes des Rückenmarkes detektiert, wobei mPAT2 im Gegensatz zu mPAT1 nicht in der lysosomalen Membran, sondern im endoplasmatischen Retikulum und in Endosomen von Neuronen exprimiert ist (Rubio-Aliaga *et al.* 2004).

Für mPAT3 wurde eine gewebespezifische Lokalisation ausschließlich in den Testes adulter männlicher Mäuse gezeigt (Boll *et al.* 2003b).

2.5 Spezifität

Das zu PAT1 orthologe Aminosäuretransportsystem LYAAT1 transportiert GABA, Glycin, L-Prolin und L-Alanin mit Affinitätskonstanten im mikromolaren bzw. unteren millimolaren Bereich. Glutamin und Glutamat werden nicht akzeptiert. Eine Besonderheit der Substratspezifität von LYAAT1 ist die im Vergleich zu L-Prolin ähnlich hoch affine Interaktion von

D-Prolin (Sagne *et al.* 2001). Nach der Klonierung des PAT1 aus der Maus und der Expression in *Xenopus laevis* Oozyten wurde dessen Interaktion mit den 20 proteinogenen L-Aminosäuren und ausgewählten Derivaten untersucht. Dabei wurden starke Interaktionen ausschließlich mit kurzkettigen, unverzweigten Aminosäuren wie Glycin, L-Alanin, L-Prolin, β -Alanin und dem Neurotransmitter GABA festgestellt (Boll *et al.* 2002). Die Affinitätskonstanten liegen im millimolaren Bereich, z.B. 2,8 mM für L-Prolin und 7,5 mM für L-Alanin. Untersuchungen zur Stereoselektivität dieses Transportsystems zeigten, dass die D-Isomere von Alanin, Prolin und Serin mit gleicher bzw. höherer Affinität als deren L-Isomere mit mPAT1 interagierten.

Substratspezifitätsanalysen zum humanen PAT1 an Caco-2 Zellen ergaben ähnliche Profile: Starke Interaktionen zeigten Alanin, Prolin, Glycin und auch die Aminosäurederivate trans-4-Hydroxy-L-prolin (THLP), α -Aminoisobuttersäure (AIB) und GABA, geringe Interaktionen zeigten Valin, Threonin, Phenylalanin und Glutamin. Für MeAIB, einem klassischen System A-Substrat, konnte eine hohe Affinität zu hPAT1 ermittelt werden. Die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten (K_t) ergab Werte im millimolaren Bereich, z.B. 2,3 mM für Glycin, 2,0 mM für L-Prolin und 4,6 mM für GABA. Die Besonderheit der deutlichen Präferenz einiger D-Isomere im Vergleich zu den entsprechenden L-Isomeren wurde auch für hPAT1 nachgewiesen. Chen und Mitarbeiter untersuchten dieses Phänomen am Beispiel von Serin und Cystein und stellten 6- bis 7-fach höhere Affinitäten der korrespondierenden D-Isomere fest (Chen *et al.* 2003a). Eine erweiterte Studie zu strukturellen Voraussetzungen einer Substanz für die Interaktion mit PAT1 beinhaltete die Rolle der terminalen Kopfgruppen, partielle Variationen der Seitenketten und Einflüsse des Abstandes zwischen den funktionellen Kopfgruppen (Boll *et al.* 2003a). Folgende essentielle strukturelle Voraussetzungen für eine hoch affine PAT1-Interaktion wurden ermittelt: (i) eine aliphatische Seitenkette von L- α -Aminosäuren sollte aus höchstens einer CH₂-Einheit bestehen, (ii) der maximale Abstand zwischen der Amino- und Carboxylgruppe beträgt zwei CH₂-Einheiten und (iii) Methyl-Substitutionen werden nur an der Aminogruppe toleriert.

Daten zur Substratspezifität von PAT2 wurden bisher ausschließlich mittels elektrophysiologischer Messungen an mPAT2- bzw. rPAT2-exprimierenden *Xenopus laevis* Oozyten erhoben (Foltz *et al.* 2004; Kennedy *et al.* 2005). Wesentliche Unterschiede in der PAT2- Substraterkennung zu der von PAT1 sind: (i) die Substratspezifität ist limitierter, (ii) gemeinsame Substrate (Glycin, L-Prolin) interagieren mit viel höherer Affinität (5 - 10fach), (iii) für eine hohe Affinität sollte die Aminogruppe in α -Position sein und PAT2 interagiert hoch selektiv mit L-Aminosäuren. GABA ist kein PAT2-Substrat (Boll *et al.* 2002).

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 Charakterisierung des Prolintransportes an Caco-2-Zellen

Vgl. Anlage 7.1 (Metzner *et al.* 2004) und 7.2 (Metzner und Brandsch 2006)

Für Untersuchungen zum L-Prolintransport wurde die Aufnahme von L-[³H]Prolin als Referenzsubstrat in auf Gewebekulturschälchen kultivierten Caco-2-Zellen bestimmt. Die treibende Kraft für die apikale L-Prolinaufnahme in diese Zellen ist ein nach innen gerichteter H⁺-Gradient⁷. Fehlt dieser Gradient, ist die L-[³H]Prolinaufnahme um das 6fache vermindert. Die Abwesenheit von Na⁺-Ionen zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Gesamtaufnahme von Prolin (**Anlage 7.1**: Metzner *et al.* 2004). In Kompetitionsstudien wurde die L-[³H]Prolinaufnahme in der Ab- bzw. Anwesenheit von nicht radioaktiv markiertem L-Prolin untersucht. Die L-[³H]Prolinaufnahme wird durch unmarkiertes L-Prolin (10 mM) bei einem extrazellulären pH-Wert von 6,0 um 88% vermindert. Diese Substrathemmung ist unabhängig von Na⁺-Ionen. Die pH-abhängige Aufnahme via PAT1 konnte bestätigt werden, indem die Aufnahme von unmarkiertem L-Prolin (10 mM) bei den pH-Werten 6,0 und 7,5 in Caco-2-Zellen mittels HPLC-Analytik quantifiziert wurde. Im Vergleich zu pH 7,5 war die L-Prolinaufnahme bei pH 6,0 um 206% erhöht.

Die Michaelis-Menten-Konstante (K_t) dient als Maß für die Affinität eines Substrates zu einem Transportsystem. In Caco-2-Zellen wird L-Prolin via hPAT1 aktiv gegen einen Konzentrationsgradienten mit einem K_t-Wert von 2 mM transportiert und ca. 16fach akkumuliert. Diese Anreicherung ist mit einer maximalen Transportgeschwindigkeit (V_{max}) von 62 nmol/10 min pro mg Protein sättigbar (**Anlage 7.1**: Metzner *et al.* 2004).

Informationen über die transepitheliale Passage von Substanzen erhält man durch die Nutzung von Zellkultursystemen, in denen Zellen auf permeablen Polycarbonatmembraneinsätzen in Kammern (Transwell[®]-Kammer) kultiviert werden. Diese Polycarbonatmembran unterteilt die Kammer in Donor- (apikales Kompartiment) und Akzeptorkompartiment (basolaterales Kompartiment). Wird diese Technik für die Kultivierung von Caco-2-Zellen genutzt, entspricht das apikale Kompartiment der luminalen und das basolaterale Kompartiment der abluminalen Seite des Dünndarmepithels. An in Transwell[®]-Kammern kultivierten Caco-2-Zellen wurde der transepitheliale L-[³H]Prolinflux bestimmt. Der apikal nach basolateral gerichtete Flux (J_{a-b}), gemessen bei einem pH-Wert von 6,0 im Donor- und 7,5 im Akzeptor-

⁷Ein nach innen gerichteter H⁺-Gradient liegt bei Caco-2-Zellen dann vor, wenn der extrazelluläre pH-Wert unter 7,2 liegt, da der pH in diesen Zellen einen Wert zwischen 7,2 – 7,6 beträgt (Thwaites *et al.* 1993a).

kompartiment in der Anwesenheit von Na^+ -Ionen, ist mit 3,7 pmol/h pro Akzeptorkompartiment nicht signifikant verschieden von dem Flux gemessen in der Abwesenheit von Na^+ -Ionen, jedoch 4fach höher als der bei einem pH-Wert von 7,5 bestimmte Flux (0,8 pmol/h pro Akzeptorkompartiment). Auch die L-[^3H]Prolinaufnahme in die Zellen (J_{a-c}) ist unabhängig von Na^+ -Ionen bei einem extrazellulären pH-Wert von 6,0 jedoch 3fach höher als bei pH 7,5. Sowohl der transepitheliale L-[^3H]Prolinflux durch die Zellen als auch die L-[^3H]Prolinaufnahme in die Zellen konnte durch unmarkiertes L-Prolin stark reduziert werden. Der transepitheliale L-[^3H]Prolinflux von basolateraler nach apikaler Richtung (J_{b-a}) ist mit 0,3 pmol/h pro Akzeptorkompartiment 12fach niedriger als der Flux in apikaler nach basolateraler Richtung. Auch die basolaterale Aufnahme in die Zellen beträgt nur 17% der apikalen (**Anlage 7.1**: Metzner *et al.* 2004). Diese Studien zum transepithelialen Prolinflux J_{a-b} beweisen, dass der Prolintransport durch Caco-2-Zellen H^+ -abhängig, Na^+ -unabhängig, sättigbar sowie gerichtet stattfindet. In Caco-2-Zellen ist für den Prolintransport in J_{a-b} -Richtung nahezu ausschließlich die Aktivität von hPAT1 verantwortlich. Für die Anwesenheit eines mechanistisch von PAT1 verschieden funktionierenden Prolintransporters konnten in der apikalen Membran von Caco-2-Zellen unter den gegebenen experimentellen Bedingungen keine funktionellen Hinweise gefunden werden (siehe 3.5 Einordnung von PAT1 in den epithelialen Aminosäuretransport).

Einfluss von H^+ -Ionen auf die Transportparameter von hPAT1

Für den Cotransport von Aminosäuren und H^+ -Ionen via hPAT1 beträgt die Transportstöchiometrie 1:1 (Boll *et al.* 2002). Die Rolle des cotransportierten H^+ -Iones während des Transportes und dessen Einfluss auf die kinetischen Parameter wurden zunächst an mPAT1 exprimierenden *Xenopus laevis* Oozyten untersucht (siehe 2.3 Mechanismus; Foltz *et al.* 2005). In dieser Arbeit sollte der Einfluss von H^+ -Ionen auf die kinetischen Parameter, K_t und V_{max} , des hPAT1-vermittelten L-Prolintransportes an Caco-2-Zellen bestimmt werden. Für andere intestinale Transportsysteme, den Na^+ -Prolin-Cotransporter und den Folattransporter, wurde bereits die Aktivierung durch deren entsprechende cotransportierte Ionen gezeigt (Stevens und Wright 1987; Said und Mohammadkhani 1993). Diese geht mit der Erhöhung der Affinität ausgewählter Substrate an den Transportproteinen einher. Im Gegensatz dazu wurde für die H^+ -Peptid-Cotransporter PEPT1 und PEPT2 ermittelt, dass die Anwesenheit von H^+ -Ionen die maximale Transportgeschwindigkeit (V_{max}) dieser Systeme erhöht, ohne die Substrataffinität zu verändern (Ganapathy *et al.* 1984; Brandsch *et al.* 1997).

Die kinetischen Parameter des L-Prolintransportes wurden in der Anwesenheit (pH 6,0) und Abwesenheit (pH 7,5) eines nach innen gerichteten H^+ -Gradienten an Caco-2-Zellen bestimmt. Bei einem extrazellulären pH-Wert von 6,0 erfolgt der L-Prolintransport mit einem K_t -Wert von 1,8 mM und einer V_{max} von 89 nmol/10 min pro mg Protein. Ist dieser H^+ -Gradient nicht vorhanden (pH 7,5), wird K_t um das 12fache auf 22 mM erhöht, wobei V_{max} mit 71 nmol/10 min pro mg Protein nicht signifikant verändert ist (**Anlage 7.2:** Metzner und Brandsch 2006). Die linearisierte Auftragung der Daten im Eadie-Hofstee-Diagramm bestätigte die Aussagen aus der Sättigungshyperbel. Demnach stimulieren H^+ -Ionen den L-Prolintransport, indem sie die Substrataffinität erhöhen ohne die maximale Transportgeschwindigkeit zu beeinflussen. Ladungseffekte durch die verschiedenen pH-Werte können ausgeschlossen werden, da L-Prolin bei beiden pH-Werten $> 99,9\%$ zwitterionisch vorliegt.

Diese Studie beinhaltet des Weiteren die Untersuchung des Effektes von H^+ -Ionen auf die Affinitätskonstanten (K_i) ausgewählter hPAT1-Substrate. Dazu wurden die Affinitätskonstanten von L-Azetidin-2-carbonsäure (LACA), GABA und MeAIB ebenfalls bei den extrazellulären pH-Werten 6,0 und 7,5 bestimmt. Bei einem pH-Wert von 6,0 ist die L-[3H]Prolinaufnahme mit 785 fmol/10 min pro mg Protein verglichen mit 121 fmol/10 min pro mg Protein bei 7,5 um mehr als das 6fache erhöht (**Anlage 7.2:** Metzner und Brandsch 2006). Die Affinitätskonstanten wurden aus Kompetitionskurven, erstellt in Anwesenheit steigender Konzentrationen des jeweiligen Substrates, abgeleitet. Daraus ergaben sich bei pH 6,0 für LACA, GABA und MeAIB K_i -Werte von 1,3 mM, 2,1 mM und 3,4 mM. Bei pH 7,5 sank der inhibitorische Einfluss und damit die Affinität dieser Substrate drastisch und die K_i -Werte waren dementsprechend auf ≈ 20 mM, ≈ 22 mM und ≈ 29 mM erhöht. Diese Ergebnisse bestätigen den Effekt von H^+ -Ionen auf die Substrataffinität an hPAT1 eindeutig.

3.2 Relevanz konservierter Histidinreste in hPAT1

Vgl. Anlage 7.2 (Metzner und Brandsch 2006) und 7.5 (Metzner *et al.* 2007 eingereicht)

Für H^+ -gekoppelte Transportsysteme ist bekannt, dass hauptsächlich Histidinreste in der Bindung und Translokation von H^+ -Ionen involviert sind. Transportsysteme, bei denen die für die katalytische Aktivität essentiellen Histidinreste schon genauer untersucht wurden, sind z.B. der Na^+/H^+ -Austauscher in der Plazenta (Ganapathy *et al.* 1987) und der organische Kationen- H^+ -Antiporter (Hori *et al.* 1989).

Die H^+ -Akzeptor- bzw. Donorfunktion von Histidinresten im Transportprotein kann durch Diethylpyrocarbonat (DEPC) mittels einer Acetylierungsreaktion inhibiert werden

(Miles 1977). Für die Peptidtransporter PEPT1 und PEPT2 konnte gezeigt werden, dass die Blockade von Histidinresten zu einer Erhöhung von V_{\max} führt, ohne K_t zu beeinflussen (Brandsch *et al.* 1997). Der renale Na^+/H^+ -Austauscher arbeitet nach DEPC-Behandlung mit verminderter V_{\max} und unbeeinflusstem K_t (Grillo und Aronson 1986). Ein kombinierter Effekt konnte für den intestinalen Folattransporter festgestellt werden, bei dem nach DEPC-Behandlung V_{\max} vermindert und K_t erhöht war (Said und Mohammadkhani 1993).

Um die Rolle von Histidinresten während des H^+ -Aminosäuresymportes via hPAT1 aufzuklären, wurde in dieser Arbeit zunächst der Einfluss von DEPC auf die kinetischen Parameter der L-Prolinaufnahme in Caco-2-Zellen bestimmt. Die Messung der L-Prolinaufnahme erfolgte bei pH 6,0 nach Inkubation der Zellen mit Puffer bei pH 7,5 als Kontrolle bzw. nach einer 10minütigen Inkubation mit DEPC. Ohne DEPC-Behandlung beträgt der K_t -Wert des Prolintransportes 2,3 mM und der V_{\max} -Wert 109 fmol/10 min pro mg Protein. Nach DEPC-Behandlung ist der K_t -Wert fast um das Doppelte auf 4 mM erhöht, wobei V_{\max} mit 108 fmol/10 min pro mg Protein unverändert bleibt (**Anlage 7.2:** Metzner und Brandsch 2006). Dieser Effekt auf die Substrataffinität an hPAT1 konnte in der Eadie-Hofstee-Darstellung bestätigt werden.

Ähnlich den beschriebenen Experimenten zum Einfluss der H^+ -Ionen auf die Affinitäten ausgewählter Substanzen (siehe 3.1 Charakterisierung des Prolintransportes an Caco-2-Zellen) wurde der Effekt der DEPC-Inkubation (nahe dessen IC_{50}) auf die Affinitätskonstanten der PAT1-Substrate LACA, GABA und MeAIB bestimmt. Die K_t -Werte betragen ohne DEPC-Behandlung 2,6 mM für LACA, 2,8 mM für GABA und 5,7 mM für MeAIB und waren nach DEPC-Inkubation um ca. das 1,5fache entsprechend auf 3,6 mM, 3,7 mM und 7,1 mM erhöht.

Die Blockade der Histidinreste durch DEPC beeinflusst demnach die kinetischen Parameter auf die gleiche Weise wie das Fehlen des nach innen gerichteten H^+ -Gradienten. Die Substrataffinität zu hPAT1 wird vermindert, wohingegen die maximale Transportgeschwindigkeit unbeeinflusst bleibt. Der Einfluss von DEPC ist in seiner Charakteristik und seiner Potenz mit dem von H^+ -Ionen vergleichbar. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind ein starkes Indiz, wenn auch kein Beweis, für die Beteiligung von Histidinresten an der Bindung und Translokation von H^+ -Ionen während des H^+ -Aminosäuresymportes über hPAT1.

Mutagenese ausgewählter Histidinreste

Das hPAT1-Protein besteht aus 476 Aminosäuren, welche in TMD in der Zytoplasmamembran organisiert sind. Im gesamten hPAT1-Protein befinden sich 10 Histidinreste. Es existieren zwei TMD-Topologie-Modelle, die eine intrazelluläre Lokalisation des N-Terminus und die extrazelluläre Lokalisation des C-Terminus vorschlagen (Boll *et al.* 2002; Chen *et al.* 2003a). Folgt man den Theorien, die eine Organisation des Proteins in 11 TMD vorschlagen (Boll *et al.* 2002; eigenes Modell in Abbildung 1), befinden sich zwei Histidinreste innerhalb der Membran, vier in der zweiten intrazellulären Schleife und vier in extrazellulären Schleifen. Drei Histidinreste sind innerhalb der SLC36-Familie und innerhalb der Spezies Mensch, Kaninchen, Ratte und Maus konserviert: His-55, His-93 und His-135. His-55 befindet sich in der ersten TMD, His-93 in der zweiten TMD, wohingegen His-135 in der zweiten zytoplasmatischen Schleife lokalisiert ist (Abbildung 1).

Um die für den H⁺-Aminosäuresymport essentiellen Histidinreste zu identifizieren, wurden in dieser Arbeit ortsspezifische Mutagenesestudien an hPAT1 durchgeführt (**Anlage 7.3:** Metzner *et al.* 2007 eingereicht). Mittels solcher Untersuchungen wurden bereits für die H⁺-Peptidsymporter PEPT1 und PEPT2 die Histidinreste His-57 bzw. His-87 als essentiell für deren katalytische Funktion identifiziert (Fei *et al.* 1997). Für den erst kürzlich klonierten Transporter MATE1 (*multidrug and toxin extrusion*; Tsuda *et al.* 2007), einen H⁺-organische Kationen-Antiporter, für den ein entgegengesetzter, nach außen gerichteter H⁺-Gradient die treibende Kraft ist, wurde durch Mutagenesestudien und anschließende Transportuntersuchungen kürzlich gezeigt, dass His-385 im rMATE1-Protein für dessen Transportaktivität essentiell ist (Asaka *et al.* 2007).

Die konservierten Histidinreste (H), His-55, His-93 und His-135, wurden in hPAT1 durch Alanin (A) bzw. Asparagin (N) substituiert. Alanin wurde aufgrund seiner stark von Histidin divergenten Eigenschaften gewählt, wohingegen durch die Substitution durch Asparagin lokale strukturelle Veränderungen bzw. Störungen weitestgehend verringert werden sollten. Für die heterologe Expression der cDNA von hPAT1 bzw. der entsprechenden Mutanten wurde das Vaccinia-Virus-Expressionssystem in HRPE-Zellen angewandt. Nach der transienten Transfektion der Zellen mit hPAT-cDNA erfolgte die funktionelle Charakterisierung des Transportproteins. Auch in diesem System ist der Transport von Aminosäuren über hPAT1 stark durch einen in die Zelle gerichteten H⁺-Gradienten stimuliert und verläuft unabhängig von der Anwesenheit von Na⁺-Ionen. Die L-[³H]Prolinaufnahme erfolgt mit

einem K_t -Wert von 1,2 mM und ist mit einer V_{\max} von 68 nmol/10 min pro mg Protein sättigbar. Diese Daten entsprechen den an Caco-2-Zellen ermittelten Ergebnissen. Die Funktionalität des heterolog exprimierten hPAT1 konnte somit bestätigt werden.

Nach der Bestimmung der Transportcharakteristika von hPAT1 erfolgte die Untersuchung der Funktion der erzeugten Histidinmutanten H55A, H55N, H93A, H93N, H135A, H135N und der Doppelmutanten H55A/H93A und H55N/H93N nach transienter Transfektion in HRPE-Zellen. Die Substitution von His-55 durch Alanin oder Asparagin (H55A, H55N) resultierte in einem vollständigen Verlust der Aktivität. Keine der Mutanten zeigte eine spezifische L-[³H]Prolinaufnahme. Bei den Mutanten des His-93 war auffällig, dass im Gegensatz zum starken Effekt der Substitution durch Alanin (H93A) die Substitution durch Asparagin (H93N) kaum Einfluss auf die Transportaktivität hatte (**Anlage 7.3:** Metzner *et al.* 2007 *eingereicht*). Diese Ergebnisse deuten auf die starke Involvierung des His-55 während des H⁺-Aminosäuresymportes via hPAT1 hin, wohingegen His-93 nicht für die Bindung bzw. Translokation des H⁺-Ions essentiell zu sein scheint. Wie erwartet zeigten beide Doppelmutanten (H55A/H93A, H55N/H93N) keine Aktivität mehr. Die L-[³H]Prolinaufnahmeuntersuchungen an den Mutanten des in der zweiten intrazellulären Schleife lokalisierten His-135 (H135A, H135N) ergaben Aufnahmeleistungen, die der des unveränderten hPAT1-Proteins (Wildtyp) entsprachen (**Anlage 7.3:** Metzner *et al.* 2007 *eingereicht*).

Die verminderte bzw. kaum messbare Transportaktivität der His-Mutanten ist möglicherweise durch sterische Veränderungen im Protein, verändertes *trafficking* des mutierten Proteins innerhalb der Zelle oder eine nicht-korrekte Insertion des Proteins durch mutationsbedingte Falschfaltung bedingt. Um die Insertion der Proteine in die Membran der transfizierten HRPE-Zellen zu überprüfen, wurde ein Biotinylierungsassay zur Isolation von Zelloberflächenproteinen, die mit anschließender Western Blot Methode detektiert wurden, etabliert. Unter Verwendung eines spezifischen, gegen eine 15 Aminosäuren lange Sequenz im hPAT1-Protein gerichteten, Antikörpers erfolgte die Detektion von hPAT1 bzw. der entsprechenden Mutanten. Überraschenderweise wurde hPAT1 nicht ausschließlich in Caco-2-Zellen, die als Positivkontrolle dienten, und in mit hPAT1 cDNA transfizierten Zellen nachgewiesen, sondern auch in nicht-transfizierten (NT) und in mit dem Leervektor (pSPORT1) transfizierten Zellen. Funktionell wurde PAT1 in diesen Zellen nicht gefunden. Dieses Ergebnis machte die selektive Untersuchung der Expression von hPAT1 und den Histidinmutanten in der Zellmembran dieser Zellen unmöglich. Zur Umgehung des Problems der offensichtlich konstitutiven Expression von hPAT1 oder sehr verwandter antigener Proteine in HRPE-Zellen erfolgte die Kopplung eines Hämagglutinin(HA)-Epitopes (Tyr-Pro-

Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala) an den N-Terminus des hPAT1-Proteins und die Nutzung eines spezifischen monoklonalen anti-HA-Tag-selektiven Antikörpers. Zunächst wurden der Mechanismus und die Transportparameter von HA-hPAT1 in cDNA-transfizierten HRPE-Zellen bestimmt und die Ergebnisse mit denen von hPAT1 verglichen. Auch via HA-hPAT1 verläuft der Aminosäuretransport angeregt durch einen nach innen gerichteten H^+ -Gradienten, unabhängig von der Anwesenheit von Na^+ -Ionen mit einem K_t -Wert von 1,1 mM und einer V_{max} von 51 nmol/10 min pro mg Protein (**Anlage 7.3**: Metzner *et al.* 2007 eingereicht). Um Effekte des HA-Tags auf funktionelle Parameter eindeutig auszuschließen, wurde ein ausgewähltes Substratspezifitätsprofil von hPAT1 und HA-hPAT1 erstellt. Es konnten keine Unterschiede in der Substrat- bzw. Inhibitorinteraktion zwischen hPAT1 und HA-hPAT1 festgestellt werden. Daraufhin erfolgten auch an HA-hPAT1 die Mutagenesen der konservierten Histidinreste. Die generierten Mutanten erhielten folgende Bezeichnungen: HA-H55A, HA-H55N, HA-H93A, HA-H93N, HA-H135A, HA-H135N, HA-H55A/H93A und HA-H55N/H93N. Die funktionelle Untersuchung der Mutanten an cDNA-transfizierten HRPE-Zellen ergab ein L-[3H]Prolinaufnahmeprofil, das dem der hPAT1-Histidinmutanten entsprach. Die Substitution des His-55 durch Alanin bzw. Asparagin resultierte in einem absoluten Verlust der Transportfunktion, ebenso bei der Mutante HA-H93A und den Doppelmutanten HA-H55A/H93A und HA-H55N/H93N. Die Transportaktivität von HA-H93N, HA-H135A und HA-H135N blieb im Vergleich zu der von HA-hPAT1 nahezu unverändert.

Anschließende Western Blot Analytik biotinylierter Zelloberflächenproteine, aus mit HA-hPAT1-cDNA bzw. HA-Mutanten-cDNA transfizierten Zellen, zeigte eindeutig die membranständige Lokalisation von HA-hPAT1 und der generierten Histidinmutanten. Immunfluoreszenzstudien mittels geeigneter Antikörper an transfizierten und untransfizierten HRPE-Zellen bestätigten die Ergebnisse aus dem Biotinylierungsassay und damit die Membranständigkeit der Transportproteine.

Diese Studie stellte die erste Mutationsanalyse innerhalb der Genfamilie der H^+ -gekoppelten Aminosäuretransporter dar. Es konnte gezeigt werden, dass der Histidinrest 55 für die Transportaktivität von hPAT1 zwingend notwendig ist. Da der Funktionsverlust der generierten His-55-Mutanten nicht auf geringerer Expression des Proteins bzw. auf dessen verminderter Insertion in die Zellmembran basierte, kann geschlussfolgert werden, dass His-55 an der Bindung und Translokation des H^+ -Iones während des Transportvorganges beteiligt ist.

Wie bereits erwähnt, wurden für das PAT1-Protein in Publikationen verschiedener Arbeitsgruppen zwei TMD-Modelle vorgestellt. Die Theorie von Boll und Mitarbeitern

schlägt die Organisation von mPAT1 in 11 TMD vor (Boll *et al.* 2002), wohingegen die Arbeitsgruppe von Ganapathy für hPAT1 ein TMD-Modell mit 9 TMD präferiert (Chen *et al.* 2003a). Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen indirekt ein 11 TMD-Modell (Abbildung 1), da in diesem Modell His-55 innerhalb einer Transmembrandomäne lokalisiert ist, was für die H⁺-Bindungs- und Translokationsfunktion dieses Restes essentiell zu sein scheint.

Neben den Histidinresten His-55, His-93 und His-135 sind in PAT1 innerhalb der Spezies Mensch, Schimpanse, Kaninchen, Ratte und Maus fünf weitere Histidinreste konserviert (His-12, His-103, His-104, His-137, His-248), für die eine Beteiligung während der H⁺-Bindung und Translokation nicht ausgeschlossen werden kann.

3.3 Physiologische und pharmazeutisch-relevante Substrate

Vgl. Anlagen 7.1 (Metzner *et al.* 2004) und 7.5 (Metzner *et al.* 2006)

Die primären, natürlichen Substrate für PAT1 sind kleine unverzweigte, neutrale Amino- und Iminosäuren wie Glycin, L-Alanin und L-Prolin (siehe 2.5 Spezifität; Thwaites *et al.* 1993a, 1994; Boll *et al.* 2003a; Chen *et al.* 2003a). Dieses Kapitel beinhaltet Studien zur systematischen Analyse struktureller Anforderungen an physiologische hPAT1-Substrate und Untersuchungen zur Interaktion mit pharmazeutisch-relevanten Substraten.

In Kompetitionsassays an Caco-2-Zellen wurde die Interaktion verschiedenster Substanzen mit hPAT1 bestimmt. Aus den jeweilig resultierenden Kompetitionskurven wurde der K_i-Wert ermittelt, der ein carrier- und substratspezifisches Maß für die Affinität eines Substrates zu einem Transporter ist. Die Einteilung von hPAT1-Substraten in drei Affinitätsbereiche erwies sich als praktikabel und ist in Tabelle 2 dargestellt. Substrate mit Affinitätskonstanten kleiner als 5 mM, wie z.B. L- und D-Prolin, D-Pipecolinsäure, β-Alanin und GABA sind hoch affine hPAT1-Substrate. Glycin, L-Thiaprolin, Taurin⁸ und L-Pipecolinsäure (Homoprolin) sind mit Affinitätskonstanten zwischen 5 und 15 mM Substrate mittlerer Affinität. Geringe Interaktion mit hPAT1, d.h. K_i-Werte > 15 mM, zeigten D-Alanin und die GABA-Derivate α-Aminobuttersäure und L-2-Aminobuttersäure. Da man bei der Anwendung des beschriebenen Kompetitionsassays lediglich Informationen über die Interaktion einer Substanz mit dem Transportprotein, nicht aber über deren tatsächlichen Transport erhält, ist die Anwendung weiterer experimenteller Methoden zur Identifizierung wirklich transportierter Substrate erforderlich. In den vorliegenden Arbeiten zu PAT1 wurden

⁸Da PAT1 Taurin transportiert entsteht die zu klärende Frage nach der Relation von PAT1 und dem eigentlichen Taurintransporter TAUT1 (Tabelle 5) am intestinalen Taurintransport (Brandsch *et al.* 1995).

die Methoden der nicht-radioaktiven Analytik mittels HPLC, die Nutzung eines Membranpotentialassays⁹ und elektrophysiologische Messungen an mPAT1-exprimierenden *Xenopus laevis* Oozyten zur Aufklärung echter Transportmechanismen genutzt. Aus den Daten (Tabelle 2, **Anlage 7.1**: Metzner *et al.* 2004, **Anlage 7.5**: Metzner *et al.* 2006) ergeben sich folgende Erkenntnisse zu den strukturellen Anforderungen an hPAT1-Substrate: Für eine hohe Affinität zu PAT1 ist eine freie Iminogruppe oder eine quarternäre Aminogruppe mit einem Maximalabstand von drei Methylenheiten zu einer unsubstituierten negativ geladenen Carboxylgruppe essentiell (**Anlage 7.5**: Metzner *et al.* 2006). Daher interagieren nicht nur α -Aminosäuren, sondern auch β -Alanin und GABA mit PAT1 (Thwaites *et al.* 1993a, b, 2000; Boll *et al.* 2003a; **Anlage 7.1**: Metzner *et al.* 2004).

Tabelle 2. **Klassifizierung von Affinitätskonstanten von hPAT1-Substraten an Caco-2-Zellen** (* eigene unveröffentlichte Daten)

Klassifizierung	Substrat	K _i bzw. K _t (mM)	Referenz
< 5 mM hohe Affinität	D-Prolin	1,2 ± 0,3	Anlage 7.1
	L-Prolin	1,6 ± 0,1	Anlage 7.1
	Sarkosin	1,9 ± 0,1	Anlage 7.5
	Betain	1,9 ± 0,3	Anlage 7.5
	N-Methyl-L-alanin	2,2 ± 0,1	Anlage 7.1
	β -Alanin	2,4 ± 0,5	Anlage 7.5
	D-Pipecolinsäure	2,5 ± 1,1	Anlage 7.5
	L-Alanin	2,8 ± 0,3	Anlage 7.5
	cis-4-Hydroxy-D-prolin	3,3 ± 0,2	Anlage 7.1
	GABA	4,0 ± 0,3	Anlage 7.1
5 – 15 mM mittlere Affinität	Glycin	5,1 ± 0,9	Anlage 7.1
	Kreatin	7,7 ± 0,4*	
	Taurin	7,8 ± 0,7	Anlage 7.5
	L-Thiaprolin	7,9 ± 0,7	Anlage 7.1
	THLP	9,0 ± 0,9	Anlage 7.1
	L-Pipecolinsäure	11 ± 3	Anlage 7.5
> 15 mM niedrige Affinität	α -Aminobuttersäure	23 ± 5	Anlage 7.1
	D, L-Homocystein	≈ 28*	
	L-2-Aminobuttersäure	> 30	Anlage 7.1

Ebenfalls hoch affine PAT1-Substrate sind die Osmolyte Betain und Sarkosin (**Anlage 7.5**: Metzner *et al.* 2006). Kreatin, ein N-Amidinosarkosin, ist mit einer Affinitätskonstante von

⁹Die Etablierung eines Membranpotentialassays für Untersuchungen an PAT1 war möglich, da der Transport von Aminosäuren in Symport mit einem H⁺-Ion erfolgt und somit eine Änderung des Membranpotentials bewirkt. Dieser elektrogene Transportmechanismus wird bei dem Assay genutzt, indem Zellen mit einem membranpotential-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff inkubiert werden und die Änderung der Fluoreszenzintensität dieses Farbstoffes nach der Zugabe ausgewählter Substanzen bestimmt wird (Faria *et al.* 2004). Das L-prolinvermittelte Signal entspricht 100%.

7,7 mM ein PAT1-Substrat mittlerer Affinität, wobei dessen Anhydrid Kreatinin die L-[³H]Prolinaufnahme nur auf 79% hemmt und somit als „Nicht-Substrat“ eingestuft wird. Aminosäuren, in deren Seitenkette sich eine SH-Gruppe befindet, z.B. Cystein und Homocystein, sind keine PAT1-Substrate (**Anlage 7.5:** Metzner *et al.* 2006). Ist die Carboxylgruppe durch eine Sulfonylgruppe substituiert, wie z.B. bei β -Alanin zu Taurin, so wird dies mit einem nur geringen Affinitätsverlust toleriert (Tabelle 2, **Anlage 7.1:** Metzner *et al.* 2004).

Betrachtet man die Interaktion von L-Prolin und L-Prolinestern mit PAT1, wird eine starke Affinitätsminderung durch die Veresterung der Carboxylgruppe deutlich (**Anlage 7.5:** Metzner *et al.* 2006). PAT1 akzeptiert des Weiteren Prolinderivate, deren Grundstruktur ein 4-, 5-, bzw. 6-gliedriger Ring zugrunde liegt. Ist dieser Ring decarboxyliert, erfolgt keine Interaktion mit dem Transportprotein. Beispiele hierfür sind die Decarboxylierungsprodukte Pyrrolidin und Piperidin der entsprechenden PAT1-Substrate L-Prolin und L-Pipecolinsäure. Wird ein weiteres Heteroatom, z.B. ein Schwefelatom, in das Prolingrundgerüst eingefügt, entsteht das etwas niedriger affine Derivat Thiaprolin (**Anlage 7.1:** Metzner *et al.* 2004, **Anlage 7.5:** Metzner *et al.* 2006). Beispiele für die nur teilweise vorhandene Stereoselektivität von hPAT1 sind in Tabelle 2 gezeigt. In den meisten Fällen interagiert das D-Isomer der entsprechenden Aminosäure mit höherer Affinität mit hPAT1.

Weiterhin konnte an Caco-2-Zellen gezeigt werden, dass L-Prolin und Glycin über ein und dasselbe Transportsystem, hPAT1, transportiert werden (ABC-Test). Glycin und L-Prolin inhibieren die L-[³H]Prolinaufnahme mit Affinitätskonstanten von 1,6 bzw. 5,1 mM. Gegenüber der [³H]Glycinaufnahme zeigte Glycin eine Affinität von 9,2 mM und L-Prolin von 2,2 mM. Da die Affinitäten ausgewählter Substanzen wie D-Prolin, cis-4-Hydroxy-D-prolin (CHDP) und N-Methylalanin gegenüber den beiden radioaktiv-markierten Referenzsubstraten jeweils gleiche Werte ergaben, konnte auch darauf geschlossen werden, dass alle diese Substanzen über PAT1 aufgenommen werden (**Anlage 7.1:** Metzner *et al.* 2004).

Zusammenfassend führten die Untersuchungen zur Interaktion von 87 Substanzen mit PAT1 zu folgenden Schlussfolgerungen hinsichtlich struktureller Voraussetzungen an Substrate (**Anlage 7.5:** Metzner *et al.* 2006):

- Der Transporter bevorzugt kleine, unverzweigte, neutrale Aminosäuren.
- PAT1 differenziert nicht zwischen L- und D-Isomeren bestimmter Aminosäuren und akzeptiert häufig das entsprechende D-Isomer mit höherer Affinität.

- Prolinderivate mit 4-, 5-, bzw. 6-gliedrigen Ringsystemen interagieren mit hoher Affinität.
- Das Einfügen eines Schwefelatoms in heterozyklische Ringsysteme mindert die Affinität zu PAT1 nicht.
- Eine freie Iminogruppe oder eine quarternäre Aminogruppe ist für eine hohe Affinität essentiell und wird vor einer freien Aminogruppe bevorzugt. ω -Aminosäuren, bei denen bis zu drei Methylengruppen zwischen den funktionellen Gruppen stehen, werden gut toleriert.
- Eine freie negativ geladene Carboxylgruppe ist essentiell und sollte bevorzugt in α -Position zu der Imino- oder Aminogruppe stehen. Die Substitution der Carboxylgruppe durch eine Sulfonylgruppe ist möglich.
- L-Tryptophan und andere heterozyklische Substanzen mit einem Indolgrundgerüst werden mit hoher Affinität von PAT1 erkannt.

Keine Interaktion mit PAT1 wurde für die proteinogenen Aminosäuren Valin, Norvalin, Leucin, Isoleucin, Tyrosin, Phenylalanin, Methionin, Glutamin, Asparagin, Histidin, Arginin, Lysin, Asparaginsäure und Glutaminsäure festgestellt.

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Untersuchung des Transportes pharmazeutisch-relevanter Aminosäuren und Derivate. PAT1 ist aufgrund seiner breiten Substratspezifität und seiner hohen Transportkapazität ein vielversprechender Kandidat für die intestinale Wirkstoff-freisetzung. Pharmazeutisch relevante PAT1-Substrate und deren Wirkung bzw. pharmazeuti-scher Einsatz sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

cis-4-Hydroxy-L-prolin (CHLP), 3,4-Dehydro-D,L-prolin und L-Azetidin-2-carbonsäure (LACA) werden in der Therapie von fibrotischen Erkrankungen angewandt. Die Strukturformeln dieser Prolinderivate sind in Abbildung 3 dargestellt.

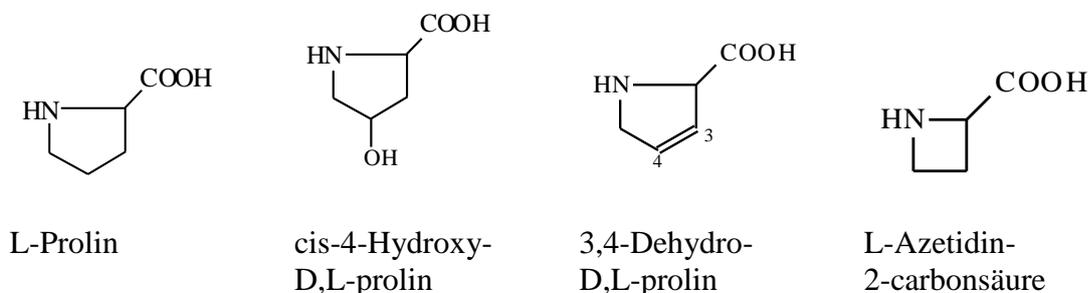


Abbildung 3. **Strukturformeln pharmazeutisch-relevanter Prolinderivate**

Tabelle 3. Pharmazeutisch-relevante PAT1-Substrate

Substrat	K_i (mM)	Pharmazeutische Wirkung bzw. therapeutischer Einsatz
L-Azetidin-2-carbonsäure	$1,8 \pm 0,1$	Inhibitor der Kollagenbiosynthese
3,4-Dehydro-D,L-prolin	$5,3 \pm 0,8$	- “ -
3,4-Dehydro-L-prolin	$6,2 \pm 0,1$	- “ -
cis-4-Hydroxy-L-prolin	30 ± 4	- “ -
GABA	$4,0 \pm 0,3$	Neurotransmitter
3-Amino-1-propansulfonsäure	$7,1 \pm 0,6$	GABA-Agonist
Vigabatrin	$4,8 \pm 0,2$	GABA-Agonist/Antikonvulsivum
Gabapentin	> 30	- “ -
Guvacin	$2,2 \pm 0,3$	GABA-Agonist
Isoguvacin	$5,8 \pm 0,1$	- “ -
Nipecotinsäure	$2,7 \pm 0,3$	- “ -
Isonipecotinsäure	$2,3 \pm 0,2$	- “ -
γ -Hydroxybuttersäure	> 30	Narkoleptikum/“ <i>liquid extasy</i> ”
D-Cycloserin	$4,4 \pm 0,2$	Antibiotikum

In die vermehrte maligne Bildung von Kollagen kann auf der Vorstufe des Prokollagens, einer prolin- und lysinreichen Polypeptidvorstufe des Kollagens, durch Hemmung der Hydroxylierung der L-Prolin- und L-Lysinreste oder direkt in der Synthese des Prokollagens eingegriffen werden, indem z.B. Prolinderivate inseriert werden (Takeuchi und Prockop 1969). Die Anwesenheit von CHLP, 3,4-Dehydro-D,L-prolin oder LACA während der Synthese des Prokollagens resultiert in einer abnormen Kollagensynthese. Dieses Kollagen ist nicht in der Lage, die für das fibrilläre Kollagen typische tripel-helikale Struktur auszubilden, und es konnte gezeigt werden, dass es nicht in die extrazelluläre Matrix sezerniert wird (Tan *et al.* 1983). Es kommt zu einer intrazellulären Akkumulation des abnorm gefalteten Kollagens, welche zur Elimination von Zelltypen führt, die eine starke Proliferationsrate aufweisen (Rosenbloom und Prockop 1971; Uitto *et al.* 1975). Die Verhinderung der helikalen Prokollagenbildung auf posttranslatonaler Stufe durch CHLP, LACA und 3,4-Dehydro-D,L-prolin (Tan *et al.* 1983; Uitto *et al.* 1984; Walmsley *et al.* 1999) bedingt deren Einsatz als potentielle Arzneistoffe in der Therapie von Erkrankungen, die die Akkumulation von Kollagen als Hauptsymptom (pulmonale Fibrose, Leberzirrhose, dermale Fibrose, systemische Sklerose, hypertrophe Narben und andere) aufzeigen (Klohs *et al.* 1985; Poiani *et al.* 1992, 1994; Yoo *et al.* 1997).

L-Prolin und die in Abbildung 3 gezeigten Derivate interagieren mit PAT1 mit unterschiedlichen Affinitäten (Tabelle 3). LACA ist ein hoch-affines Substrat mit einem K_i -Wert von 1,8 mM, wohingegen 3,4-Dehydro-L-prolin mit einem K_i -Wert von 6,2 mM ein Substrat

mittlerer Affinität ist. (**Anlage 7.1:** Metzner *et al.* 2004). Wie erwartet erzeugten diese Substanzen im Membranpotentialassay Signale, die dem L-prolinvermittelten entsprachen (**Anlage 7.5:** Metzner *et al.* 2006). CHLP interagiert mit niedriger Affinität (30 mM) mit PAT1, jedoch beträgt die empfohlene orale Dosis zu Erlangung therapeutisch relevanter Blutspiegel 0,05 – 0,2 g/kg Körpergewicht/Tag (Hoerrmann 1986, 2000). Bei einer (bereits getesteten) zweimaligen täglichen oralen Applikation von 3,5 g für einen Erwachsenen ist eine luminal Konzentration von 30 mM gut vorstellbar (**Anlage 7.1:** Metzner *et al.* 2004).

Bei der Untersuchung des transepithelialen L-[³H]Prolinfluxes (J_{a-b}) und der L-[³H]Prolinaufnahme in die Zellen (J_{a-c}) in Anwesenheit von CHLP, CHDP und LACA (30 mM) hemmten diese Substanzen sowohl den Flux als auch die Aufnahme in die Zellen in der Reihenfolge, die der ihrer Affinitätskonstanten entspricht. Das hoch affine PAT1-Substrat LACA hemmte den Flux und die Aufnahme von L-[³H]Prolin stärker als das sehr niedrig affine CHLP. Für diese zwei Substanzen wurde weiterhin mittels nicht-radioaktiver HPLC-Analytik eine Erhöhung der Akkumulation in auf Gewebekulturschälchen kultivierten Caco-2-Zellen bei einem extrazellulären pH-Wert von 6,0 um 236% bzw. 214% im Vergleich zu einem extrazellulären pH-Wert von 7,5 nachgewiesen (**Anlage 7.1:** Metzner *et al.* 2004). Dies zeigt, dass CHLP und LACA nicht nur mit PAT1 interagieren, sondern aktiv in die Zellen transportiert werden. Der aktive Transport von L-Prolin, D-Prolin, CHLP, CHDP und LACA wurde in Fluxstudien an Caco-2-Zellen bestimmt und mittels HPLC-Analytik ausgewertet. Die Reihenfolge der ermittelten transepithelialen Fluxraten (J_{a-b}) der Aminosäuren und Substrate war mit der ihrer Affinitätskonstanten (K_i) vergleichbar (**Anlage 7.1:** Metzner *et al.* 2004). Das hoch affine PAT1-Substrat L-Prolin zeigte die höchste Fluxrate, gefolgt von LACA, CHDP, D-Prolin und CHLP. Die Reihenfolge der Akkumulationsmenge in den Caco-2-Zellen (J_{a-c}) war CHDP > D-Prolin = CHLP > LACA > L-Prolin und korrelierte nicht mit den entsprechenden Affinitätskonstanten, was auf eine entscheidende Beteiligung basolateraler Transportsysteme hinweist (siehe 3.5 Einordnung von PAT1 in den epithelialen Aminosäuretransport).

GABA wird endogen aus der Decarboxylierung von Glutaminsäure mittels Glutaminsäure-Decarboxylase (GAD65; GAD67) synthetisiert und ist der primäre inhibitorische Neurotransmitter im zentralen Nervensystem. GABAerge Effekte resultieren aus der Stimulation der ligandenkontrollierten Chloridkanal-Rezeptoren GABA_A, GABA_C und dem G-Protein gekoppelten Rezeptor GABA_B. Die GABAerge Neurotransmission wird beendet durch die schnelle Aufnahme des Neurotransmitters aus dem synaptischen Spalt in Neuronen und Gliazellen über spezifische hoch affine Na⁺/Cl⁻-abhängige GABA-Transporter, GAT1-3 (SLC6)

(Conti *et al.* 2004; Christiansen *et al.* 2007). Der GABA-Abbau erfolgt in der Zelle sowie im synaptischen Spalt durch GABA-Transaminasen zu Succinatsemialdehyd (Wong *et al.* 2003). Ein Anteil der GABA-Transporter an Krankheitsbildern wie Epilepsie und Ischämie, die durch Missverhältnisse in Neurotransmitterkonzentrationen bzw. die Dysregulation neuronaler Erregbarkeit bedingt sind, ist wahrscheinlich (Conti *et al.* 2004). In Caco-2-Zellen inhibiert GABA als hoch-affines PAT1-Substrat die L-[³H]Prolinaufnahme um 83% und interagiert mit hPAT1 mit einem K_i-Wert von 4 mM (Tabelle 3). Die elektrogene Aufnahme in Caco-2-Zellen wurde im Membranpotentialassay (10 mM) durch ein Fluoreszenzsignal von 102% bestätigt (**Anlage 7.1:** Metzner *et al.* 2004, **Anlage 7.5:** Metzner *et al.* 2006).

Das synthetische GABA-Analogon 3-Amino-1-propansulfonsäure (APSA, Tramiprosat, Homotaurin) ist ein selektiver GABA_A-Agonist und wird in der Therapie der Alkoholabhängigkeit eingesetzt (Olive *et al.* 2002). Das APSA-Derivat Calcium-Acetylhomotaurin (Acamprosat) findet aufgrund seines reaktivierenden Effektes auf glutaminerge Neuronen ebenfalls in der Therapie der Alkoholentwöhnung Anwendung (Bartholini 1985; Mason 2001; Olive 2002). Für beide Substanzen konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass sie dosisabhängig die Ethanolaufnahme bzw. -abhängigkeit reduzierten (Olive *et al.* 2002). Ein weiteres neues Einsatzgebiet von APSA könnte die Therapie der Alzheimer-Erkrankung sein. Aktuelle Publikationen beschreiben das Einwirken von APSA auf die pathogene Krankheitskaskade dieser Erkrankung, die vor allem durch das Peptid β-Amyloid initiiert wird (Aisen *et al.* 2006; Greenberg *et al.* 2006). Für Acamprosat wird der Einsatz als neuer alternativer Therapieansatz in der Behandlung des Tinnitus diskutiert (Azevedo und Figueiredo 2005). APSA inhibierte die L-[³H]Prolinaufnahme um 40% und interagierte mit hPAT1 mit einer Affinität von 7,1 mM. Als PAT1-Substrat mit mittlerer Affinität erzeugte es im Membranpotentialassay ein Fluoreszenzsignal von 87%.

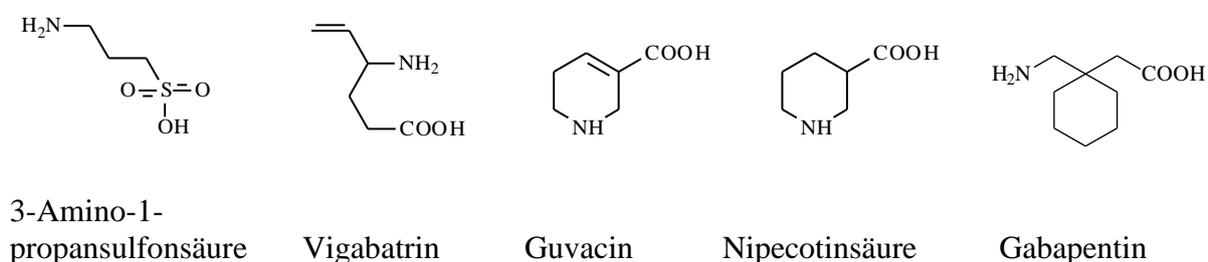


Abbildung 4. **Strukturformeln pharmazeutisch relevanter-GABA-Agonisten**

Das γ-Vinylderivat der GABA (Abbildung 4), Vigabatrin, inaktiviert die GABA-Transaminase durch kovalente Bindung in deren aktivem Zentrum und bewirkt somit eine Erhöhung

der synaptischen GABA-Konzentration (Petroff *et al.* 1996). Aufgrund dieser Verstärkung GABA-erger Effekte wird Vigabatrin als Monotherapeutikum in der Behandlung der Epilepsie eingesetzt. Ein weiteres synthetisches GABA-Analogon ist Gabapentin, welches jedoch keine direkten oder indirekten GABA-Wirkungen aufweist. Es wird diskutiert, dass die agonistische Wirkung am GABA_B-Rezeptor für dessen antikonvulsive Wirkung verantwortlich ist (Bertrand *et al.* 2001). Weitere potente GABA-Agonisten sind die spezifischen GABA_A-Rezeptorliganden Isoguvacin und Isonipecotinsäure sowie die GABA-Aufnahmeinhibitoren Guvacin und Nipecotinsäure¹⁰ (Abbildung 4; Krogsgaard-Larsen *et al.* 2000). Die Interaktion dieser GABA-Agonisten mit hPAT1 wurde in Kompetitionsstudien bestimmt: Vigabatrin, Guvacin, Isoguvacin, Nipecotinsäure und Isonipecotinsäure (10 mM) inhibierten die L-[³H]Prolinaufnahme um 60%, 69%, 57%, 58% und 69% und erzeugten auch im Membranpotentialassay Fluoreszenzsignale zwischen 76 und 96% (eigene unveröffentlichte Daten). Die Bestimmung der Affinitätskonstanten ergab, dass Vigabatrin, Guvacin, Nipecotinsäure und Isonipecotinsäure hoch affine hPAT1-Substrate sind, wohingegen Isoguvacin ein Substrat mittlerer Affinität ist (Tabelle 3, eigene unveröffentlichte Daten; Abbot *et al.* 2006). Gabapentin zeigt mit einer Affinitätskonstante von > 30 mM keine Interaktion mit hPAT1. Diese Daten belegen, dass die GABA-Agonisten Vigabatrin, Guvacin, Isoguvacin, Nipecotinsäure und Isonipecotinsäure von hPAT1 in Caco-2-Zellen transportiert werden. Die Interaktion von Vigabatrin mit hPAT1 könnte zu einem Großteil dessen hohe orale Bioverfügbarkeit von 80 – 90% erklären (Patsalos 1999). Diese Informationen zu Struktur-Wirkungsbeziehungen an hPAT1 sind vor allem für die zukünftige Entwicklung von oral applizierten Arzneistoffen mit Angriffspunkten am GABA-ergen System interessant.

Das natürlich im Gehirn vorkommende GABA-Derivat γ -Hydroxybuttersäure (GHB) ist in der Europäischen Union zur Therapie der Narkolepsie zugelassen und findet außerdem Anwendung in der Behandlung von Schlafstörungen (Robinson und Keating 2007), Alkohol- und Opioidmissbrauch und als Anästhetikum. Die Verwendung als Anästhetikum fand allerdings keine große Akzeptanz (Tunnicliff 1992). Der genaue Wirkmechanismus von GHB ist noch nicht aufgeklärt, scheint jedoch auf dessen agonistischer Wirkung an GABA_B- und separaten GHB-spezifischen Rezeptoren zu basieren (Wong *et al.* 2003). Zweifelhafte Berühmtheit erlangte GHB durch dessen Missbrauch als Rauschdroge „*liquid extasy*“ (Hernandez *et al.* 1998; Wong *et al.* 2003). Die Ergebnisse der Untersuchungen dieser Arbeit ergaben, dass die aus der oralen Applikation von GHB resultierenden Wirkungen offensichtlich nicht auf

¹⁰Diese Substanzen sind Derivate des Muscimoles, eines Inhaltsstoffes aus *Amanita muscaria*. Muscimol selbst fungiert bereits als potenter GABA_A-Agonist aber auch als Inhibitor der GABA-Transaminase und der neuronalen und glialen GABA-Aufnahme.

den Transport von GHB via PAT1 zurückzuführen sind, da GHB (10 mM) die L-[³H]Prolinaufnahme nur um 12% inhibierte und eine Affinität von > 30 mM an PAT1 zeigte (Tabelle 3, **Anlage 7.5**: Metzner *et al.* 2006).

Diese Arbeit beschäftigte sich des Weiteren mit dem intestinalen Transportmechanismus von D- und L-Cycloserin. D-Cycloserin wird als klassisches Tuberkulotikum bezeichnet. Es hemmt die Enzyme D-Alanin-Razemase und D-Alanin-D-Alanin-Ligase während der Peptidoglykansynthese bakterieller Zellwände, ist wirksam gegen Tuberkelbakterien sowie einige atypische Mykobakterien und wies eine nur langsame Resistenzentwicklung auf (Feng und Barletta 2003). Des Weiteren wurde die partiell agonistische Wirkung von D-Cycloserin an NMDA-Rezeptoren in der Therapie der chronischen Schizophrenie untersucht. Studien ergaben, dass unter der Behandlung mit modulatorischen NMDA-Rezeptoragonisten wie Glycin oder D-Cycloserin eine leichte Besserung der Negativsymptomatik auftrat (Goff *et al.* 1999; Heresco-Levy und Javitt 2004). An Caco-2-Zellen wurde bereits 1994 ein aktiver Transportmechanismus für D-Cycloserin beschrieben, der noch nicht genau einem System zugeordnet werden konnte (Ranaldi *et al.* 1994). Dieser H⁺-abhängige Transport konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. D-Cycloserin ist ein hoch affines hPAT1-Substrat mit einer Affinität von 4,4 mM (Tabelle 3, **Anlage 7.1**: Metzner *et al.* 2004). Das L-Isomer ist mit einem K_i-Wert von 7,7 mM ein hPAT1-Substrat mittlerer Affinität. Die höhere Affinität des D-Isomers unterstreicht die nicht vorhandene Stereoselektivität von hPAT1 bei einigen Aminosäuren und Derivaten. Im Membranpotentialassay wurde die elektrogene Aufnahme bestätigt, da beide Isomere (10 mM) Fluoreszenzsignale zwischen 98 und 100% erzeugten (**Anlage 7.5**: Metzner *et al.* 2006). Diese Ergebnisse zeigen, dass D-Cycloserin in Caco-2-Zellen via hPAT1 aufgenommen wird und dessen hohe Bioverfügbarkeit (Quartermain *et al.* 1994) womöglich auf dieser Interaktion beruht.

3.4 Inhibitoren

Vgl. Anlagen 7.4 (Metzner *et al.* 2005) und 7.5 (Metzner *et al.* 2006)

Für die Untersuchung der Substratspezifität an hPAT1 wurden in den Kompetitionsstudien neben den in Kapitel 3.3 verwendeten Substanzen weitere Aminosäuren und Derivate eingesetzt. In Tabelle 4 sind die in diesen Studien ermittelten Daten der L-[³H]Prolinhemmung in % enthalten. Die Kontrolle entspricht der L-[³H]Prolinaufnahme in der Abwesenheit unmarkierter Substanzen und betrug 701 fmol/10 min pro mg Protein. Alle Substanzen wurden in einer Konzentration von 10 mM eingesetzt. Bei diesen Untersuchungen fiel auf, dass die

proteinogene Aminosäure Tryptophan, deren Grundgerüst ein Indolsystem ist, die L-[³H]Prolinaufnahme um 52% inhibiert. Der K_i-Wert beträgt 4,7 mM. Eine ähnlich hoch affine Interaktion mit hPAT1 konnte auch bei anderen Indolderivaten wie 5-Hydroxy-L-tryptophan, Indol-2-carbonsäure, Indol-3-propansäure, Tryptamin und dem Neurotransmitter Serotonin festgestellt werden (**Anlage 7.5:** Metzner *et al.* 2006). Nach heutigem Kenntnisstand ist 5-Hydroxy-L-tryptophan mit einem K_i-Wert von 0,9 mM die Substanz mit der höchsten Affinität zu hPAT1 in Caco-2-Zellen. Die Messung des Membranpotentials zur Überprüfung der elektrogenen Aufnahme der Indolderivate via hPAT1 in Caco-2-Zellen ergab jedoch keine signifikante Fluoreszenzänderung in Anwesenheit dieser Tryptophanderivate (10 mM; Tabelle 4).

Tabelle 4. **Substratspezifität von PAT1: Aminosäuren und Derivate** (verkürzte Tabelle aus Metzner *et al.* 2006)

	Substrat/Inhibitor	L-[³H]Prolinaufnahme (%)	Fluoreszenzsignal (%)
	Kontrolle	100 ± 8	
1	L-Prolin	32 ± 4	100 ± 2
2	D-Prolin	24 ± 2	100 ± 1
3	cis-4-Hydroxy-L-prolin	87 ± 3	70 ± 1
4	cis-4-Hydroxy-D-prolin	39 ± 3	99 ± 1
8	3,4-Dehydro-L-prolin	50 ± 7	96 ± 1
17	L-4-Thiazolidincarbonsäure (L-Thiaprolin)	48 ± 3	91 ± 1
24	L-Pipecolinsäure (Homoprolin)	71 ± 4	71 ± 2
25	D-Pipecolinsäure	58 ± 3	81 ± 4
26	L-Azetidin-2-carbonsäure	24 ± 1	102 ± 2
27	Glycin	56 ± 2	100 ± 3
28	L-Alanin	50 ± 1	74 ± 10
29	D-Alanin	69 ± 3	108 ± 1
50	Taurin	36 ± 1	102 ± 2
51	γ-Aminobuttersäure	34 ± 3	102 ± 2
69	Indol-2-carbonsäure	42 ± 1	4 ± 5
72	Indol-3-essigsäure	49 ± 2	-3 ± 2
73	Indol-3-propansäure	37 ± 3	-18 ± 6
74	L-Tryptophan	48 ± 4	23 ± 3
75	D-Tryptophan	95 ± 7	32 ± 2
79	N-Methyl-L-tryptophan	79 ± 7	36 ± 1
80	5-Hydroxy-L-tryptophan	30 ± 1	13 ± 5
83	Tryptamin	30 ± 1	12 ± 5
84	Serotonin	45 ± 3	23 ± 2
86	L-Indolin-2-carbonsäure	65 ± 4	23 ± 11

Im Verhältnis zum L-prolinvermittelten Signal erzeugten alle in dieser Arbeit vermessenen Tryptophanderivate Fluoreszenzänderungen im Bereich von -18 - 36%. Signale unter 30% wurden als nicht signifikant eingestuft. Die im Membranpotential ermittelten Daten ließen den Schluss zu, dass diese Aminosäurederivate die Membran nicht über einen elektrogenen Mechanismus passieren.

Um einen elektroneutralen Transport dieser Substanzen über PAT1 auszuschließen, wurden Konkurrenzexperimente unter Verwendung von L-[³H]Tryptophan durchgeführt. Die Aufnahme von L-[³H]-Tryptophan in Caco-2-Zellen war weder Na⁺- noch H⁺-abhängig und wurde durch unmarkiertes L-Tryptophan (20 mM) um 98% gehemmt. Die Anwesenheit von L-Prolin (20 mM) hatte keinen Einfluss auf die L-[³H]Tryptophanaufnahme. Zusätzlich wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von H. Daniel (TUM) elektrophysiologische Messungen an mPAT1-exprimierenden *Xenopus laevis* Oozyten vorgenommen. Glycin und L-Prolin als PAT1-Standardsubstrate erzeugten hohe nach innen gerichtete membranpotentialabhängige Ströme. L-Tryptophan und die Derivate Indol-2-carbonsäure, Indol-3-propan-säure, Tryptamin und Serotonin dagegen lösten keine Ströme aus. Obwohl diese Tryptophanderivate nicht elektrogen von PAT1 transportiert werden, hemmt L-Tryptophan den von Glycin induzierten Strom konzentrationsabhängig (**Anlage 7.5:** Metzner *et al.* 2006). Es handelt sich demzufolge bei L-Tryptophan und den untersuchten Derivaten um nicht-transportierte PAT1-Inhibitoren, die mit einer substratähnlichen Affinität mit PAT1 interagieren.

Die Korrelation der gewonnenen Daten aus Konkurrenzstudien und Membranpotentialassay ist in Abbildung 5 dargestellt. In diesem Diagramm ist die Hemmung der L-[³H]Prolinaufnahme (%) gegen das im Membranpotentialassay erzeugte Fluoreszenzsignal (%) der Substanzen aus Tabelle 4 dargestellt. In beiden Experimentserien wurden die Substanzen unabhängig von ihren Affinitätskonstanten gegenüber hPAT1 in einer Endkonzentration von 10 mM eingesetzt¹¹.

Durch diese Auftragung werden zwei Gruppen verdeutlicht: Die obere Gruppe entspricht transportierten Substraten, deren inhibitorische Potenz mit deren Effekt auf das Membranpotential korreliert ($P < 0,0001$). Substanzen, die die L-[³H]Prolinaufnahme stark inhibierten, lösten ein dem L-prolinvermittelten vergleichbar hohes Membranpotentialsignal aus. Diese Substanzen gelten als „echte“ PAT1-Substrate. Keine Relation besteht jedoch zwischen Substanzen, die die L-[³H]Prolinaufnahme stark inhibierten und im Membranpotentialassay keine Änderung hervorriefen (untere Gruppe; $P = 0,34$). Hierbei handelt es sich um

¹¹Eine andere experimentelle Herangehensweise bestünde im Einsatz der Substanzen in der Konzentration, die ihrem K_T -Wert entspricht oder ein definiertes Vielfaches darstellt. Die Korrelation wäre in diesem Fall höher. Eine fixierte Konzentration für alle Substanzen wurde aus Gründen der Vergleichbarkeit eingesetzt.

PAT1-Inhibitoren, die mit einer den Substraten ähnlichen Affinität mit PAT1 interagieren, jedoch nicht transportiert werden (Anlage 7.5: Metzner *et al.* 2006).

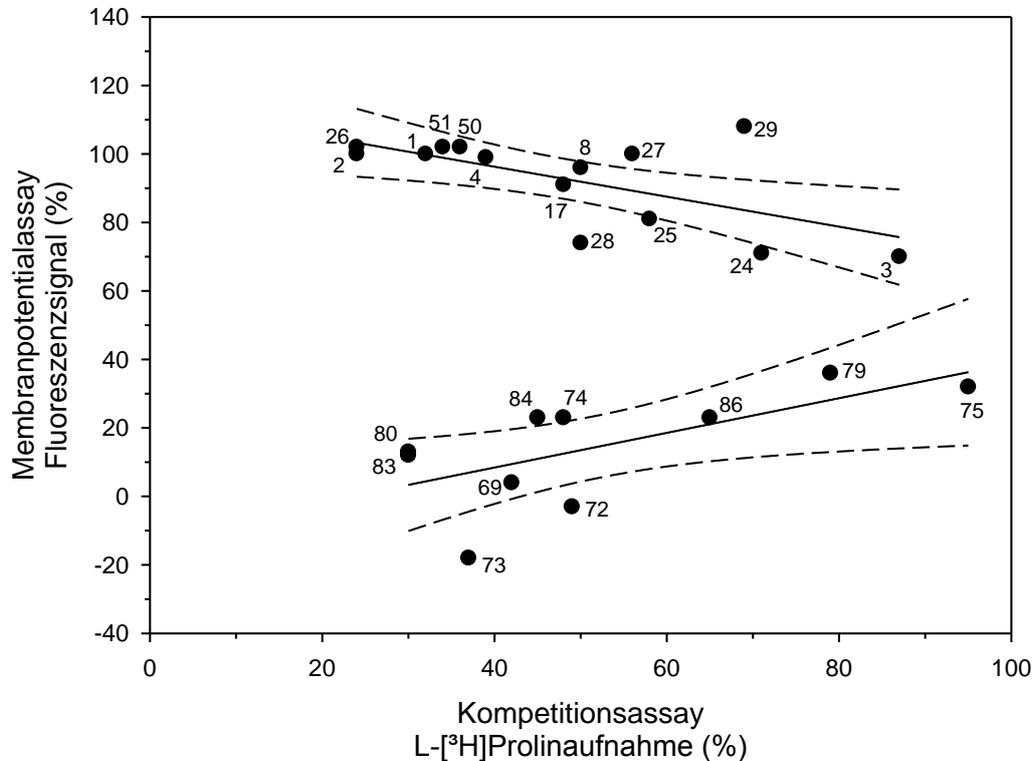


Abbildung 5. **Korrelation der Hemmung der L-[³H]Prolinaufnahme und des Effektes auf das Membranpotential ausgewählter PAT1-Substrate und Inhibitoren**
 Nummern der Substanzen und Werte entsprechen denen in Tabelle 4.
 Gestrichelte Linien: 95% Konfidenzintervall der linearen Regression.

Die Identifizierung nicht-transportierter Substrate, die mit hohen Affinitäten an den Transporter binden, ist für strukturelle Untersuchungen des Proteins, speziell dessen Substratbindetasche, sehr hilfreich. Mit Hilfe eines solchen selektiven radioaktiv-markierten Inhibitors ließen sich außerdem die Anzahl der Transporter in einer Zelle und dessen *turnover-rate* bestimmen. Diese Strategie bewährte sich bereits bei dem Na⁺/D-Glucose-Symporter SGLT1 unter Verwendung des selektiven Inhibitors Phlorizin (Loo *et al.* 1993; Novakova *et al.* 2001). Für den H⁺/Di- und Tripeptidsymporter PEPT1 wurden in der AG Inhibitoren entwickelt, deren Einsatz in solchen Studien geplant ist (Knütter *et al.* 2001).

3.5 Einordnung von PAT1 in den epithelialen Aminosäuretransport

Bei der Untersuchung des transepithelialen Fluxes von L-Prolin und pharmazeutisch-relevanten Derivaten durch Caco-2-Zellen in apikaler (luminaler) nach basolateraler (abluminaler) Richtung war auffällig, dass zwischen der Akkumulation von L-Prolin, THLP, LACA, CHDP, D-Prolin und CHLP in den Zellen nach zwei Stunden und den entsprechenden Affinitätskonstanten kein Zusammenhang bestand (siehe 3.3 Physiologische und pharmazeutisch-relevante Substrate, **Anlage 7.1**: Metzner *et al.* 2004). Dies gab Anlass zu der Vermutung, dass basolaterale Transporter den Efflux dieser Substanzen kontrollieren. Außerdem erfolgte etwa zu dieser Zeit der Untersuchungen die Klonierung des Na⁺/Iminosäure-Transporters 1, SIT1¹², der Charakteristika des System IMINO aufweist (Takanaga *et al.* 2005; Kowalczyk *et al.* 2005). Daraufhin stellte sich die Frage, wie PAT1 in den epithelialen Aminosäuretransport einzuordnen ist.

Im humanen Dünndarm ist eine Vielzahl aktiver Transportproteine in der apikalen (luminalen) und basolateralen (abluminalen) Membran lokalisiert (Palacin *et al.* 1998; Bode 2001; Wagner *et al.* 2001; Ganapathy *et al.* 2001; Bröer 2002; Steffansen *et al.* 2004; Brandsch und Brandsch 2003). Eine Übersicht über die humanen intestinalen Aminosäuretransporter ist in Tabelle 5 dargestellt. In der apikalen Membran von Enterozyten sind, nach derzeitigem Wissen, neun verschiedene Aminosäuretransporter für die Aufnahme von Aminosäuren verantwortlich. Diese Transporter unterscheiden sich in ihrer Sequenz, ihrem Mechanismus und ihrer Substratspezifität, wobei hier Überlappungen auftreten. Prolintransportierende Systeme in der apikalen Membran sind SIT1 (SLC20A6) und PAT1 (SLC36A1). Auch System B⁰ (SLC6A19) interagiert mit Prolin, jedoch mit sehr niedriger Affinität (Tabelle 6; Böhmer *et al.* 2005). SIT1 wird heute der Genfamilie der Na⁺- und Cl⁻-abhängigen Neurotransmitter-Transporter zugeordnet und transportiert L-Prolin Na⁺-abhängig, durch Cl⁻-Ionen stimuliert, unabhängig vom pH-Gradient und im Vergleich zu PAT1 mit höherer Affinität (Takanaga *et al.* 2005; Kowalczyk *et al.* 2005). Die mRNA von SIT1 wurde vorwiegend in Teilen des Gehirnes, der Niere und in den epithelialen Zellen des Dickdarmes und Dünndarmes nachgewiesen (Takanaga *et al.* 2005; Kowalczyk *et al.* 2005). Hoch affine

¹²Die Klonierung und Charakterisierung des Na⁺-abhängigen Iminosäuretransporters erfolgte in zwei Arbeitsgruppen gleichzeitig, in der Gruppe von M.A. Hediger (Takanaga *et al.* 2005) und in der Gruppe von S. Bröer (Kowalczyk *et al.* 2005). Die Bezeichnung SIT1 für Na⁺/Iminosäure-Transporter stammt von Hediger, wohingegen Bröer dieses Transportsystem XT3s1 bzw. IMINO^B nannte. In dieser Arbeit wird für das System IMINO der Name SIT1 verwandt, da dieser das Transportprotein am eindeutigsten zuordnet.

Substrate sind L-Prolin, D-Prolin, Betain und D,L-Pipecolinsäure, wohingegen L-Alanin, β -Alanin, Glycin und GABA nicht transportiert werden.

In Caco-2-Zellen, dem *in-vitro* Modell für humanes intestinales Epithel, erfolgte bis heute die funktionelle Charakterisierung von PAT1, nicht jedoch von SIT1, obgleich die mRNA von beiden Transportern in diesen Zellen nachgewiesen werden konnte (eigene unveröffentlichte Daten). Vergleichende Untersuchungen von rPAT1 und rSIT1 im HRPE-Vaccinia-Virus-Expressionssystem und in renalen BBMV des Kaninchens zeigten, dass die Aktivität der beiden Transportproteine in hohem Maß von den vorhandenen Bedingungen bestimmt wird. So wurde die Transportfunktion von SIT1 in renalen BBMV in Abwesenheit eines H^+ -Gradienten, jedoch in Anwesenheit eines nach innen gerichteten Na^+ -Gradienten und L-Alanin (10 mM) gemessen, um jegliche PAT1-Aktivität zu minimieren (Miyachi *et al.* 2005). Zusammenfassend erlauben diese Ergebnisse den Schluss, dass beide Transporter für L-Prolin und Derivate im Dünndarm vorhanden sind, jedoch mit unterschiedlichen Expressionsmustern. Des Weiteren herrscht eine große Diversität diesbezüglich innerhalb der Spezies vor (Thwaites und Anderson 2007). Im humanen Dünndarm scheint PAT1 das für die Aufnahme von L-Prolin und seiner Derivate dominante System zu sein.

Die Aufnahme der in dieser Arbeit untersuchten pharmazeutisch-relevanten Substanzen in Zellen des intestinalen Epithels scheint PAT1-vermittelt zu erfolgen. Über deren Efflux aus den Zellen und der Interaktion mit basolateral lokalisierten Transportsystemen ist bisher wenig bekannt. Selbst über den Export von L-Prolin aus Caco-2-Zellen gab es kaum Informationen. In der intestinalen basolateralen Zellmembran sind nach derzeitigem Wissen zehn Transportsysteme lokalisiert (Tabelle 5), von denen zwei auch L-Prolin akzeptieren: System ASC (Pinilla-Tenas *et al.* 2003) und System A (Takanaga *et al.* 2002). System ASC, vertreten durch das Transportprotein ASCT1 (SLC1A4), transportiert Aminosäuren elektrogen im Symport mit Na^+ -Ionen bevorzugt, wenn deren Kohlenstoffkette drei bis vier CH_2 -Einheiten umfasst. System asc (SLC7A10), ein heterodimeres Transportprotein, besitzt eine sehr ähnliche Substratspezifität wie System ASC, jedoch liegen keine Informationen zur Interaktion mit L-Prolin vor. Der Aminosäure-Antiport über asc erfolgt Na^+ -unabhängig. Ein weiteres Na^+ -abhängiges Transportsystem für Iminosäuren und neutrale Aminosäuren ist System A, das Transportprotein SNAT2 (SLC38A2).

Zur Identifizierung des für den basolateralen Export von L-Prolin verantwortlichen Transportproteins in Caco-2-Zellen wurden transepitheliale Fluxuntersuchungen bei pH 7,5 und in Anwesenheit von Na^+ -Ionen durchgeführt.

Tabelle 5. Klassifizierung humaner intestinaler Transportsysteme für Aminosäuren

System	Protein ¹³	Gen (<i>human</i>)	Mechanismus	Bevorzugte Substrate
Apikale Membran				
X _{AG} ⁻	EAAT3, EAAC1	SLC1A1	Cotransport (3 Na ⁺ , 1 H ⁺), Antiport (K ⁺)	L-Glu, D-, L-Asp
ASC	ASCT2	SLC1A5	Aminosäureaustausch, Cotransport (Na ⁺)	L-Ala, L-Ser, L-Cys, L-Thr, L-Gln
β	TAUT	SLC6A6	Cotransport (2 Na ⁺ , 1 Cl ⁻)	Taurin, Hypotaurin, β-Ala, Betain
B ^{0,+}	ATB ^{0,+}	SLC6A14	Cotransport (2 Na ⁺ , 1 Cl ⁻)	Neutrale, kationische Aminosäuren
B ⁰	B ⁰ AT1	SLC6A19	Cotransport (Na ⁺)	Neutrale Aminosäuren, L-Pro
IMINO	SIT1	SLC6A20	Cotransport (Na ⁺ , Cl ⁻)	L-Pro, L-Pipecolinsäure, Sarkosin
y ⁺	CAT1	SLC7A1	Uniport	L-Arg, L-Lys, Ornithin
b ^{0,+}	rBAT/b ^{0,+} AT*	SLC3A1/SLC7A9	Aminosäureaustausch	Kationische Aminosäuren, Cystin
PAT	PAT1	SLC36A1	Cotransport (H ⁺)	D-, L-Pro, Gly, D-, L-Ala, GABA
Basolaterale Membran				
ASC	ASCT1, SAAT1	SLC1A4	Aminosäureaustausch, Cotransport (Na ⁺)	L-Ala, L-Ser, L-Cys, L-Pro
Gly	GLYT1	SLC6A9	Cotransport (2-3 Na ⁺ , 1 Cl ⁻)	Gly, Sarkosin
L	4F2hc/LAT1*	SLC3A2/SLC7A5	Aminosäureaustausch	L-Leu, L-His, L-Met, BCH
	4F2hc/LAT2*	SLC3A2/SLC7A8	Aminosäureaustausch	L-Leu, L-Arg, BCH
y ^{+L}	4F2hc/ y ⁺ LAT2*	SLC3A2/SLC7A6	Aminosäureaustausch	L-Arg, L-Lys, L-Trp
	4F2hc/y ⁺ LAT1*	SLC3A2/SLC7A7	Aminosäureaustausch	L-Arg, L-Lys, L-Trp
asc	4F2hc/asc-1*	SLC3A2/SLC7A10	Aminosäureaustausch	L-Ala, L-, D-Ser, L-Cys
T	TAT1	SLC16A10	Uniport	L-Phe, L-Tyr, L-Trp, L-Dopa
A	SNAT2, ATA2	SLC38A2	Cotransport (Na ⁺)	Gly, L-Pro, L-Ala, MeAIB
y ⁺ (?)	CAT1	SLC7A1	Uniport	L-Arg, L-Lys, Ornithin

*Heterodimer

¹³Für einige Proteine gibt es in der Literatur mehrere Bezeichnungen bzw. Aliases. In dieser Tabelle sind die aktuell gebräuchlichsten verwendet.

Der basolateral nach apikal gerichtete Flux von L-[³H]Prolin wurde in Anwesenheit von L-Valin bzw. L-Methionin bestimmt. Diese Aminosäuren wurden ausgewählt, da L-Valin und L-Methionin nicht mit PAT1 interagieren. L-Valin wird von System ASC, nicht aber von System A akzeptiert, wohingegen L-Methionin kein Substrat für System ASC, jedoch für System A ist. Vorangegangene Hemmversuche mit L-Cystein, einem Substrat für beide Transportproteine, erlaubten den Schluss, dass eines dieser beiden Systeme am Efflux beteiligt sein könnte. Die spezifischen Hemmversuche mit L-Valin und L-Methionin ergaben folgendes Bild: Ist L-Valin während der Bestimmung des J_{b-a} L-[³H]Prolinfluxes dem Donorkompartiment (abluminal) zugesetzt, wird die L-[³H]Prolinaufnahme in die Zellen (J_{b-c}) um 32% gehemmt. Bei der gleichen Versuchsdurchführung mit L-Methionin ist J_{b-c} jedoch nicht beeinflusst. Diese Ergebnisse sind ein erstes Indiz für die hauptsächliche Beteiligung von System ASC (SLC1A4) am Efflux von L-Prolin aus Caco-2-Zellen. Da in Transwell[®]-Kammern kultivierte Caco-2-Zellen ein sehr komplexes Modell des humanen Dünndarmepithels darstellen, sollten Ergebnisse aus transepithelialen Fluxuntersuchungen im Kontext mit Aufnahmeuntersuchungen und Affinitätsbestimmungen stehen und Interpretationen sorgsam bedacht werden. Aussagen über den für den Efflux der Prolinderivate verantwortlichen Transporter sind nicht zu treffen, da die Interaktion dieser Substanzen mit ASCT1 und SNAT2 bisher nicht untersucht wurde. Weiterhin wurde in diesen Versuchen ausschließlich die Aufnahme aus dem basolateralen Kompartiment in die Zelle bestimmt und nicht der spezifische Efflux aus den Zellen. Eine weitere Beteiligung anderer Aminosäuretransporter im humanen Dünndarm ist nicht auszuschließen. Diese Studien sollten fortgeführt werden.

Alle nach heutigem Kenntnisstand bekannten Transporter für freies Prolin sind in Tabelle 6 zusammengefasst (Brandsch 2006). Die Tabelle zeigt die Affinität von L-Prolin an dem jeweiligen Transportprotein und dessen Lokalisation in humanen Geweben.

Die Klonierung von Transportern und deren funktionelle Analyse ermöglichte in bestimmten Fällen die Zuordnung bekannter Krankheitsbilder zu strukturell veränderten Transportproteinen. So konnte z.B ein Teil des Krankheitsbildes der Cystinurie (OMIM 220100), einer autosomal-rezessiv vererbaren Störung der renotubulären und intestinalen Resorption von Cystin mit den Symptomen Nephrolithiasis und Pyelonephritis, auf Mutationen im Aminosäuretransportsystem $b^{0,+}$ (SLC3A1/SLC7A9; Tabelle 5) zurückgeführt werden (Calonge *et al.* 1994).

Tabelle 6. Übersicht über die humanen Transporter für freies Prolin

Protein	Gen	Lokalisation	K_i L-Pro (mM)
ASCT1	SLC1A4	sehr weit verbreitet, an Epithelien meist abluminal	0,7
SIT1	SLC6A20	Darm, Niere, Ovar, Gehirn (Choroid Plexus, Mikroglia, Meningen)	0,2
PROT	SLC6A7	Gehirn (Neuronen)	0,02
SBAT1	SLC6A15	Gehirn (Neuronen: Synaptosomen), Lunge, Niere	0,4
B ⁰ AT1	SLC6A19	Darm, Niere (apikal)	> 5
PAT1	SLC36A1	Darmepithel (apikal), Gehirn (Neuronen: lysosomal), Niere, Lunge, Leber, Milz	1,6
PAT2	SLC36A2	mRNA: Lunge, Niere, Herz, Muskel, Testes, Leber, Milz, Thymus, Rückenmark, Gehirn (Neuronen: endopl. Retikulum, Endosomen)	0,2
SNAT2	SLC38A2	sehr weit verbreitet, an Epithelien meist abluminal	0,4

Ein weiteres Krankheitsbild, das auf der Fehlfunktion eines Membrantransporters beruht, ist die Hartnup-Krankheit (OMIM 234500). Mutationen in dem für den Transporter B⁰AT1 kodierenden Gen SLC6A19 wurden als Ursache für diese vererbte Stoffwechselkrankheit identifiziert (Bröer *et al.* 2004). Generelle Symptome sind eine neutrale Aminoazidurie und ein Tryptophanmangel, der zu einem Niacinmangel (Vitamin B3) mit pellagraähnlichen Krankheitserscheinungen führen kann. Auch das Krankheitsbild der Iminoglycinurie (OMIM 242600) weist auf einen Defekt in einem Transportprotein hin (Bröer *et al.* 2006). Diese autosomal-rezessiv vererbte Krankheit ist durch die vermehrte renale Ausscheidung von L-Prolin und Glycin charakterisiert (Scriver *et al.* 1964). Es handelt sich in diesem Fall um einen benignen Fehler in der intestinalen Resorption und/oder renalen Rückresorption von Aminosäuren. Iminoglycinurie wurde auch als Teil des Fanconi-Syndroms (Glucose-Aminosäure-Diabetes) identifiziert, einer Erkrankung mit Symptomen wie Glucose-, Protein- und Aminoazidurie, die aus der verminderten Rückresorption von Glucose, Aminosäuren und Phosphaten resultiert. Diese Krankheit kann u.a. zu globaler Niereninsuffizienz und Enzephalopathie führen (Farriaux *et al.* 1966; Tanaka *et al.* 2000). Die für den intestinalen Prolin- bzw. Glycintransport verantwortlichen Transportproteine sind PAT1, SIT1 und zu einem geringeren Teil B⁰AT1 (Bröer *et al.* 2006). SIT1 akzeptiert L-Prolin, transportiert jedoch nicht Glycin. Beide Aminosäuren interagieren mit B⁰AT1, jedoch mit sehr niedriger Affinität. Bei unserer Art scheint PAT1 den Hauptanteil der Prolin- und Glycinaufnahme zu vermitteln. Mutationen in PAT1 könnten die Ursache für den Defekt der Iminoglycinurie bedingen.

4 ZUSAMMENFASSUNG

Der H⁺-Aminosäure-Cotransporter PAT1 ist aufgrund seiner intestinalen Lokalisation, seiner hohen Kapazität und seiner breiten Substratspezifität sowohl von ernährungsphysiologischer als auch von pharmazeutischer Relevanz. In dieser Arbeit wurden weiterführende Untersuchungen zum Transportmechanismus von hPAT1, insbesondere zur Bestimmung der Rolle des cotransportierten H⁺-Iones durchgeführt. Des Weiteren wurden die essentiellen Strukturmerkmale von PAT1-Substraten unter Verwendung eines umfassenden Datensatzes aufgeklärt. Es wurden nicht-transportierte Inhibitoren und neue pharmazeutisch-relevante Substrate identifiziert. Als *in-vitro*-Modell diente hierbei die humane Kolonkarzinom-Zelllinie Caco-2, in der hPAT1 ausschließlich in der apikalen Membran lokalisiert ist. Für intestinale Aufnahmestudien wurden die Zellen in Gewebekulturschälchen und für Transportstudien auf permeablen Polycarbonatfiltern kultiviert. Die spezifische Analyse generierter hPAT1-Mutanten erfolgte nach transienter Transfektion von HRPE-Zellen mit Hilfe des Vaccinia-Virus-Expressionssystems.

Die wesentlichen Ergebnisse sind:

- In Caco-2-Zellen wird der Transport von L-Prolin nahezu ausschließlich von PAT1 vermittelt. Dieser wird durch einen nach innen gerichteten H⁺-Gradienten stark stimuliert. Er ist unabhängig von einem Na⁺-Gradienten.
- Das cotransportierte H⁺-Ion aktiviert hPAT1, indem es dessen Substrataffinität erhöht. Die maximale Transportgeschwindigkeit bleibt unverändert.
- Nach der Behandlung von Caco-2-Zellen mit DEPC, einem Histidin-blockierenden Agens, war ausschließlich die Affinität des L-Prolintransportes und nicht dessen maximale Geschwindigkeit beeinflusst. Dies gilt als Hinweis für die Beteiligung von Histidinresten an der H⁺-Bindung bzw. Translokation während des Aminosäuretransportes.
- Mittels ortsgerichteter Mutagenese und anschließender funktioneller Untersuchung in HRPE-Zellen konnte das Histidin 55 im hPAT1-Protein als für die Bindung und Translokation des H⁺-Iones essentieller Aminosäurerest identifiziert werden. Die Lokalisation der nicht transportierenden His-55-Mutanten in der Zellmembran wurde durch Zelloberflächen-Biotinylierung und anschließende Western Blot Analytik bzw. mittels Immunfluoreszenzstudien nachgewiesen.
- Die Auswertung eines aus 87 Substanzen bestehenden Datensatzes zur Substratspezifität machte eine Klassifizierung von PAT1-Substraten in drei Gruppen möglich und ergab folgende Merkmale für eine hoch affine Interaktion:

- (i) transportierte Substrate sind kleine unverzweigte Aminosäuren
- (ii) eine freie Iminogruppe wird im Vergleich zu einer primären Aminogruppe bevorzugt
- (iii) eine freie Carboxyl- oder Sulfongruppe in α -Position zur Imino- bzw. Aminogruppe ist essentiell
- (iv) bis zu drei CH_2 -Einheiten werden als Abstand zwischen den funktionellen Gruppen toleriert
- (v) heterocyclische Indolderivate interagieren mit substratähnlicher Affinität.
- Eine Besonderheit in der Substraterkennung von PAT1 liegt in dessen Präferenz der D-Isomere einiger Aminosäuren.
- L-Tryptophan, Serotonin und weitere Indol-Derivate sind Inhibitoren, die mit PAT1 mit hoher Affinität interagieren, jedoch nicht transportiert werden.
- Die in der Reduktion maligner Kollagensynthese eingesetzten pharmazeutisch-relevanten Prolinderivate CHLP und LACA werden aktiv über PAT1 transportiert.
- PAT1 akzeptiert GABA und verschiedene GABA-Derivate wie APSA, Vigabatin, Guvacin und Nipecotinsäure. Der intestinale PAT1-vermittelte Transport von Vigabatin bedingt zu einem großen Teil dessen hohe Bioverfügbarkeit.
- Das Tuberkulotikum D-Cycloserin, das auch Anwendung bei neurologischen Erkrankungen wie z.B. Schizophrenie findet, ist ein hoch affines PAT1-Substrat.
- Eine Beteiligung von PAT1 am Krankheitsbild der Iminoglycinurie ist wahrscheinlich.
- PAT1 ist ein vielversprechender Kandidat für neue Wege des Arzneistofftransportes.

5 AUSBLICK

In zukünftigen Projekten sollten folgende Untersuchungen im Vordergrund stehen:

- Aufklärung der Relation von PAT1 gegenüber SIT1 im humanen Dünndarm bezüglich Verteilung, Expressionsstärke und Aktivität.
- Strukturelle Aufklärung des PAT1-Proteins nach rekombinanter Expression, Rekonstitution und funktioneller Untersuchung.
- Entwicklung von *Prodrugs* als PAT1-Substrate mittels computerbasierter Struktur-Wirkungsuntersuchungen.
- Untersuchungen der intestinalen Expression von PAT1, SIT1 und B⁰AT1 in Iminoglycinurie-Patienten zur Aufklärung der Beteiligung von PAT1 und zur Identifizierung eventuell vorhandener Mutationen.
- Untersuchung der physiologischen Rolle von PAT1 in der Blut-Hirn-Schranke und im Gehirn zur Verfolgung des Transportweges ZNS-wirksamer oral applizierter Arzneistoffe.
- Untersuchung von PAT1 in Modellorganismen (*C. elegans*, Zebrafisch, *knock-out*-Maus).

6 LITERATUR

Weiterführende Literatur findet sich in den anliegenden Publikationen.

- Abbot, E.L., Grenade, D.S., Kennedy, D.J., Gatfield, K.M., Thwaites, D.T. 2006. Vigabatrin transport across the human intestinal epithelial (Caco-2) brush-border membrane is via the H⁺-coupled amino-acid transporter hPAT1. *Br. J. Pharmacol.* **147**:298-306.
- Aisen, P.S., Saumier, D., Briand, R., Laurin, J., Gervais, F., Tremblay, P., Garceau, D. 2006. A Phase II study targeting amyloid-beta with 3APS in mild-to-moderate Alzheimer disease. *Neurology* **67**:1757-1763.
- Anderson, C.M. und Thwaites, D.T. 2005. Indirect regulation of the intestinal H⁺-coupled amino acid transporter hPAT1 (SLC36A1). *J. Cell Physiol.* **204**:604-613.
- Anderson, C.M., Grenade, D.S., Boll, M., Foltz, M., Wake, K.A., Kennedy, D.J., Munck, L.K., Miyauchi, S., Taylor, P.M., Campbell, F.C., Munck, B.G., Daniel, H., Ganapathy, V., Thwaites, D.T. 2004. H⁺/amino acid transporter 1 (PAT1) is the imino acid carrier: An intestinal nutrient/drug transporter in human and rat. *Gastroenterology* **127**:1410-1422.
- Asaka, J., Terada, T., Tsuda, M., Katsura, T., Inui, K. 2007. Identification of essential histidine and cysteine residues of the H⁺/organic cation antiporter multidrug and toxin extrusion (MATE). *Mol. Pharmacol.* **71**:1487-1493.
- Azevedo, A.A. und Figueiredo, R.R. 2005. Tinnitus treatment with acamprosate: double-blind study. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* **71**:618-623.
- Bartholini, G. 1985. GABA receptor agonists: pharmacological spectrum and therapeutic actions. *Med. Res. Rev.* **5**:55-75.
- Bertrand, S., Ng, G.Y., Purisai, M.G., Wolfe, S.E., Severidt, M.W., Nouel, D., Robitaille, R., Low, M.J., O'Neill, G.P., Metters, K., Lacaille, J.C., Chronwall, B.M., Morris, S.J. 2001. The anticonvulsant, antihyperalgesic agent gabapentin is an agonist at brain gamma-aminobutyric acid type B receptors negatively coupled to voltage-dependent calcium channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **298**:15-24.
- Beutner, K.R., Friedman, D.J., Forszpaniak, C., Andersen, P.L., Wood, M.J. 1995. Valaciclovir compared with acyclovir for improved therapy for herpes zoster in immunocompetent adults. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:1546-1553.
- Bode, B.P. 2001. Recent molecular advances in mammalian glutamine transport. *J. Nutr.* **131**:2475S-2485S.
- Böhmer, C., Bröer, A., Munzinger, M., Kowalczyk, S., Rasko, J.E., Lang, F., Bröer, S. 2005. Characterization of mouse amino acid transporter B⁰AT1 (slc6a19). *Biochem. J.* **389**:745-751.
- Boll, M., Daniel, H., Gasnier, B. 2004. The SLC36 family: proton-coupled transporters for the absorption of selected amino acids from extracellular and intracellular proteolysis. *Pflugers Arch.* **447**:776-779.
- Boll, M., Foltz, M., Anderson, C.M.H., Oechsler, C., Kottra, G., Thwaites, D.T., Daniel, H. 2003a. Substrate recognition of the mammalian proton-dependent amino acid transporter PAT1. *Mol. Membr. Biol.* **20**:261-269.

- Boll, M., Foltz, M., Rubio-Aliaga, I., Daniel, H. 2003b. A cluster of proton/amino acid transporter genes in the human and mouse genomes. *Genomics* **82**:47-56.
- Boll, M., Foltz, M., Rubio-Aliaga, I., Kottra, G., Daniel, H. 2002. Functional characterization of two novel mammalian electrogenic proton-dependent amino acid cotransporters. *J. Biol. Chem.* **277**:22966-22973.
- Brandsch, M. 2006. Transport of L-proline, L-proline-containing peptides and related drugs at mammalian epithelial cell membranes. *Amino Acids* **31**:119-136.
- Brandsch, M. und Brandsch, C. 2003. Intestinal transport of aminoacids, peptides and proteins. In: Progress in research on energy and protein metabolism. Souffrant, W.B., Metges, C.C. (Hrsg). Wageningen Academic Publishers, Niederlande, pp. 667-680.
- Brandsch, M., Brandsch, C., Ganapathy, M.E., Chew, C.S., Ganapathy, V., Leibach, F.H. 1997. Influence of proton and essential histidyl residues on the transport kinetics of the H⁺/peptide cotransport systems in intestine (PEPT 1) and kidney (PEPT 2). *Biochim. Biophys. Acta* **1324**:251-262.
- Brandsch, M., Ramamoorthy, S., Marczin, N., Catravas, J.D., Leibach, J.W., Ganapathy, V., Leibach, F.H. 1995. Regulation of taurine transport by Escherichia coli heat-stable enterotoxin and guanylin in human intestinal cell lines. *J. Clin. Invest.* **96**:361-369.
- Bretschneider, B., Brandsch, M., Neubert, R. 1999. Intestinal transport of β -lactam antibiotics: analysis of the affinity at the H⁺/peptide symporter (PEPT1), the uptake into Caco-2 cell monolayers and the transepithelial flux. *Pharm. Res.* **16**:55-61.
- Bröer, S. 2002. Adaptation of plasma membrane amino acid transport mechanisms to physiological demands. *Pflugers Arch.* **444**:457-466.
- Bröer, A., Cavanaugh, J.A., Rasko, J.E., Bröer, S. 2006. The molecular basis of neutral aminoacidurias. *Pflugers Arch.* **451**:511-517.
- Bröer, A., Klingel, K., Kowalczyk, S., Rasko, J.E., Cavanaugh, J., Bröer, S. 2004. Molecular cloning of mouse amino acid transport system B⁰, a neutral amino acid transporter related to Hartnup disorder. *J. Biol. Chem.* **279**:24467-24476.
- Burckhardt, B.C. und Burckhardt, G. 2003. Transport of organic anions across the basolateral membrane of proximal tubule cells. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **146**:95-158.
- Calonge, M.J., Gasparini, P., Chillaron, J., Chillon, M., Gallucci, M., Rousaud, F., Zelante, L., Testar, X., Dallapiccola, B., Di Silverio, F., Barceló, P., Estivill, X., Zorzano, A., Nunes, V., Palacin, M. 1994. Cystinuria caused by mutations in rBAT, a gene involved in the transport of cystine. *Nat. Genet.* **6**:420-425.
- Chen, Z., Fei, Y.-J., Anderson, C.M.H., Wake, K.A., Miyauchi, S., Huang, W., Thwaites, D.T., Ganapathy, V. 2003a. Structure, function and immunolocalization of a proton-coupled amino acid transporter (hPAT1) in the human intestinal cell line Caco-2. *J. Physiol.* **546**:349-361.
- Chen, Z., Kennedy, D.J., Wake, K.A., Zhuang, L., Ganapathy, V., Thwaites, D.T. 2003b. Structure, tissue expression pattern, and function of the amino acid transporter rat PAT2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304**:747-754.
- Christiansen, B., Meinild, A.K., Jensen, A.A., Brauner-Osborne, H. 2007. Cloning and characterization of a functional human gamma -aminobutyric acid (GABA) transporter, human GAT-2. *J. Biol. Chem.* **282**:19331-19341.

- Conti, F., Minelli, A., Melone, M. 2004. GABA transporters in the mammalian cerebral cortex: localization, development and pathological implications. *Brain Res. Brain. Res. Rev.* **45**:196-212.
- Daniel, H. und Adibi, S.A. 1993. Transport of β -lactam antibiotics in kidney brush border membrane. Determinants of their affinity for the oligopeptide/ H^+ symporter. *J. Clin. Invest.* **92**:2215-2223.
- Faria, T.N., Timoszyk, J.K., Stouch, T.R., Vig, B.S., Landowski, C.P., Amidon, G.L., Weaver, C.D., Wall, D.A., Smith, R.L. 2004. A novel high-throughput pepT1 transporter assay differentiates between substrates and antagonists. *Mol. Pharm.* **1**:67-76.
- Farriaux, J.P., Christiaens, L., Biserte, G., Fontaine, G. 1966. Biological and developmental characteristics of the Toni-Debre-Fanconi syndrome. *Lille Med.* **11**:45-53.
- Fei, Y.J., Liu, W., Prasad, P.D., Kekuda, R., Oblak, T.G., Ganapathy, V., Leibach, F.H. 1997. Identification of the histidyl residue obligatory for the catalytic activity of the human H^+ /peptide cotransporters PEPT1 and PEPT2. *Biochemistry* **36**:452-460.
- Feng, Z. und Barletta, R.G. 2003. Roles of Mycobacterium smegmatis D-alanine:D-alanine ligase and D-alanine racemase in the mechanisms of action of and resistance to the peptidoglycan inhibitor D-cycloserine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:283-291.
- Foltz, M., Mertl, M., Dietz, V., Boll, M., Kottra, G., Daniel, H. 2005. Kinetics of bidirectional H^+ and substrate transport by the proton-dependent amino acid symporter PAT1. *Biochem. J.* **386**:607-616.
- Foltz, M., Oechsler, C., Boll, M., Kottra, G., Daniel, H. 2004. Substrate specificity and transport mode of the proton-dependent amino acid transporter mPAT2. *Eur. J. Biochem.* **271**:3340-3347.
- Ganapathy, M.E., Brandsch, M., Prasad, P.D., Ganapathy, V., Leibach, F.H. 1995. Differential recognition of β -lactam antibiotics by intestinal and renal peptide transporters, PEPT1 and PEPT2. *J. Biol. Chem.* **43**:25672-25677.
- Ganapathy, M.E., Huang, W., Wang, H., Ganapathy, V., Leibach, F.H. 1998. Valacyclovir: a substrate for the intestinal and renal peptide transporters PEPT1 and PEPT2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **246**:470-475.
- Ganapathy, V., Balkovetz, D.F., Ganapathy, M.E., Mahesh, V.B., Devoe, L.D., Leibach, F.H. 1987. Evidence for histidyl and carboxy groups at the active site of the human placental Na^+H^+ exchanger. *Biochem. J.* **245**:473-477.
- Ganapathy, V., Burckhardt, G., Leibach, F.H. 1984. Characteristics of glycylsarcosine transport in rabbit intestinal brush-border membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* **259**:8954-8959.
- Ganapathy, V., Ganapathy, M.E., Leibach, F.H. 2001. Intestinal Transport of Peptides and Amino Acids. *Curr. Topics in Membr.* **50**:379-412.
- Ganapathy, V., Roesel, R.A., Howard, J.C., Leibach, F.H. 1983. Interaction of proline, 5-oxoproline, and pipercolic acid for renal transport in the rabbit. *J. Biol. Chem.* **258**:2266-2272.
- Goff, D.C., Tsai, G., Levitt, J., Amico, E., Manoach, D., Schoenfeld, D.A., Hayden, D.L., McCarley, R., Coyle, J.T. 1999. A placebo-controlled trial of D-cycloserine added to conventional neuroleptics in patients with schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* **56**:21-27.

- Greenberg, S.M., Rosand, J., Schneider, A.T., Creed Pettigrew, L., Gandy, S.E., Rovner, B., Fitzsimmons, B.F., Smith, E.E., Edip Gurol, M., Schwab, K., Laurin, J., Garceau, D. 2006. A phase 2 study of tramiprosate for cerebral amyloid angiopathy. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **20**:269-274.
- Grillo, F.G. und Aronson, P.S. 1986. Inactivation of the renal microvillus membrane Na⁺-H⁺ exchanger by histidine-specific reagents. *J. Biol. Chem.* **261**:1120-1125.
- Heresco-Levy, U. und Javitt, D.C. 2004. Comparative effects of glycine and D-cycloserine on persistent negative symptoms in schizophrenia: a retrospective analysis. *Schizophr. Res.* **66**:89-96.
- Hernandez, M., McDaniel, C.H., Costanza, C.D., Hernandez, O.J. 1998. GHB-induced delirium: a case report and review of the literature of γ -hydroxybutyric acid. *Am. J. Drug Alcohol Abuse* **24**:179-183.
- Hoerrmann, W. 1986. Medicines which contain derivatives of proline or hydroxyproline. Patent WO 86/07053.
- Hoerrmann, W. 2000. Cis-4-hydroxy-L-proline for the treatment of cancer. Patent US 6153643.
- Hoffmeyer, S., Burk, O., von Richter, O., Arnold, H.P., Brockmöller, J., Johne, A., Cascorbi, I., Gerloff, T., Roots, I., Eichelbaum, M., Brinkmann, U. 2000. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**:3473-3478.
- Hori, R., Maegawa, H., Kato, M., Katsura, T., Inui, K. 1989. Inhibitory effect of diethyl pyrocarbonate on the H⁺/organic cation antiport system in rat renal brush-border membranes. *J. Biol. Chem.* **264**:12232-12237.
- Jessen, H., Jorgensen, K.E., Røigaard-Petersen, H., Sheikh, M.I. 1989. Demonstration of H⁺- and Na⁺-coupled co-transport of beta-alanine by luminal membrane vesicles of rabbit proximal tubule. *J. Physiol.* **411**:517-528.
- Kennedy, D.J., Gatfield, K.M., Winpenny, J.P., Ganapathy, V., Thwaites, D.T. 2005. Substrate specificity and functional characterisation of the H⁺/amino acid transporter rat PAT2 (Slc36a2). *Br. J. Pharmacol.* **144**:28-41.
- Klohs, W.D., Steinkampf, R.W., Wicha, M.S., Mertus, A.E., Tunac, J.B., Leopold, W.R. 1985. Collagen-production inhibitors evaluated as antitumor agents. *J. Natl. Cancer. Inst.* **75**:353-359.
- Knütter, I., Theis, S., Hartrodt, B., Born, I., Brandsch, M., Daniel, H., Neubert, K. 2001. A novel inhibitor of the mammalian peptide transporter PEPT1. *Biochemistry* **40**:4454-4458.
- Koepsell, H., Schmitt, B.M., Gorboulev, V. 2003. Organic cation transporters. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **150**:36-90.
- Kowalczuk, S., Bröer, A., Munzinger, M., Tietze, N., Klingel, K., Bröer, S. 2005. Molecular cloning of the mouse IMINO system: an Na⁺- and Cl⁻-dependent proline transporter. *Biochem. J.* **386**:417-422.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., Sonnhammer, E.L. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* **305**:567-580.

- Krogsgaard-Larsen, P., Frolund, B., Frydenvang, K. 2000. GABA uptake inhibitors. Design, molecular pharmacology and therapeutic aspects. *Curr. Pharm. Des.* **6**:1193-1209.
- Loo, D.D., Hazama, A., Supplisson, S., Turk, E., Wright, E.M. 1993. Relaxation kinetics of the Na⁺/glucose cotransporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **90**:5767-5771.
- Luckner, P. und Brandsch, M. 2005. Interaction of 31 β -lactam antibiotics with the H⁺/peptide symporter PEPT2: analysis of affinity constants and comparison with PEPT1. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **59**:17-24.
- Mason, B.J. 2001. Treatment of alcohol-dependent outpatients with acamprosate: a clinical review. *J. Clin. Psychiatry* **62**:42-48.
- Metzner, L. und Brandsch, M. 2006. Influence of a proton gradient on the transport kinetics of the H⁺/amino acid cotransporter PAT1 in Caco-2 cells. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **63**:360-364. (**Anlage 7.2**)
- Metzner, L., Kalbitz, J., Brandsch, M. 2004. Transport of pharmacologically active proline derivatives by the human proton-coupled amino acid transporter hPAT1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **309**:28-35. (**Anlage 7.1**)
- Metzner, L., Kottra, G., Neubert, K., Daniel, H., Brandsch, M. 2005. Serotonin, L-tryptophan, and tryptamine are effective inhibitors of the amino acid transport system PAT1. *FASEB J.* **19**:1468-1473. (**Anlage 7.4**)
- Metzner, L., Natho, K., Zebisch, K., Dorn, M., Bosse-Doenecke, E., Ganapathy, V., Brandsch, M. 2007. Mutational analysis of histidine residues in the human proton-coupled amino acid transporter PAT1. *Biochemical Journal*, eingereicht (**Anlage 7.3**)
- Metzner, L., Neubert, K., Brandsch, M. 2006. Substrate specificity of the amino acid transporter PAT1. *Amino Acids* **31**:111-117. (**Anlage 7.5**)
- Miyauchi, S., Abbot, E.L., Zhuang, L., Subramanian, R., Ganapathy, V., Thwaites, D.T. 2005. Isolation and function of the amino acid transporter PAT1 (slc36a1) from rabbit and discrimination between transport via PAT1 and system IMINO in renal brush-border membrane vesicles. *Mol. Membr. Biol.* **22**:549-559.
- Miles, E.W. 1977. Modification of histidyl residues in proteins by diethylpyrocarbonate. *Methods Enzymol.* **47**:431-442.
- Müller, J., Lips, K.S., Metzner, L., Neubert, R.H., Koepsell, H., Brandsch, M. 2005. Drug specificity and intestinal membrane localization of human organic cation transporters (OCT). *Biochem. Pharmacol.* **70**:1851-1860.
- Munck, B.G. 1966. Amino acid transport by the small intestine of the rat. The existence and specificity of the transport mechanism of imino acids and its relation to the transport of glycine. *Biochim. Biophys. Acta* **120**:97-103.
- Novakova, R., Homerova, D., Kinne, R.K., Kinne-Saffran, E., Lin, J.T. 2001. Identification of a region critically involved in the interaction of phlorizin with the rabbit sodium-D-glucose cotransporter SGLT1. *J. Membr. Biol.* **184**:55-60.
- Olive, M.F. 2002. Interactions between taurine and ethanol in the central nervous system. *Amino Acids* **23**:345-357.
- Olive, M.F., Nannini, M.A., Ou, C.J., Koenig, H.N., Hodge, C.W. 2002. Effects of acute acamprosate and homotaurine on ethanol intake and ethanol-stimulated mesolimbic dopamine release. *Eur. J. Pharmacol.* **437**:55-61.

- Palacin, M., Estevez, R., Bertran, J., Zorzano, A. 1998. Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol. Rev.* **78**:969-1054.
- Patsalos, P.N. 1999. New antiepileptic drugs. *Ann. Clin. Biochem.* **36**:10-19.
- Petroff, O.A., Behar, K.L., Mattson, R.H., Rothman, D.L. 1996. Human brain gamma-aminobutyric acid levels and seizure control following initiation of vigabatrin therapy. *J. Neurochem.* **67**:2399-2404.
- Pinilla-Tenas, J., Barber, A., Lostao, M.P. 2003. Transport of proline and hydroxyproline by the neutral amino-acid exchanger ASCT1. *J. Membr. Biol.* **195**:27-32.
- Poiani, G.J., Greco, M., Choe, J.K., Fox, J.D., Riley, D.J. 1994. Liposome encapsulation improves the effect of antifibrotic agent in rat lung fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **150**:1623-1627.
- Poiani, G.J., Wilson, F.J., Fox, J.D., Sumka, J.M., Peng, B.W., Liao, W.C., Tozzi, C.A., Riley, D.J. 1992. Liposome-entrapped antifibrotic agent prevents collagen accumulation in hypertensive pulmonary arteries of rats. *Circ. Res.* **70**:912-922.
- Quartermain, D., Mower, J., Rafferty, M.F., Herting, R.L., Lanthorn, T.H. 1994. Acute but not chronic activation of the NMDA-coupled glycine receptor with D-cycloserine facilitates learning and retention. *Eur. J. Pharmacol.* **257**:7-12.
- Rajendran, V.M., Barry, J.A., Kleinman, J.G., Ramaswamy, K. 1987. Proton gradient-dependent transport of glycine in rabbit renal brush-border membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* **262**:14974-14977.
- Ranaldi, G., Islam, K., Sambuy, Y. 1994. D-cycloserine uses an active transport mechanism in the human intestinal cell line Caco 2. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:1239-1245.
- Robinson, D.M. und Keating, G.M. 2007. Sodium oxybate: a review of its use in the management of narcolepsy. *CNS Drugs* **21**:337-354.
- Røigaard-Petersen, H., Jacobsen, C., Jessen, H., Møllerup, S., Sheikh, M.I. 1989. Electrogenic uptake of D-imino acids by luminal membrane vesicles from rabbit kidney proximal tubule. *Biochim. Biophys. Acta* **984**:231-237.
- Røigaard-Petersen, H. und Sheikh, M.I. 1984. Renal transport of neutral amino acids. Demonstration of Na⁺-independent and Na⁺-dependent electrogenic uptake of L-proline, hydroxy-L-proline and 5-oxo-L-proline by luminal-membrane vesicles. *Biochem. J.* **220**:25-33.
- Rosenbloom, J. und Prockop, D.J. 1971. Incorporation of cis-hydroxyproline into protocollagen and collagen. Collagen containing cis-hydroxyproline in place of proline and trans-hydroxyproline is not extruded at a normal rate. *J. Biol. Chem.* **246**:1549-1555.
- Rubio-Aliaga, I., Boll, M., Vogt Weisenhorn, D.M., Foltz, M., Kottra, G., Daniel, H. 2004. The proton/amino acid cotransporter PAT2 is expressed in neurons with a different subcellular localization than its paralog PAT1. *J. Biol. Chem.* **279**:2754-2760.
- Sagne, C., Agulhon, C., Ravassard, P., Darmon, M., Hamon, M., El Mestikawy, S., Gasnier, B., Giros, B. 2001. Identification and characterization of a lysosomal transporter for small neutral amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:7206-7211.
- Said, H.M. und Mohammadkhani, R. 1993. Folate transport in intestinal brush border membrane: involvement of essential histidine residue(s). *Biochem. J.* **290**:237-240.
- Scriver, C.R. 1968. Renal tubular transport of proline, hydroxyproline, and glycine. 3. Genetic basis for more than one mode of transport in human kidney. *J. Clin. Invest.* **47**:823-835.

- Scriver, C.R., Efron, M.L., Schafer, I.A. 1964. Renal tubular transport of proline, hydroxyproline, and glycine in health and in familial hyperprolinemia. *J. Clin. Invest.* **43**:374-385.
- Steffansen, B., Nielsen, C.U., Brodin, B., Eriksson, A.H., Andersen, R., Frokjaer, S. 2004. Intestinal solute carriers: an overview of trends and strategies for improving oral drug absorption. *Eur. J. Pharm. Sci.* **21**:3-16.
- Stevens, B.R. 1992. Vertebrate intestine apical membrane mechanisms of organic nutrient transport. *Am. J. Physiol.* **263**:R458-R463.
- Stevens, B.R., Ross, H.J., Wright, E.M. 1982. Multiple transport pathways for neutral amino acids in rabbit jejunal brush border vesicles. *J. Membr. Biol.* **66**:213-225.
- Stevens, B.R. und Wright, E.M. 1985. Substrate specificity of the intestinal brush-border proline/sodium (IMINO) transporter. *J. Membr. Biol.* **87**:27-34.
- Stevens, B.R. und Wright, E.M. 1987. Kinetics of the intestinal brush border proline (Imino) carrier. *J. Biol. Chem.* **262**:6546-6551.
- Takanaga, H., Mackenzie, B., Suzuki, Y., Hediger, M.A. 2005. Identification of mammalian proline transporter SIT1 (SLC6A20) with characteristics of classical system imino. *J. Biol. Chem.* **280**:8974-8984.
- Takanaga, H., Tokuda, N., Ohtsuki, S., Hosoya, K., Terasaki, T. 2002. ATA2 is predominantly expressed as system A at the blood-brain barrier and acts as brain-to-blood efflux transport for L-proline. *Mol. Pharmacol.* **61**:1289-1296.
- Takeuchi, T. und Prockop, D.J. 1969. Biosynthesis of abnormal collagens with amino acid analogues. I. Incorporation of L-azetidine-2-carboxylic acid and cis-4-fluoro-L-proline into protocollagen and collagen. *Biochim. Biophys. Acta* **175**:142-155.
- Tan, E.M.L., Ryhänen, L., Uitto, J. 1983. Proline analogues inhibit human skin fibroblast growth and collagen production in culture. *J. Invest. Dermatol.* **80**:261-267.
- Tanaka, A., Nishida, R., Yokoi, H., Kuwahara, T. 2000. The characteristic pattern of aminoaciduria in patients with aristolochic-acid-induced Fanconi syndrome: could iminoaciduria be the hallmark of this syndrome? *Clin. Nephrol.* **54**:198-202.
- Thwaites, D.T. und Anderson, C.M. 2006. Deciphering the mechanisms of intestinal imino (and amino) acid transport: the redemption of SLC36A1. *Biochim. Biophys. Acta* **1768**:179-197.
- Thwaites, D.T. und Anderson, C.M. 2007. H⁺-coupled nutrient, micronutrient and drug transporters in the mammalian small intestine. *Exp. Physiol.* **92**:603-619.
- Thwaites, D.T., Basterfield, L., McCleave, P.M.J., Carter, S.M., Simmons, N.L. 2000. Gamma-aminobutyric acid (GABA) transport across human intestinal epithelial (Caco-2) cell monolayers. *Br. J. Pharmacol.* **129**:457-464.
- Thwaites, D.T., McEwan, G.T.A., Brown, C.D.A., Hirst, B.H., Simmons, N.L. 1993a. Na⁺-independent, H⁺-coupled transepithelial β-alanine absorption by human intestinal Caco-2 cell monolayers. *J. Biol. Chem.* **268**:18438-18441.
- Thwaites, D.T., McEwan, G.T., Brown, C.D., Hirst, B.H., Simmons, N.L. 1994. L-alanine absorption in human intestinal Caco-2 cells driven by the proton electrochemical gradient. *J. Membr. Biol.* **140**:143-151.

- Thwaites, D.T., McEwan, G.T.A., Cook, M.J., Hirst, B.H., Simmons, N.L. 1993b. H⁺-coupled (Na⁺-independent) proline transport in human intestinal (Caco-2) epithelial cell monolayers. *FEBS Lett.* **333**:78-82.
- Thwaites, D.T., McEwan, G.T.A., Hirst, B.H., Simmons, N.L. 1995a. H⁺-coupled α -methylaminobutyric acid transport in human intestinal Caco-2 cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1234**:111-118.
- Thwaites, D.T., Mc Ewan, G.T., Simmons, N.L. 1995b. The role of the electrochemical gradient in the transepithelial absorption of amino acids by human intestinal Caco-2 cell monolayers. *J. Membr. Biol.* **145**:254-256.
- Thwaites, D.T. und Stevens, B.C. 1999. H⁺-zwitterionic amino acid symport at the brush-border membrane of human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Exp. Physiol.* **84**:275-284.
- Tsuda, M., Terada, T., Asaka, J., Ueba, M., Katsura, T., Inui, K. 2007. Oppositely directed H⁺ gradient functions as a driving force of rat H⁺/organic cation antiporter MATE1. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **292**:F593-F598.
- Tunnicliff, G. 1992. Significance of γ -hydroxybutyric acid in the brain. *Gen. Pharmacol.* **23**:1027-1034.
- Uitto, J., Hoffman, H., Prockop, D.J. 1975. Retention of nonhelical procollagen containing cis-hydroxyproline in rough endoplasmic reticulum. *Science* **190**:1202-1204.
- Uitto, J., Ryhänen, L., Tan, E.M.L., Oikarinen, A.I., Zaragoza, E.J. 1984. Pharmacological inhibition of excessive collagen deposition in fibrotic diseases. *Fed. Proc.* **43**:2815-2820.
- Urdaneta, E., Barber, A., Wright, E.M., Lostao, M.P. 1998. Functional expression of the rabbit intestinal Na⁺/L-proline cotransporter (IMINO system) in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Physiol. Biochem.* **54**:155-160.
- Wagner, C.A., Lang, F., Bröer, S. 2001. Function and structure of heterodimeric amino acid transporters. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **281**:C1077-C1093.
- Walmsley, A.R., Batten, M.R., Lad, U., Bulleid, N.J. 1999. Intracellular retention of procollagen within the endoplasmic reticulum is mediated by prolyl 4-hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **274**:14884-14892.
- Wong, C.G., Bottiglieri, T., Snead, O.C. 3rd. 2003. GABA, gamma-hydroxybutyric acid, and neurological disease. *Ann. Neurol.* **54**:S3-S12.
- Yoo, J.S., Sakamoto, T., Spee, C., Kimura, H., Harris, M.S., Hinton, D.R., Kay, E.P., Ryan, S.J. 1997. cis-Hydroxyproline inhibits proliferation, collagen synthesis, attachment, and migration of cultured bovine retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **38**:520-528.
- Young, G.B., Jack, D.L., Smith, D.W., Saier, M.H. 1999. The amino acid/auxin:proton symport permease family. *Biochim. Biophys. Acta* **1415**:306-322.

7 ANLAGEN

- 7.1 Transport of pharmacologically active proline derivatives by the human proton-coupled amino acid transporter hPAT1
Metzner, L., Kalbitz, J., Brandsch, M.
Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 309, 28-35, 200450
(enthält Ergebnisse der Diplomarbeit und Dissertation)
- 7.2 Influence of a proton gradient on the transport kinetics of the H⁺/amino acid cotransporter PAT1 in Caco-2 cells
Metzner, L. und Brandsch, M.
European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 63, 360-364, 200658
- 7.3 Mutational analysis of histidine residues in the human proton-coupled amino acid transporter PAT1
Metzner, L., Natho, K., Zebisch, K., Dorn, M., Bosse-Doenecke, E., Ganapathy, V., Brandsch, M.
Biochemical Journal, eingereicht64
- 7.4 Serotonin, L-tryptophan, and tryptamine are effective inhibitors of the human amino acid transport system PAT1
Metzner, L., Kottra, G., Neubert, K., Daniel, H., Brandsch, M.
FASEB Journal 19, 1468-1473, 200590
- 7.5 Substrate specificity of the amino acid transporter PAT1
Metzner, L., Neubert, K., Brandsch, M.
Amino Acids 31, 111-117, 200696

DANKSAGUNG

Mein großer Dank gilt in erster Linie meinem Betreuer PD Dr. Matthias Brandsch. Er ermöglichte mir diese Arbeit, schenkte meinen Ideen immer große Aufmerksamkeit und gab mir in vielen lehrreichen, motivierenden und begeisternden Diskussionen neue Denkansätze. Seine allzeitige Unterstützung und sein Vertrauen formten mich bei meinem wissenschaftlichen Werdegang wesentlich.

Sehr dankbar bin ich Prof. Dr. B. Diettrich für die Bereitstellung der Haushaltsstelle und die Schaffung von Freiräumen, die ich zur Fertigstellung dieser Arbeit benötigte.

Herzlich danke ich Prof. Dr. Klaus Neubert für die Synthese potentieller PAT1-Substrate bzw. Inhibitoren und seinem aufmerksamen Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Danken möchte ich den Koautoren der beiliegenden Publikationen für ihre Mitarbeit.

Für viele schöne, fröhliche Stunden, nicht nur im Labor, danke ich sehr der Arbeitsgruppe Membrantransport und ganz besonders Dr. Johanna Förster und Wiebke Fischer.

Von ganzem Herzen danke ich meinen lieben Eltern und meinem Bruder für die mir geschenkte Liebe, Geborgenheit, Geduld und all die Zeit, in der sie immer für mich da waren.

Meinem Freund Roderich danke ich sehr, dass er die Zeit dieser Arbeit mit Liebe und auch Tapferkeit hier in Halle mit mir verbracht hat.

LEBENS LAUF

Name	Linda Metzner
Geboren	26. März 1979 in Halle/Saale
Staatsangehörigkeit	Bundesrepublik Deutschland
Familienstand	ledig
Wohnsitz	Lessingstraße 44, 06114 Halle/Saale
Abitur	05/1997, Thomas-Müntzer-Gymnasium, Halle/Saale
Berufsausbildung	
1997 - 1998	Pharmazeutisch-Technische Assistentin (Abbruch durch Studienantritt) Berufsbildende Schulen V, Halle/Saale
Studium	
10/1998 – 09/2002	Pharmazie, Fachbereich Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
08/2000	1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
09/2002	2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
11/2003	3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
05/2003 – 10/2003	Praktische Ausbildung (Pharmaziepraktikantin) in der „Neue Apotheke“, Halle/Saale
10/2002 – 04/2003	Diplom Biozentrum und Fachbereich Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg „Der intestinale protonen-abhängige Aminosäuretransporter hPAT1: Mechanismus, Substratspezifität und Transport therapeutisch relevanter Prolinderivate“
Berufliche Stationen	
11/2003 - 09/2007	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Halle/Saale, 13. August 2007

Linda Metzner