

Cornelius Honold

Dr. med.

Strukturaufklärung und Charakterisierung zweier neuer, membranständiger Transportsysteme aus der Amphiphilic-Solute-Facilitator-Familie

Geboren am 21.12.1973 in Liestal / Schweiz

Reifeprüfung am 17.05.1993 in Rheinfelden/Baden

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1994/95 bis WS 2001/2002

Physikum am 09.09.1996 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Heidelberg und Aarau, Schweiz

Staatsexamen am 05.12.2001 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Pharmakologie

Doktorvater: Prof. Dr. med. E. Schömig

Verschiedene membranständige Transportproteine wurden in den letzten Jahren in ihrer molekularen Struktur aufgeklärt. Darunter fallen auch die Transporter, die an der Translokation verschiedenster polarer Substanzen wie organische Kationen und Anionen beteiligt sind.

Im Rahmen dieser Arbeit gelang die molekulare Strukturaufklärung und Charakterisierung zweier neuer Transportproteine aus der Rattenleber.

Ausgehend von konservierten Sequenzabschnitten innerhalb der ASF-Transporterfamilie konnten zwei cDNA-Baupläne durch das Durchsuchen einer cDNA-Bibliothek aus Rattenleber mit Hilfe degenerierter Oligonukleotide und der Verwendung der so klonierten cDNA-Teilstücke als Sonde in einem sich anschließenden Nukleinsäurehybridisierungsprozeß isoliert werden. Fehlende Sequenzinformation am 5'- und 3'-Ende wurde mittels Inverser PCR erhalten. Die isolierten cDNA-Sequenzen (1913 bp bzw. 2079 bp) enthalten je einen vollständigen, für ein Protein von 552 Aminosäuren Länge

kodierenden offenen Leserahmen. Die Proteine erhielten die Namen UST4r bzw. UST5r (unspecified substrate transporter).

Aufgrund der Hydropathie-Analyse, die für beide Proteine 12 Transmembransegmente vorschlägt, und vorhandenen Aminosäuresequenzen, die nur innerhalb der Transporter-superfamilie MFS bzw. der ASF-Transporterfamilie zu finden sind, sind UST4r und UST5r als integrale Membranproteine mit Transportfunktion aufzufassen.

Sie zeigen eine signifikante Homologie zu den Transportern für organische Anionen (OAT1, OAT3, NLT), organische Kationen (OCT1, OCT2, EMT) und weiteren putativen Transportproteinen mit bisher unbekanntem Substratspektrum (RST, UST1). Innerhalb der ASF-Familie bilden die Transportproteine UST4 und UST5 zusammen mit UST1, UST3 und UST6 eine distinkte Gruppe. Diese UST-Gruppe kann als Subfamilie innerhalb der ASF-Familie aufgefaßt werden.

Bei der Analyse der Expression der beiden Gene konnte eine ubiquitäre Verteilung bei quantitativ größter Bedeutung in der Leber gefunden werden.

Mit der reproduzierbaren Messung einer um den Faktor zwei erhöhten initialen Biotin-Effluxrate aus mit der UST5r-cDNA stabil transfizierten HEK 293-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen ohne UST5r-Expression gelang in dieser Arbeit der Einstieg in die funktionelle Charakterisierung. Ob es sich bei UST5r um einen weiteren Biotin-Transporter handelt, oder Biotin nur Ausgangsstruktur für weitere Substrate mit höherer Transporteraffinität ist, blieb bisher ungeklärt.

Erste Versuche, das erweiterte Substratspektrum von UST5r durch die alternative Detektion der Testsubstanzen mittels Massenspektrometrie zu charakterisieren, führten zu einigen diskreten, aber wegen mangelnder Reproduzierbarkeit nicht aussagekräftigen Befunden.

Eine Vertiefung des funktionellen Verständnisses über UST5r und damit die gesamte UST-Subfamilie ist in der Zukunft an eine Weiterentwicklung und Modifizierung der Inkubationsexperimente der Zellkulturen und der Untersuchungen zur zellulären Lokalisation geknüpft.