

Folker Spitzenberger
Dr. sc. hum.

Strukturaufklärung und Charakterisierung neuartiger, membrangebundener Transportsysteme

Geboren am 18.01.1970 in Hildesheim
Reifeprüfung am 29.05.1989 in Hildesheim
Studiengang der Fachrichtung Chemie vom WS 1989/90 bis WS 1994/95
Vordiplom am 24.10.1991 an der Universität Hannover
Diplom am 25.10.1994 an der Universität Hannover

Promotionsfach: Pharmakologie
Doktorvater: Prof. Dr. med. E. Schömig

Die Niere enthält zahlreiche membranständige Transportproteine, die an der Translokation verschiedenster polarer Substanzen beteiligt sind, zu denen organische Kationen und Anionen zählen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte auf der Grundlage von Sequenzdaten der molekular aufgeklärten Transporter für organische Kationen OCT1 und OCT2 die Strukturaufklärung und Charakterisierung neuartiger, putativer Transportproteine, deren cDNA-Baupläne aus renalem Gewebe von Mensch und Ratte isoliert wurden.

Einleitend führte eine Recherche der TIGR Humanen cDNA-Datenbank zur Identifizierung eines EST-Abschnittes, der aufgrund signifikanter Homologie zu OCT2 als Fragment des cDNA-Bauplans eines korrespondierenden, humanen Transportsystems aufgefaßt wurde. Nach dem Prinzip der spezifischen Nukleinsäurehybridisierung wurde eine cDNA-Bibliothek aus Caki-1-Zellen (humane, renale Adenokarzinomzellen) auf die komplette Nukleotidsequenz hin durchmustert. Die isolierte cDNA (2192 bp) enthält den vollständigen kodierenden Bereich eines Proteins, das 551 Aminosäuren umfaßt („UT2h“). Die neugewonnene Sequenzinformation wurde benutzt, um mit Hilfe degenerierter Konsensusprimer in der Polymerase-Kettenreaktion einen homologen cDNA-Abschnitt aus der Rattenniere zu amplifizieren. Die Klonierung aus Rattengewebe diente einer umfassenderen Charakterisierung des Gens, beispielsweise der Gewebeverteilung. In Analogie zur UT2h-Klonierung gelang die Isolierung einer cDNA-Sequenz, deren Leserahmen allerdings etwa 10% des gesamten, voraussichtlichen Translationsbereichs des Klons fehlten. Dieser wurde mit Hilfe der Inversen PCR gewonnen. Der vollständige Klon (3029 bp) enthält den kodierenden Bereich eines Proteins, das 557 Aminosäuren umfaßt („UT2r“). UT2h und UT2r sind streng homolog, – wahrscheinlich ortholog. Die Identität bzw. Ähnlichkeit auf Proteinebene beträgt 74 bzw. 87%.

Aus der Hydropathie-Analyse resultierte, daß UT2h und UT2r als integrale Membranproteine mit 12 Transmembrandomänen anzusehen sind. Diese Charakteristik weist auf eine Transportfunktion der Proteine hin, die durch eine Datenbankrecherche der Sequenzen gestützt wird. Es zeigt sich eine signifikante Homologie zu renalen Transportproteinen für organische Kationen (OCT1, OCT2) bzw. Anionen (OAT1) sowie zu einem hepatischen Membranprotein der Ratte (NLT). Die Sequenzanalyse gestattet eine Einordnung von UT2h und UT2r in die Superfamilie der Uni-, H⁺-Sym- und Antiporter (MFS), wie sie von Marger und Saier (1993) definiert wurde.

UT2r-mRNA zeigte ubiquitäre Verteilung mit deutlichen Expressionsstärken in Niere und Hoden. Dieses Muster der Gewebeverteilung besteht bisher in keinem der zu UT2 homologen, renalen Transportproteine und eröffnet potentielle organübergreifende Zusammenhänge in dieser Transportergruppe.

Die funktionelle Untersuchung von UT2h und UT2r ergab bei transienter Transfektion von HEK 293-Zellen bisher keine Hinweise auf einen Transport für eine Reihe organischer Kationen und Anionen, zu denen klassische Substrate wie Tetraethylammonium, N-Methylphenylpyridinium bzw. p-Aminohippurat und Urat zählen. Der Versuch der konstitutiven Überexpression der Proteine erwies sich für das Wirtssystem als lethal.

Eine Vertiefung des funktionellen und regulativen Verständnisses über UT2h und UT2r ist zukünftig an eine Modifizierung bzw. Weiterentwicklung der bisher untersuchten Parameter zur Genexpression und Gewebelokalisation geknüpft.