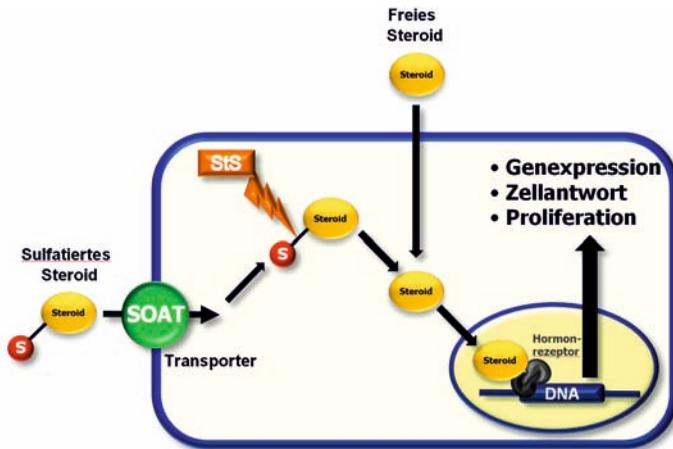


Membrantransporter für sulfatierte Steroidhormone im Hoden:

Die Bedeutung des Sodium-dependent Organic Anion Transporters (SOAT) im Reproduktionsgeschehen

Katharina Bakhaus



INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin der

Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2015

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Joachim Geyer

Membrantransporter für sulfatierte Steroidhormone
im Hoden:

Die Bedeutung des Natrium-dependent Organic Anion
Transporters (SOAT) im Reproduktionsgeschehen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Katharina Bakhaus

Tierärztin aus Attendorn

Gießen 2014

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M.Kramer

1. Gutachter: Prof. Dr. J. M. Geyer

2. Gutachter: Prof. Dr. G. Schuler

Tag der Disputation: 21. August 2014

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation

**„Membrantransporter für sulfatierte Steroidhormone
im Hoden:**

**Die Bedeutung des Natrium-dependent Organic Anion Transporters (SOAT) im
Reproduktionsgeschehen“**

selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen.

.....

Katharina Bakhaus

Publikationen und Kongressbeiträge

Paper

Fietz D[#], Bakhaus K[#], Wapelhorst B, Grosser G, Günther S, Alber J, Döring B, Kliesch S, Weidner W, Galuska CE, Hartmann MF, Wudy SA, Bergmann M, Geyer J (2013) Membrane transporters for sulfated steroids in the human testis – Cellular localization, expression pattern and functional analysis, PLoS One 8(5): e62638.

[#]beide Autoren trugen gleichermaßen zu der Studie bei (both authors contributed equally to the study)

Grosser G, Fietz D, Günther S, Bakhaus K, Schweigmann H, Ugele B, Petzinger E, Bergmann M, Geyer J (2013) Cloning and functional characterization of the mouse sodium – dependent organic anion transporter Soat (Slc10a6). J. Steroid Biochem.Mol.Bio. 138:90-99.

Galuska CE, Hartmann MF, Sanchez-Guijo A, Bakhaus K, Geyer J, Schuler G, Zimmer KP, Wudy SA (2013) Profiling intact steroid sulfates and unconjugated steroids in biological fluids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS), Analyst. 138:3792-3801.

Kongressbeiträge

Bakhaus K, Wapelhorst B, Döring B, Bergmann M, Geyer J (2011) Membrane transporters for sulfated steroid hormones in the testis - gatekeepers of the sulfatase pathway. Posterpräsentation auf der 4. Jahreskonferenz des *International Giessen Graduate Centre for the Life Sciences* (GGL), Gießen, 21.-22. September 2011.

Bakhaus K, Wapelhorst B, Fietz D, Döring B, Kliesch S, Galuska C E, Hartmann M F, Wudy S A, Bergmann M, Geyer J (2012) Localisation and functional characterisation of membrane transporters for sulfated steroids in the human testis. Posterpräsentation auf dem 55. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Mannheim, 07.-10. März 2012.

Bakhaus K, Wapelhorst B, Fietz D, Döring B, Kliesch S, Galuska C E, Hartmann M F, Wudy SA, Bergmann M, Geyer J (2012) Localisation and functional characterisation of membrane transporters for sulfated steroid hormones in the human testis. Posterpräsentation auf der 78. Jahreskonferenz der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie Dresden, 19.-22. März 2012. Abstract in Naunyn-Schmiedeberger's Arch Pharmacol 385 (1):7.

Bakhaus K, Wapelhorst B, Fietz D, Döring B, Kliesch S, Galuska C E, Hartmann M F, Wudy SA, Bergmann M, Geyer J (2012) Localisation and functional characterisation of membrane transporters for sulfated steroid hormones in the human testis. Posterpräsentation auf dem 8. Transportkolloquium, Schloss Rauischholzhausen Rauischholzhausen, 17.-18. Mai 2012.

Bakhaus K, Wapelhorst B, Fietz D, Döring B, Kliesch S, Galuska C E, Hartmann M F, Wudy S A, Bergmann M, Geyer J (2012) Localisation and functional characterisation of membrane transporters for sulfated steroid hormones in the human testis. Vortrag auf dem 22. VETPHARM Symposium, Wien, 13.-14. September 2012.

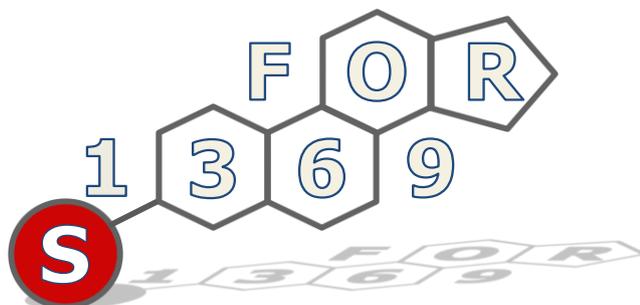
Bakhaus K, Wapelhorst B, Fietz D, Döring B, Kliesch S, Galuska C G, Hartmann M F, Wudy S A, Bergmann M, Geyer J (2012) Localisation and functional characterisation of membrane transporters for sulfated steroid hormones in the human testis. Vortrag auf der 5. Jahreskonferenz des *International Giessen Graduate Centre for the Life Sciences (GGL)*, Gießen, 18.-19 September 2012.

Bakhaus K, Fietz D, Wapelhorst B, Kliesch S, Galuska CE, Hartmann MF, Sanchez Guijo A, Wudy SA, Bergmann M, Geyer J (2013) SOAT – a steroid sulfate carrier playing a role for male reproduction? Posterpräsentation auf der 6 Jahreskonferenz des *International Giessen Graduate Centre for the Life Sciences (GGL)*, Gießen, 21.-22. September 2013.

Bakhaus K, Fietz D, Wapelhorst B, Kliesch S, Hartmann MF, Sanchez Guijo A, Wudy SA, Bergmann M, Geyer J (2014) SOAT – a steroid sulfate carrier playing a role for male reproduction? Posterpräsentation auf dem 9. Transportkolloquium, Schloss Rauischholzhausen, Rauischholzhausen, 08.-09. Mai 2014.

Förderung

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Projekts 2 der Forschergruppe FOR1369 „Sulfated Steroids in Reproduction“ angefertigt.



Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungen	X
1 Einleitung	1
1.1 Allgemeine Endokrinologie	1
1.1.1 Einteilung der Hormone	1
1.1.2 Wirkungsmechanismen der Hormone	3
1.2 Steroidhormone.....	4
1.2.1 Sexualhormone mit Steroidgerüst	4
1.2.2 Synthese der Steroidhormone	5
1.3 Der Hoden als Steroidhormon-synthetisierendes Organ.....	9
1.3.1 Anatomie des Hodens	9
1.3.1.1 Die Leydigzellen	10
1.3.1.2 Androgene und östrogene Wirkungen	12
1.3.1.3 Die Sertolizellen	13
1.3.1.4 Die Keimzellen	14
1.3.2 Die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse.....	18
1.3.2.1 Wirkung des GnRH	19
1.3.2.2 Wirkung der Gonadotropine LH und FSH.....	21
1.4 Die Haut als Steroidhormon-synthetisierendes Organ	22
1.4.1 Anatomie der Haut.....	22
1.4.2 Steroide in der Haut	24
1.5 Sulfatierte Steroidhormone.....	26
1.5.1 Die Steroidsulfatase.....	28
1.5.2 Die Steroidsulfotransferasen	30
1.6 Membrantransport.....	31
1.6.1 Aufnahme von sulfatierten Steroidhormonen in die Zielzelle	33
1.7 Kandidatentransporter für die Aufnahme sulfatierter Steroide im Hoden	34
1.7.1 Die OATP-Superfamilie	35
1.7.1.1 OATP6A1	37
1.7.1.2 OATP1C1.....	38
1.7.2 Das Organic Solute Carrier Protein 1	40
1.7.3 Die SLC10-Familie.....	41
1.7.3.1 Der humane Natrium-dependent Organic Anion Transporter (SOAT/SLC10A6)	41
1.7.3.2 Der murine Natrium-dependent Organic Anion Transporter (mSoat)	43
1.7.3.3 Weitere Mitglieder der SLC10-Familie.....	43
1.8 Zielsetzung der Arbeit	44
2 Material	46
2.1 Material für die molekularbiologischen Arbeiten	46
2.1.1 Primer	46
2.1.2 Enzyme	47
2.1.2.1 Hitzebeständige DNA-Polymerasen	47
2.1.2.2 Reverse Transkriptase.....	48
2.1.3 Restriktionsenzyme	48
2.1.4 Sonstige Enzyme	49
2.1.5 Sonstiges Material	49

2.2	Vektoren.....	50
2.2.1	pcDNA5/FRT/TO-TOPO Vector.....	50
2.2.2	pcDNA5/FRT/V5His-TOPO Vector.....	50
2.2.3	pOG44.....	51
2.2.4	pcDNA9.....	51
2.3	Bakterienstämme.....	52
2.4	Kommerziell erhältliche cDNA-Panels (BioCat GmbH, Heidelberg).....	53
2.5	Quantitative Real Time-PCR.....	54
2.5.1	TaqMan Gene Expression Assays.....	54
2.5.2	TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG.....	54
2.6	Längenstandards.....	55
2.7	Kommerziell erhältliche Kits und Materialien für die Molekularbiologie.....	55
2.8	Puffer und Medien.....	55
2.9	Native Gelelektrophorese.....	56
2.10	Zellkultur.....	57
2.10.1	Zelllinien.....	57
2.10.1.1	Flip-In T-Rex 293 Zellen.....	57
2.10.1.2	GripTite 293 MSR Zellen.....	57
2.10.2	Medien.....	58
2.10.3	Antibiotika.....	59
2.10.4	Stabile und transiente Transfektion.....	59
2.10.4.1	Transfektionsreagenzien.....	59
2.10.4.2	Medien zur Transfektion.....	59
2.11	Transportmessungen an eukaryotischen Zellen.....	60
2.11.1	Puffer und Lösungen.....	60
2.11.2	Proteinbestimmung.....	61
2.12	Heterologe Expression in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	61
2.12.1	Versuchstiere.....	61
2.12.2	Puffer und Lösungen für Transportmessungen an Oozyten.....	61
2.13	Immunfluoreszenz.....	62
2.13.1	Puffer und Lösungen für Immunfluoreszenz an eukaryotischen Zellen.....	62
2.14	Proteinanalyse.....	63
2.14.1	Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Proteine).....	63
2.14.2	Puffer und Lösungen für die Western Blot Analyse.....	64
2.14.3	Filmentwicklung.....	65
2.14.4	Kommerziell erhältliche Kits und Materialien (für die Proteinanalyse).....	65
2.14.5	Längenstandards.....	65
2.14.6	Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe.....	66
2.15	Genotypisierung der Slc10a6-Knockout-Maus.....	67
2.16	Chemische Substanzen.....	67
2.17	Radioaktiv-markierte Substanzen.....	70
2.18	Geräte.....	70
2.19	Verbrauchsmaterialien.....	73
2.19.1	Zellkultur.....	73
2.19.2	Proteinnachweis.....	74
2.19.3	Molekularbiologie.....	74
2.19.4	Allgemeine Verbrauchsmaterialien.....	74
2.20	Bioinformatische Programme und Datenbanken.....	75
3	Methoden.....	77
3.1	Allgemeine Methoden in der Molekularbiologie.....	77
3.1.1	DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung.....	77

3.1.2	Native Agarose-Gelelektrophorese.....	77
3.1.3	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	78
3.1.4	Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA	78
3.1.5	Aufreinigung von Plasmid-DNA im Mini-Maßstab	79
3.1.6	Aufreinigung von Plasmid-DNA im Midi-Maßstab	80
3.2	Methoden zur Isolierung und Aufarbeitung von RNA.....	81
3.2.1	Total-RNA Isolierung aus Zellen.....	81
3.2.2	cDNA-Synthese aus Total-RNA.....	82
3.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	83
3.3.1	Allgemeine Regeln zur Primerauswahl.....	83
3.3.2	Besonderheiten bei der Auswahl von Klonierungsprimern.....	84
3.3.3	PCR-Reaktionsansatz	84
3.3.4	Touchdown-PCR	86
3.3.5	Kolonie-PCR	87
3.3.6	PCR zur Generierungen von 3'-A-Überhängen	88
3.3.7	Zielgerichtete Mutagenese	88
3.3.8	Quantitative Real-Time PCR	90
3.4	DNA-Klonierung	94
3.4.1	TOPO-Klonierung	95
3.4.2	Transformation.....	95
3.4.3	Sequenzierung und Auswertung der Sequenzspuren	96
3.5	Heterologe Expression in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	96
3.5.1	cRNA-Synthese	97
3.5.2	Oozytengewinnung	99
3.5.3	Mikroinjektion der cRNA	100
3.5.4	Transportmessungen an Oozyten	100
3.6	Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	101
3.6.1	Passagieren und Aussäen der Zellen.....	101
3.6.2	Kryokonservierung der Zellen.....	102
3.6.3	Auftauen der Zellen	102
3.7	Transfektion eukaryotischer Zellen.....	103
3.7.1	Transiente Transfektion	103
3.7.2	Stabile Transfektion	104
3.7.3	Tetrazyklin-regulierte Proteinexpression	106
3.8	Transportmessung an eukaryotischen Zellen mit radioaktiv- markierten Substanzen	107
3.8.1	Ansetzen der Messlösung und Vorbereitung der Zellen	108
3.8.2	Aufnahmemessung.....	108
3.8.3	Flüssigszintillationsmessung	109
3.8.4	Proteinbestimmung.....	109
3.8.5	Auswertung der Aufnahmeversuche	109
3.9	Transportmessung an eukaryotischen Zellen mittels Flüssigkeitschromatographie- Tandemmassenspektrometrie	110
3.9.1	Ansetzen der Messlösungen und Vorbereitung der Zellen	110
3.9.2	Aufnahmemessung.....	111
3.9.3	Proteinbestimmung.....	111
3.9.4	Flüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS).....	111
3.9.5	Auswertung der Aufnahmeversuche	112
3.10	Immunfluoreszenz.....	112
3.10.1	Herstellung des SOAT ₃₁₁₋₃₇₇ -Antikörpers.....	112
3.10.2	Indirekte Immunfluoreszenz mit dem SOAT ₃₁₁₋₃₇₇ -Antikörper	114
3.10.3	Indirekte Immunfluoreszenz mit dem Maus anti-V5-Antikörper.....	115
3.10.4	Indirekte Immunfluoreszenz mit dem SOAT ₂₋₁₇ -Antiserum.....	115
3.10.5	Bestimmung der indirekten Fluoreszenz im Photometer.....	116
3.10.6	Mikroskopie.....	116
3.11	Western Blot	116

3.11.1	Proteinextraktion	117
3.11.2	Proteinextraktion mit RIPA-Puffer.....	117
3.11.3	Proteinextraktion mit <i>Proteo Extract Native Membrane Protein Extraction Kit</i>	118
3.11.4	Proteinbestimmung mittels BCA Protein Assay Kit	118
3.11.5	Gellauf und Blotting	119
3.11.6	Absättigung und Antikörper-Inkubation der Membran.....	121
3.11.7	Detektion.....	122
3.11.8	Densitometrische Auswertung der Western Blot Analyse	123
3.12	Die <i>Slc10a6</i> -Knockout-Maus	123
3.12.1	Generierung der <i>Slc10a6</i> -Knockout-Maus	123
3.12.2	Rückkreuzung der <i>Slc10a6</i> -Knockout-Maus auf ihren genetischen Hintergrund.....	125
3.12.3	Genotypisierung der <i>Slc10a6</i> -Knockout-Maus	126
3.12.4	Speed congenics	128
3.12.5	Anpaarung der heterozygoten <i>Slc10a6</i> -Knockout-Maus.....	129
4	Ergebnisse	130
4.1	Quantitative Real-Time-PCR der ausgewählten Carrier in verschiedenen humanen Geweben.....	130
4.1.1	Validierung der ausgewählten Gene Expression Assays	130
4.1.2	Erstellen von Expressionsprofilen für SOAT, OATP6A1, OATP1C1 und OSCP1 in verschiedenen Geweben mittels quantitativer Real-Time PCR	133
4.2	Funktionelle Charakterisierung der Transportproteine	136
4.2.1	Funktionelle Charakterisierung der Transportproteine im transient transfizierten Zellkulturmodell.....	136
4.3	Generierung und funktionelle Charakterisierung der stabil transfizierten OATP6A1-, OATP1C1- und OSCP1-HEK293 Zelllinien	138
4.3.1	Etablierung der stabilen OATP6A1-, OATP1C1- und OSCP1-Zelllinien	138
4.3.2	Funktionelle Charakterisierung der OATP6A1-, OATP1C1- und OSCP1-Zelllinien.....	140
4.3.2.1	OATP6A1	141
4.3.2.2	OSCP1	142
4.3.2.3	OATP1C1.....	143
4.3.3	Immunfluoreszenz der OATP6A1-, OATP1C1- und OSCP1-Zelllinien	143
4.3.3.1	Immunfluoreszenz der OATP6A1-V5His-HEK293 Zelllinie	143
4.3.3.2	Immunfluoreszenz der OSCP1-V5His-HEK293 Zelllinie	144
4.3.3.3	Immunfluoreszenz der OATP1C1-V5His-HEK293 Zelllinie	145
4.4	Heterologe Expression in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	145
4.5	Funktionelle Charakterisierung des SOATs.....	147
4.5.1	Messung intakter sulfatierter Steroidmoleküle aus Zelllysaten mittels LC-MS/MS und Vergleich mit der Flüssigszintillationsmessung	147
4.5.2	Erweiterung des Substratspektrums des SOAT	150
4.5.3	Einfluss der im fötalen Kälberserum (FKS) enthaltenen Steroide auf die Aufnahme von DHEAS durch SOAT.....	151
4.5.4	Transportversuche mit Steroidgemischen	152
4.6	Nachweis des SOAT-Proteins mit dem Antikörper anti-SOAT ₃₁₁₋₃₇₇	157
4.6.1	Western Blot Analyse der SOAT-HEK293-Zellen mit dem anti-SOAT ₃₁₁₋₃₇₇ -Antikörper ...	157
4.6.2	Vergleich des Präimmunserums und des Serums des immunisierten Kaninchens mit dem aufgereinigten Antikörper anti-SOAT ₃₁₁₋₃₇₇	159
4.6.3	Peptidblockierung des Antikörpers anti-SOAT ₃₁₁₋₃₇₇	161
4.6.4	Nachweis des SOAT-Proteins mittels Immunfluoreszenz unter Verwendung des Antikörpers anti-SOAT ₃₁₁₋₃₇₇	161
4.7	Polymorphismen des <i>SLC10A6</i> -Gens	162
4.7.1	Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit des SOAT-V5His-Transportes.....	165
4.7.2	Konzentrationsabhängige Aufnahme von DHEAS in verschiedene SOAT-Varianten	165
4.7.3	Vergleich der kinetischen Parameter V_{max} und K_m	167
4.7.4	Western Blot Analyse der stabil transfizierten SOAT-Polymorphismen.....	169
4.7.5	Vergleichende Immunfluoreszenz der stabil transfizierten SOAT-Polymorphismen.....	170

4.7.6	Vergleich der Membranlokalisierung der SOAT-Polymorphismen mit Hilfe der Immunfluoreszenz	171
4.8	<i>Slc10a6</i> -Knockout-Maus	174
4.8.1	Rückkreuzung der <i>Slc10a6</i> -Knockout-Maus	174
4.8.2	Anpaarung der heterozygoten Knockout-Maus	174
5	Diskussion	177
5.1	OATP6A1, OATP1C1, OSCP1 und SOAT – Membrantransporter für sulfatierte Steroide im Hoden?	177
5.1.1	Expression	178
5.1.2	Transport der Kandidatencarrier	180
5.1.2.1	Der OSCP1, ein Transportprotein oder nur ein Transporthilfsprotein?	180
5.1.2.2	Der OATP6A1	185
5.1.2.3	Der OATP1C1 – mehr als ein Schilddrüsenhormontransporter?	188
5.2	SOAT	193
5.2.1	Die LC-MS/MS als neues Hilfsmittel zur Evaluierung der Transporteigenschaften des SOAT-Proteins	194
5.2.2	Erweiterung des Substratspektrums des SOAT-Proteins	196
5.2.3	Cholesterinsulfat – ein neues potentielles Substrat des SOAT-Proteins	197
5.2.4	Transportverhalten des SOAT-Proteins	200
5.2.4.1	Einfluss von fötalem Kälberserum auf das Transportverhalten des SOAT-Proteins	201
5.2.4.2	Einfluss von Steroidgemischen auf das Transportverhalten des SOAT-Proteins	202
5.2.4.3	Einfluss freier Steroide auf das Transportverhalten des SOAT-Proteins	207
5.2.4.4	Konsequenzen für die physiologische Bedeutung des SOAT-Proteins	210
5.2.5	Der Nachweis des SOAT-Proteins in SOAT-HEK293 Zellen	211
5.2.5.1	Nachweis des SOAT-Proteins im Zellkulturmodell mittels Western Blot Analyse	212
5.2.5.2	Membranlokalisierung des SOAT-Proteins im Zellkulturmodell	213
5.2.6	Polymorphismen im <i>SLC10A6</i> -Gen	214
5.2.6.1	Bioinformatische Bewertung der untersuchten Einzelnukleotidpolymorphismen im <i>SLC10A6</i> -Gen	215
5.2.6.2	Funktionelle Bewertung der Einzelnukleotidpolymorphismen im <i>SLC10A6</i> -Gen	217
5.2.6.3	Ethnischer Vergleich der funktionell relevanten Einzelnukleotidpolymorphismen des <i>SLC10A6</i> -Gens	222
5.2.7	Mögliche physiologische Bedeutung des SOATs in verschiedenen Organen	227
5.2.7.1	Hoden	227
5.2.7.2	Haut	234
5.2.7.3	Brustdrüse	236
5.2.7.4	Plazenta	237
5.3	Ausblick	239
6	Zusammenfassung	241
7	Summary	243
8	Anhang	248
9	Literaturverzeichnis	251

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Wirkungsweisen von Hormone	2
Abbildung 1.2: Steran, das Grundgerüst der Steroide (A) und Cholesterin (B)	5
Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden (Hoden)-Achse	19
Abbildung 1.4: Eine Auswahl sulfatierter Steroidhormone, die in dieser Arbeit untersucht wurden.	28
Abbildung 1.5: Klassifikation von Membrantransportsystemen und Abgrenzung zu Membrankanälen (Hediger et al. 2004).....	33
Abbildung 1.6: Schematische Darstellung des <i>Sulfatase Pathway</i>	34
Abbildung 2.1: Vektorkarte und Polylinkersequenz (<i>multiple cloning site</i> , MCS).....	50
Abbildung 2.2: Vektorkarte und Polylinkersequenz (<i>multiple cloning site</i> , MCS).....	50
Abbildung 2.3: Vektorkarte und Polylinkersequenz (<i>multiple cloning site</i> , MCS).....	51
Abbildung 2.4: Vektorkarte und Polylinkersequenz (<i>multiple cloning site</i> , MCS).....	52
Abbildung 3.1: Prinzip der quantitativen Real-Time PCR mit dem TaqMan-System	91
Abbildung 3.2: Real-Time PCR Standardreihe mit einer PCR-Effizienz von 100 %	94
Abbildung 3.3: Screenshot einer Sequenzspur dargestellt mit dem Programm FinchTV	96
Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der stabilen Transfektion mit dem Flp-In System.	106
Abbildung 3.5: Schematische Darstellung der Tetrazyklin-regulierten Genexpression in den Flp-In T-REx Zelllinien	107
Abbildung 3.6: Prinzip des Proteinnachweises mit Hilfe von Fluoreszenz-markierten Antikörpern.	115
Abbildung 3.7: Schematischer Aufbau der Blotting-Kammer	120
Abbildung 3.8: Prinzip des Proteinnachweises mit Hilfe von HRP-markierten Antikörpern in der Western Blot-Analyse.	122
Abbildung 3.9: Generierung der <i>Slc10a6</i> -Knockout-Maus-Linie.....	125
Abbildung 4.1: Ermittlung der Effizienz der ausgewählten <i>Gene Expression Assays</i> für β - Actin, SOAT, OSCP1, OATP6A1 und OATP1C1.	132
Abbildung 4.2: Expressionsprofil von SOAT, OSCP1, OATP6A1 und OATP1C1 in verschiedenen humanen Geweben.	136
Abbildung 4.3: Aufnahmestudien mit Griptite 293 MSR- und CHO- Zellen, die mit OATP6A1, OATP1C1, OSCP1, NTCP oder SOAT transient transfiziert wurden.....	137
Abbildung 4.4: Qualitative PCR- und Western Blot Analyse der stabil transfizierten HEK293- Zelllinien mit den Transportproteinen OATP6A1, OATP6A1-V5His, OSCP1, OSCP1-V5His und OATP1C1-V5His.	139
Abbildung 4.5: Aufnahme von [3 H]DHEAS und [3 H]Taurocholat (TC) in stabil transfizierte OATP6A1-HEK293 Zellen.	141
Abbildung 4.6: Substratscreening und zeitabhängige Aufnahme in stabil transfizierte OSCP1- HEK293 Zellen.	142
Abbildung 4.7: Aufnahmemessungen an stabil transfizierten OATP1C1-HEK293 Zellen....	143
Abbildung 4.8: Immunfluoreszenz der stabil transfizierten OATP6A1-V5His-HEK293 Zellen.	144
Abbildung 4.9: Immunfluoreszenz der stabil transfizierten OSCP1-V5His-HEK293 Zellen..	144
Abbildung 4.10: Immunfluoreszenz der stabil transfizierten OATP1C1-V5His-HEK293 Zellen.	145
Abbildung 4.11: Aufnahme von [3 H]DHEAS, [3 H]Taurocholat (TC) und [3 H]E $_1$ S in OATP6A1-, OATP1C1-, OSCP1- und NTCP-injizierte <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.	146
Abbildung 4.12: Schematische Darstellung der Transportmessung mit und ohne radioaktiv- markierten Substanzen.....	148
Abbildung 4.13: Vergleich der Aufnahme von radioaktiv-markiertem und unmarkiertem E $_1$ S und DHEAS in stabil transfizierte HEK293 Zelllinien mit anschließender	

Ermittlung der aufgenommenen Substratmenge mittels Flüssigszintillationsmessung (LSC) und Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS).....	149
Abbildung 4.14: Identifizierung neuer Substrate des Membrantransporters SOAT.	150
Abbildung 4.15: Aufnahme von [³ H]DHEAS in SOAT-HEK293 Zellen nach Inkubation mit fötalem Kälberserum bzw. aufgereinigtem fötalem Kälberserum.	151
Abbildung 4.16: Aufnahme von Steroidsulfat-Mixen in physiologischen und supraphysiologischen Konzentrationen in SOAT-HEK293 Zellen und Flp-In-HEK293 Zellen.	153
Abbildung 4.17: Aufnahme von Steroidsulfat-Mixen mit steigenden E ₁ S-Konzentrationen in SOAT-HEK293 Zellen.....	154
Abbildung 4.18: Aufnahme von Steroidsulfat-Mixen in physiologischen Konzentrationen in SOAT-HEK293 Zellen.....	155
Abbildung 4.19: Aufnahme des Steroidsulfat-Mixes in Anwesenheit von unterschiedlichen Testosteronkonzentrationen in SOAT-HEK293 Zellen.	156
Abbildung 4.20: Aufnahme eines Steroidsulfatmixes bestehend aus 10 nM E ₁ S, 1 µM PREGS, 10 µM DHEAS, 0,5 nM E ₁ , 17 nM DHEA und 0,5 nM Testosteron in SOAT-HEK293 Zellen.....	157
Abbildung 4.21: Western Blot Analyse der stabil transfizierten SOAT-HEK293 Zellen mit und ohne Tetrazyklin-Induktion und der Flp-In-HEK293 Zellen mit dem Antikörper anti-SOAT ₃₁₁₋₃₇₇	158
Abbildung 4.22: Western Blot Analyse der stabil transfizierten SOAT-HEK293 Zellen nach Behandlung mit Tunicamycin.....	159
Abbildung 4.23: Vergleichende Western Blot Analyse mit dem Antikörper anti-SOAT ₃₁₁₋₃₇₇ , dem Präimmenserum der immunisierten Kaninchen und dem Serum der Kaninchen nach Immunisierung mit dem SOAT-Peptid an stabil transfizierten SOAT-HEK293 Zellen sowie Flp-In-HEK293 Zellen.....	160
Abbildung 4.24: Peptidblockierung zur Überprüfung der Spezifität des Antikörpers anti-SOAT ₃₁₁₋₃₇₇	161
Abbildung 4.25: Immunfluoreszenz der stabil transfizierten SOAT-HEK293 Zellen mit dem Antikörper anti-SOAT ₃₁₁₋₃₇₇	162
Abbildung 4.26: Aufnahme von 1 µM [³ H]E ₁ S und 1 µM [³ H]DHEAS in GripTite 293 MSR Zellen, die mit verschiedenen polymorphen SOAT cDNA-Konstrukten transient transfiziert wurden.	164
Abbildung 4.27: Zeit- und konzentrationsabhängiger Transport von DHEAS in mit SOAT-V5His transient transfizierte GripTite 293 MSR Zellen.	165
Abbildung 4.28: Konzentrationsabhängige Aufnahme von DHEAS in SOAT-HEK293, SOAT-I114V-HEK293 und SOAT-L204F-HEK293 Zellen.....	167
Abbildung 4.29: Vergleich der kinetischen Parameter V _{max} und K _m der SOAT-spezifischen Aufnahme von DHEAS durch verschiedene SOAT-Varianten.....	168
Abbildung 4.30: Western Blot Analyse der stabil transfizierten SOAT-HEK293 Mutanten mit und ohne Tetrazyklin-Induktion.....	169
Abbildung 4.31: Vergleichende Immunfluoreszenzuntersuchung der SOAT-Varianten nach Inkubation mit dem SOAT ₃₁₁₋₃₇₇ Antikörper.	170
Abbildung 4.32: Vergleichende Fluoreszenzmikroskopie der SOAT-Varianten nach Inkubation mit dem SOAT ₂₋₁₇ -Antiserum	172
Abbildung 4.33: Überprüfung der Membranlokalisierung der SOAT-Varianten mittels Immunfluoreszenz und vergleichender densitometrischer Beurteilung des Gesamtproteins im Western Blot	173
Abbildung 4.34: PCR zur Genotypisierung der homo- und heterozygoten <i>Slc10a6</i> -Knockout-Mäuse und der Wildtyp-Maus.	175
Abbildung 5.1: Immunfluoreszenz der mit OSCP1-V5His transfizierten GripTite 293 MSR Zellen.	181

Abbildung 5.2 Qualitative und quantitative mRNA Expressionsanalyse des humanen OSCP1 in Biopsien mit normaler und gestörter Spermatogenese..... 184

Abbildung 5.3: Quantitative Expressionsanalyse der OATP6A1 mRNA in Hodenbiopsien mit normaler und gestörter Spermatogenese nach LACP..... 187

Abbildung 5.4 Chemische Struktur der Cyclodextrine..... 198

Abbildung 5.5: Aufnahme von Cholesterolsulfat (CS) in die SOAT-HEK293 Zellen 199

Abbildung 5.6: Vergleich der Strukturformel des SNPs L204F.....220

Abbildung 5.7: Illustration eines 3D-Modells des SOATs ohne N- und C-Terminus mit den SNPs I114V und L204F221

Abbildung 5.8: Relative mRNA Expression von SOAT in Hodenbiopsien mit normaler Spermatogenese und mit verschiedenen Spermatogenesedefekten.225

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Equilibrierungsschema der Blotting-Komponenten.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Tabelle 4.1: Effizienz der ausgewählten Gene Expression Assays für β -Actin, SOAT, OSCP1, OATP6A1 und OATP1C1.	131
Tabelle 4.2 Messlösungen mit steigenden Konzentrationen E ₁ S	154
Tabelle 5.1: Übersicht über die in dieser Arbeit untersuchten SNPs des humanen <i>SLC10A6</i> -Gens.....	216
Tabelle 5.2: Zusammenfassung der hinterlegten SNP ID Nr. ss44480182 (I114V-SNP im <i>SLC10A6</i> -Gen).....	223

Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µL	Mikroliter
aa	Amino acid, Aminosäure
ABC	ATP Binding Cassette
ABP	Androgen binding protein
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
AR	Androgenrezeptor
AS	Aminosäure
ASBT/ISBT/IBAT	Apical sodium-dependent bile acid transporter/Ileal sodium-dependent bile salt transporter/Ileal bile acid transporter
ATP	Adenosintriphosphat
b	Base
BCA	Bicinchoninic acid, BCA, 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare, base pair
BSA	Bovines Serumalbumin
BSP	Bromsulfophthalein
bzw.	beziehungsweise
C-	Kohlenstoffatom
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary DNA
CHO	Chinese hamster ovary
Ci	Curie
CMV	Cytomegalievirus
cpm	counts per minute (Impulse pro Minute)
cRNA	complementary RNA
CT	Signal threshold cycle
Da	Dalton
DAPI	4', 6'-Diamidine-2'-Phenylindol Dihydrochlorid
DCC	Dextran coated charcoal, Dextran-überzogene Aktivkohle
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEAS	Dehydroepiandrosteron-3-sulfat
DHT	Dihydrotestosteron
D-MEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
dpm	Disintegration per minute (Zerfall pro Minute)

DTT	Dithiothreitol
E	Effizienz
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E ₁	Estron
E ₁ S	Estron-3-sulfat
E ₂	Estradiol
E ₂ S	Estradiol-3-sulfat
E ₃	Estriol
EB	Ethidiumbromid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay analysis
ER	Estrogenrezeptor
ES	Embryonale Stammzellen
et. al.	et alii, et aliae, et alia, und andere
etc.	et cetera
EtOH	Ethanol
FITC	Fluorescein-5-Isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FLAG	Polypeptide mit der Sequenz DYKDDDDK, was an den C- oder N-Terminus von Proteinen angehängt werden kann
FRT	Flp Recombinase Target
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GnRH	Gonadotropin releasing hormone
GOI	Gene of interest
GST	Gonad specific transporter
h	Stunde
hCG	humanes Choriongonadotropin
HEK	Human embryonic kidney
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HHL	Hypophysenhinterlappen
HPLC	High performance liquid chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRE	Hormone response element
HRP	Horseradish peroxidase
HSD	Hydroxysteroid-Dehydrogenase
hSOAT	Sodium-dependent organic anion transporter des Menschen
HUGO	Human Genome Organisation
HVL	Hypophysenvorderlappen
hyp	Hypospermatogenese
IRES	internal ribosomal entry site
IZM	Innere Zellmasse

K _m	Michaelis-Menten-Konstante
KO/ko	knockout
L	Liter
LB	Luria Bertani
LC-MS/MS	Liquid chromatography tandem mass spectrometry, Flüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie
LDL	Low Density Lipoprotein
LH	Luteinisierendes Hormon
M	Molar (mol/l)
mA	Milliampere
MCS	Multi Cloning Site
MDR	Multidrug-resistance
MGB	Minor Groove Binder
MGF	Mutageneseprimer vorwärts
MGR	Mutageneseprimer rückwärts
min	Minute
mL	Milliliter
MMLV	Murine Moloney Leukaemia Virus
mRNA	messenger RNA
MRP	Multidrug resistance-associated protein
mSoat	Sodium-dependent organic anion transporter der Maus
MSR	Macrophage scavenger receptor
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEAA	Non essential amino acids
NEB	New England Biolabs
NNR	Nebennierenrinde
NP40	Nonidet P40
NPY	Neuropeptid Y
NTCP	Na ⁺ -Taurocholate cotransporting polypeptide
NZY	NZ-amine/yeast extract
OATP	Organic anion transporting polypeptide
OD	Optische Dichte
ORF/orf	open reading frame, offener Leserahmen
OSCP	Organic solute carrier protein
P450arom	Aromatase Cytochrom P450
P450c17	Cytochrom P450 17 (CYP17)
P450scc	Cytochrom P450 side chain cleavage (CYP11a)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAH	para-Aminohippursäure
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction/Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
Pgp	P-glycoprotein
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Ionenkonzentration

PIS	Präimmunserum
PolyA	Polyadenylierungssequenz
PR	Progesteronrezeptor
PREG	Pregnenolon
PREGS	Pregnenolonsulfat
qPCR	Quantitative PCR
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
RNA	Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
rpm	Rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
rT3	reverse T3, inaktiver Metabolit des Trijodthyronin
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
RXLI	Rezessive X-linked Ichthyose
s	Sekunde
SBAT	Sodium-dependent bile acid transporter
SCO	Sertoli cell only syndrome
SCP-2	Sterol carrier protein 2
sda	Spermatidenarrest
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SF-1	Steroidogenic factor 1
sga	Spermatogonienarrest
SHBG	Steroid hormone binding globuline
SLC	Solute Carrier
SLCO	Genbezeichnung der organic anion transporting polypeptides
SMP	Sulfoxymethylpyrene
SNP	Single Nucleotid Polymorphism
SOAT	Sodium-dependent Organic Anion Transporter
StAR	Steroidogenic acute regulator protein
StS	Steroidsulfatase
SULT	Sulfotransferase
sza	Spermatozytenarrest
T3	Trijodthyronin
T4	Thyroxin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS-T	Tris buffered saline with Tween, Tris gepuffertes NaCl mit Tween-Zusatz
TC	Taurocholol
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetrazyklin
TetO2	Tetrazyklin-Operator
TetR	Tetrazyklin-Repressor
TLCS	Taurolithocholat-3-sulfat
Tm	Schmelztemperatur
TMD	Transmembrandomäne

Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TSPO	Translocator protein
U	Unit
UTR	Untranslated region, untranslatierter Bereich
UV	Ultraviolett
V	Volt
v. a.	vor allem
V_{\max}	Maximale Aufnahmegeschwindigkeit
WT/wt	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Endokrinologie

Die Endokrinologie beschäftigt sich mit Hormonen, wobei sowohl ihre Bildung und der Transport zu den Zielzellen, als auch die Interaktion mit diesen und die Wirkung der Hormone und ihre Integration in die physiologischen Vorgänge des Körpers untersucht werden. Hormone sind chemische Botenstoffe, die in bestimmten Zellen gebildet werden und dann, meist über den Blutweg, zu ihrem Zielorgan gelangen, wo sie über Hormonrezeptoren an spezifischen Zielzellen (*target cells*) wirken und somit regulierend in die physiologischen Vorgänge des Körpers eingreifen (Baulieu et al. 1971; Nussey und Whitehead 2001). Hormone sind in Regelkreisläufe eingebettet, was bedeutet, dass sie nicht nur eine gezielte Wirkung an einem bestimmten Ort haben, sondern auch in der Lage sind, negative Feedbackmechanismen entweder durch sich selbst oder durch ihre Wirkungsprodukte auszulösen und zu modulieren (Zimmermann und Critchlow 1969; Barraclough und Haller 1970; Mennin und Gorski 1975; Shaw 1975). Dies führt zu einer sehr feinen Regulierung der physiologischen Vorgänge im Körper und ermöglicht zudem eine schnelle Reaktion auf sich ändernde Bedingungen.

1.1.1 Einteilung der Hormone

Hormone lassen sich auf verschiedene Arten einteilen. Zum einen kann eine Gruppierung anhand ihrer Kommunikationswege erfolgen, zum anderen können sie aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften verschiedenen Hormonklassen zugeordnet werden. Man kann Hormone aber auch nach funktionellen Aspekten gliedern (Hormone für Wachstum und Differenzierung, Hormone zur Regulation des Calcium-Phosphathaushaltes, Hormone zur Regulierung des Wasser- und Elektrolythaushaltes, etc.). Für diese Arbeit ist die Einteilung anhand des Kommunikationsweges und nach strukturellen, chemischen Aspekten von Bedeutung, so dass im Folgenden näher darauf eingegangen wird. Nachdem ein Hormon gebildet wurde, ist es in der Lage auf vier verschiedene Arten zu kommunizieren: endokrin, parakrin, autokrin oder intrakrin (Labrie 1991; Nussey und Whitehead 2001). Bei der endokrinen Wirkung wird das Hormon von seinem Bildungsort abgegeben und gelangt via Blutstrom zu seiner Zielzelle. Parakrin hingegen wirken Hormone, wenn die Zellen in der direkten Nachbarschaft der hormonabgebenden Zellen unter Umgehung des Blutflusses moduliert werden. Beim autokrinen Kommunikationsweg reagieren die Zellen selbst auf das von ihnen abgegebene Hormon. Ein Hormon hingegen, was innerhalb der Zelle wirkt, in der es produziert wurde, wirkt intrakrin.

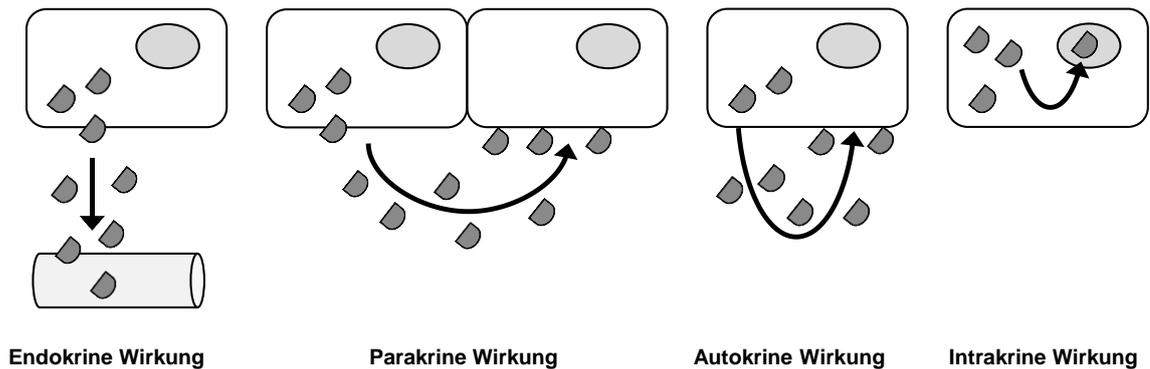


Abbildung 1.1: Wirkungsweisen von Hormone

Hormone können endokrin, parakrin, autokrin oder intrakrin wirken. Bei der endokrinen Wirkung werden Hormone von der synthetisierenden Zelle ins Blut abgegeben und gelangen so zur Zielzelle. Bei der parakrinen Wirkung stimulieren die Hormone die Nachbarzelle(n) der hormonbildenden Zelle. Eine autokrine Wirkung liegt vor, wenn die Zelle sich mit dem abgegebenen Hormon selbst stimuliert. Bei der intrakrinen Wirkung werden Hormone innerhalb der Zielzelle gebildet und wirken auch in dieser (Schema angelehnt an Labrie 1991).

Die Einteilung der Hormone anhand ihrer chemischen Eigenschaften führt zur Bildung von drei Gruppen: die Gruppe der Steroidhormone, die aus Cholesterol hervorgehen (Östrogene, Androgene, Gestagene, Gluko- und Mineralokortikoide), die Gruppe der Proteo- oder Peptidhormone (Insulin, ACTH, Calcitonin, Prolaktin, Wachstumshormone) und die Gruppe der Hormone, die Abkömmlinge von Aminosäuren darstellen (z.B. Thyroxin, Adrenalin, Katecholamine, Serotonin, Melatonin). Ferner gibt es noch Hormone, die aus Fettsäuren synthetisiert werden (Eicosanoide) (Nussey und Whitehead 2001). Zwischen den Gruppen gibt es einige Unterschiede. Proteo- oder Peptidhormone bestehen aus Aminosäuren und besitzen in der Regel ein höheres Molekulargewicht als die Hormone anderer Gruppen. Sie können die Plasmamembran aufgrund ihrer geringen lipophilen Eigenschaften und ihrer komplexen Struktur schlecht bis gar nicht durchdringen und wirken daher über Rezeptoren, die an der äußeren Oberfläche der Zellmembran sitzen. Im Gegensatz dazu sind Steroidhormone fettlöslich und können so durch die Zellmembran diffundieren. Intrazellulär binden sie an die sogenannten Steroidhormonrezeptoren. Diese sitzen entweder im Zytoplasma (Glukokortikoid-Rezeptoren), so dass der Hormon-Rezeptorkomplex zunächst in den Zellkern transloziert und dann über eine Interaktion mit der DNA die hormonelle Wirkung hervorruft, oder die Steroidhormonrezeptoren befinden sich bereits im Zellkern (Sexualsteroide), so dass die Hormon-Rezeptorkomplex-Bildung dort stattfindet (Yamamoto 1985; Kumar und Thompson 1999; Beato und Klug 2000). Aufgrund ihrer genomischen Wirkung findet die Reaktion auf ein Steroidhormon bei dem zuvor beschriebenen Wirkungsweg langsamer (min bis h) statt, als die auf ein Proteo- bzw. Peptidhormon. Allerdings gibt es auch nicht-genomische Wirkungen der Steroidhormone über membranständige Rezeptoren, bei denen

die zelluläre Antwort schneller erfolgt (Banerjee et al. 2014; Chaudhri et al. 2014a; Chaudhri et al. 2014b). Die Schilddrüsenhormone bestehen aus zwei Aminosäuren, die über eine Etherbrücke miteinander verbunden sind. Sie werden über Transportproteine in die Zellen aufgenommen (Friesema et al. 2005; Visser et al. 2008; Schweizer und Kohrle 2013) und binden an Rezeptoren im Zellkern (Harvey und Williams 2002).

1.1.2 Wirkungsmechanismen der Hormone

Hormone binden in der Zielzelle an spezifische Rezeptoren, die sich entweder im Zytoplasma, im Zellkern oder auf der Zellmembran befinden. Somit gibt es zwei hormonelle Wirkmechanismen. Der eine umfasst den intrazellulären Hormon-Rezeptorkomplex, bei dem das Hormon an den Hormonrezeptor im Zellinnern bindet. Der Hormon-Rezeptorkomplex transloziert in den Zellkern und interagiert dort mit der DNA über sogenannte *hormone response elements (HRE)* (Beato 1989). Diese stellen eine kurze Nukleotidsequenz dar, an die der Hormonrezeptor binden kann. Der Hormonrezeptor weist eine charakteristische, hochkonservierte DNA-Bindungsstelle (*DNA binding domain*) auf, die in der Regel aus zwei Zinkfingern besteht, die über Cysteine im Bereich der großen Furche der DNA-Helix mit der DNA in Kontakt treten. Der Hormon-Rezeptorkomplex wirkt somit als Transkriptionsfaktor, was zu einer genomisch-vermittelten Wirkung führt. Die HREs bestehen aus *tandem repeats*, die sich aus zwei Nukleotidsequenzen mit jeweils sechs identischen Basen zusammensetzen. Dazwischen befinden sich null bis acht Basen, die die Sequenzstücke voneinander trennen. Die Sequenzstücke können identisch ($\rightarrow\rightarrow$) oder komplementär-rückwärts ($\rightarrow\leftarrow$) oder komplementär-rückwärts-gegenläufig ($\leftarrow\rightarrow$) zueinander sein (Helsen et al. 2012). Diese Eigenschaft wird Polaritätsanordnung genannt und bestimmt gemeinsam mit der Menge der zwischen den *tandem repeats* liegenden Nukleotiden und der Sequenz die Identität des HRE. Der Hormon-Rezeptorkomplex bindet über seine *DNA binding domain* meist als Dimer an die HREs. Die Bindung erfolgt sowohl in Form von Homo-, wie auch Heterodimeren. Bei einigen Rezeptoren ist auch eine Bindung als Monodimer bekannt, diese ist allerdings selten (Helsen et al. 2012). Insgesamt sind 48 verschiedene nukleäre Rezeptoren bekannt (Kishimoto et al. 2006). Im Gegensatz dazu vermitteln insbesondere membranimpermeable Hormone ihre Wirkung über zellmembranständige Hormonrezeptoren, welche die Information meist in Form einer Signalkaskade in das Zellinnere weitergeben (Castagna 1983; Gorelick 1987). In der Endokrinologie liegen meist Rezeptoren der G-Protein-gekoppelten Rezeptorfamilie oder der zur Tyrosinkinase gehörenden Rezeptorfamilie (z. B. Insulinrezeptor) vor. In der Reproduktionsendokrinologie wirken die dort wichtigen Peptidhormone meist über den *second messenger cAMP* (zyklisches Adenosinmonophosphat). Dieses bindet und aktiviert Proteinkinasen, die wiederum katalytisch aktive Untereinheiten freisetzen, die daraufhin

zelluläre Proteine (Enzyme, Proteine der Mitochondrien) phosphorylieren und somit aktivieren, was dann die Hormonantwort darstellt. Da in der vorliegenden Arbeit aber der Schwerpunkt auf den Steroidhormonen liegt und diese vornehmlich, wenn auch nicht ausschließlich, über den intrazellulär lokalisierten Steroidhormon-Kernrezeptor-Komplex wirken, wird die Wirkung der Peptidhormone nur anhand dieser groben Übersicht betrachtet.

1.2 Steroidhormone

Hormone, die zur Gruppe der Steroidhormone gehören, sind lipophile Botenstoffe, die zu einem großen Teil in der Nebennierenrinde (NNR) gebildet werden. Man unterscheidet drei Zonen in der NNR. In der außen liegenden *Zona glomerulosa* werden die Mineralokortikoide (wichtigster Vertreter: Aldosteron) gebildet. Diese sind für die Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes verantwortlich. In der *Zona fasciculata* erfolgt die Synthese der Glukokortikoide (Cortisol, Cortison), die vor allem an der Regulation des Kohlenhydrat-, Protein- und Fettstoffwechsels beteiligt sind. Die innerste Schicht der NNR, die *Zona reticularis* stellt den Syntheseort der Androgene, Östrogene und Gestagene dar, wobei hier nur ein kleiner Anteil der Gesamtmenge produziert wird (Nussey und Whitehead 2001). Hauptsyntheseorte dieser Steroidhormone sind der Hoden (Androgene, Östrogene), die Ovarien (Östrogene, Gestagene, Androgene) und die Plazenta (Gestagene, Östrogene) (Vermeulen 1976; Hall et al. 1977; Burger 2002).

1.2.1 Sexualhormone mit Steroidgerüst

Man unterscheidet bei den Sexualhormonen verschiedene Hormonklassen, wobei die Androgene, Östrogene und Gestagene zu der Klasse der Steroidhormone gehören. Während die Androgene im Volksmund als „männliche“ Geschlechtshormone bezeichnet werden, zählen die Östrogene und Gestagene zu den „weiblichen“ Sexualhormonen. Allerdings produzieren beide Geschlechter alle drei Sexualhormonarten, nur die Menge und die Syntheseorte unterscheiden sich voneinander. Den Androgenen, Östrogenen und Gestagenen ist gemeinsam, dass sie allesamt aus Cholesterin (englisch: *Cholesterol*) synthetisiert werden. Während die Gestagene 21 C-Atome aufweisen, sind die Androgene aus 19 und die Östrogene aus 18 C-Atomen aufgebaut. Das Progesteron ist der wichtigste Vertreter der Gestagene und wird auch als Gelbkörperhormon bezeichnet, da es im Gelbkörper in großen Mengen produziert wird (Niswender et al. 2000). Estron (E_1), Estradiol (E_2) und Estriol (E_3) sind die natürlich vorkommenden Östrogene. Bei den Androgenen zählen Testosteron und 5 α -Dihydrotestosteron (DHT) zu den bekanntesten Vertretern, aber auch Dehydroepiandrosteron (DHEA) und Androstendiol sind Androgene, deren Bedeutung nicht

außer Acht gelassen werden darf (Dillon 2005; Honma et al. 2011; De Oliveira et al. 2012; Aerts-Kaya et al. 2012; Engdahl et al. 2014; Zangmo et al. 2014; Starka et al. 2014).

1.2.2 Synthese der Steroidhormone

Alle Steroidhormone sind Abkömmlinge des Cholesterols und weisen daher ein Steroidgerüst auf. Dieses besteht aus 17 Kohlenstoffatomen, die in drei Cyclohexanringen (A, B, C) und einem Cyclopentanring (D) miteinander verbunden sind (s. Abbildung 1.2). Dieses Grundgerüst ist ein Steran und kann durch Anlagerung verschiedener funktioneller Gruppen und durch die Veränderung des Oxidationsstatus der Ringe modifiziert werden, so dass eine Vielzahl unterschiedlicher Steroide entstehen können.

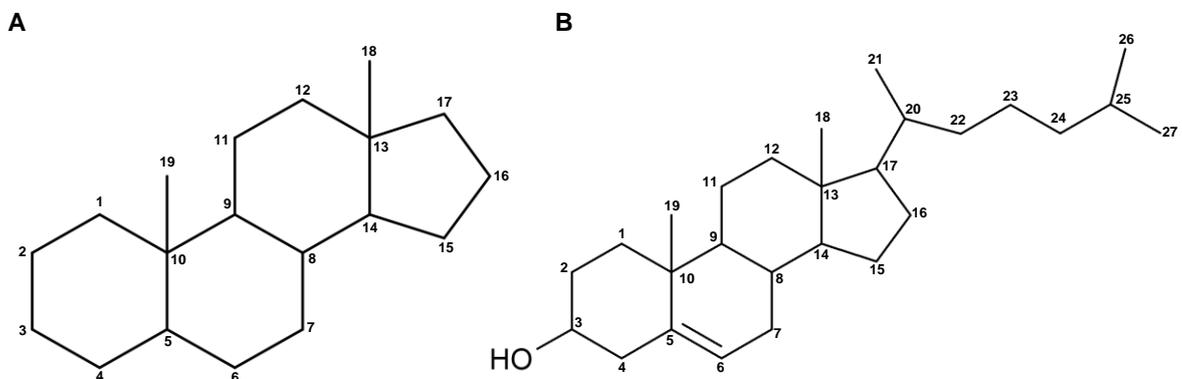


Abbildung 1.2: Steran, das Grundgerüst der Steroide (A) und Cholesterin (B)

Cholesterin wird entweder über die Nahrung aufgenommen oder de novo im Gewebe aus der Vorstufe Acetyl-CoA gebildet. Letzteres findet hauptsächlich in der Leber statt, kommt aber auch in den steroidhormonproduzierenden Organen (z. B. in der NNR) vor. Das in der Leber synthetisierte bzw. das aus der Nahrung aufgenommene Cholesterin wird über den Blutweg zu den Organen der Steroidhormonsynthese verbracht. Da Cholesterin in wässrigem Medium unlöslich ist, wird es für den Transport an Lipoproteine (*low density lipoprotein, LDL*) gebunden. Nach Aufnahme in die Zellen kann das Cholesterin direkt genutzt werden, oder für eine spätere Verwendung in Form von Cholesterin-Estern in Fetttropfen in der Zelle gespeichert werden. Eine weitere Cholesterinquelle stellt die Zellmembran dar, in die große Mengen Cholesterin integriert sind. Die Synthese der Sexualhormone beginnt mit dem Verbringen des Cholesterins zur äußeren Membran der Mitochondrien. Dies kann auf verschiedenen Wegen erfolgen, unter anderem durch Bindung an das *sterol carrier protein 2 (SCP-2)* (Gallegos et al. 2000; Schroeder et al. 2007) oder durch den sogenannten vesikulären Weg, bei dem es zu einer Fusion der Membranen von Endosomen und Lysosomen kommt. Es folgt der Transport des Cholesterins in die Mitochondrien durch das *steroidogenic acute*

regulator protein (StAR protein) (Miller 2007) und des *translocator protein (TSPO, früher: peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR))*, wobei in der Literatur kontrovers diskutiert wird, ob sowohl StAR als auch TSPO unabdingbare Faktoren in der Steroidbiosynthese darstellen (Bose et al. 2002; Morohaku et al. 2014; Papadopoulos 2014). In den Mitochondrien wird zunächst die Seitenkette des Cholesterols abgespalten. Dies geschieht durch das Cytochrom P450 *side-chain cleavage enzyme (P450_{ssc}, Synonym: CYP11A, Genname: CYP11A1)*, indem zunächst der Kohlenstoff an Position 22 und anschließend der Kohlenstoff an Position 20 hydroxyliert werden (Burstein und Gut 1976; Chung et al. 1986; Papadopoulos 2014). Es schließt sich die Spaltung der Bindung zwischen den C-Atomen 20 und 22 an, so dass Pregnenolon und Isocapronaldehyd entstehen, wovon letzteres zu Isocapronsäure oxidiert wird. Alle drei Schritte werden von CYP11A durchgeführt und stellen den wichtigsten und limitierenden Schritt der Biosynthese der Sexualhormone dar. CYP11A wird sowohl in allen drei Zonen der NNR (Ishimura und Fujita 1997), wie auch im Ovar (*Theca interna*, Granulosazellen ovulierender Follikel), in den Leydig Zellen des Hodens (Payne und Youngblood 1995; Payne und Hales 2004) und in den Synzytiotrophoblasten der humanen Plazenta (Strauss, III et al. 1996) exprimiert, so dass in diesen Organen der erste Schritt der Steroidhormonsynthese stattfinden kann. Neuere Studien zeigen, dass CYP11A auch im zentralen und peripheren Nervensystem, sowie im Herzen exprimiert wird und dort zur Bildung para- oder autokrin wirkender Steroidhormone beiträgt (Compagnone et al. 1995; Kayes-Wandover und White 2000; Young et al. 2001). Im nächsten Schritt wird das gebildete Pregnenolon von den Mitochondrien ins glatte Endoplasmatische Retikulum (ER) verbracht. Dort hydroxyliert das CYP17 (P450_{c17}) das Pregnenolon zunächst an der 17 α -Position, wobei 17 α -Hydroxypregnenolon entsteht, und katalysiert dann die Spaltung der Bindung zwischen dem C17- und dem C20-Atom, so dass ein C19-Steroid, in diesem Fall DHEA, entsteht (Nakajin et al. 1984). CYP17 ist auch in der Lage Progesteron als Substrat zu verwenden, was, im Gegensatz zum Pregnenolon (Δ^5 -Weg), zum Δ^4 -Weg gehört. Δ^5 und Δ^4 geben an, an welcher Position sich die Doppelbindung des Steroids befindet. Im humanen Organismus wird der Δ^5 -Weg dem Δ^4 -Weg gegenüber bevorzugt. Im Δ^4 -Weg wird zunächst 17 α -Hydroxyprogesteron durch Hydroxilierung gebildet und anschließend Androstendion durch Spaltung der Bindung zwischen dem Kohlenstoff an Position 17 und dem an Position 20 erzeugt. Beim CYP17 treten speziesspezifische Unterschiede in Bezug auf das bevorzugte Substrat für die Spaltung der Bindung zwischen dem C17- und dem C20-Atom auf. Beim Menschen und beim Rind wird 17 α -Hydroxypregnenolon als Substrat bevorzugt, so dass DHEA entsteht, wohingegen bei den Nagern vor allem 17 α -Hydroxyprogesteron genutzt und somit Androstendion gebildet wird (Brock und Waterman 1999). Dies beruht nicht auf einer unterschiedlichen Enzymaktivität der beteiligten Systeme, sondern auf der Fähigkeit des

humanen und bovinen Enzyms mit dem Hilfsprotein *Cytochrom b₅* zu interagieren (Auchus et al. 1998). Cytochrom b₅ wirkt allosterisch auf den *P450c17-NADPH-Cytochrom-P450-Oxidoreduktase-Komplex* ein, was den Elektronentransfer bei der Hydroxylierung von Pregnenolon zu 17 α -Hydroxypregnenolon verbessert. Dieser Effekt ist nur für die Hydroxylierung von Pregnenolon, nicht aber für die von Progesteron zu beobachten und führt zu einer Bevorzugung des Δ^5 -Weges bei Mensch und Rind.

CYP17 wird in beinahe allen Geweben exprimiert, die eine Steroidsynthese durchführen können. Ausnahmen stellen die humane und equine Plazenta dar. Bei Mensch und Pferd findet daher die plazentäre Östrogensynthese durch Aromatisierung der in der fetalen Nebenniere (Mensch) bzw. den fetalen Gonaden (Pferd) gebildeten Androgene statt (Wu et al. 1970; Pashen und Allen 1979; Voutilainen und Miller 1986). Im Hoden ist CYP17 genau wie CYP11A in den Leydig Zellen detektierbar (Pelletier et al. 2001), im Ovar hingegen findet man es nur in den Thekazellen, nicht aber in den Granulosazellen (Sasano et al. 1989). In der NNR ist es in der *Zona reticularis* und in der *Zona fasciculata* exprimiert (Bird und Conley 2002). In der *Zona granulosa* hingegen ist keine Expression des CYP17 zu finden. Bei Maus und Ratte ist CYP17 ab der Mitte der Trächtigkeit bis zum Partus im Mutterkuchen detektierbar (Durkee et al. 1992; Arensburg et al. 1999), wohingegen beim Menschen kein CYP17 in der Plazenta vorkommt. Die durch das CYP17 generierten C19-Steroide können zu C18-Steroiden umgewandelt werden. Diese Reaktion wird durch CYP19 (Aromatase Cytochrom P450, P450arom) katalysiert, wobei zunächst die Methyl-Gruppe des C19-Atoms zweifach hydroxyliert wird. Im Anschluss erfolgt eine sogenannte *peroxidative attack* des Kohlenstoffatoms an Position 19 (Korzekwa et al. 1993). Zusätzlich wird der an Position 1 β befindliche Wasserstoff entfernt, so dass zwischen C1 und C10 eine Doppelbindung entsteht. Desweiteren wird der Sauerstoff am C3 protoniert und der 2 β -Wasserstoff auf eine Abgangsgruppe, z. B. eine Carboxylgruppe, übertragen. Dies ermöglicht eine Enolisierung des Ketons am C3-Atom, so dass der A-Ring des Steroids nun ein Phenolderivat darstellt (Simpson et al. 1994). CYP19 wird in vielen Organen des Körpers exprimiert. Beim Mensch ist es vor allem im Follikel kurz vor der Ovulation, im *Corpus luteum* zyklischer Frauen und in der Plazenta zu finden (Simpson et al. 2002). Beim Mann wurde CYP19 in Leydig Zellen detektiert, aber nicht in Sertoli Zellen (Brodie et al. 2001). Dies steht im Kontrast zu männlichen Ratten, bei denen die Sertoli Zellen in der präpubertären Phase durchaus CYP19 exprimieren, die Expression aber abnimmt und bei pubertären und adulten Ratten im Hoden nur noch in den Leydig Zellen vorkommt. CYP19 wird bei den Nagern auch in Keimzellen (pachytänen Spermatozyten, runden Spermatiden) exprimiert (Carreau et al. 2012a). Beim Menschen konnte indirekt die Expression in Spermatozoen nachgewiesen werden (Carreau et al. 2012b), so dass auch Teile der Keimzellpopulation in der Lage sind, Androgene in Östrogene umzuwandeln. Die

zellspezifische Expression von CYP11A, CYP17 und CYP19 in der NNR und in den Gonaden wird durch den *steroidogenic factor 1* (SF-1) reguliert (Lala et al. 1992; Lynch et al. 1993). SF-1 ist ein nukleares DNA-Bindungsprotein, was an ein bestimmtes Sequenzmotiv im Promotor aller P450 Enzyme bindet, die an der Steroidhormonsynthese beteiligt sind und somit die Expression der Enzyme induziert (Parker und Schimmer 1995). Eine zusätzliche Regulation der Enzymexpression findet durch pituitäre Proteohormone statt (Waterman und Keeney 1996). So stimuliert ACTH in der NNR (*Zona reticularis*, *Zona fasciculata*) die Expression steroidogener Enzyme. Im Hoden und im *Corpus luteum*, sowie in den Thekazellen wird die Expression durch das luteinisierende Hormon (LH) beeinflusst, in den Granulosazellen des Ovars stimuliert das Follikelstimulierende Hormon (FSH) die Enzymbildung. Die Wirkung von ACTH, LH und FSH erfolgt über G-Protein-gekoppelte Membranrezeptoren, die zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase führen und somit durch einen Anstieg von intrazellulärem cAMP die Enzymexpression steigern.

Neben den Cytochrom P450-Enzymen spielen auch zwei Enzyme der *short-chain alcohol dehydrogenase reductase superfamily*, die Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (HSD) 3 β -HSD und 17 β -HSD eine wichtige Rolle in der Steroidbiosynthese, da sie die Reduktions- und Oxidationsreaktionen verschiedener Steroidhormone katalysieren. Sowohl die 3 β -HSD, wie auch die 17 β -HSD weisen verschiedene Isoformen auf, wobei Anzahl der Isoformen, Enzymaktivität, bevorzugte Wirkungsweise, Gewebeverteilung inklusive subzellulärer Lokalisation und Substratspezifität speziesabhängig variieren. Beim Menschen sind die 3 β -HSD I und II an der Steroidbiosynthese beteiligt (Luu, V et al. 1989; Rheume et al. 1991), bei der Maus sind es die Isoformen I und VI (Bain et al. 1991; Payne et al. 1997; Abbaszade et al. 1997). Sie sind für die Umwandlung der Δ^5 - β -Hydroxysterioide (Pregnenolon, 17 α -Hydroxypregnenolon und DHEA) in Δ^4 -3-Ketosterioide (Progesteron, 17 α -Hydroxyprogesteron, Androstendion) verantwortlich. Chemisch betrachtet, wird hierbei zunächst das 3 β -Hydroxysteroid dehydrogeniert, so dass ein Δ^5 -3-Intermediat entsteht mit einer Ketogruppe am C3, was dann durch die Isomerase-Aktivität der 3 β -HSD in ein Δ^4 -3-Ketosteroid umgewandelt wird (Miller 1988). Ferner ist die 3 β -HSD auch in der Lage, DHT in 5 α -Androstan-3 β ,17 β -diol zu konvertieren. Die 3 β -HSD wird in Abhängigkeit der jeweiligen Isoform gewebe- und zellspezifisch exprimiert. Beim Menschen ist die 3 β -HSD I in der Plazenta, der Haut und der Brustdrüse detektierbar, die 3 β -HSD II hingegen im Hoden, im Ovar und in der Nebenniere (Rheume et al. 1991). Bei der Maus weist die 3 β -HSD I diese Verteilung auf, wohingegen die Isoform VI in Plazenta und Haut, aber auch im Hoden vorkommt (Bain et al. 1991; Payne et al. 1997; Abbaszade et al. 1997). Wie bei den Cytochrom P450 Enzymen, wird die Expression der 3 β -HSD ebenfalls durch SF-1 reguliert, wobei teilweise auch andere Faktoren (AP-2 γ , Dlx 3, *transcription enhancer factor-5*, *GATA-like*

protein) an der Genregulation beteiligt sind (Peng und Payne 2002; Peng et al. 2004). Ferner haben auch hier Peptidhormone wie das humane Choriongonadotropin (hCG) oder FSH Einfluss auf die Genregulation. Neben den 3 β -HSD spielen auch die Isoformen der 17 β -HSD in der Steroidhormonsynthese eine wichtige Rolle. Insgesamt sind 17 Isoformen der 17 β -HSD bekannt, wobei wie bei den 3 β -HSD große Unterschiede in Bezug auf Gewebeexpression, Enzymeigenschaften und Substratspezifität zwischen den verschiedenen Isoformen auftreten. Die Aufgabe der 17 β -HSD besteht darin, die inaktiven 17-Ketosteroide in aktive 17 β -Hydroxysteroiden umzuwandeln, wobei sie in den Zellen im Organismus unidirektional wirken, was bedeutet, dass sie entweder als Reduktase, oder als Oxidase die Reaktion katalysieren. Beim Menschen sind mehrere Isoformen von Bedeutung (Labrie et al. 2000b). Somit bevorzugen einige 17 β -HSD Enzyme Östrogene als Substrat (17 β -HSD Typ 1, 7, 8) (Dumont et al. 1992a; Ohno et al. 2008; Laplante et al. 2009), andere hingegen sind in der Lage sowohl Androgene, wie auch Östrogene als Substrat zu nutzen (17 β -HSD Typ 2) (Wu et al. 1993). Die Typ 3 17 β -HSD weist eine dominante Expression im Hoden auf und katalysiert dort in den Leydig Zellen die Umwandlung von 4-Androstendion (Androst-4-en-3,17-dion) zu Testosteron (Geissler et al. 1994). Diese Rolle übernimmt in peripheren Geweben die 17 β -HSD Typ 5 (Labrie et al. 2000b). Für die Inaktivierung von Östrogenen zeichnet sich die 17 β -HSD Typ 4 verantwortlich, wofür auch ihre ubiquitäre Expression in vielen verschiedenen Geweben spricht (Adamski et al. 1995). Auch die Regulation der 17 β -HSD-Expression ist vielseitig. Neben FSH sind auch Androgene, Östrogene, Gonadotropine sowie verschiedene Wachstumsfaktoren und mehrere Proteinkinasen an dieser beteiligt (Payne and Hales, 2004). Die 5 α -Reduktase ist ein weiteres Enzym, welches in der Steroidbiosynthese eine wichtige Funktion übernimmt. Das Enzym katalysiert die Reduktion des 3-Oxo- Δ^4 -Steroids Testosteron zu dem korrespondierenden und potenteren 3-Oxo-5 α -Molekül DHT (Andersson und Russell 1990).

Auf die Synthese der Glukokortikoide, die ebenfalls aus Cholesterol hervorgehen, wird hier nicht eingegangen, da sie im Rahmen dieser Arbeit keine Rolle spielen.

1.3 Der Hoden als Steroidhormon-synthetisierendes Organ

Nachdem zunächst im Allgemeinen die Steroidbiosynthese dargelegt wurde, soll nun im Folgenden näher auf die Steroidbiosynthese im Hoden eingegangen werden.

1.3.1 Anatomie des Hodens

Die paarig angelegten Hoden gehören zum männlichen Reproduktionstrakt und erfüllen zwei wichtige Aufgaben. Zum einen dienen sie der Steroidogenese, d. h. der Bildung von

Steroidhormonen, zum anderen sind sie für die Entwicklung und Differenzierung der männlichen Keimzellen im Rahmen der Spermatogenese verantwortlich. Die Hoden befindet sich im Hodensack, dem Scrotum, und sind jeweils von der *Tunica albuginea*, einer fibromuskulären Bindegewebsschicht umgeben, die sich im *Mediastinum testis* verdickt und in Bindegewebssepten in das Hodenparenchym zieht, was zu einer Unterteilung des Hodens in Läppchen führt. Insgesamt besteht der humane Hoden aus bis zu 250 dieser kleinen Kompartimente, welche die *Tubuli seminiferi contorti* (Samenkanälchen) enthalten. Diese sind in viele kleine Schlaufen gelegt und beinhalten die Keimzellen sowie die Sertolizellen, welche für die Versorgung der Spermatozoen zuständig sind und daher auch Ammenzellen genannt werden. Umgeben sind die Samenkanälchen von der *Lamina propria*, in die peritubuläre Myoidzellen eingelagert sind. Sie tragen zur Kontraktion der Samenkanälchen bei und ermöglichen somit den Transport der Spermien vom Keimepithel zum *Rete testis*. Von dort gelangen die Spermien über die *Ductuli efferentes* zum Nebenhoden. Zwischen den *Tubuli seminiferi contorti* befindet sich Bindegewebe, welches neben Blut- und Lymphgefäßen auch Nerven und Abwehrzellen (Makrophagen) beinhaltet. Zusätzlich zu diesen Strukturen weist das Bindegewebe zwischen den Samenkanälchen auch endokrin tätige Zellen auf, welche Leydigzellen genannt werden (Mayerhofer et al. 2005).

1.3.1.1 Die Leydigzellen

Die Leydigzellen wurden das erste Mal von Franz Leydig im Jahre 1850 beschrieben und befinden sich im Bindegewebe zwischen den Samenkanälchen, wo sie von Blutgefäßen, Lymphgefäßen, Nerven und extrazellulärer Matrix umgeben sind. Leydigzellen treten sowohl vereinzelt, wie auch in Gruppen auf und sind für die Androgenproduktion im Hoden verantwortlich (Weinbauer et al. 2010). Man unterscheidet bei den Leydigzellen fünf verschiedene Zellgenerationen: Leydig-Vorläuferzellen, Leydig-Stammzellen, neu gebildete adulte Leydigzellen, unreife adulte Leydigzellen und reife adulte Leydigzellen (Mendis-Handagama und Ariyaratne 2001). Lejeune et al. teilten die Leydigzellpopulationen zuvor in zwei Generationen ein (Lejeune et al. 1998). In der ersten Generation werden sie als fetale Leydigzellen bezeichnet. Diese entwickeln sich aus verschiedenen embryonalen Geweben, wie dem Zölomepithel, der Gonadenleiste und Mesonephroszellen (Svechnikov et al. 2010). Sie besitzen aufgrund ihrer Enzymausstattung die Fähigkeit verschiedenen Androgene, v. a. Testosteron zu produzieren (Svechnikov et al. 2010), was im humanen Fetus bereits vor der siebten Schwangerschaftswoche unabhängig von LH geschieht (Lambrot et al. 2006), da dessen Produktion erst ab der siebten Schwangerschaftswoche in der fetalen Hypophyse beginnt. Hauptaufgabe der fetalen Leydigzellen ist die Maskulinisierung des ungeborenen männlichen Urogenitaltrakts. Aus den fetalen Leydigzellen entwickelt sich zwei bis drei Monate

nach der Geburt die neonatale Leydigzellpopulation, die aus gut entwickelten fetalen Leydigzellen und degenerierenden Leydigzellen besteht (Prince 2001). Die ursprünglich als zweite Generation der Leydigzellen bezeichnete Population stellen die adulten Leydigzellen dar. Diese Zellen sind sehr groß, besitzen einen ovoid bis rund geformten, dezentralen Kern und weisen nur wenige Lipidtröpfchen in ihrem Zytoplasma auf, was der gesteigerten Steroidsynthese geschuldet ist. Die endokrine Aktivität der Leydigzellen als steroidsezernierende Zelle wird auch durch den Mitochondrienreichtum und das ausgeprägte ER deutlich (Prince 1984). Zu Beginn der Pubertät wird mittels hypophysärem LH und FSH die Anreicherung von Mitochondrien in den Leydigzellen induziert und die Sensitivität der Zellen gegenüber LH-Stimulierung gesteigert (Habert et al. 2001). LH stimuliert die Testosteronbildung im Hoden, indem es an den LH-Rezeptor außen an der Zellmembran bindet und über eine Aktivierung der Adenylatzyklase einen cAMP-Anstieg herbeiführt (Saez 1994). Dies induziert eine Rekrutierung von Cholesterol mit anschließendem Transport zu den Mitochondrien, in denen dann Pregnenolon gebildet wird, was im ER über mehrere Schritte zu Testosteron umgewandelt wird (s. Kapitel 1.2.2). Leydigzellen produzieren 6-7 mg Testosteron pro Tag. Da sie nicht fähig sind Androgene zu speichern, erfolgt die Synthese und Abgabe dieser kontinuierlich. Neben Testosteron, was das Hauptsekretionsprodukt darstellt, werden auch DHT, Androstendion, DHEA, Androstendiol, Androsteron, 17-Hydroxyprogesteron, Progesteron und Pregnenolon gebildet und sezerniert. DHT ist drei- bis sechsfach potenter als Testosteron, dennoch wird mehr Testosteron von den Leydigzellen freigesetzt. Es wird zum Zielgewebe transportiert, z. B. der Prostata und dann dort zu DHT umgesetzt (Weinbauer et al. 2010). Das ebenfalls gebildete Androstendion dient in peripheren Organen als Vorstufe für die Bildung von Östrogenen, indem es zunächst zu Estron und dann zu biologisch aktivem Estradiol umgewandelt wird. Der Transport der in den Leydigzellen synthetisierten Steroide erfolgt über die *Vena spermatica*, wobei Testosteron an das *sex hormone binding globulin* (SHBG) oder an Albumin gebunden ist. Das SHBG wird auch als *androgen binding protein* (ABP) bezeichnet. Im männlichen Organismus sind lediglich 2 % des Testosterons im Blut frei vorhanden, 44 % sind an SHBG und 54 % an Albumin gebunden. Im Zielgewebe kommt es zu einer Interaktion zwischen dem Transportprotein und der endothelialen Glykokalix, so dass es aufgrund einer Konformationsänderung der Hormonbindungsstelle im Transportprotein zur Freisetzung von Testosteron kommt, was dann wiederum in die Zelle diffundieren kann. Zusätzlich gibt es den Megalin-Weg, bei dem das Steroid zusammen mit dem Transportprotein an Megalin bindet und dann über Endozytose in die Zelle aufgenommen wird (Hammes et al. 2005). Megalin wird daher auch als *cell importer protein* bezeichnet. Das aufgenommene Testosteron kann im Zytoplasma entweder selbst an den Androgenrezeptor (AR) binden oder wird in DHT umgewandelt, was ebenfalls über den AR wirken kann. Nach Dimerisierung des

Hormonrezeptors transloziert dieser in den Zellkern, bindet über die HREs an die DNA und induziert die Transkription und Translation des Zielgens, was letztendlich zum biologischen Effekt führt.

Die Leydigzellen weisen nur eine geringe Proliferationsrate im adulten Hoden auf, können aber aus perivaskulären und peritubulären Zellen ersetzt werden. Diese Umwandlung wird sowohl durch LH, wie auch durch verschiedenen Wachstumsfaktoren gesteuert (Weinbauer et al. 2010).

1.3.1.2 Androgene und östrogene Wirkungen

Testosteron ist als „das“ Androgen im Volksmund bekannt, allerdings wirkt es nicht nur selbst als Hormon, sondern auch über seine Metaboliten DHT und E₂. Interessanterweise führen Testosteron und DHT trotz des gleichen Rezeptors zu teilweise unterschiedlichen Wirkungen im männlichen Organismus. Testosteron reguliert die Zelldifferenzierung und das Zellwachstum sowie die Entwicklung des männlichen Geschlechts und die Virilisierung bei der Frau. DHT hat eher Einfluss auf die Ausprägung der Muskelmasse und ist an der Ausprägung der tiefen männlichen Stimme beteiligt. In der Prostata wird aus Testosteron DHT gebildet, was über den AR das Wachstum dieses Organs fördert. Ferner wirkt DHT auch auf den Nebenhoden, die *Vas deferens* und die Samenblasendrüse. Testosteron hingegen ist nicht nur in der Entwicklung und Aufrechterhaltung der männlichen Geschlechtsmerkmale involviert, sondern hat auch Einfluss auf das sexuelle Verhalten und die Ausprägung von Aggression (Wu und Shah 2011). Im Hoden selbst wird durch die Androgene über Wirkung an den Sertolizellen die komplette Spermatogenese aufrechterhalten und die Entwicklung einzelner Keimzellpopulationen reguliert (Chang et al. 2004). Auch die peritubulären Zellen stehen unter Androgeneinfluss (Zhang et al. 2006). Bei ihnen wird durch die Androgene die Kontraktilität gefördert, was wichtig für den Spermientransport in den Tubuli ist. Auch die Leydigzellen selbst werden durch die Expression des AR gesteuert, so dass sie durch eine kontrollierte Testosteronsynthese die Spermatogenese unterhalten und die männliche Fertilität aufrechterhalten können (Xu et al. 2007). Testosteron dient als Vorstufe (*precursor*) der Östrogene und kann durch die Aromatase (P450arom) in E₁ bzw. E₂ umgewandelt werden. Östrogene wirken sowohl synergistisch wie auch antagonistisch mit den Androgenen. In der Prostata bewirken sie über den Östrogenrezeptor β (ER β) in Zusammenarbeit mit den Androgenen einen kontinuierlichen Gewebeauf- und abbau regulieren, der für die normale Entwicklung und das physiologische Wachstum der Prostata wichtig sind. Auch im Knochen wirken sowohl Östrogene, wie auch Androgene. Letztere, insbesondere Testosteron sind für den Knochenaufbau und den Epiphysenschluss verantwortlich, wohingegen E₂ die Knochenformation und die Knochenresorption unterdrückt, so dass beide Steroidhormone an

der Knochenumsetzungsrate (*bone turnover rate*) beteiligt sind (Valimaki et al. 2004). Auch in der Haut und in den Hautanhangsorganen wirken Androgene und Östrogene zusammen. Die Hauptwirkung wird hier durch Testosteron vermittelt, allerdings wird in der Literatur auch der Einfluss von DHT als gegeben angesehen (Gilliver et al. 2009; Lee et al. 2010; Zhao et al. 2011). Testosteron stimuliert das Wachstum der Talgdrüsen, was zu einer gesteigerten Talgproduktion führen kann. Die *Akne vulgaris* kann durch hohe Testosteronkonzentrationen verursacht werden, wohingegen Östrogene die Talgproduktion verringern. Da der Haarfollikel androgensensitiv ist, werden auch die Haare durch Testosteron und DHT beeinflusst. Der individuelle Haaransatz z. B. ist durch genetische Faktoren, aber auch durch die Verteilung des AR und des Vorhandenseins von Androgenen determiniert. Das Bartwachstum ist ebenfalls durch hohe Androgenkonzentrationen induziert. In den Haarfollikeln führen androgene Stimulationen zu einer Veränderung der Haarfarbe und des Haarwuchses während des Haarwachstumszyklus und scheinen Haarausfall zu reduzieren (Randall et al. 2008). DHT beeinflusst außerdem noch die Wundheilung, indem es die Reepithelisierung hemmt (Gilliver et al. 2009).

1.3.1.3 Die Sertolizellen

Die Sertolizellen sind nach ihrem Entdecker Enrico Sertoli benannt, der sie 1865 als Erster beschrieben hat. Sie befinden sich gemeinsam mit den Keimzellen in den *Tubuli seminiferi contorti*, wo sie eine Art Ammenfunktion für die Keimzellen innehaben. Sie sind an der Basalmembran lokalisiert und erstrecken sich Balken-ähnlich mit zahlreichen lateralen und apikalen Zellausläufern zum Lumen des Hodenkanälchens hin und definieren so die innere, strukturelle Organisation des Hodenkanälchens. Zwischen den Zellausläufern befinden sich, in direktem Kontakt zu den Sertolizellen die Keimzellen, welche sich somit in einem geschützten Mikromillieu entwickeln und differenzieren können. Sertolizellen sind im Erwachsenenalter nicht mehr mitotisch aktiv (Clermont und Perey 1957) und ihre Anzahl bestimmt die Größe, die Keimzellzahl und die Produktionsleistung des Hodens (Orth et al. 1988). Sie weisen einen prominenten Kern auf, der meist im unteren Drittel der Zelle zu finden ist, und zahlreiche Zellorganellen (ER, Mitochondrien), die abhängig vom Zyklus des Keimepithels, morphologische und funktionelle Veränderungen durchlaufen (Morales et al. 1986; Ye et al. 1993). Dies ermöglicht der Sertolizelle, sich auf die unterschiedlichen Ansprüche der Keimzellen während der Differenzierung und Entwicklung einzustellen. Die Sertolizellen bilden außerdem die Blut-Hoden-Schranke (Dym und Fawcett 1970; Bergmann et al. 1989), welche die Hodenkanälchen in ein basales und ein adluminales Kompartiment unterteilen. Hierfür besitzen sie verschiedene Zell-Zell-Verbindungen. Mit der Basallamina sind die Sertolizellen über Hemidesmosomen verbunden. Untereinander stehen sie über

Desmosomen, *gap junctions* und *tight junctions* in Kontakt. Hierdurch entsteht die Blut-Hoden-Schranke, die Moleküle, welche größer als 1 kDa sind, nicht durchdringen können. So stellt die Blut-Hoden-Schranke sicher, dass die haploiden, antigenen Keimzellen vor autoimmunen Reaktionen des Organismus geschützt werden. Wichtig ist auch, dass beide Kompartimente sowohl anatomisch, wie auch funktionell komplett unterschiedlich sind (Bergmann et al. 1989). Im basalen Kompartiment befinden sich frühe Stadien der Keimzellpopulation, wohingegen spätere Stadien im adluminalen Kompartiment zu finden sind (s. Kapitel 1.3.1.4). Letztere sind komplett abhängig von den Sertolizellen, da dort nur selektiv Moleküle und Stoffe durch die Blut-Hoden-Schranke hingelangen. Sertolizellen produzieren und sezernieren eine Vielzahl von Stoffen, u. a. unterschiedliche Proteine, Steroide, Wachstumsfaktoren, endokrine und parakrine Modulatoren von Wachstum und Differenzierung, welche allesamt die Entwicklung der Keimzellen unterstützen und regulieren. Die Sertolizellen tragen also maßgeblich zur Aufrechterhaltung einer intakten Spermatogenese bei und sind daher wichtig für die Fertilität des männlichen Geschlechts.

1.3.1.4 Die Keimzellen

Die Keimzellen sind ebenfalls in den *Tubuli seminiferi contorti* lokalisiert und liegen zu einem großen Teil eingebettet zwischen den Sertolizellen. Die Keimzellpopulation setzt sich aus verschiedenen Stadien der Spermatogenese (Keimzellentwicklung) zusammen, die sich in vier Phasen unterteilen lässt. In der mitotischen Phase proliferieren und differenzieren die diploiden Keimzellen, auch Spermatogonien genannt, bevor in der nächsten Phase die noch diploiden Spermatozyten in die meiotische Teilung gehen. Es entstehen die Spermatiden, die nur noch haploid sind und sich dann zu Spermien weiterentwickeln. Nach dieser Phase kommt mit der Spermiation die letzte Phase: Die Spermien werden aus dem Keimepithel in das Lumen des Samenkanälchens freigesetzt und werden zum Nebenhoden transportiert (Russel et al. 1990; Weinbauer et al. 2010).

1.3.1.4.1 Spermatogonien

Die Spermatogonien befinden sich im basalen Kompartiment des Hodenkanälchens und sind in Typ A- und Typ B-Spermatogonien eingeteilt. Die Typ A-Spermatogonien werden weiter unterteilt in *dark* A-Spermatogonien und *pale* A-Spermatogonien. Die *dark* A-Spermatogonien stellen eine Art testikuläre Stammzellpopulation (de Rooij 1998) dar und zeigen keine Proliferation (Ehmcke et al. 2006), außer die Gesamtzahl der Spermatogonien ist stark reduziert, beispielsweise durch radioaktive Strahlung. Dann werden die *dark* A-Spermatogonien rekrutiert, um eine intakte Spermatogenese wieder herzustellen. *Pale* A-

Spermatogonien hingegen teilen sich, um sich selbst zu ersetzen oder um zwei B-Spermatogonien zu generieren.

1.3.1.4.2 Spermatozyten

Aus den B-Spermatogonien differenzieren sich die primären Spermatozyten (*preleptotene* Spermatozyten), die dann in die Meiose eintreten. Hierbei wird zunächst in der pachytänen Phase der meiotischen Teilung verstärkt RNA synthetisiert. Nach der ersten Reifeteilung spricht man von sekundären Spermatozyten. Diese weisen einen haploiden Chromosomensatz in doppelter Form auf. Nach Abschluss der Meiose liegen dann haploide Spermatisiden vor (Russel et al. 1990).

1.3.1.4.3 Spermatisiden

Die Spermatisiden sind rundliche Zellen ohne mitotische Aktivität, die eine komplizierte Umformung erfahren, um über elongierte Spermatisiden in Spermien transformiert zu werden. Hierbei kommt es zu einer starken Kondensation des Zellkerns mit Ausbildung einer Geißel und einer drastischen Reduzierung des Zytoplasmas. Diese Spermiogenese kann in vier Phasen unterteilt werden. In der Golgi-Phase bilden sich die Akrosomenbläschen und es erfolgt eine symmetrische Anordnung der Zellorganellen von vorne nach hinten. In der Kappenphase verlängern sich die Spermatisiden und das Akrosom wird gebildet. Dieses sitzt am vorderen Ende und umfasst ca. die Hälfte bis ein Drittel des gesamten Spermatisids. In der Akrosomenphase werden die Spermatisiden weiter elongiert und der Zellkern kondensiert. Dies führt zu einem Stopp der Gentranskription, so dass alle Proteine, die für die weitere Entwicklung benötigt werden, bis zu diesem Zeitpunkt gebildet sein müssen und nur noch mRNA vorhanden ist, die entweder eine lange Halbwertszeit besitzt oder an spezielle, stabilisierende Proteine gebunden ist. Ferner wird in dieser Phase die Geißel fertiggestellt. In der letzten Phase der Spermiogenese, der Reifungsphase, wird der Rest des Zytoplasmas in Form von Residualkörperchen (*residual bodies*) abgeschnürt und im Anschluss von den Sertolizellen phagozytiert. Diese zytoplasmatischen Tropfen fördern gemeinsam mit den Spermatisiden die Bildung des tubulären Fluids durch die Sertolizellen. Ferner wird die Sekretion von Inhibin, Interleukin 1 und 6 sowie des *androgen binding proteins* (ABP) durch die Sertolizellen induziert. Mit diesen letzten Schritten beginnt ein neuer Zyklus der Spermatogenese (Russel et al. 1990; Weinbauer et al. 2010).

1.3.1.4.4 Spermien

Die Spermien werden im Rahmen der Spermiation in das Lumen der Hodenkanälchen entlassen, wobei nicht freigesetzte Spermien von den Sertolizellen phagozytiert werden.

Interessanterweise besitzen bereits neben den Spermien auch elongierte und sogar runde Spermatiden die nötigen Informationen, weibliche Eizellen zu befruchten und eine Schwangerschaft herbeizuführen. Die entlassenen Spermien werden durch peristaltische Bewegungen, an denen auch die peritubulären Myoidzellen beteiligt sind, durch die *Tubuli seminiferi recti* zum *Rete testis* transportiert, von wo aus sie über die *Ductuli efferentes* in den Nebenhoden gelangen. Im Nebenhoden werden weitere Modifikationen an den Spermien vorgenommen. Durch die Zusammensetzung des Nebenhodenfluids wird die Motilität der Spermien induziert. Außerdem wird der an den Spermien verbliebene Zytoplasmotropfen vom Hals in den mittleren Schwanzbereich verlagert und der Spermienkopf erneut morphologisch verändert. Diese Prozesse werden als Spermienreifung angesehen und finden im Nebenhodenkopf statt. Anschließend erfolgt die Lagerung der Spermien im Nebenhodenkörper und Nebenhodenschwanz bis sie bei der Ejakulation freigesetzt werden. Im weiblichen Geschlechtstrakt müssen sie dann zunächst kapazitieren, um eine Eizelle befruchten zu können (Russel et al. 1990; Weinbauer et al. 2010).

1.3.1.4.5 Stadien der Spermatogenese

Bei der histologischen Betrachtung des Querschnittes durch einen *Tubulus seminiferus contortus* wird immer eine bestimmte Assoziation von Keimzellen beobachtet, die als Spermatogenese-Stadium bezeichnet wird. Clermont hat 1963 sechs verschiedene Stadien unterschieden (Clermont 1963), die ihren Ursprung in den parallel ablaufenden Spermatogenesezyklen (Spermatogenesewellen) innerhalb eines Keimtubulus haben (Bergmann 2005). Die zeitliche oder räumliche Abfolge dieser Stadien nennt man Keimepithelzyklus. Im Folgenden werden sie kurz dargestellt:

Stadium I:

Auftreten von zwei Spermatidengenerationen; Über- und Nebeneinanderliegen von runden und elongierten Spermatiden; Vorkommen primärer Spermatozyten im Pachytänstadium; Vorkommen von A- und B-Spermatogonien

Stadium II:

Vorkommen von beinahe fertigen Spermien; Abschnürung des Residualkörperchens bei den Spermatiden und Vollendung der Spermiation; Vorkommen von pachytänen Spermatozyten; Vorkommen von A- und B-Spermatogonien; *Sperm release* am Ende dieses Stadiums

Stadium III:

Auftreten einer einzigen Spermatidengeneration; Auftreten von zwei Spermatozytengenerationen (pachytäne und präleptotene Spermatozyten); Vorkommen von A-Spermatogonien

Stadium IV:

Beginnende Elongation der runden Spermatiden; Auftreten von zwei Spermatozytengenerationen (präleptotene und leptotäne Spermatozyten); Vorkommen von A-Spermatogonien

Stadium V:

Weiterführung des Stadiums IV mit Elongation der runden Spermatiden; Auftreten von zwei Spermatozytengenerationen (präleptotene und leptotäne Spermatozyten); Vorkommen von A-Spermatogonien; am Ende des Stadiums Eintritt der Spermatozyten in die 1. Reifeteilung der Meiose

Stadium VI:

Vorkommen sekundärer Spermatozyten, die unverzüglich in die 2. Reifeteilung der Meiose übergehen und zu runden Spermatiden werden; selten histologisch beobachtetes Stadium der Spermatogenese

1.3.1.4.6 Störungen der Spermatogenese

Störungen in der Spermatogenese sind mit Sub- oder Infertilität verknüpft und somit von klinischer Bedeutung in der Andrologie. Bei Dohle und in den Richtlinien der *European Association of Urology* findet sich eine Beschreibung der Ejakulatuntersuchung und der möglichen Störungen (Dohle et al. 2005). Um eine durch Defekte der Spermatogenese hervorgerufene Sub- oder Infertilität zu diagnostizieren ist eine diagnostische Hodenbiopsie nötig. Spermatogenesestörungen können in allen Stadien der Spermatogenese auftreten und werden folgendermaßen unterteilt. Bei einer qualitativ intakten, aber quantitativ reduzierten Keimzellproduktion wird von einer Hypospermatogenese (hyp) gesprochen. Bei dieser werden noch Spermien in das Lumen des Tubulus entlassen. Wenn die Spermatogenese auf einer Stufe der Keimzellentwicklung stoppt, spricht man vom Arrest der entsprechenden Stufe (Spermatidenarrest (sda), Spermatozytenarrest (sza), oder Spermatogonienarrest (sga)). Befinden sich nur noch Sertolizellen in den Keimtubuli und ist ein vollständiges Fehlen der Keimzellen zu beobachten, liegt ein *Sertoli Cell Only Syndrom* (SCO) vor. Wenn in einem Tubulus weder Sertolizellen, noch Keimzellen vorhanden sind, wird dies als „Tubulusschatten“ bezeichnet. Neben den Arresten, dem SCO und dem Auftreten von Tubulusschatten können

auch Differenzierungsstörungen im Keimepithel beobachtet werden, wie z. B. mehrkernige Spermatozyten. Eine Beurteilung der Spermatogenese erfolgt histologisch in semi-quantitativer Form mittels *score count* und ist bei Johnsen (Johnsen 1970) bzw. Bergmann und Kliesch beschrieben (Bergmann M und Kliesch S 2010).

1.3.2 Die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse

Die Fortpflanzung beim Säuger ist durch neuronale und endokrine Faktoren reguliert. Eine wichtige Funktion übernimmt hierbei die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse. Sie ist nicht rein hierarchisch aufgebaut, sondern stellt vielmehr eine Verzahnung verschiedener endokriner Regelkreisläufe dar, die über Stimulation und negative Feedbackmechanismen sehr fein reguliert sind. Der Hypothalamus ist ein Teil des Zwischenhirns und enthält verschiedene Kerngebiete (Nuclei, Ganglien), die über afferente und efferente Nervenbahnen mit den übergeordneten Strukturen des zentralen Nervensystems verbunden sind (Nickel et al. 2004a). Da der Hypothalamus Signale verarbeitet und an untergeordnete Strukturen weitergibt, wird er auch als Integrationszentrum bezeichnet (Nickel et al. 2004a). Seine Signale gibt er entweder in neuronaler oder endokriner Form weiter. Die Zellen, die in der Lage sind ihre Signale in endokriner Form weiterzugeben, werden als neurosekretorische Zellen bezeichnet. Sie produzieren Peptidhormone (Neuropeptide), die in der Fortpflanzung eine regulatorische Funktion einnehmen. Von ihrer Produktionsstätte werden sie über die Axone zu den Nervenzellendigungen transportiert, von wo aus sie ins Blut abgegeben werden. Die Peptidhormone können stimulierend oder inhibierend wirken. Je nach Wirkung werden sie als *releasing hormone* oder *inhibiting hormone* bezeichnet. Das für die Reproduktion wichtige hypothalamische Peptidhormon ist das *gonadotropin releasing hormone (GnRH)*, das an der Adenohypophyse wirkt. Die Hypophyse (Hirnanhangsdrüse, *Glandula pituitaria*) besteht aus drei Teilen: dem Hypophysenvorderlappen (Adenohypophyse, HVL), dem Zwischenlappen und dem Hypophysenhinterlappen (Neurohypophyse, HHL) (Nickel et al. 2004b). Der HVL und der Zwischenlappen weisen die Struktur einer endokrinen Drüse auf, wohingegen der HHL aus spezialisierten Gliazellen, Kapillaren und Nervenfasern besteht und keine endokrine Funktion innehat. Der HVL bildet das *Luteinisierende Hormon (LH)* und das *Follikelstimulierende Hormon (FSH)*. LH bewirkt beim männlichen Organismus die Steroidogenese in den Leydigzellen des Hodens, wohingegen das FSH zum einen die Spermatogenese stimuliert (Gametogenese) und zum anderen auf die Sertolizellen einwirkt, so dass diese die für die Spermatogenese benötigten Faktoren synthetisieren und sezernieren (Weinbauer et al. 2010). Beim weiblichen Säuger wirken die beiden Hormone am Ovar und tragen zur Steuerung des Sexualzyklus und der Ovulation bei.

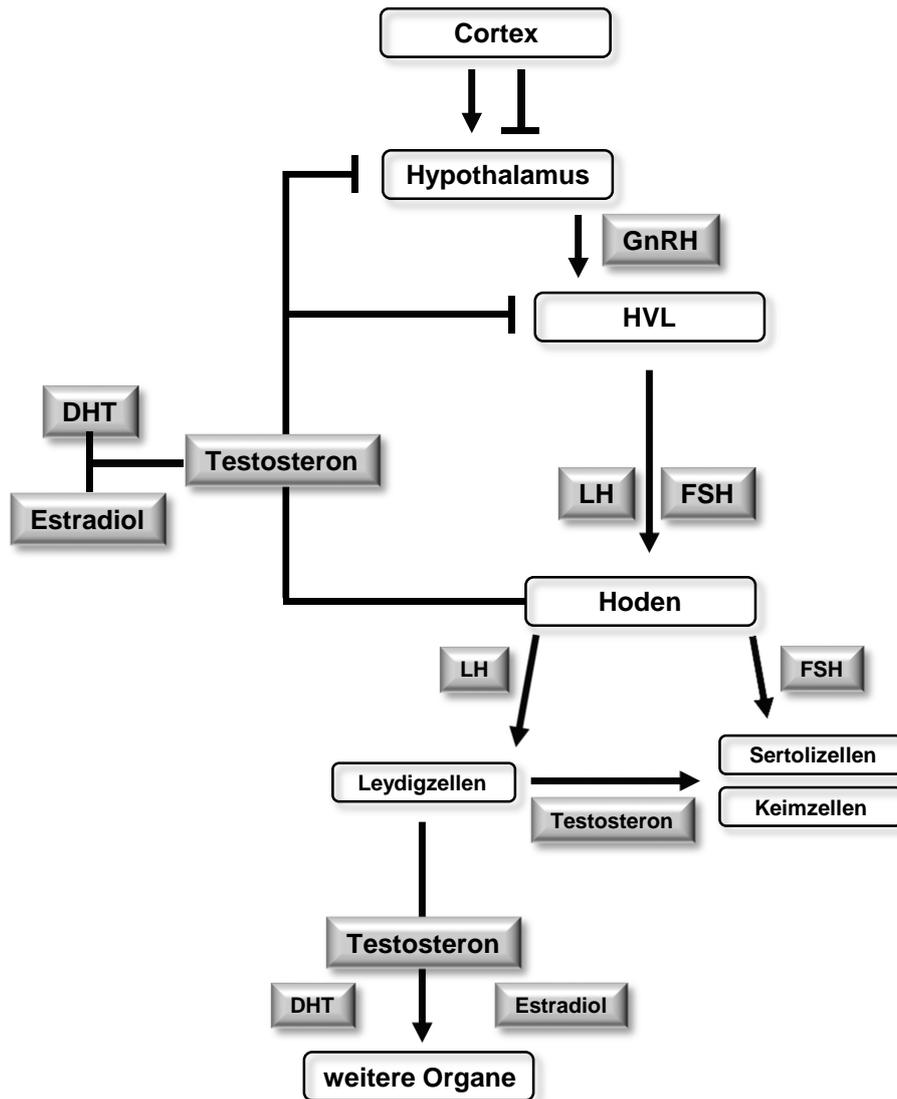


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden (Hoden)-Achse
(Erläuterungen siehe Text)

1.3.2.1 Wirkung des GnRH

GnRH wird im Hypothalamus gebildet und gelangt über die Axone in das Kapillarnetz des HVL, von wo aus es die Freisetzung des LHs und FSHs stimuliert. GnRH hat eine kurze biologische Halbwertszeit von 2-4 min und ist daher im peripheren Blutkreislauf nur in sehr geringen Konzentrationen vorhanden. Im Bereich des HVLs können aber hohe Konzentrationen gemessen werden. GnRH wird pulsatil freigesetzt, wobei diese unter Kontrolle des *Kisspeptin-GPR54-Systems* steht (Pinilla et al. 2012). Kisspeptin ist das Produkt des *KISS1-Gens* und stellt den natürlichen Liganden des GPR54-Rezeptors dar (Lee et al. 1999; Muir et al. 2001). Kisspeptin wird vor allem im Hypothalamus gebildet, kann aber auch von der Plazenta, dem Hoden, dem Pankreas, der Leber und dem Darm produziert werden (Weinbauer et al. 2010). Kisspeptin bindet an den GPR54-Rezeptor, der sich an der Oberfläche von GnRH-

sezernierenden Neuronen befindet. Das Kisspeptin-GPR54-System ist für die Initiierung der Gonadotropin-Freisetzung während der Pubertät (Seminara et al. 2003) und für die normale Androgenisierung des postpubertären männlichen Organismus essentiell (Funes et al. 2003), da ein mutationsbedingter Funktionsverlust des GPR54-Rezeptors zu hypogonadotropem Hypogonadismus und einem gestörten Pubertätsverlauf führt (de Roux et al. 2003). Kisspeptin ist sensitiv für die Steroidhormonkonzentration im Blutkreislauf und somit verantwortlich für den negativen bzw. positiven Feedbackmechanismus, der die Gonadotropin-Sekretion reguliert. Androgene, Östrogene und Gestagene wirken nicht direkt an den GnRH-sezernierenden Neuronen, sondern über ihre Wirkung an den entsprechenden Rezeptoren (Androgenrezeptor (AR), Östrogenrezeptor α und β (ER α , ER β) und Progesteronrezeptor (PR)) an den Kisspeptin-Neuronen, so dass über die Bindung der Steroidhormone an diesen Neuronen die Kisspeptin-Ausschüttung reduziert wird und somit auch die GnRH-Freisetzung (Weinbauer et al. 2010). GnRH selbst wird durch zwei separate Gene codiert, so dass man zwischen zwei Peptiden unterscheidet: GnRH I und GnRH II. Beide weisen eine sehr ähnliche Struktur auf, unterscheiden sich aber in ihren Expressionsorten (Cheng und Leung 2005). Beide Peptidhormonformen binden an den GnRH-Rezeptor Typ I, wobei GnRH I die Gonadotropin-Freisetzung reguliert und GnRH II stimulierenden Einfluss auf das Sexualverhalten hat. GnRH ist, phylogenetisch betrachtet, ein sehr altes, hochkonserviertes Hormon. Wie bereits zuvor erwähnt, wird es pulsatil freigesetzt. Neben dem Kisspeptin-GPR54-System beeinflussen auch die Konzentrationen peripherer Steroide seine Freisetzung (Handa und Weiser 2013). Dies konnte dadurch gezeigt werden, dass nach Gonadektomien die Pulsfrequenz und die Pulsamplitude der GnRH-Freisetzung deutlich anstieg bzw. zunahm (Lopez et al. 1998). Die GnRH-Sekretion ist hauptsächlich durch die Bindung von Testosteron am AR reguliert, was den negativen Feedbackmechanismus am Hypothalamus auslöst (siehe oben). Neben Testosteron können auch seine Metaboliten DHT und E₂ diese Rückkopplung vornehmen (Hrabovszky et al. 2007). Allerdings wird davon ausgegangen, dass Testosteron und DHT die Hauptakteure am Hypothalamus darstellen, wohingegen das E₂ eher an der Hypophyse tätig wird (Hayes und Crowley, Jr. 1998). Einen weiteren Einfluss auf die GnRH-Sekretion haben das noradrenerge, das dopaminerge, GABA-erge, und serotoninerge System sowie Opiode, Leptin und Neuropeptid Y (NPY), die entweder stimulierend oder inhibierend wirken (Finn et al. 1998; Evans 1999; Ojeda et al. 2010). Die Wirkung des GnRH erfolgt durch Bindung an den GnRH-Rezeptor, was zu einer Interaktion mit einem Gq-Protein führt. Daraus resultiert die Hydrolyse von Phosphoinositol-Bisphosphat, so dass Diacylglycerol und Inositol-Trisphosphat freigesetzt werden. Diese sind wiederum für die intrazelluläre Calcium-Mobilisation und das Öffnen von Calcium-Kanälen verantwortlich, so dass der erhöhte Calciumgehalt in der Zelle zusammen mit dem Diacylglycerol die Proteinkinase C aktivieren

kann, was zu Proteinphosphorylierungen führt und den Calciumeinstrom weiter stimuliert (Conn et al. 1986). Final kommt es zur Exozytose der Gonadotropine und zur deren gesteigerten Synthese aufgrund der hohen Calciumkonzentration in der Zelle. GnRH kann die Anzahl und Aktivität seiner Rezeptoren selbst regulieren. Eine übermäßige GnRH-Stimulation führt allerdings zu einer Desensibilisierung und Internalisierung der Rezeptoren.

1.3.2.2 Wirkung der Gonadotropine LH und FSH

Sowohl beim männlichen, als auch beim weiblichen Organismus werden die als Gonadotropine bezeichneten HVL-Hormone LH und FSH synthetisiert. Sie dienen der Modulation der Gonaden in Bezug auf Entwicklung, Reifung und Funktion (O'Shaughnessy 2014). Beim Mann wird LH aus dem HVL durch die GnRH-Stimulierung pulsatil freigesetzt, wobei die Pulsfrequenz der GnRH-Sekretion mit der des LHs korreliert (Clarke und Cummins 1985). FSH hingegen besitzt eine längere biologische Halbwertszeit (2 h) und weist eine eher kontinuierliche Freisetzung auf (Weinbauer et al. 2010). Beide Hormone stellen Glykoprotein-Hormone dar, die aus einer α - und einer β -Untereinheit bestehen. Während die α -Untereinheit bei allen Mitgliedern der Glykoprotein-Hormon-Familie gleich ist, weist die β -Untereinheit hormonspezifische Unterschiede auf. LH und FSH werden nach ihrer Bildung in verschiedenen Granula innerhalb der Hypophyse gelagert. Ein Teil der synthetisierten Hormone wird aber auch kontinuierlich freigesetzt und somit nicht gespeichert. Dies trifft vor allem auf FSH zu. Durch die Pulsfrequenz der GnRH-Freisetzung wird determiniert, ob FSH oder LH freigesetzt wird (Clarke und Cummins 1985). Eine niedrige Pulsfrequenz führt zur FSH-Sekretion, eine hohe zur Freisetzung von LH. Während der fetalen und der präpubertären Phase dominiert die FSH-Sekretion über die LH-Freisetzung, allerdings ändert sich das während der Pubertät. Die Freisetzungsrates von FSH und LH steigt zunächst langsam an und wird im Laufe der pubertären Phase gesteigert, so dass sowohl tagsüber wie auch nachts eine kontinuierliche, pulsatile Ausschüttung erfolgt. Ähnlich wie beim GnRH gibt es auch bei LH und FSH negative Feedbackmechanismen, allerdings sind diese sehr komplex. Testosteron wirkt bei allen Spezies inhibitorisch auf die GnRH-stimulierte Freisetzung der Gonadotropine. Auch die Östrogene scheinen eine hemmende Wirkung auf die Gonadotropin-Sekretion zu haben. Die Gonadotropine wirken über den jeweiligen Gonadotropin-Rezeptor, die zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören. Nach Aktivierung des Rezeptors folgt ein Anstieg von cAMP und eine Aktivierung der Proteinkinase A. Neben diesem Hauptwirkungsweg kann auch die intrazelluläre Calciumkonzentration gesteigert werden. Die genaue Bedeutung des zweiten Weges ist aber bislang noch nicht geklärt. Die Proteinkinase A phosphoryliert verschiedene Zielproteine, unter anderem Enzyme, Struktur- und Transportproteine sowie Transkriptionsfaktoren. FSH und LH sind wichtig für die Funktion der Gonaden, allerdings ist

noch nicht abschließend verstanden, welches Gonadotropin welche Funktion übernimmt. Erschwert wird das Ganze durch die Tatsache, dass es speziesspezifische Unterschiede gibt, so dass in der Vergangenheit durch den Knockout einzelner Rezeptor-Gene oder Co-Faktoren nicht automatisch die Bedeutung und Funktion beim Menschen evaluiert werden konnte.

1.4 Die Haut als Steroidhormon-synthetisierendes Organ

1.4.1 Anatomie der Haut

Die Haut (*Cutis*, *Derma*) stellt das größte Organ des Körpers dar und übernimmt als äußere Umhüllung des Körpers eine wichtige Schutzfunktion, indem sie externe Schädigungen, wie Umwelteinflüsse oder Krankheitserreger vom Körperinneren fernhält (Nickel et al. 2005). Neben dem Schutz vor physikalischen, chemischen, mechanischen oder biologischen Einwirkungen, erfüllt sie auch einige Funktionen im Bereich des Stoffwechsels. Hierzu zählt die Aufrechterhaltung des Serum-Elektrolytspiegels durch die Bereitstellung eines „Ionenpools“ und ihre Tätigkeit als Regulationsorgan für den Blutdruck. Die Haut ist auch ein wichtiger Bestandteil der Thermoregulation beim Menschen genauso wie bei den Haussäugetieren, die allesamt zu den homoiostatischen Lebewesen gehören. Die Haut ist hierfür mit einer Vielzahl von Blutgefäßen ausgestattet, die gemeinsam mit den Haaren und den Talg- und Schweißdrüsen dazu beitragen die Körpertemperatur zum einen aufrechtzuerhalten, und zum anderen den Körper vor Überhitzung zu schützen (Nickel et al. 2005). Während die Schweißdrüsen Wärme über Verdunstungskälte abgeben, fetten die Exkrete der Talgdrüsen die Haut und Haare ein und machen sie so wasserundurchlässig. Organische Fette hingegen und chemische Stoffe, die lipophil sind, können in die Haut eindringen. Trotzdem stellt die Haut eine wirkungsvolle Schutzbarriere des Organismus dar. Die Haut gehört auch zu den Sinnesorganen. Sie besitzt Rezeptoren für Temperatur, Druck, Spannung und Schmerz (Meckelsche Tastscheiben, Meissnersche Tastkörperchen, Vater-Pacinische Lamellenkörperchen, freie sensible Nervenendigungen) (Liebich 2004). Ferner dienen die Haut und die Hautanhangsorgane auch der sozialen Kommunikation zwischen zwei oder mehreren Individuen einer Spezies, beispielsweise durch Abgabe von Duftstoffen (Nickel et al. 2005).

Die Haut besteht aus drei Schichten: Die außen befindliche Epidermis (Oberhaut), die darauffolgende Dermis (Lederhaut) und die zum Körperinneren zeigende Subcutis (Unterhaut) (Liebich 2004). Epidermis und Dermis bilden die Haut im eigentlichen Sinne. Die Epidermis wird von einem mehrschichtigen, an der Oberseite verhornenden Plattenepithel gebildet, das sich ständig erneuert. Die Hauptaufgabe dieser Schicht ist der Schutz vor chemischen, thermischen, physikalischen und biologischen Einwirkungen, so dass der Verhornungsgrad in

Abhängigkeit von der Belastung unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Es gliedert sich in folgende Schichten:

- *Stratum corneum*
- *Stratum lucidum*
- *Stratum granulosum*
- *Stratum spinosum*
- *Stratum basale*

Das *Stratum basale* und das *Stratum spinosum* bilden die Keimschicht, das *Stratum germinativum*. Die Epidermis besteht zu 85 % aus Keratinozyten, die sich vom *Stratum germinativum* im Rahmen eines mehrstufigen Differenzierungsprozesses nach außen schieben und durch Keratinisierung und Verhornung final in der abgestorbenen Hornzelle enden, die als Hautschuppe vom Körper abgestoßen wird (Desquamation) (Liebich 2004).

Das *Stratum corneum* bildet die Hornschicht, die den Körper abdeckt. Die Zellen dieser Schicht sind maßgeblich für den Schutz des Körpers als epidermale Grenzbarriere zuständig (Liebich 2004). Das *Stratum lucidum* ist meist nur bei einer sehr dicken Epidermis im histologischen Schnitt zu sehen. Seinen Namen hat es durch die Verflüssigung der Keratohyalinkörnchen zu Eleidin bekommen, da letzteres eine transparent-leuchtende Struktur hat (Nickel et al. 2005).

Im *Stratum granulosum* sind in der Histologie die Keratohyalin granula als granuliert Struktur zu sehen, die dieser Schicht ihren Namen einbrachte. Die polygonalen Epithelzellen der nächsten Schicht sind durch Desmosomen miteinander über Ausläufer verbunden, was ihnen die Bezeichnung Stachelzellen eingebracht hat. Sie gehören zum *Stratum spinosum*. Hier beginnt die Keratinisierung der Epithelzellen mit verschiedenen Zytokeratinen und den Filaggrinen (Keratinfilament-assoziierten Proteinen) (Liebich 2004). In der innersten Schicht der Epidermis, dem *Stratum basale* befinden sich hochprismatische Zellen, die mit der Lederhaut über Hemidesmosomen verankert sind. Vom *Stratum basale* werden zyklisch neue Epithelzellen gebildet, welche die sich abschilfernden Zellen der Hornschicht ersetzen (Liebich 2004). Im *Stratum basale* unterscheidet man verschiedene Zelltypen. Neben den Keratinozyten finden sich hier auch die Melanozyten, die Melaninkörnchen eingelagert haben und somit zur Pigmentierung der Haut beitragen und die Dendritenzellen, die als Langerhanszellen immunologische Aufgaben übernehmen und zum Immunsystem gehören. Die Dendritenzellen können aber auch Melanin bilden und es an die Nachbarzellen abgeben. In der Epidermis gibt es keine Blutgefäße. Die Versorgung dieser Schicht erfolgt über Diffusion und Osmose mit Stoffen, die aus der Lederhaut kommen. Die Qualität der Epidermis ist stark abhängig von der Nährstoff- und Energiezufuhr, daher ist eine starke Vaskularisierung und Durchblutung der Lederhaut für die Aufrechterhaltung der epidermalen Barriere von äußerster Wichtigkeit. Die Lederhaut, auch Dermis oder *Corium* genannt, ist eine bindegewebsreiche Zwischenschicht, die die Epidermis mit der Subcutis verbindet. Sie wird in zwei Schichten

unterteilt: *Stratum papillare* und *Stratum reticulare*. Das *Stratum papillare* (Zapfen- oder Papillenschicht) besteht aus lockerem Bindegewebe und bildet die Papillarkörper, die in die Epidermis hineinragen und somit diese mit dem *Corium* verzahnen. In den Papillarkörpern sind zahlreiche Kapillarnetze eingelagert, die zum einen die Versorgung der Epidermis mit Nährstoffen sicherstellen, und zum anderen der Thermoregulation dienen (Nickel et al. 2005). Für letztere sind auch die größeren Blutgefäße dieser Hautschicht verantwortlich (Liebich 2004). Ferner ist hier die vegetative Innervation untergebracht. In dieser Schicht befindet sich auch die epidermale Trias, bestehend aus Haaren, Talg- und Schweißdrüsen. Das *Stratum reticulare* (Netzschrift) garantiert die Aufrechterhaltung der Struktur und die Herstellung der ursprünglichen Form nach Deformierung (Plastizität) (Liebich 2004). Es besteht hierfür aus Kollagenfasern und elastischem Bindegewebe und ist eher gefäßarm.

Die innerste Hautschicht stellt die Subcutis dar. In ihr verlaufen die großen Blutgefäße und die Nerven der oberen Hautschichten, eingebettet in kollagenes Bindegewebe, welches mit elastischen Fasern durchzogen ist. Dies ermöglicht die Verschiebbarkeit der Haut. Das in großer Menge vorhandene subkutane Fett wird sowohl zur Temperaturregulierung, wie auch als Energiereserve genutzt. Ferner stellt es ein Druck- und Stoßpolster dar.

Neben der Haut an sich, besitzt der Organismus auch Hautanhangsorgane. Hierzu zählen die Haare mit ihren Talgdrüsen und Haarbalgmuskeln, die Nägel, die Hörner und die Schweißdrüsen. Die Brustdrüse gehört ebenfalls zu den Hautanhangsorganen, sie ist eine modifizierte Hautdrüse.

Die Talgdrüsen (*Glandulae sebaceae*) sind exokrine, alveoläre und holokrin sezernierende Drüsen (Liebich 2004). Sie sind in die Lederhaut eingelagert und über einen kurzen Ausführungsgang mit der Oberfläche der Epidermis verbunden. Sie bilden am Grund der Drüse den Talg (*Sebum*), der aus Fettsäuren, Cholesterin und Triglyzeriden besteht. Im Laufe der Talgbildung kommt es zur Degeneration der älteren Generation der Sebozyten durch eine massive Einlagerung der Talgbestandteile, so dass die Zellen irgendwann platzen und ebenfalls zu einem Bestandteil des *Sebums* werden (holokrine Sekretion). Der Talg dient dazu, die Epidermis geschmeidig zu halten und sie undurchlässig gegenüber wässrigen Flüssigkeiten zu machen (Liebich 2004).

1.4.2 Steroide in der Haut

Die Haut besitzt, wie der Hoden, die Fähigkeit, Steroide zu bilden (Zouboulis 2000; Labrie et al. 2000a; Zouboulis 2004), da die für die Steroidbiosynthese benötigten Enzyme (P450_{sc}, P450_{c17}, 3 β -HSD und 17 β -HSD) in den verschiedenen Zelltypen der Haut vorhanden sind (Dumont et al. 1992b; Courchay et al. 1996; Ando et al. 1999). Ferner sind die Zellen der Haut auch *target cells* für die in den Gonaden bzw. in der Nebenniere gebildeten Steroidhormone.

Die Haut ist somit, wie der Hoden, gleichzeitig Produzent und Zielorgan von Steroidhormonen. Die Haut ist in der Lage, die steroidal Hormone sowohl aus Cholesterol neu zu synthetisieren, als sie auch aus im Blutkreislauf zirkulierenden Vorstufen (DHEA, DHEAS) zu bilden. Die Neusynthese aus Cholesterol findet vor allem in den Keratinozyten und Sebozyten statt (Thiboutot et al. 2003), die nicht nur das für die Mobilisierung und den Transport zu den Mitochondrien benötigte StAR-Protein exprimieren, sondern auch die Enzyme P450_{sc}, P450_{c17} und die 3 β -HSD. Die Androgensynthese geschieht vor allem in der Haartalgrüseneneinheit (*pilosebaceous unit*) (Hay und Hodgins 1973; Takayasu et al. 1980; Itami und Takayasu 1981; Simpton et al. 1983), die aus dem Haarfollikel, der Talgdrüse und dem *Musculus arrector pili* besteht. Aber auch in den Schweißdrüsen findet ein großer Teil des Androgenmetabolismus der Haut statt. Durch die Expression der 17 β -HSD halten die der Haartalgrüseneneinheit angehörenden Sebozyten die Homöostase zwischen Testosteron und Androstenedion aufrecht (Fritsch et al. 2001). Dies ist wichtig, da ein Übermaß an Testosteron die Barrierefähigkeit der Haut einschränkt (Kao et al. 2001). In der Haut können Androgene aufgrund der Anwesenheit der Aromatase auch zu Östrogenen metabolisiert werden (Fritsch et al. 2001; Brodie et al. 2001), die dann über die Östrogenrezeptoren α und β , die in fast allen Zelltypen der Haut exprimiert werden, wirken können (Thornton et al. 2003). Ferner erfolgt auch die Inaktivierung der Androgene in der Haut selbst, da mit der 3 α -HSD das benötigte Enzym vorhanden ist. Die Inaktivierung geschieht vorzugsweise in den Keratinozyten (Fritsch et al. 2001). Die Haut ist somit in der Lage, die von ihr benötigten Steroidhormone selbst zu bilden, so dass sie als intrakrin tätiges Organ verstanden wird (Labrie et al. 2000a). Diese hormonelle Autonomie ermöglicht der Haut, die Funktion und den Metabolismus der Steroidhormone in Abhängigkeit des lokalen Bedarfs zu variieren und anzupassen. Neben der Neusynthese der Steroidhormone ist auch die Aktivierung der im Blutstrom vorhandenen Vorstufen in der Haut möglich. Dies wird vor allem in der Hautpapille (*Papilla dermae*) durchgeführt, da hier die Steroidsulfatase (StS) stark exprimiert wird und sie die Aktivierung der Steroidsulfate katalysiert (Hoffmann et al. 2001; Hoffmann 2001). Die StS erfüllt damit eine wichtige Funktion in der Hautphysiologie. Bei der RXLI (rezessiven X-linked Ichthyosis) besteht eine StS-Defizienz, was zu einer massiven Akkumulation von Cholesterolsulfat im *Stratum corneum* führt (siehe Kapitel 1.5.1) (Williams und Elias 1981). Dies beruht auf der Stimulierung der Verhornung durch das akkumulierte Cholesterolsulfat (Elias et al. 1984), was zu den Symptomen der Erkrankung, massive Schuppung der Haut mit grau-bräunlicher Verfärbung der betroffenen Stellen, führt. In der Haut wird neben dem Cholesterolsulfat hauptsächlich DHEAS durch die StS (Milewich et al. 1988; Hoffmann et al. 2001) in DHEA überführt, was dann wiederum der Testosteron- und DHT-Bildung zugeführt wird (Zouboulis 2000; Labrie et al. 2000a; Labrie et al. 2001). Beide Androgene stimulieren in der Haut die

Zellproliferation, vor allem in den Sebozyten im Gesicht (Akamatsu et al. 1992). Eine weitere Aufgabe der Androgene in der Haut ist die Regulation der Haarfollikel, was Konsequenzen für Haar- und Bartwuchs hat (Randall 2007; Randall 2008). Die Östrogene führen in der Haut zu einem höheren Collagengehalt, verbessern die Vaskularisierung und erhöhen die Hautdicke (Thornton 2002). Ferner wirken sie positiv auf das Längenwachstum der Haare durch Stimulierung der Zellproliferation. Die Steroidhormone haben aber nicht nur lokale Wirkung. Labrie et al. fanden heraus, dass bei postmenopausalen Frauen nahezu alle aktiven Sexualhormone des gesamten Organismus in peripheren Geweben wie der Haut gebildet werden, so dass die Bedeutung der Haut als endokrines Organ außer Frage steht (Labrie et al. 2000a).

1.5 Sulfatierte Steroidhormone

Im menschlichen Organismus sind nicht nur freie, unkonjugierte Steroide zu finden, sondern auch sulfatierte und glukuronidierte Formen. Lange Zeit galten diese konjugierten Steroide als Ausscheidungsprodukte, die, nachdem das freie Steroid in der Zelle seine Funktion erfüllt hatte, durch Metabolisierungsreaktionen entstanden und dann über den Blutweg zur Leber bzw. Niere transportiert wurden, um mit der Galle, respektive mit dem Urin ausgeschieden zu werden (Strott 1996; Hum et al. 1999). Unterstützt wurde diese Theorie dadurch, dass sulfatierte Östrogene, wie E₁S oder E₂S keine Wirkung am Östrogenrezeptor aufweisen, was lange Zeit ihr Dasein als inaktive Steroide untermauerte. Allerdings ist die Konzentration von im Blut zirkulierendem E₁S deutlich höher als die von freiem, unkonjugiertem E₁ (Pasqualini et al. 1989). Ferner weist E₁S eine deutliche längere Halbwertszeit im Blut auf (bis zu 9 x länger) im Vergleich mit den freien Steroiden E₁ bzw. E₂ (Ruder et al. 1972). Daher wird in der Literatur diskutiert, ob sulfatierte Steroide wirklich nur als Exkretionsprodukte betrachtet werden sollten, oder ob sie nicht ein Reservoir darstellen, aus dem Östrogen- bzw. Androgen-Vorstufen für die Bildung biologisch aktiver Steroide rekrutiert werden können, wenn im Organismus allgemein oder lokal im Gewebe ein Bedarf an Steroidhormonen besteht (Labrie et al. 2001). Für die Bildung biologisch aktiver Steroidhormone wird die StS (siehe Kapitel 1.5.1) benötigt, die sowohl Arylsulfate (E₁S), als auch Alkylsulfate (z. B. DHEAS, Pregnenolonsulfat (PREGS), Cholesterolsulfat) hydrolysieren kann und somit diese sulfatierten Steroide in die freie Form überführt (Noel et al. 1983; Dibbelt und Kuss 1983; Selcer et al. 2002). Dieser sogenannte *Sulfatase pathway* ist vor allem in hormonabhängigen Mammakarzinomen von Bedeutung. Studien belegen, dass die Bildung biologisch aktiver Steroide aus E₁S bzw. E₂S über den *Sulfatase pathway* bis zu 10 x mehr E₁ hervorbringt, als die E₁-Herstellung aus Androstendion mittels P450arom (Santner et al. 1984). Ferner sind in hormonabhängigen Mammakarzinomen große Mengen der sulfatierten Östrogene zu finden, was ebenfalls auf das Vorhandensein

eines alternativen bzw. lokalen Steroidhormonreservoirs hindeutet (Pasqualini et al. 1989; Pasqualini und Chetrite 2005). Neben E_1S fungiert auch DHEAS als Precursor für unkonjugierte Steroidhormone. DHEAS weist wie E_1S eine längere Halbwertszeit im Blut auf, verglichen mit der freien Form (Kroboth et al. 1999). Aus DHEAS kann neben DHEA auch Androstendion gebildet werden, was dann wiederum in Östrogene umgewandelt werden kann. 5-Androstendiol (5-Androstendiol- $3\beta,17\beta$ -diol) kann an den ER binden (Poortman et al. 1975), wenn auch mit einer geringeren Affinität wie E_2 . Da aber in postmenopausalen Frauen die Konzentration von Androstendiol im Plasma mindestens 100-fach höher ist als die Konzentration von E_2 , wird angenommen, dass Androstendiol am ER ähnlich potent wie E_2 bei diesen Frauen wirken kann (Labrie et al. 2001). Im Hoden werden große Mengen Testosteron produziert, die über den Androgenrezeptor auf Sertolizellen, Leydigzellen und peritubuläre Myoidzellen wirken. Zusätzlich ist der Hoden aber auch in der Lage, sulfatierte Steroide wie PREGS, DHEAS und Testosteronsulfat herzustellen (Laatikainen et al. 1971; Ruokonen et al. 1972), wobei Ruokonen zeigen konnte, dass hierbei PREGS und DHEAS quantitativ am häufigsten vorkommen (Ruokonen et al. 1972). Die sulfatierten Steroide scheinen daher im Hoden, ähnlich wie in hormonabhängigen Mammakarzinomen, eine wichtige Rolle für die lokale Versorgung mit Steroidhormonen darzustellen (Ruokonen et al. 1972; Vihko und Ruokonen 1975; Ruokonen und Vihko 1983). Dies konnten auch andere Studien belegen, in denen gezeigt wurde, dass PREGS als Vorläufer für die Testosteronsynthese im Hoden genutzt werden kann (Payne et al. 1971; Payne et al. 1973; Payne und Jaffe 1975). Neben PREGS dienen auch DHEAS und Androstendiol-3-sulfat als Vorstufen des Testosterons (Payne et al. 1971; Ruokonen 1978). Diese Daten weisen darauf hin, dass im Hoden sulfatierte Steroide als lokales Steroidhormonreservoir dienen und nicht nur Ausscheidungsprodukte darstellen. Diese These wird durch die Tatsache unterstützt, dass Leydigzellen in Kultur in der Lage sind, DHEAS in Testosteron umzuwandeln (Mouhadjer et al. 1989) und das benötigte Enzym, die StS zumindest beim Eber in den Leydigzellen exprimiert wird (Mutembei et al. 2009). Es ist daher anzunehmen, dass sulfatierten Steroide in der Versorgung des Hodengewebes, insbesondere des Keimepithels eine wichtige Rolle spielen, die allerdings bislang nicht eindeutig geklärt werden konnte. Interessanterweise treten bei der rezessiven X-linked Ichthyosis (RXLI), einer Erkrankung, bei der eine StS-Defizienz vorliegt, keine oder nur gering erniedrigte Testosteronlevel im Plasma auf (Lykkesfeldt et al. 1985a; Ruokonen et al. 1986). Allerdings weisen die Patienten erhöhte LH-Spiegel auf, so dass hier der nicht funktionierende *Sulfatase pathway* über die *de novo* Synthese des Testosterons durch die Leydigzellen nahezu ausreichend kompensiert zu werden scheint (Lykkesfeldt et al. 1985b). Die RXLI gehört zu den vorherrschenden angeborenen Metabolismusstörungen (Reed et al. 2005) und ist daher eine wichtige Erkrankung in der Endokrinologie. Die Betroffenen zeigen

erhöhte Serumkonzentrationen der sulfatierten Steroide E₁S, DHEAS, Cholesterolsulfat und PREGS. Ferner zeigen viele der männlichen Betroffenen einen unvollständigen Hodenabstieg (Kryptorchismus) und andere testikuläre Störungen, wie z. B. Hodentumore (Lykkesfeldt et al. 1985a; Lykkesfeldt et al. 1991), manche hingegen besitzen aber eine intakte Spermatogenese in einem normal abgestiegenen Hoden, so dass dies wahrscheinlich auf die kompensatorische LH-Hochregulierung zurückzuführen ist (Lykkesfeldt et al. 1985a; Lykkesfeldt et al. 1985b). Klinisch äußert sich die RXLI v. a. durch eine sichtbare Akkumulation von Hautschuppen, die teilweise zu massiven, bräunlichen Verkrustungen auf der Hautoberfläche führen können und einer Verdickung des Stratum corneums (Williams und Elias 1981). Neben den testikulären und Haut-assoziierten Störungen im Zusammenhang mit der RXLI bekräftigen auch Studien von Payne, die eine enge Korrelation zwischen der Aktivität der StS, der 3β-HSD und den Serumtestosteronkonzentrationen detektierten (Payne et al. 1971), dass der *Sulfatase Pathway* eine wichtige Bedeutung in der lokalen Versorgung von Geweben, speziell des Hoden und der Haut, mit Steroiden hat und Störungen dieses alternativen Weges zu Konsequenzen für die Funktion dieser Organe führt.

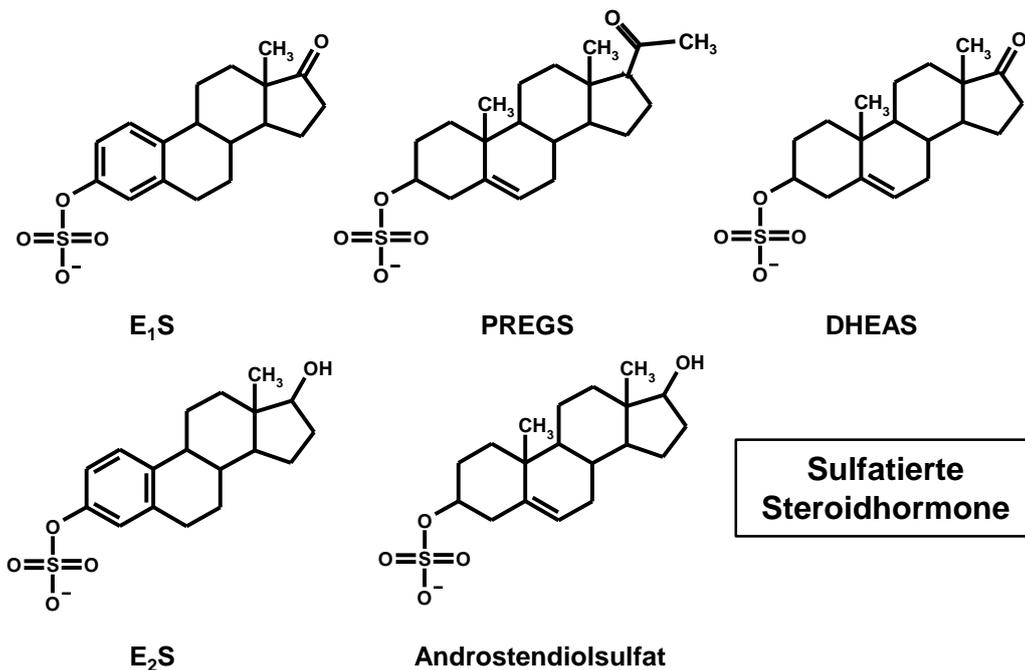


Abbildung 1.4: Eine Auswahl sulfatierter Steroidhormone, die in dieser Arbeit untersucht wurden.

1.5.1 Die Steroidsulfatase

Die Steroidsulfatase (StS) gehört zur Superfamilie der 12 beim Säuger vorkommenden Sulfatasen und hydrolysiert Aryl- und Alkylsteroidsulfate, sowie Iodthyroninsulfate, so dass sie

in die freie Form überführt werden (Noel et al. 1983; Dibbelt und Kuss 1983; Kester et al. 2002). Das StS-Gen liegt auf dem X-Chromosom, was auch die Bezeichnung rezessive X-linked Ichthyosis erklärt (RXLI). Die StS ist ubiquitär im Körper exprimiert, unter anderem in den steroidproduzierenden Organen Hoden, Ovar, Nebenniere, Plazenta, Prostata und Haut, wobei die Organverteilung zwischen den Säugerspezies variiert. Hauptexpressionsort ist die Plazenta. Die StS ist auf subzellulärer Ebene im rauhen ER, im Golgi Apparat, in der Plasmamembran und in den Zellorganellen, die an der Endozytose beteiligt sind, lokalisiert (Reed et al. 2005). Die StS ist ein wichtiger Marker für die Prognose bei hormonabhängigen Mammatumoren, da ihre Aktivität dort gesteigert ist und sie zur Produktion freier, biologisch aktiver Steroide beiträgt. Auch im Hoden ist die StS aktiv und wird als Schlüsselenzym des *Sulfatase Pathways* angesehen (Payne et al. 1971; Payne und Jaffe 1975). Langlais postulierte bereits 1981 eine Involvierung der StS in die Reifung und Kapazitation der Spermien (Langlais et al. 1981). So zeigten seine Studien, dass radioaktiv markiertes Cholesterolsulfat in die Spermatozoen aufgenommen wird, welches im Bereich des Akrosomens in der Plasmamembran akkumuliert und dort membranstabilisierende Wirkung hat. Im weiblichen Genitale kann dann das Cholesterolsulfat durch die dort ansässige StS gespalten werden, was die Freisetzung akrosomaler Enzyme ermöglicht, so dass das Spermium die Eizelle penetrieren kann. Bei der Frau findet sich die StS in mehreren Geweben des weiblichen Geschlechtstraktes, unter anderem in Follikel des Ovars, im *Corpus luteum* (Haning, Jr. et al. 1990; Haning, Jr. et al. 1992), in den Granulosazellen (Bonser et al. 2000), im Eileiter (Yanaihara et al. 2001) und im Endometrium, wo, ähnlich wie beim Brustkrebs, die Aktivität des Enzyms deutlich höher ist, wenn maligne Veränderungen des Gewebes vorliegen (Haning, Jr. et al. 1990; Haning, Jr. et al. 1992; Yamamoto et al. 1993; Bonser et al. 2000; Yanaihara et al. 2001). Die StS wird auch in der Haut exprimiert und ist dort für die Produktion von aktiven Androgenen maßgeblich verantwortlich. Die StS-Defizienz ist Ursache der RXLI, bei der eine erhöhte Konzentration von Cholesterolsulfat im *Stratum corneum* der Haut vorliegt und eine massive Schuppung der Haut auftritt (Williams und Elias 1981). Da bei der androgenabhängigen Alopezie und bei Hirsutismus die Plasmakonzentrationen von DHEAS erhöht sind, wird in der Literatur diskutiert, ob DHEAS als Vorläufer für DHT in der Haut fungiert, was dann über den Androgenrezeptor auf die Haarfollikel in der Achselgegend wirkt (Hay und Hodgins 1973; Pitts 1987) und die Symptome hervorruft. Hoffmann zeigte, dass die StS in den Haarfollikeln prädominant in der Dermalpapille exprimiert wird und dort auch ihre höchste Aktivität aufweist (Hoffmann et al. 2001), was die eben erwähnte Hypothese unterstützt. Auch bei der *Akne vulgaris* wurde eine erhöhte StS-Expression detektiert (Chen et al. 2002). Die StS ist nicht nur in den bereits angesprochenen Organen, sondern auch im

Immunsystem und in Teilen des Gehirns aktiv, worauf hier allerdings nicht weiter eingegangen werden soll.

1.5.2 Die Steroidsulfotransferasen

Die Steroidsulfotransferase ist ein Enzym, was dazu beiträgt, freie Steroide in ihre biologisch inaktive Form zu überführen und somit ihre Wirkung zu beenden. Steroidsulfotransferasen können anhand ihrer Akzeptorgruppe, die an der Schwefelkonjugation beteiligt ist, eingeteilt werden. Zu den Akzeptorgruppen gehören Hydroxylgruppen (O-Sulfonierung), Amide (N-Sulfonierung) und Thiole (S-Sulfonierung). Steroide werden meist über ihre Hydroxylgruppen sulfoniert, wobei der Wasserstoff abgespalten und die Sulfogruppe vom 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS), dem Co-Substrat der Sulfotransferasen, übertragen wird. Allgemein wird diese Reaktion meist Sulfatierung genannt, was aber eigentlich nicht korrekt ist, da die Sulfatierung die Übertragung einer SO_4^{2-} -Gruppe beinhaltet, aber die Sulfotransferase eine SO_3^{1-} -Gruppe verwendet. Der Begriff „Sulfatierung“ hat sich allerdings eingebürgert, da der Transfer der SO_3^{1-} -Gruppe auf die Hydroxylgruppe in der Regel ein Sulfat (SO_4) generiert (Huxtable RJ 1986). Sulfotransferasen haben zwar eine hohe Substrataffinität, aber nur eine geringe Metabolisierungskapazität. Man unterscheidet zwei Klassen bei den Sulfotransferasen: die zytosolischen (SULTs genannt) und die Membran-assoziierten (z. B. *Golgi-associated sulfotransferases*) (Strott 2002). Bei den zytosolischen SULTs wurden bislang 44 Vertreter entdeckt, die sich in fünf Familien einteilen lassen (Strott 2002), die von 1 bis 5 durchnummeriert sind (SULT1, SULT2, etc.). Je nach Substrat, welches sulfoniert wird, folgt der Familiennummer ein Buchstabe, z. B. SULT1E für die Sulfotransferasen der Familie, die Östrogene metabolisieren. Die einzelnen SULT1E Enzyme erhalten eine weitere Nummer nach dem Buchstaben, um sie voneinander zu unterscheiden. Neben den SULT1E verwenden auch Mitglieder der SULT2-Familie (SULT2A und SULT2B) Steroide und Sterole als Substrate und können somit biologisch aktive Steroidhormone inaktivieren. Dies bezieht sich allerdings vorwiegend auf ihre genomische Aktivität, wobei durch die Sulfatgruppe die Bindung an den Hormonrezeptor verhindert wird. Pregnenolon kann durch die SULT aber auch aktiviert werden, in dem es zu PREGS metabolisiert wird, was dann antagonistische Effekte am GABA_A -Rezeptor besitzt und somit eine potente neuroexzitatorische Wirkung hat (Paul und Purdy 1992). DHEA ist das bevorzugte Substrat der SULT2A1, allerdings werden auch Pregnenolon, Testosteron, E_2 und E_1 von der SULT2A1 sulfoniert (Falany et al. 1994). Cholesterol hingegen ist kein Substrat der SULT2A1, wohingegen die zwei Isoformen der SULT2B1 Cholesterol und, wenn auch zu einem deutlich geringeren Anteil, DHEA metabolisieren (Her et al. 1998; Javitt et al. 2001). Die SULT2B1 Isoformen sulfonieren außerdem Pregnenolon, DHT und Androstendiol, aber kein Testosteron und E_2 (Meloche und

Falany 2001; Geese und Raftogianis 2001). Zwischen den beiden Isoformen der SULT2B1 gibt es allerdings Unterschiede: Isoform a bevorzugt Pregnenolon, wohingegen Isoform b Cholesterin verstärkt als Substrat verwendet (Fuda et al. 2002). Auch in der Gewebeverteilung unterscheiden sich die SULTs. SULT2A1 ist vor allem in den steroidproduzierenden Organen wie dem Ovar oder der Plazenta, oder in steroidabhängigen Organen wie der Prostata exprimiert, aber nicht in der Haut. Die SULT2B1-Varianten hingegen sind massiv in der Haut exprimiert (Javitt et al. 2001). Dies ist der Metabolisierung des Cholesterins geschuldet, dessen Sulfonierung einen wichtigen Schritt in der Entwicklung der Haut und der Hautbarriere darstellt. Durch die Akkumulation von Cholesterinsulfat in der Haut können sich die Keratinozyten normal differenzieren und ihrer Funktion nachkommen, was ohne SULTs nicht möglich wäre (Jetten et al. 1989; Denning et al. 1995). Auch im Hoden sind die SULTs von großer Bedeutung. So konnte durch einen gezielten Knockout des SULT1E-Gens in der Maus gezeigt werden, dass das Enzym an der Aufrechterhaltung der intakten Struktur des adulten männlichen Hodens beteiligt ist. Diese gentechnisch veränderten Mäuse entwickelten im Alter eine Hypertrophie bzw. Hyperplasie der Leydigzellen mit Läsionen der Samenkanälchen. Ferner zeigten die männlichen Mäuse eine reduzierte Spermienmotilität und eine verringerte Wurfgröße mit Wildtyp-Weibchen (Qian et al. 2001). Es ist daher in Erwägung zu ziehen, dass auch die SULTs für die lokale Versorgung hormonabhängiger bzw. hormonproduzierender Organe mit Steroiden von Bedeutung sind und ebenfalls zum Funktionieren des *Sulfatase Pathway* beitragen, indem sie durch Sulfonierung Steroide inaktivieren und diese dann für eine spätere Reaktivierung durch die StS zur Verfügung stellen. Ferner können hormonbildende Zellen, wie z.B. Leydigzellen, durch Sulfonierung vor schädigender Östrogeneinwirkung geschützt werden (Tong et al. 2004).

Die zuvor ebenfalls genannten Membran-assoziierten Sulfotransferasen sind vor allem in die posttranslationale Modifikation von Proteinen und in die Sulfonierung von Zuckern integriert und befinden sich daher im Golgi-Apparat. Bei den Steroidhormonen spielen sie keine Rolle.

1.6 Membrantransport

Damit eine Zelle ihre Funktionen erfüllen und ihren Aufgaben nachkommen kann, ist es wichtig, dass sie mit den dafür notwendigen Stoffen und Molekülen versorgt wird und ihr Zytoplasma eine entsprechende Zusammensetzung aufweist. Um diese zelluläre Homöostase zu gewährleisten, muss die Zelle fähig sein zu kontrollieren, welche Stoffe und Moleküle aufgenommen werden, damit dies nicht willkürlich geschieht, sondern an die Anforderungen des Organismus und die jeweilige Situation angepasst erfolgt. Hierbei dient die Zellmembran, welche aus einer Phospholipid-Doppelschicht besteht als äußere Barriere der Zelle, die nur lipophilen Stoffen die Permeation in das Zellinnere erlaubt. Hierzu gehören z. B. unkonjugierte

Steroidhormone. Auch Gase können die Zellmembran ohne größere Schwierigkeiten passieren, wohingegen die Permeation von hydrophilen und polaren Substanzen und größeren Molekülen nicht ohne weiteres möglich ist. Die Aufnahme dieser Stoffe kann aber über verschiedene Transportsysteme, welche in die Zellmembran eingebettet sind, vermittelt werden, so dass ein regulierbarer Stoffaustausch zwischen Extrazellularraum und Intrazellularraum möglich ist (Hediger et al. 2004).

Nach strukturellen und mechanistischen Gesichtspunkten können verschiedene Transportsysteme unterschieden werden. So können Ionen-Transport-ATPasen in ATP-verbrauchenden Prozessen Ionen auch gegen einen Konzentrationsgradienten über die Plasmamembran transportieren, was häufig im Austausch zweier Ionen erfolgt (z.B. Na^+/K^+ -ATPase). Zu den primär Energie verbrauchenden Transportproteinen zählen auch die sogenannten *ATP-binding cassette* (ABC)-Transporter, welche an einer intrazellulären *ATP-binding site* ATP rekrutieren und spalten und die dabei freiwerdende Energie in einen Transportprozess umsetzen können. Ein bekannter Vertreter dieser Familie ist das sogenannte *multi drug resistance protein 1* (MDR1, P-gp, *P-glycoprotein*).

Dem gegenüber stehen die Membrantransporter der *Solute Carrier Family* SLC, welche mechanistisch als Uniporter, Antiporter oder Symporter arbeiten (Saier, Jr. 2000; Hediger et al. 2004). Häufig ist der Transport über SLC-Carrier sekundär energetisiert, indem ein durch primär aktiven Transport generierter Ionengradient, z.B. der über die Na^+/K^+ -ATPase aufgebaute zelleinwärtsgerichtete Na^+ -Gradient genutzt wird, um hydrophile Moleküle im Cotransport in das Zellinnere zu transportieren (Hediger et al. 2004; Geyer et al. 2006a; Conde et al. 2010). Eine weitere Carrier-vermittelte Aufnahmemöglichkeit ist der Transport durch erleichterte Diffusion, wobei das Substrat entlang seines eigenen Konzentrationsgradienten ohne zusätzlichen Energieverbrauch transportiert wird (Hediger et al. 2004). Das Substrat kann hierbei entweder in die Zelle hinein oder aus der Zelle heraus befördert werden. Transportprozesse über SLC-Carrier unterliegen grundsätzlich einer Transportkinetik, bei welcher die Transportgeschwindigkeit eines Substrates entsprechend einer Michaelis-Menten-Kinetik bei steigenden Substratkonzentrationen gesättigt ist. Der Substrattransport über ein Transportprotein kann daher durch die Konstanten K_m , als Maß für die Affinität des Substrats zum Transporter, und V_{\max} , als Maß für die maximale Transportgeschwindigkeit, beschrieben werden.

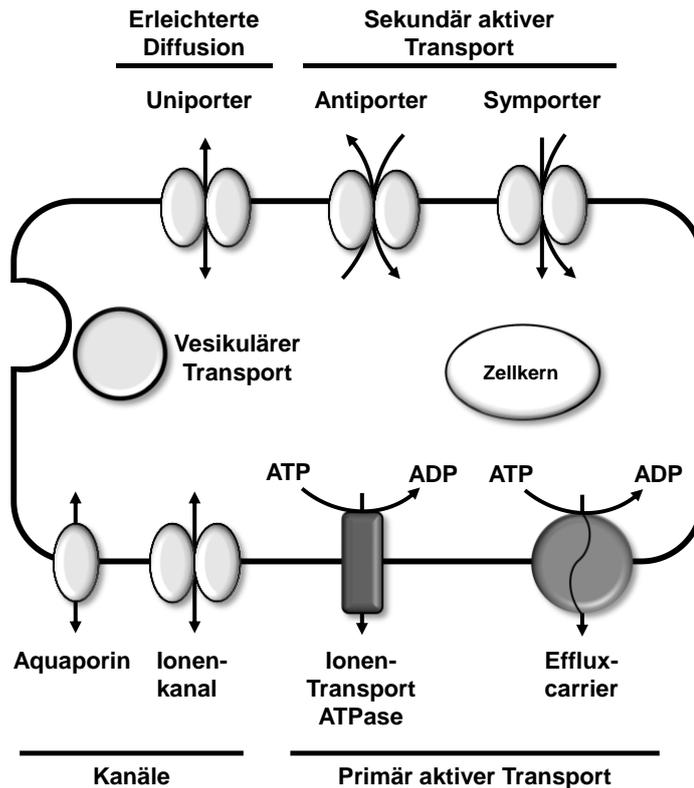


Abbildung 1.5: Klassifikation von Membrantransportsystemen und Abgrenzung zu Membrankanälen (Hediger et al. 2004)

Ergänzend zu den membranständigen Transportsystemen kann die Zelle hochmolekulare Moleküle, wie z. B. Peptide oder Proteine, über Vesikelendozytose aufnehmen. Hierbei lagern sich die Moleküle an die Zellmembran an und werden über Abschnürung der Zellmembran ins Zellinnere aufgenommen (Deitcher 2002; Vassilieva und Nusrat 2008).

1.6.1 Aufnahme von sulfatierten Steroidhormonen in die Zielzelle

Freie, unkonjugierte Steroide sind aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften in der Lage die Zellmembran mittels Diffusion zu passieren und somit ohne Hilfe von Transportproteinen in das Zellinnere einzudringen. Zusätzlich ermöglichen bestimmte Rezeptoren, wie z. B. der Megalin-Rezeptor (siehe Kapitel 1.3.1.1) die gezielte Aufnahme in die Zelle. Im Gegensatz dazu können konjugierte Steroide, unabhängig ob sulfatiert oder glukuronidiert, die Plasmamembran nur schlecht mittels Diffusion überwinden, was ihrer Hydrophilie geschuldet ist. Diese Tatsache bekräftigte über Jahre die Hypothese, dass Steroidsulfate lediglich biologisch inaktive und für die Ausscheidung über Leber und Niere vorgesehene Metaboliten darstellen. In den letzten Jahren wurden allerdings verschiedene Membrantransporter entdeckt, welche mittels erleichterter Diffusion oder sekundär aktivem Natrium/Substrat-Cotransport diese negativ geladenen Steroidsulfate gezielt in eine Zielzelle hineintransportieren können

(Hagenbuch und Meier 2003; Burckhardt und Burckhardt 2003; Hagenbuch und Meier 2004; Geyer et al. 2006a; Geyer et al. 2006b). Diese Transporter gehören zu den SLC-Familien *SLCO* (*organic anion transporting polypeptides*, OATPs) und *SLC10*. Die Substrate dieser Transporter umfassen neben Gallensäuren, Schilddrüsenhormonen und diversen Pharmaka und Xenobiotika auch sulfatierte Steroidhormone (Geyer et al. 2004a; Geyer et al. 2004b). Durch diese Transportproteine wird die Aufnahme sulfatierter Steroide in die Zelle also ermöglicht und zusammen mit der Tatsache, dass intrazellulär mit der StS ein Sulfat- abspaltendes Enzym vorhanden ist, erscheint die (Re-)Aktivierung der biologisch inaktiven Steroidsulfate möglich. Dieses Konzept der intrakrinen Bildung aktiver Steroidhormone aus ihren sulfatieren Vorstufen wird gemeinhin als *Sulfatase Pathway* bezeichnet. Während die Bedeutung dieses *Sulfatase Pathway* in der Pathogenese des hormonabhängigen Mammakarzinoms und der Bildung von Östrogenen in der Humanplazenta bereits gut untersucht wurde, ist die Bedeutung des *Sulfatase Pathways* in anderen Gewebe und insbesondere im Hoden noch völlig unbekannt.

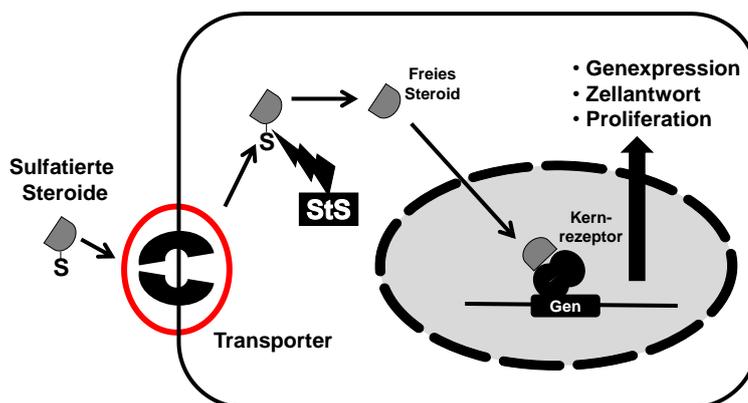


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung des *Sulfatase Pathway*

Spezifische Membrantransporter vermitteln die Aufnahme sulfatierter Steroide in die Zelle. Intrazellulär erfolgt die Reaktivierung durch die Steroidsulfatase (StS), so dass das resultierende freie Steroid im Anschluss mit nukleären Steroidrezeptoren interagieren und eine zelluläre Antwort hervorrufen oder modulieren kann.

1.7 Kandidatentransporter für die Aufnahme sulfatierter Steroide im Hoden

Mit der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob der *Sulfatase* pathway im humanen Hoden eine Rolle spielt und wenn ja, welche physiologische Funktion er dort innehat. Der Hoden stellt einerseits mit den Leydigzellen ein steroidhormonproduzierendes Organ dar, andererseits benötigt er die Steroidhormone, um die Spermatogenese aufrecht zu erhalten und ist somit ein steroidhormonresponsives Organ. Es erscheint daher sinnvoll einen alternativen, lokalen Versorgungsweg mit den benötigten Hormonen in Reserve zu haben, bei dem die Verfügbarkeit biologisch aktiver Steroidhormone auf zellulärem Level reguliert werden

kann. Im Hoden ist so ein System durchaus denkbar (Labrie et al. 2001), da hier sowohl die benötigten Enzyme (StS, SULT) (Payne et al. 1971; Laatikainen et al. 1971; Ruokonen et al. 1972; Payne et al. 1973; Ruokonen 1978; Mutembei et al. 2009), als auch die entsprechenden Transportproteine, welche die Aufnahme der Steroidsulfate in die Zelle vermitteln, exprimiert werden (Labrie et al. 2001; Pizzagalli et al. 2002; Suzuki et al. 2003b; Hagenbuch und Meier 2004; Geyer et al. 2007). Um nun die physiologische Bedeutung des *Sulfatase Pathway* im humanen Hoden besser zu verstehen, war es Ziel dieser Arbeit, Transportproteine, welche Kandidaten für eine Beteiligung am *Sulfatase Pathway* darstellen, zu identifizieren und funktionell zu charakterisieren. Diese Kandidatentransporter wurden hierfür anhand folgender Kriterien selektiert: Zum einen mussten sie im Hoden (hoch) exprimiert werden, zum anderen sollten sie potentielle Transportproteine für sulfatierte Steroidhormone darstellen. Mit Hilfe dieser Kriterien wurden vier Transporter für die Studie ausgewählt: die beiden *Organic anion transporting polypeptides* OATP6A1 (*SLC06A1*) und OATP1C1 (*SLC01C1*), das *Organic solute carrier protein 1* OSCP1 und der *Sodium-dependent organic anion transporter* SOAT (*SLC10A6*).¹

1.7.1 Die OATP-Superfamilie

Die OATPs stellen eine Gruppe Natrium-unabhängiger Transportsysteme dar, welche verschiedene endogene und exogene Substrate (Xenobiotika, Pharmaka) transportieren können. Insgesamt sind mehr als 300 einzelne OATP/Oatp-Transporter bekannt, welche sich auf über 40 Spezies verteilen (Hagenbuch und Stieger 2013). Hagenbuch und Meier führten 2004 ein neues Klassifikations- und Nomenklatorsystem der OATPs ein, was auf phylogenetischen Gesichtspunkten ähnlich der Nomenklatur der Cytochrom P450 Enzyme beruht (Hagenbuch und Meier 2004). Die OATP-Superfamilie teilt sich nach diesem System bei Mensch und Nagern in sechs Familien auf, die von 1 bis 6 durchnummeriert sind (OATP1-OATP6). Die Mitglieder dieser Familien weisen mehr als 40 % Identität der Aminosäuresequenz auf. Innerhalb der Familien werden Subfamilien klassifiziert mit einer Sequenzübereinstimmung der Aminosäuren von mehr als 60 % (Hagenbuch und Meier 2004). Die Subfamilien werden mit A bis C benannt (OATP1A, OATP1B, OATP1C) und die Nummerierung der Mitglieder (OATP1A1, OATP1A2, etc.) erfolgt chronologisch nach dem Zeitpunkt ihrer Entdeckung bzw. Identifikation. Wenn bereits orthologe OATPs bei Mensch, Nagern oder einer anderen Spezies bekannt sind, dann erhält der neu identifizierte OATP die orthologe Nummerierung. Bei paralogenen Genen wird die Nummerierung entsprechend

¹ OATP, SOAT und OSCP1 sind die Proteinamen und werden beim Menschen groß, bei allen Tieren klein geschrieben. Die zugehörigen Gene werden mit *SLCO*, *SLC10* oder *OSCP1* bezeichnet und kursiv dargestellt. Sie werden ebenfalls beim Menschen groß und beim Tier klein geschrieben.

erweitert. Die Genbezeichnung der OATP-Familie bildet einen Sonderfall innerhalb aller SLC-Familien. Sie ist nämlich nicht durch eine Zahl gekennzeichnet, sondern durch den Buchstaben „O“ für OATP, was der SLC-Familie SLC21 (frühere Nomenklatur) entsprechen würde (Hagenbuch und Stieger 2013). OATPs kommen nach derzeitigem Kenntnisstand nur in höher entwickelten Organismen vor und konnten bisher nicht in Bakterien oder Hefen nachgewiesen werden (Hagenbuch und Stieger 2013). Der erste OATP wurde 1994 mittels Expressionsklonierung aus der Leber der Ratte identifiziert und als *Oatp1* (heute *Oatp1a1*) bezeichnet (Jacquemin et al. 1994). Der erste humane wurde als OATP-A (heute OATP1A2) bezeichnet und konnte ein Jahr später in der gleichen Arbeitsgruppe identifiziert werden (Kullak-Ublick et al. 1995). Heute sind bereits 11 verschiedene humane OATPs bekannt. Viele dieser OATPs kommen ubiquitär im Organismus vor, allerdings gibt es auch einige Mitglieder, die nur in bestimmten Organen exprimiert werden. Ein Beispiel hierfür sind die beiden humanen, leberspezifischen Transporter OATP1B1 und OATP1B3 (Hsiang et al. 1999; Abe et al. 1999; König et al. 2000). Außer in der Leber sind die Mitglieder der OATP1-Familie im Gehirn, in der Niere, in der Lunge, im Hoden, in der Prostata und in der Plazenta zu finden. Der zu dieser Familie gehörende OATP1C1 ist vor allem im Gehirn, aber auch in den Leydigzellen des Hodens exprimiert und stellte somit einen potentiellen Kandidaten für diese Arbeit dar (Pizzagalli et al. 2002). Die Mitglieder der OATP2-Familie sind wie die der OATP1-Familie ubiquitär im Organismus verteilt und wurden sowohl in der Plazenta, wie auch in der Leber, im Darm, in der Haut, der Brust und an der Blut-Hirn-Schranke detektiert. Der OATP2A1 ist außerdem im Auge, im Herz und in der Skelettmuskulatur zu finden. mRNA und Proteine der OATP3-Familie wurden ebenfalls in verschiedenen Organen gefunden, unter anderem im Hoden. Gleiches gilt für die mRNA des OATP4C1 und des OATP5A1, die ebenfalls in mehreren Organen des Körpers detektiert wurden. Der OATP6A1 zeigt eine organspezifische Expression. Er ist vornehmlich im Hoden exprimiert (Suzuki et al. 2003b) und stellte somit auch einen potentiellen Kandidaten für diese Studie dar. Die Funktion der OATPs ist der Transport endogener, hauptsächlich amphipathischer, negativ geladener Substanzen, wobei ein Großteil der OATPs zusätzlich Xenobiotika und andere pharmakologisch wirksame Stoffe transportieren. Neben konjugierten und unkonjugierten Gallensäuren werden auch Steroidsulfate und Schilddrüsenhormone in die Zelle hineintransportiert. Der Transportmechanismus der OATPs ist bisher noch nicht vollständig verstanden, allerdings scheinen die OATPs als organische Anionen-Austauscher zu fungieren (Hagenbuch und Stieger 2013). Neben Bicarbonat können auch Glutathion und Glutathionkonjugate als Austausch- bzw. Gegen-Ion genutzt werden (Satlin et al. 1997; Li et al. 1998; Li et al. 2000). Allerdings kann kein genereller Transportmechanismus für die OATPs definiert werden. Die Aufnahme von Taurocholat kann z. B. durch Glutathion einerseits stimuliert werden (*Oatp1a1*

der Ratte), andererseits kann die Aufnahme von Taurocholat auch durch einen Efflux von Glutathionkonjugaten gefördert werden (Li et al. 1998). Dies kommt allerdings nicht beim Oatp1a1 der Ratte vor, sondern beim Ratten-Oatp1a4. Durch diese teilweise widersprüchlichen Beobachtungen, die auch Hinweise auf einen bidirektionalen Transport lieferten, ließ sich bislang kein allgemein gültiger Transportmechanismus erkennen. Aber viele OATPs zeigen eine Stimulierung ihrer Transportaktivität durch einen niedrigeren extrazellulären pH-Wert von 6,5 (Kobayashi et al. 2003). Ein saures Mikroklima, wie es im Dünndarm vorliegt, wo viele OATPs exprimiert sind, stimuliert demnach die Aufnahme der Substrate, was physiologisch betrachtet, eine sinnvolle Modifikation des Transportmechanismus darstellt. Die Aufnahme eines bestimmten Substrates durch ein OATP-Transportprotein kann auch durch ein anderes Substrat stimuliert oder gehemmt werden. So ist die Aufnahme von E₁S über OATP2B1 in Anwesenheit niedriger Progesteronkonzentrationen erhöht, wohingegen Testosteron die Aufnahme inhibiert (Grube et al. 2006). Trotz des weiten Substratspektrums und der weitläufigen Expression der OATPs in vielen verschiedenen Organen konnte bislang aber keine schwere Erkrankung des Menschen in Bezug auf die Homöostase der Gallensäuren bzw. des Metabolismus der Schilddrüsen- und der Steroidhormone entdeckt werden, die auf Mutationen in den *SLCO*-Genen zurückzuführen war, so dass die physiologische Bedeutung der OATP-Transporter noch nicht final für alle Mitglieder dieser Superfamilie geklärt ist.

Wie bereits zuvor erwähnt kamen für diese Studie zwei OATPs als Kandidaten-Transporter in Frage: der OATP6A1 und der OATP1C1.

1.7.1.1 OATP6A1

In 2003 wurden die OATP6A1/Oatp6a1-Carrier von Mensch und Ratte durch Screenen von Hoden-cDNA-Bibliotheken entdeckt und zunächst als *gonad specific transporter (GST)* bezeichnet, da sie exklusiv im Hoden exprimiert sind (Suzuki et al. 2003b). Während bei der Ratte zwei Subtypen auftreten (Ratten GST-1 und Ratten GST-2), gibt es beim Menschen nur eine Variante. Das humane Gen (*SLCO6A1*, Accession No.: NM_173466.3) codiert ein 719 Aminosäuren (aa) langes Protein mit einem Molekulargewicht von 79,2 kDa. Die Varianten der Ratte sind 748 aa (Molekulargewicht: 83,1 kDa) und 701 aa (Molekulargewicht: 78,0 kDa) lang und haben eine Sequenzidentität von 42 % in Bezug auf die Aminosäuresequenz. Der humane OATP6A1 hat zum GST-1 der Ratte eine Übereinstimmung von 45,3 % und zum GST-2 eine Sequenzhomologie von 39 %. Wie bei allen OATPs ist sowohl für die Rattenvarianten, als auch für den humanen OATP6A1 ein 12 Transmembrandomänen-Modell wahrscheinlich. Es wurden mehrere Glykosylierungsstellen bei allen drei Transportproteinen identifiziert (GST-1/GST-2 Ratte: drei potentielle N-Glykosylierungsstellen in den extrazellulären Loops;

OATP6A1: fünf potentielle N-Glycosylierungsstellen in den extrazellulären Loops). Alle drei Proteine weisen außerdem mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase C auf, wobei der Ratten GST-2 zusätzlich noch eine vorausgesagte Phosphorylierungsstelle für eine cAMP-abhängige Proteinkinase in einem intrazellulären Loop aufweist (Suzuki et al. 2003b). Expressionsprofile mit Hilfe von *Northern Blot* Analysen zeigten, dass die Rattenvarianten vor allem im Hoden exprimiert werden, wobei der GST-1 auch Signale in Herz, Gehirn, Milz, Lunge, Leber, Niere, Ovar, Nebenhoden, Nebenniere und Skelettmuskulatur der Ratte hervorrief. Mittels *in situ* Hybridisierung wurden Hoden, Ovar und Nebenhoden näher untersucht und die Spermatogonien, Sertolizellen und Leydigzellen als exprimierende Zelltypen determiniert. Im Nebenhoden fanden sich beide Varianten in den Epithelzellen der *Ductuli efferentes* und des Nebenhodengangs. Im Ovar wurden GST-1 und GST-2 der Ratte sowohl in den Epithelzellen der *Theka interna*, wie auch in denen des *Stratum granulosum* detektiert. Die Lokalisation des humanen OATP6A1 im Organismus wurde mittels RT-PCR unter Verwendung eines cDNA-Panels, welches mehrere Gewebe beinhaltete ermittelt und zeigte, dass auch hier eine dominante Expression im Hoden zu finden ist (Suzuki et al. 2003b). Suzuki et al. (2003b) untersuchten ferner die Transportaktivität dieses gewebespezifischen OATPs und fanden heraus, dass die Rattenproteine in cRNA-injizierten *Xenopus laevis* Oozyten sowohl Taurocholat, wie auch DHEAS und die Schilddrüsenhormone T₃ und T₄ transportierten. Der humane OATP6A1 hingegen wurde funktionell bislang noch nicht charakterisiert. Da er aber einen hodenspezifischen Transporter darstellt und seine Ratten-Homologe das sulfatierte Steroid DHEAS transportieren, ist er ein interessanter Kandidat für diese Arbeit gewesen.

1.7.1.2 OATP1C1

Neben dem OATP6A1 gehört auch der OATP1C1 zu den OATPs, die im *Sulfatase Pathway* eine mögliche Rolle spielen. Der OATP1C1 wurde 2002 als OATP-F (früher *SLC21A14*, heute *SLCO1C1*) von der Gruppe um Pizzagalli als neues Mitglied der OATP-Familie identifiziert (Pizzagalli et al. 2002). Der cDNA-Klon wurde aus einer Gehirn cDNA-Bibliothek isoliert und weist einen offenen Leserahmen (*orf*) von 2136 bp auf, welcher für das 712 aa lange OATP1C1 Protein codiert, das sich über 12 Transmembrandomänen und entsprechende intra- und extrazelluläre Loops erstreckt. Seine Topologie entspricht somit der anderer OATPs. In der GenBank-Datenbank wurde die OATP1C1 cDNA unter der Accession No.: NM_00114594 eingetragen. Das *SLCO1C1*-Gen ist auf Chromosom 12p12 lokalisiert und hat eine Gesamtlänge von 58 kb. Es besteht aus insgesamt 15 Exons und 14 Introns, wobei sich das erste Exon in der untranslatierten 5'-Region (5'-UTR, *untranslated region*) befindet und daher nicht zum *orf* gehört. Bei Maus, Ratte und Affe scheint es jeweils ein Ortholog zu geben, da

entsprechende GenBank-Sequenzen dieser drei Spezies hinterlegt sind, die in ihrer Aminosäuresequenz zu ca. 85 % mit der humanen OATP1C1-Sequenz übereinstimmen (Pizzagalli et al. 2002; Sugiyama et al. 2003). Insgesamt gibt es vier Transkriptvarianten für OATP1C1, welche sich in ihrer Transkriptlänge und der OATP1C1-Anfangssequenz unterscheiden. Die von Pizzagalli 2002 veröffentlichte Sequenz entspricht der Isoform 2 (Accession No.: NM_001145955.1). Mittels *Northern Blot* Analyse wurde die mRNA des OATP1C1 im Gehirn und im Hoden detektiert (Pizzagalli et al. 2002). Während im Gehirn die OATP1C1 mRNA in fast allen Regionen außer der Pons und dem Kleinhirn gefunden wurden, zeigte die immunhistochemische Untersuchung des Hodens eine Lokalisation des Proteins nur in der Leydigzellpopulation (Pizzagalli et al. 2002). In der Literatur wird über die Expression des humanen OATP1C1 im Gehirn teilweise kontrovers diskutiert. So gibt es Studien, die herausgefunden haben, dass, im Gegensatz zum Nager (bei dem der OATP1C1 massiv in den Kapillaren des Gehirns exprimiert wird (Sugiyama et al. 2003; Tohyama et al. 2004)), beim Menschen keine deutliche Lokalisation in den Endothelzellen der Gehirnkapillaren zu finden ist und somit eine Funktion im Bereich der Blut-Hirn-Schranke zwar bei Maus und Ratte anzunehmen ist, beim Menschen aber fraglich erscheint (Roberts et al. 2008). In anderen Studien hingegen wurde der humane OATP1C1 in den Gliazellen des Hypothalamus, in Neuronen und Kapillarwänden im Bereich der *Nuclei paraventricularis, infundibularis* und *supraopticus* sowie in zahlreichen Gefäßen und dem *Plexus choroideus* detektiert, so dass ihm andere Studien durchaus eine Funktion in der Blut-Hirn-Schranke und in der Regulation der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse zuschreiben (Heuer und Visser 2009; Alkemade et al. 2011). Zur Evaluierung der Transporteigenschaften wurden sowohl OATP1C1 cRNA-injizierte *Xenopus laevis* Oozyten, als auch stabil transfizierte OATP1C1-CHO-K1-Zellen für Transportexperimente genutzt. Die Oozyten-Experimente zeigten lediglich eine Aufnahme von T₄ und Bromosulphophthalein (BSP), wohingegen in den CHO-K1-Zellen nicht nur diese beiden Substrate transportiert wurden, sondern auch rT₃, T₃, E₁S, und Estradiol-17β-Glukuronid. Als präferierte Substrate wurden T₄ und rT₃ identifiziert, deren K_m-Werte 90 ± 28 nM (T₄) und 128 ± 38 nM (rT₃) betragen (Pizzagalli et al. 2002). Bislang wurden die meisten Untersuchungen des OATP1C1 im Hinblick auf seine Funktion als spezifischer Transporter für Schilddrüsenhormone durchgeführt. Eine potentielle Bedeutung dieses Transporters in der Physiologie des Hodens war in der Literatur bisher nicht detailliert untersucht worden. In 2012 wurde die Generierung einer *Oatp1c1*-Knockout-Maus veröffentlicht. Diese Maus basiert auf dem Cre-LoxP-System und weist einen Knockout im Gesamtorganismus auf (Mayerl et al. 2012). Es wurde auch hier wieder vordergründig das Gehirn untersucht, allerdings wurde darauf hingewiesen, dass sowohl die männlichen, wie auch die weiblichen homozygoten Knockout-Tiere fertil seien und sich wie die entsprechenden

Wildtyp-Mäuse vermehren (Mayerl et al. 2012). Trotzdem wurde OATP1C1 als Kandidat für diese Arbeit ausgewählt, da er, neben dem Gehirn, die zweithöchste Expression im Hoden aufweist und laut Literatur in der Lage ist, sulfatierte Steroide in Form von E₁S zu transportieren (Pizzagalli et al. 2002).

1.7.2 Das Organic Solute Carrier Protein 1

Neben den OATPs stellt der OSCP1 ein weiteres Transportprotein dar, was für diese Arbeit von Interesse ist. Der OSCP1 wurde 2005 aus einer humanen Plazenta cDNA-Bibliothek isoliert und weist einen *orf* von 1137 bp auf (Kobayashi et al. 2005). Das codierte Protein besteht aus 379 aa mit einem Molekulargewicht von 43,3 kDa und zwei potentiellen O-Glykosylierungsstellen (Kobayashi et al. 2005). Im Gegensatz zu den OATPs wird für den OSCP1 keine Membrantopologie mit 12 Transmembrandomänen vorhergesagt. In der Literatur werden Modelle mit einer oder drei Transmembrandomänen diskutiert (Kobayashi et al. 2005). Die OSCP1-Expression wurde in verschiedenen Geweben untersucht. Sowohl beim Menschen, wie auch bei Ratte und Maus zeigt er eine dominante Expression im Hoden (Izuno et al. 2007; Kobayashi et al. 2007), ist beim Menschen aber auch im Thymus, in der Plazenta und im Dünndarm zu finden (Kobayashi et al. 2005; Izuno et al. 2007; Kobayashi et al. 2007). Bei der Ratte konnte der *Oscp1* mittels RT-PCR neben dem Hoden auch in der Lunge, der Leber, der Niere, dem Gehirn und dem Skelettmuskel nachgewiesen werden (Izuno et al. 2007). Die Immunhistochemie der humanen Plazenta ergab eine Lokalisation in der Basalmembran des Synzytiotrophoblasts, wo der OSCP1 an dem Eintritt organischer Stoffe aus dem fetalen Kreislauf in die Trophoblasten der Plazenta beteiligt sein könnte (Kobayashi et al. 2005). Bei Maus und Ratte wurde *Oscp1* im Hoden immunhistochemisch in der basalen Zellmembran der Sertolizellen detektiert (Izuno et al. 2007; Kobayashi et al. 2007), wohingegen *in situ* Hybridisierungsexperimente eindeutige Signale in den Spermatozyten und den Spermatiden lieferten (Hiratsuka et al. 2008). Die gleiche Gruppe konnte das Protein nur in den Keimzellen (exklusive Spermatogonien) detektieren (Hiratsuka et al. 2008). Der humane OSCP1 wird ferner in verschiedenen Tumorzelllinien exprimiert, so dass vermutet wird, dass er eine Funktion in der gesteigerten Proteinsynthese für das Zellwachstum oder die Zellaktivierung spielt (Kobayashi et al. 2005). OSCP1 transportiert eine ganze Reihe verschiedener Moleküle, unter anderem E₁S, L-Leucin, Ascorbinsäure, Tetrazyklin, Prostaglandin E₂, Paraaminohippursäure und Tetraethylammonium. Dies wurde im Rahmen von Transportmessungen an *Xenopus laevis* Oozyten sowohl für den humanen, als auch für die beim Nager vorkommenden OSCP1/*Oscp1*-Proteine bestätigt (Kobayashi et al. 2005; Izuno et al. 2007; Kobayashi et al. 2007). Für Testosteron, Androstendion, Progesteron und einige weitere Stoffe hingegen konnte keine Aufnahme beobachtet werden (Kobayashi et al.

2005). Das Substratspektrum bei Maus und Ratte ähnelt dem des Menschen, allerdings ist es nicht komplett identisch. So zeigt der Ratten OSCP1 (rOscp1) eine Aufnahme von Testosteron und Androstendion, welche beim humanen OSCP1 keine Substrate sind (Izuno et al. 2007). Der Transportmechanismus der OSCP1/Oscp1 wird als Natrium-unabhängig, aber pH-sensitiv beschrieben. Allerdings werden nur anionische Substrate bei niedrigerem pH-Wert besser transportiert als bei einem höheren pH-Wert. Bei kationischen Molekülen ist die Sensitivität gegenüber dem pH-Wert nicht zu beobachten (Kobayashi et al. 2005).

1.7.3 Die SLC10-Familie

Im Jahr 2004 wurde der *sodium-dependent organic anion transporter* Soat (*Slc10a6*) der Ratte (rSoat) entdeckt (Geyer et al. 2004a). Dieser Carrier gehört zur SLC10/Slc10-Familie, die bis dato aus zwei Familienmitgliedern, dem *Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide* (NTCP/*SLC10A1*, *Ntcp/Slc10a1*) (Hagenbuch et al. 1991; Hagenbuch und Meier 1994) und dem *apical sodium-dependent bile acid transporter* (ASBT/*SLC10A2*, *Asbt/Slc10a2*) (Wong et al. 1994) bestand. SLC10 steht dabei für *solute carrier family 10* (Hediger et al. 2004). Die SLC10-Familie galt bis zur Entdeckung des SOAT als „Familie der Natrium-abhängigen Gallensäuretransporter“ (*sodium-dependent bile acid transporter*, SBAT) (Hagenbuch und Dawson 2004), welche als Hauptfunktion die Aufnahme von Gallensäuren aus dem Darm (ASBT) bzw. in die Leber (NTCP) vermitteln und somit maßgeblich zum Recycling der Gallensäuren über den enterohepatischen Kreislauf beitragen (Kullak-Ublick et al. 2004; Dawson et al. 2009). Der rSoat wich jedoch von dieser Vorstellung ab, da er keine Transportaktivität für Gallensäuren zeigte. Er transportierte hingegen die sulfatierten Steroidhormone E₁S und DHEAS (Geyer et al. 2004a). Drei Jahre später wurde das humane Ortholog des rSoat identifiziert, der humane SOAT (hSOAT/*SLC10A6*), welcher zunächst aus der Nebenniere des Menschen kloniert wurde (Geyer 2005).

1.7.3.1 Der humane Sodium-dependent Organic Anion Transporter (SOAT/*SLC10A6*)

Die hSOAT cDNA umspannt 1502 bp, welche einen *orf* von 1134 bp beinhaltet. Dieser kodiert ein Protein mit 377 Aminosäuren und einem vorausgesagten Molekulargewicht von 41,2 kDa. Das *SLC10A6*-Gen ist auf dem Chromosom 4q21.3 lokalisiert und hat eine Länge von insgesamt 25,8 kb. Das mRNA-Transkript besteht aus 6 Exonen unterschiedlicher Länge (Geyer et al. 2007). Das hSOAT-Protein weist drei potentielle Glykosylierungsstellen auf (N⁴, N¹⁴, N¹⁵⁷) und mehrere Phosphorylierungsstellen, die hauptsächlich im C-Terminus lokalisiert sind (Döring 2009). Der hSOAT gehört nach phylogenetischer Klassifikation zur SLC10-Familie. Zum einen besitzt das Protein das Signaturmotiv der SLC10-Familie „ALGMMPL“ (Geyer et al. 2006a), zum anderen zeigt der SOAT eine hohe Sequenzidentität zum ASBT

(41,8 %, Sequenzähnlichkeit 69,7 %) und NTCP (33,4 %, Sequenzähnlichkeit 62,6 %) (Döring 2009). Die genaue Membrantopologie des hSOAT-Proteins ist bislang noch nicht endgültig geklärt. Modelle mit sechs bis neun Transmembrandomänen (TMD) wurden berechnet und diskutiert (Döring 2009). Die Lage des N- bzw. C-Terminus konnte mittels Immunfluoreszenz an stabil transfizierten SOAT-HEK293 Zellen verifiziert werden, so dass momentan ein Modell mit sieben bzw. neun TMD, einem extrazellulär gelegenen N-Terminus und einem intrazellulär gelegenen C-Terminus (Döring 2009) favorisiert wird. Der hSOAT wird in verschiedenen Geweben (Hoden, Plazenta, Herz, Milz, Pankreas, Thymus, Dünndarm, Colon, Brustdrüse, Leber, Lunge und Leukozyten) exprimiert, allerdings zeigt die qPCR unter Verwendung verschiedener Gewebe eine dominante Expression im Hoden und eine deutliche Expression in Plazenta und Brustdrüse (Geyer et al. 2007). Sowohl in Oozyten, wie auch in stabil transfizierten HEK293-Zellen zeigte der hSOAT einen Natrium-abhängigen Steroidsulfattransport (Geyer et al. 2007; Döring 2009). Neben E₁S und DHEAS transportiert SOAT auch Pregnenolonsulfat (PREGS). Letzteres ist, wie in Kinetikstudien gezeigt werden konnte, sein bevorzugtes Substrat mit der höchsten Affinität (K_m -Wert: $11,3 \pm 3,0 \mu\text{M}$) und der höchsten Transportrate (V_{max} -Wert: $2168 \pm 134 \text{ pmol/mg Protein/min}$). E₁S hat zwar eine höhere Affinität zum hSOAT, aber für DHEAS besitzt hSOAT eine größere Transportkapazität (Döring 2009). Überraschenderweise zeigte der hSOAT, genauso wie das Rattenortholog, keine Aufnahme von freien Gallensäuren. Erst in 2013 konnte mit Tauroolithocholat eine Gallensäure entdeckt werden, welche von SOAT und auch von ASBT und NTCP transportiert wird (Grosser 2013). Bis dahin war die sulfatierte Gallensäure Tauroolithocholat-3-sulfat (TLCS) die einzige Gallensäure, welche mit einer geringen Ratio von 1,6 (hSOAT/Kontrolle) vom hSOAT als Substrat erkannt wird. Auch Steroidglukuronide (Estradiol-17 β -glukuronid, Estron-3 β -glukuronid) und freie Steroide (DHEA, E₁) stellen keine Substrate des hSOAT dar (Geyer et al. 2007; Döring 2009). Mit Hilfe von Hemmstudien wurde ermittelt, dass der hSOAT eine starke Interaktion mit Substanzen eingeht, die eine negativ geladene Sulfatgruppe und mindestens zwei Hydrocarbonringe besitzen. Die Substanzen TLCS, Glycolithocholat-3-sulfat, Lithocholat-3-sulfat, 1 omega-SEP, BSP, 2-SMP und 4-SMP hemmen die Transportfunktion des Proteins fast vollständig (Döring 2009). Im Gegensatz zu den OATPs und dem OSCP1 ist der Transport der SOAT/Soat-Proteine Natrium-abhängig (Döring 2009). Ein Ersatz des Natriums durch Lithium oder Kalium im Transportpuffer, führte zu einer Reduktion der Aufnahme auf 36 % bzw. 19 %, wohingegen der Einsatz von Cholin anstelle von Natrium zu einem vollständigen Verlust der Transportfunktion führte (Döring 2009). Der hSOAT weist einen leichten Anstieg der DHEAS-Aufnahme bei einem abgesenkten pH von 7,4 auf 6 auf, zeigt aber in beiden Bereichen eine deutliche Aufnahme, so dass er als pH-sensitiv, aber nicht als pH-abhängig betrachtet werden kann (Döring 2009). Die physiologische Bedeutung dieses

sehr spezifischen Steroidsulfattransporters ist bislang nicht identifiziert worden, allerdings könnte SOAT eine Rolle bei der Entstehung hormonabhängiger Mammakarzinome spielen. Im Proliferationsassay zeigte eine mit hSOAT transfizierte, hormonsensitive Brustkrebszelllinie (T47D) eine 10-fach höhere Sensitivität für E_1S gegenüber den mit Leervektor transfizierten Kontrollzellen (Karakus 2009). Dieser Effekt ließ sich sowohl durch den selektiven Estrogenrezeptormodulator Tamoxifen, als auch durch den StS-Inhibitor STX64 und die SOAT-Inhibitoren 2- und 4-SMP aufheben, was eine Funktion des hSOATs im Brustgewebe bekräftigt. Da in gesundem Brustgewebe neben SOAT auch die StS exprimiert wird, ist ein Zusammenspiel der beiden Proteine denkbar. Sulfatierte Steroide könnten über SOAT in die Brustdrüsenzellen aufgenommen werden, intrazellulär von der StS in die aktive Form überführt werden und dann einen proliferativen Effekt auf das Tumorgewebe ausüben (Suzuki et al. 2005; Funk 2009). Aufgrund seiner starken Expression im Hoden und seiner Substratspezifität für Steroidsulfate scheint hSOAT aber auch eine Rolle bei der Versorgung des Hodens mit sulfatierten Steroiden zu spielen, so dass eine Funktion im *Sulfatase Pathway* möglich ist. Daher wurde auch hSOAT für diese Arbeit als Kandidatencarrier ausgewählt.

1.7.3.2 Der murine Sodium-dependent Organic Anion Transporter (mSoat)

Neben dem hSOAT wurde auch der murine Soat (mSoat) in den letzten Jahren näher charakterisiert (Grosser et al. 2013). Dabei zeigte sich, dass die Aminosäure-Sequenz von SOAT bei Maus und Mensch eine Übereinstimmung von 71 % aufweist. Der mSoat wird, wie beim Menschen, im Hoden und in geringerer Menge in der Haut exprimiert, zeigt allerdings auch eine deutliche Expression in der Lunge (Grosser et al. 2013). Außerdem wird der mSoat bei der Maus in der Blase exprimiert. Im Maushoden ist Soat in den pachytänen Spermatozyten lokalisiert. In der Lunge ist er im Bronchialepithel vom Hauptbronchus bis zu den terminalen Bronchioli mittels IHC detektierbar. Ferner zeigen auch die Alveolarzellen eine mSoat-Expression. In Bezug auf seine Transporteigenschaften weist der mSoat Übereinstimmungen mit dem hSOAT auf, indem er ebenfalls sulfatierte Steroide wie E_1S , DHEAS und PREGS als Substrat erkennt (Grosser et al. 2013). Man kann also davon ausgehen, dass der humane und der murine SOAT/Soat vergleichbare Funktionen im Organismus haben, so dass die Etablierung einer *Slc10a6*-Knockout-Maus zur Identifizierung der physiologischen Bedeutung dieses Membrantransporters beitragen kann.

1.7.3.3 Weitere Mitglieder der SLC10-Familie

Zwischen 2004 und 2008 gelang die Identifizierung weiterer Mitglieder der SLC10-Familie am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Justus-Liebig-Universität Gießen. Diese wurden

vom *HUGO Gene Nomenclature Committee* als *SLC10A4*, *SLC10A5*, und *SLC10A7* klassifiziert (Geyer et al. 2006a; Fernandes et al. 2007; Godoy et al. 2007; Geyer et al. 2008). Das *SLC10A4/Slc10a4*-Protein weist eine enge Verwandtschaft zum *NTCP/Ntcp* auf (Sequenzidentität 29,7 %) und ist vorwiegend im Gehirn exprimiert (Geyer et al. 2008; Burger et al. 2011). Weitere Expressionsorte sind die Plazenta, das Pankreas, die Leber, die Niere und kultivierte Cholangiozyten (Splinter et al. 2006). Das *SLC10A4/Slc10a4*-Protein zeigt allerdings, ähnlich wie das *SOAT/Soat*-Protein, keine Transportaktivität für Gallensäuren (Splinter et al. 2006; Geyer et al. 2006a; Geyer et al. 2008). Bislang konnte auch kein anderes, eindeutiges Substrat für diesen Transporter identifiziert werden. Da er im Gehirn in cholinergen und dopaminergen Regionen lokalisiert ist, kann er eine potentielle physiologische Bedeutung in diesen Systemen einnehmen (Burger et al. 2011).

Der *SLC10A3/Slc10a3* bildet mit dem *SLC10A5/Slc10a5* eine weitere Subfamilie der *SLC10*-Familie. *SLC10A3/Slc10a3* wird ubiquitär im Körper exprimiert, so dass das codierte P3-Protein als möglicher *Housekeeper* diskutiert wird (Hagenbuch und Dawson 2004). *SLC10A5/Slc10a5* wird sowohl beim Menschen, wie auch bei Maus und Ratte dominant in Leber und Niere exprimiert (Fernandes et al. 2007). Bei der Ratte erfolgte eine Lokalisation in Hepatozyten und im proximalen Tubulus der Niere. Bisher konnte kein Substrat dieses potentiellen Transporters *in vitro* identifiziert werden, so dass es zurzeit nicht möglich ist, die Funktion des *SLC10A5/Slc10a5*-Proteins eindeutig zu benennen. Es ist aber wahrscheinlich, dass er eine Aufgabe im Transportgeschehen in Leber und Niere wahrnimmt.

SLC10A7/Slc10a7 ist bei Mensch, Ratte, Maus und Frosch in vielen Geweben exprimiert (Godoy et al. 2007), zeigt allerdings nur eine geringe Sequenzidentität (12 - 16 %) zu den anderen Mitgliedern der *SLC10*-Familie, so dass eine vergleichende Betrachtung mit den anderen *SLC10*-Familienmitgliedern erschwert ist. Phylogenetisch ist das *SLC10A7*-Protein mit zahlreichen bakteriellen Proteinen verwandt (Godoy et al. 2007). Das zum humanen *SLC10A7* homologe *RCH1*-Gen von *Candida albicans* nimmt eine wichtige Rolle in der Ca^{2+} -Homöostase ein (Jiang et al. 2012; Alber et al. 2013). Es konnte gezeigt werden, dass eine Deletion dieses Gens eine Hypersensitivität gegenüber extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen und eine Toleranz von Azolen und Lithium in *Candida albicans* Hefepilzkulturen herbeiführt (Jiang et al. 2012; Alber et al. 2013). Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass auch das *SLC10A7*-Protein eine Funktion in der Ca^{2+} -Homöostase übernimmt, die aber noch nicht abschließend geklärt werden konnte.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Im Blutkreislauf zirkulierende, hormonell inaktive Steroidsulfate werden als Vorläufermoleküle aktiver Steroidhormone angesehen. Im Gegensatz zu freien Steroiden, die die Zellmembran

mittels Diffusion passieren können, sind sulfatierte Steroide aufgrund ihrer hydrophilen Eigenschaften auf Transportsysteme in der Zellmembran angewiesen, die sie in die Zielzelle hineinbringen. Innerhalb der Zelle können Steroidsulfate durch die StS in die freie Form überführt werden und über Steroidhormonrezeptoren eine hormonelle Zellantwort initiieren. Dieser sogenannte *Sulfatase Pathway* wird in intrakrin aktiven Organen wie dem Hoden und der Haut, als alternativer Weg zur Regulation der lokalen Verfügbarkeit biologisch aktiver Steroide angesehen. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung potentieller Transportsysteme, die die Aufnahme der Steroidsulfate in spezifische Zielzellen im Hoden ermöglichen. Zu den ausgewählten Kandidatentransportern gehörten die beiden OATPs OATP6A1 und OATP1C1, sowie der OSCP1 und das SLC10-Familienmitglied SOAT. Zunächst wurde von den vier Kandidaten die Gewebeexpression in der quantitativen Realtime PCR analysiert und miteinander verglichen. Im Anschluss erfolgte die funktionelle Charakterisierung der potentiellen Transportproteine. Zur Erweiterung des Substratspektrums wurde die Flüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS) als Nachweismethode sulfatierter und freier Steroide in Zelllysaten in Kooperation mit dem Labor von Prof. S. Wudy, Gießen etabliert. Basierend auf den Ergebnissen der Funktionsanalyse wurde SOAT als vielversprechendster Kandidat detaillierter untersucht. Hierzu wurden Transportstudien mit Steroidgemischen, die der physiologischen Situation im Hoden entsprechen, durchgeführt und die simultan angebotenen Steroide bzw. Steroidsulfate über die LC-MS/MS analysiert. Ferner wurde der Einfluss von natürlich vorkommenden Einzelnukleotidpolymorphismen im *SLC10A6*-Gen auf die Transportfunktion des SOAT-Proteins untersucht. Mit den Ergebnissen dieser Arbeit sollte die physiologische Funktion des SOAT-Proteins in verschiedenen intrakrinologisch aktiven Organen besser verstanden werden.

2 Material

Die beschriebenen Ansätze, Puffer und Medien wurden auf das entsprechende Volumen mit bidestillierten Wasser (ddH₂O) aufgefüllt, sofern nicht anders angegeben. Die Nichtbenutzung von TM oder ® bedeutet nicht, dass die Produktbezeichnungen frei verfügbar sind. Sie wurden nur der Übersicht halber weggelassen.

2.1 Material für die molekularbiologischen Arbeiten

2.1.1 Primer

Target	Bezeichnung	Tm (°C)	Sequenz (5' → 3')
<u>Klonierung in TOPO-Vektoren#</u>			
OSCP1	OSCP1-F mit Start	60	ctcgttccagcaccatg tc
OSCP1	OSCP1-R mit Stop	57	ggtcagaacag ct ataactca
OSCP1	OSCP1-R ohne Stop	56	taactcatccatcatggcga
OATP1C1	OATP-F-F mit Start	57	tgtaatcat ggg agttggaac
OATP1C1	OATP-F-F mit Start-2	57	ataat gg acacttcatccaaag
OATP1C1	OATP-F-R mit Stop	57	gtagcagatgat ca cttgtag
OATP1C1	OATP-F-R-mit Stop-2	54	tct aaagttgagtttccttgc
OATP1C1	OATP-F-R ohne Stop	58	ctgtagtgtaatcttcttttg
OATP1C1	OATP-F-R-ohne Stop-3	55,3	aagttgagttccttgctg
OATP6A1	GST-F mit Start	63	cagggtgagccat gt tcgtag
OATP6A1	GST-R mit Stop	63	acaatgatgatccag tt acaagtcag
OATP6A1	GST-R ohne Stop	65	caagtcagttcttcttttcttaactttg
<u>Überprüfung der generierten Sequenzen</u>			
OSCP1	SP-OSCP1-V5His-2.1.2.1	60	ccaggactcatcagaatgttca
OSCP1	SP-OSCP1-R-1	58	agccatggtcatcaggtcat
OATP1C1	SP-OATP-F-GFP-1.2.9.1	56	accattacccccaaaaagatcc
OATP1C1	SP-OATP-F-GFP-1.2.10.1	56	actgcactgtgtggaatt
OATP1C1	SP-OATP-F-FRT.TO-1.3.7.1	60	agactaccaaacacccccagg
OATP1C1	SP-OATP-F-F-1	54	tcttactggcaaaatcatc
OATP1C1	SP-OATP-F-F-1 (2)	55,9	atgtttcctgggcaatctc
OATP1C1	SP-OATP-F-R-1	56	tcttactggcaaaatcatc
OATP1C1	SP-OATP-F-R-2	56,5	ctctgaacattgcatcttgag
OATP6A1	SP-GST-V5His-7.1.1.1	60	aggtgtcagtggtgccag
OATP6A1	SP-GST-FRT.TO.9.3.4.1	59	gggaaatgatgcaaaagtgc

Zielgerichtete Mutagenese (Einfügen zweier Stopcodons)*

OSCP1	OSCP1-Stop-MGF	73,6	catgatggatgagtta <u>TAGTG</u> aagggcgagcttggtaccg
OSCP1	OSCP1-Stop-MGR	73,6	cggtagcaagctcgccct <u>CACTA</u> aactcatccatcatg
OATP6A1	GST-Stop-MGF	73,1	gaaaaaagaagaaactgacttg <u>TAGTG</u> aagggcgagcttggtacc
OATP6A1	GST-Stop-MGR	73,1	ggtaccaagctcgccct <u>CACTA</u> caagtcagttctctttttc
OATP1C1	OATP-F-I3-Stop-MGF	>75	aggcaaggaactcaact <u>TAGTG</u> aagggcgagcttggtaccg
OATP1C1	OATP-F-I3-MGR	>75	cggtagcaagctcgccct <u>CACTA</u> aagttgagttccttgct

Zielgerichtete Mutagenese (Polymorphismen im SLC10A6-Gen)*

SOAT-R185T-MGF	72,3	ggcctttggtgctatgtgaattaca <u>C</u> atggccaaaacaatcc
SOAT-R185T-MGR	72,3	ggattgtttggccat <u>G</u> tgtaattcacatagacaccaaaggcc
SOAT-I196T-MGF	73,3	cattctcaaga <u>C</u> tggggccggtgttggtgggg
SOAT-I196T-MGR	73,3	ccccaccaacaacgcccc <u>G</u> tcttgagaatg
SOAT-I199V-MGF	73,5	agattggggcc <u>A</u> ttgttggtgggtcctcc
SOAT-I199V-MGR	73,5	ggaggacccaccaacaa <u>T</u> ggcccaatct
SOAT-L204F-MGF	71	tggtaggggtc <u>T</u> ctctctggtggtcgc
SOAT-L204F-MGR	71	gcgaccaccagaagga <u>A</u> gacccacca

Genotypisierung der Slc10a6-Knockout-Maus

mSOAT-Genotyp_R2	68,0	cctagtgttcggtctcttcagcatc
mSOAT-Genotyp_F2	72,0	ggtggtcctgtggcttctggcgtc
LacZ_F	68,0	cttctgacgagttctctgaggggat

Sowohl die Start-, wie auch die Stoppcodons sind fett dargestellt.

* Die mutierten Basen sind in Großbuchstaben und fett dargestellt. Das codierende Triplet ist unterstrichen.

Die Primer wurden mit dem Programm Oligo 4.0 ausgewählt. Die Synthese der Primer erfolgte durch die Firmen Metabion (Martinsried) und Eurofins MWG Operon (Ebersberg).

2.1.2 Enzyme

2.1.2.1 Hitzebeständige DNA-Polymerasen

1) Expand High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim)

- Mix aus thermostabiler Taq DNA Polymerase und thermostabiler Tgo DNA Polymerase
- 3' → 5' Exonuklease Aktivität (proofreading)

2) Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)

- Pyrokoccus-ähnliches Enzym, Iacl-basierte Methode
- 3' → 5' Exonuklease Aktivität (proofreading)

3) Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Scientific)

- Pyrokoccus-ähnliches Enzym, das spezielle Domäne enthält, die die Polymeraseaktivität beschleunigt → schnelles und exaktes Arbeiten
- reversibel bindendes Affibody Protein verhindert Polymeraseaktivität bei Umgebungstemperaturen → keine Generierung unspezifischer Amplifikate
- 3' → 5' Exonuklease Aktivität (proofreading)
- Ready-to-use Mastermix ermöglicht Benutzung von PCR-Protokollen mit sehr kurzen Zykluszeiten

2.1.2.2 Reverse Transkriptase

1) SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, bezogen über Life Technologies, Darmstadt)

- Version der reversen Transkriptase des M-MLV (Murine Moloney Leukemia Virus) mit erhöhter Thermostabilität und reduzierter RNase H-Aktivität

2.1.3 Restriktionsenzyme

Enzym	Erkennungssequenz	Puffer	BSA	Hersteller
<i>Apal</i>	5'...GGGCC▼C...3' 3'...C▲CCGGG...5'	Puffer B	+	Thermo Scientific
<i>KpnI</i>	5'...GGTAC▼C...3' 3'...C▲CATGG...5'	Puffer KpnI	+	Thermo Scientific
<i>NdeI</i>	5'...CA▼TATG...3' 3'...GTAT▲AC...5'	Puffer O	+	Thermo Scientific
<i>PstI</i>	5'...CTGCA▼G...3' 3'...G▲ACGTC...5'	NEBuffer 3.1	+	NEB, Ipswich, MA, USA
<i>SacI</i>	5'...GAGCT▼C...3' 3'...C▲TCGAG...5'	Puffer SacI	+	Thermo Scientific
<i>Scal</i>	5'...AGT▼ACT...3' 3'...TCA▲TGA...5'	Puffer Scal	+	Thermo Scientific

FastDigest 5'...GGTAC▼C...3' FastDigest - Thermo Scientific
KpnI 3'...C▲CATGG...5' Buffer

2.1.4 Sonstige Enzyme

1) DNase I (Thermo Scientific)

- RNase-frei

2) Klenow-Fragment (Thermo Scientific)

- Großes Fragment der DNA-Polymerase I mit 5' → 3' Polymerase Aktivität und 3' → 5' Exonuklease Aktivität
- Hat keine 5' → 3' Exonuklease Aktivität

3) ProteoBlock Protease Inhibitor (Thermo Scientific)

- Schützt Proteine vor Degradation durch Proteasen während des Extraktionsprozesses
- Enthält sechs verschiedene Proteasehemmer, die neben Proteasen auch eine Vielzahl von Esterasen hemmen

2.1.5 Sonstiges Material

1) dNTPs (Thermo Scientific)

- je 10 mM (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)

2) Wasser für die Molekularbiologie (Roth, Karlsruhe)

- Destilliertes H₂O
- Autoklaviert
- Durch Zusatz von DEPC Modifikation der Histidinreste an Proteinen zu N-Carboethoxyhistidin, dadurch Hemmung von RNasen und DNasen
- Einsatz in den PCR-Reaktionen und bei der Zellyse

2.2 Vektoren

2.2.1 pcDNA5/FRT/TO-TOPO Vector

(Life Technologies)

- 5155 bp Gesamtlänge
- CMV-Promotor mit TATA-Box und 2 x Tetrazyklin-Operon (TetO₂), TOPO-Klonierungsstelle, BGH PolyA, FRT site, SV40 early PolyA, pUC origin, *bla* Promotor, Hygromycin resistance gene, Ampicillin resistance gene

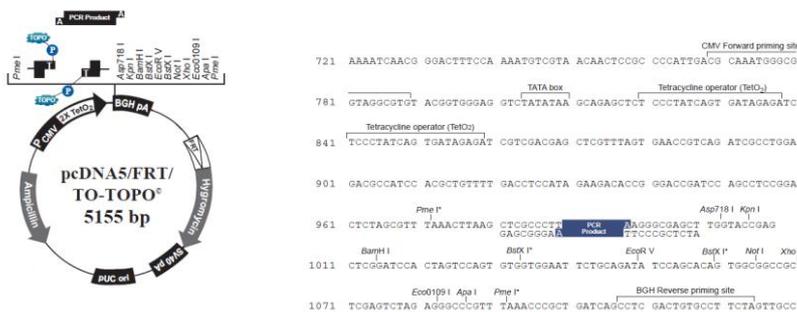


Abbildung 2.1: Vektorkarte und Polylinkersequenz (*multiple cloning site, MCS*)

2.2.2 pcDNA5/FRT/V5His-TOPO Vector

(Life Technologies)

- 5094 bp Gesamtlänge
- CMV-Promotor, T7-Promotor, TOPO-Klonierungsstelle, V5 Epitop, Polyhistidin (6x His) Region, BGH PolyA, FRT site, SV40 early PolyA, pUC origin, *bla* Promotor, Hygromycin resistance gene, Ampicillin resistance gene

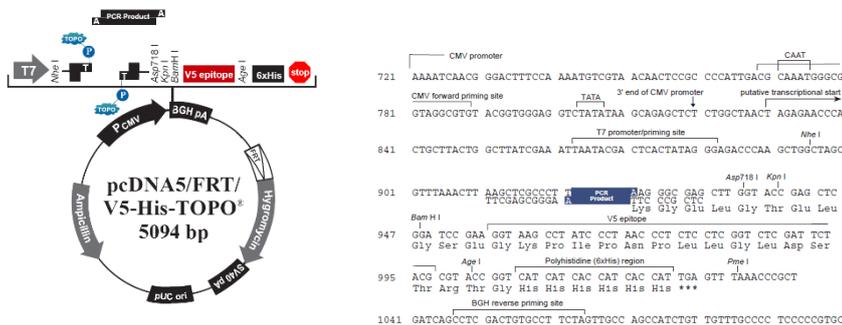


Abbildung 2.2: Vektorkarte und Polylinkersequenz (*multiple cloning site, MCS*)

2.2.3 pOG44

(Life Technologies)

- 5785 bp Gesamtlänge
- CMV-Promotor, synthetisches Intron, Leserahmen Flp Recombinase (FLP), SV40 PolyA, pUC origin, *bla* Promotor, Ampicillin resistance gene

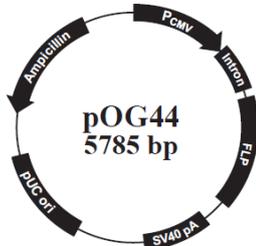
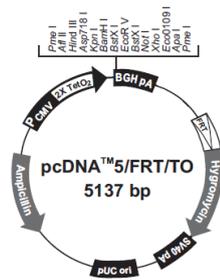


Abbildung 2.3: Vektorkarte und Polylinkersequenz (*multiple cloning site, MCS*)

2.2.4 pcDNA9

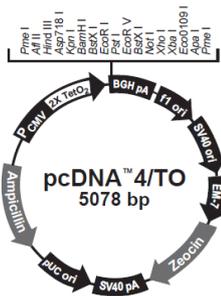
(basierend auf pcDNA5/FRT und pcDNA4/TO)

- In den Vektor pcDNA5/FRT(Life Technologies) wurde das Tetracyclin-Operon (TetO₂) des pcDNA4/TO Vektors eingefügt.
- 5070 bp Gesamtlänge
- CMV-Promotor mit TATA-Box, 2x Tetracyclin-Operon (TetO₂), BGH PolyA, FRT site, pUC origin, *bla* Promotor, Hygromycin resistance gene, Ampicillin resistance gene
- MSC: *NheI*, *PmeI*, *AflII*, *HindIII*, *Asp718I*, *KpnI*, *BamHI*, *BstXI*, *BstXI*, *NotI*, *XhoI*, *ApaI*, *PmeI*
- Dieser Vektor wurde von Herrn Dr. B. Ugele (München) zur Verfügung gestellt.



```

721 AAATCAACG GGACTTTCCA AARTGTCGTA ACAACTCCGC CCCATTGACG CAAATGGCGG
CMV Forward priming site
781 GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG GTCATATAAA GCAGAGCTCT CCTATCAGT GATAGAGATC
TATA box Tetracycline operator (TetO2)
841 TCCTATCAG TGATAGAGAT CGTCGACGAG CTGCTTTAGT GAACCGTCAG ATCGCCTGGA
Tetracycline operator (TetO2)
901 GACGCCATCC ACGCTGTTTT GACCTCCATA GAAGACACCG GGACCGATCC AGCCTCCGGA
961 CTCTAGCGTT TAAACTTAAAG CTGTGTACCG AGCTCGGATC CACTAGTCCA GTGTGGTGGG
Prime I AfII HpaI III Asp718 I KpnI BamH I BstX I EcoR I
1021 ATTCTGAGA TATCCAGCAC AGTGGCGGCC GCTCGAGTCT AGAGGGCCCG TTAAACCCG
EcoR V BstX I NotI Xba I Eco0109 I Apa I Pme I
1081 CTGATCAGCC TCGACTGTGC CTCTAGTTG CCAGCCATCT
BGH Reverse priming site
    
```



```

721 AAATCAACG GGACTTTCCA AARTGTCGTA ACAACTCCGC CCCATTGACG CAAATGGCGG
CMV Forward priming site
781 GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG GTCATATAAA GCAGAGCTCT CCTATCAGT GATAGAGATC
TATA box Tetracycline operator (TetO2)
841 TCCTATCAG TGATAGAGAT CGTCGACGAG CTGCTTTAGT GAACCGTCAG ATCGCCTGGA
Tetracycline operator (TetO2)
901 GACGCCATCC ACGCTGTTTT GACCTCCATA GAAGACACCG GGACCGATCC AGCCTCCGGA
961 CTCTAGCGTT TAAACTTAAAG CTGTGTACCG AGCTCGGATC CACTAGTCCA GTGTGGTGGG
Prime I AfII HpaI III Asp718 I KpnI BamH I BstX I EcoR I
1021 ATTCTGAGA TATCCAGCAC AGTGGCGGCC GCTCGAGTCT AGAGGGCCCG TTAAACCCG
EcoR V BstX I NotI Xba I Eco0109 I Apa I Pme I
1081 CTGATCAGCC TCGACTGTGC CTCTAGTTG CCAGCCATCT
BGH Reverse priming site
    
```

Abbildung 2.4: Vektorkarte und Polylinkersequenz (*multiple cloning site, MCS*)

(Quelle der Vektorkarten und Polylinkersequenzen (*multiple cloning site, MCS*): www.lifetechnologies.com)

2.3 Bakterienstämme

- 1) One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Life Technologies)
 - Genotyp: F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*ara-leu*) 7697 *galJ* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG*
- 2) XL1-Blue supercompetent cells (Agilent Technologies, Waldbronn)
 - Genotyp: *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *hsdR17* *supE44* *relA1* *lac* [*F'* *proAB* *lac^M* Δ M15 Tn10(Tet^r)]

2.4 Kommerziell erhältliche cDNA-Panels (BioCat GmbH, Heidelberg)

- 1) Human Adult Normal cDNA Panel - Major Organs 1
 - Herz
 - Gehirn
 - Niere
 - Leber
 - Plazenta

- 2) Human Adult Normal cDNA Panel – Major Organs 2
 - Lunge
 - Pankreas
 - Milz
 - Skelettmuskulatur
 - Plazenta

- 3) Human Adult Normal cDNA Panel – Reproductive System 1
 - Hoden
 - Epididymis
 - Penis
 - Seminalblasendrüse
 - Plazenta

- 4) Human Adult Normal cDNA Panel – Reproductive System 2
 - Ovar
 - Eileiter
 - Uterus
 - Vagina
 - Plazenta

- 5) Custom Design cDNA Panel
 - Kolon
 - Dünndarm
 - Periphere Blutleukozyten
 - Prostata
 - Nebenniere

- 6) Brust (Human Adult Normal) Ultralong PCR-Ready first Strand cDNA
- 7) Haut (Human Adult Normal) Ultralong PCR-Ready first Strand cDNA
- 8) Hoden (Human Adult Normal) Ultralong PCR-Ready first Strand cDNA

2.5 Quantitative Real Time-PCR

2.5.1 TaqMan Gene Expression Assays

(Applied Biosystems, Darmstadt, Foster City, CA, USA, bezogen über Life Technologies, Darmstadt)

SOAT human	Hs01399354_m1	(Exongrenze 5-6)
ACTB human	Hs99999903_m1	(Exongrenze 1-2)
POLR2A human	Hs01108291_m1	(Exongrenze 8-9)
OSCP1 human	Hs00376771_m1	(Exongrenze 1-2)
OATP6A1 human	Hs00542846_m1	(Exongrenze 7-8)
OAPT1C1 human	Hs00213714_m1	(Exongrenze abhängig von der Transkriptionsvariante (TKV*))

*TKV1: 11-12, TKV2: 10-11, TKV3: 10-11, TKV4: 8-9

Komponenten

- Zwei unmarkierte Primer zur Amplifikation
- FAM-markierte TaqMan MGB (Minor Groove Binder) Sonde

Die aufgelisteten Assays wurden aus den von Applied Biosystems kommerziell angebotenen, vorgefertigten Assays ausgesucht. Das Präfix Hs steht für *Homo sapiens*. Die Endung _m gibt an, dass die Sonde auf der Exongrenze zweier benachbarter Exone liegt. Daraus resultiert, dass der Assay keine genomische DNA detektieren kann.

2.5.2 TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG

(Life Technologies)

Komponenten

- AmpliTaq Gold DNA Polymerase
- dNTPs mit dUTP
- Referenzfarbstoff ROX
- Optimierte Pufferkomponenten

2.6 Längenstandards

Agarose-Gelelektrophorese

Gene Ruler DNA Ladder Mix (bp) (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)	100, 200, 300, 400, 500 , 600, 800, 900, 1000 , 1200, 1500, 2000, 2500, 3000 , 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000
---	---

2.7 Kommerziell erhältliche Kits und Materialien für die Molekularbiologie

MEGAclear Kit	Ambion by Life Technologie, Darmstadt
mMESSAGE mMACHINE Kit	Ambion by Life Technologies, Darmstadt
NucleoBond Xtra Midi EF Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
PCR Clean-Up & Gel-Extraction Kit	Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting
Poly(A) Tailing Kit	Life Technologies, Darmstadt
Qiagen Plasmid <i>Plus</i> Midi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Qiagen Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies, Waldbronn
TriReagent (RNA-Isolierung; Protein-Extraktion)	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA

2.8 Puffer und Medien

LB-medium (1 L)	Trypton	10 g
	NaCl	10 g
	Yeast-Extract	5 g

- pH 7,0 mit NaOH einstellen, autoklavieren
- vor Gebrauch Selektionsmedium hinzufügen

LB-Agar (1 L)	LB-Medium	1 L
	Agar-Agar	20 g

- Autoklavieren und auf 60° C abkühlen lassen
- Selektionsantibiotikum zufügen und Platten gießen

NZY+-Broth (1 L)	NZamine		10 g
	Yeast Extract		5 g
	NaCl		5 g
	<ul style="list-style-type: none"> pH auf 7,5 mit NaOH einstellen und autoklavieren 		
	1 M MgSO ₄ (sterilfiltriert)	12,5 mM	12,5 mL
	1 M MgCl ₂ (sterilfiltriert)	12,5 mM	12,5 mL
	2 M Glucose (sterilfiltriert)	20 mM	10 mL
	<ul style="list-style-type: none"> Kurz vor Gebrauch hinzufügen 		
SOC Medium	Trypton		2 %
	Yeast-Extract		0,50 %
	NaCl		10 mM
	KCl		2,5 mM
	MgCl ₂		10 mM
	MgSO ₄		10 mM
	Glucose		20 mM

2.9 Native Gelelektrophorese

6 x Ladepuffer (MBI-Fermentas, St. Leon-Roth)	Tris-HCl		10 mM
	Bromphenolblau		0,03 %
	Xylen Cyanol FF		0,03 %
	Glycerin		60 %
	EDTA		60 mM
10x TAE-Puffer (1 L)	Tris	400 mM	48,4 g
	Essigsäure		11,4 mL
	0,25 M EDTA (pH 8,0)	10 mM	40 mL
EB-Färbelösung	Ethidiumbromid in H ₂ O		1 µg/µL
1 % Agarosegel	Agarose		1 g
	1x TAE-Puffer		100 mL
	GelRED		300 µL

GeIRED-Färbelösung	1 M NaCl	100 mL
(Biotium, Hayward, CA, USA)	ddH ₂ O	900 mL

2.10 Zellkultur

2.10.1 Zelllinien

2.10.1.1 Flip-In T-Rex 293 Zellen

(Life Technologies)

(im Folgenden wird diese Zelllinie als FlpIn-HEK293 Zellen bezeichnet)

Wirtszelllinie:	<i>human embryonic kidney cells</i> 293 (HEK293) ATTC-Nummer CRL-1573
Modifikation:	stabile Integration einer <i>FRT</i> site in das Genom (pFRT/ <i>lacZeo</i>) Konstitutive Expression eines Tet-Repressors (pcDNA6/TR)
Charakteristika:	adhärent wachsend Zeozin resistent → Selektion auf integrierte <i>FRT site</i> Blasticidin resistent → Selektion auf pcDNA6/TR (Tet-Repressor)

2.10.1.2 GripTite 293 MSR Zellen

(Life Technologies)

Wirtszelllinie:	<i>human embryonic kidney cells</i> 293 (HEK293-H)
Modifikation:	konstitutive Expression des <i>human macrophage scavenger receptor type 1</i> (MSR1) (pCMV SPORT6 MSR.neo) → bedingt eine sehr hohe Adhärenz im Vergleich zu den Ausgangszellen
Charakteristika:	adhärent wachsend Geneticin resistent → Selektion auf pCMV SPORT6 MSR.neo

2.10.2 Medien

HEK293-Medium (500 mL)	D-MEM (high glucose)		217,5 mL
	F-12 (Ham)		217,5 mL
	FKS	10 %	50 mL
	L-Glutamin	4 mM	10 mL
	Pen/Strep (10000 U/mL; 10000 µg/mL)	1 %	5 mL

HEK293-Medium Mit DCC-FKS* (500 mL)	D-MEM (high glucose)		217,5 mL
	F-12 (Ham)		217,5 mL
	DCC FKS	10 %	50 mL
	L-Glutamin	4 mM	10 mL
	Pen/Strep (10000 U/mL; 10000 µg/mL)	1 %	5 mL

*DCC-FKS: dextran-coated charcoal-FKS, Aufreinigung des FKS mit Hilfe von Dextran überzogener Aktivkohle zur Gewinnung von Steroid-freiem FKS

GripTite MSR-Medium (500 mL)	D-MEM (high glucose)		430 mL
	FKS	10 %	50 mL
	MEM Non Essential Amino Acids (NEAA)	0,1 mM	5 mL
	L-Glutamin	4 mM	10 mL
	Pen/Strep (10000 U/mL; 10000 µg/mL)	1 %	5 mL

HEPES-Puffer (1 L)	HEPES	18 mM	4,77 g
	NaCl	120 mM	7,07 g
	KCl	5 mM	0,4 g
	KH ₂ PO ₄	0,4 mM	0,06 g
	Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	0,3 mM	0,08 g
	Glucose	6 mM	1 g
	Phenolrot	0,03 mM	0,01 g
	EDTA	1 mM	0,37 g

- pH 7,3 mit HCl/NaOH einstellen

Trypsinlösung (100 mL)	Trypsin	0,05 %	50 mg
	HEPES-Puffer		100 mL

Material

Trypsin pur (100 mL)	Trypsin	100 %	100 g
	HEPES-Puffer		100 mL
Einfriermedium	Standardmedium der jeweiligen Zelllinie	90 %	
	DMSO	10 %	
Beschichtungsmedium	Poly-L-Lysin	100 µg/mL	5 mg
	PBS		50 mL
Trypanblau (100 mL)	Trypanblau	4 %	4 g
	NaCl	0,90 %	0,9 g

2.10.3 Antibiotika

Antibiotika	Verwendungszweck	Endkonzentration	Hersteller
Blasticidin S Hydrochlorid	Selektion auf pcDNA6/TR	15 µg/mL	Roth, Karlsruhe
Geneticin Disulfat (G418)	Selektion auf pCMV SPORT6 MSR.neo	600 µg/mL	Roth
Hygromycin B (50 mg/mL)	Selektion auf Insert	150 µg/mL	Roth
Tetrazyklin Hydrochlorid	Induktion der Proteinexpression	10 µg/mL	Roth

2.10.4 Stabile und transiente Transfektion

2.10.4.1 Transfektionsreagenzien

Lipofectamine 2000 (Life Technologies)

2.10.4.2 Medien zur Transfektion

HEK293-Medium	D-MEM		22 mL
ohne Antibiotika	F-12 (Ham)		22 mL
(50 mL)	FKS	10 %	5 mL
	L-Glutamine	4 mM	1 mL

GripTite MSR-Medium ohne Antibiotika (50 mL)	D-MEM		43,5 mL
	FKS	10 %	5 mL
	MEM non essential	0,1 mM	0,5 mL
	Amino acids (NEAA) L-Glutamine (200 mM)	4 mM	1 mL

Opti-MEM

(Life Technologies)

Natriumbutyrat	2 mM
-----------------------	------

2.11 Transportmessungen an eukaryotischen Zellen

2.11.1 Puffer und Lösungen

Transportpuffer mit Na⁺ (1 L)	NaCl	142,9 mM	8,35 g
	KCl	4,7 mM	0,35 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,2 mM	0,296 g
	KH ₂ PO ₄	1,2 mM	0,163 g
	HEPES	20 mM	4,777 g
	200 mM CaCl ₂ (0,294 g / 10 mL ddH ₂ O)	1,8 mM	9 mL

- pH 7,4 mit 1 M KOH einstellen, kühl lagern

Transportpuffer ohne Na⁺ (1 L)	Cholinchlorid	142,9 mM	19,95 g
	KCl	4,7 mM	0,35 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,2 mM	0,296 g
	KH ₂ PO ₄	1,2 mM	0,163 g
	HEPES	20 mM	4,777 g
	200 mM CaCl ₂ (0,294 g / 10 mL ddH ₂ O)	1,8 mM	9 mL
	Glukose	5 mM	0,9 g

- pH 7,4 mit 1 M KOH einstellen, kühl lagern

Lysepuffer (1 L)	NaOH	1 N	40,01 g
	SDS	0,10 %	1 g

Lyse mit Wasser Wasser für die Molekularbiologie (Roth, Karlsruhe)

Szintillationsflüssigkeit	Isopropanol	300 mL
	Aqua bidest	300 mL

Rotiszint eco plus 6000 mL

2.11.2 Proteinbestimmung

Nach Lowry

Stammlösung für Proteinstandardreihe	Bovines Serum Albumin (BSA, Cohn Fraktion V) Lysepuffer	2 mg 1 mL
Lösung C (100 wells)	4 % Na ₂ CO ₃ 1 % CuSO ₄ 2 % K-Na-Tartrat	20 mL 0,8 mL 0,8 mL
Folin-Lösung (100 wells)	Folin & Ciocalteu's phenol reagent ddH ₂ O	1 mL 3 mL

BCA-Assay (Novagen, Merck KGaA Darmstadt)

Stammlösung für Proteinstandardreihe	Bovines Serum Albumin (BSA, Cohn Fraktion V) Standard	2 mg/mL
BCA Solution (100 wells)	200 µL / well	20 mL
4 % CuSO₄-Lösung (100 wells)	4 µL / well	400 µL

2.12 Heterologe Expression in *Xenopus laevis* Oozyten

2.12.1 Versuchstiere

Es wurden weibliche südafrikanische Krallenfrösche (*Xenopus laevis*) für die Gewinnung der Oozyten verwendet. Die *Xenopus laevis* Oozyten wurden von Herrn Prof. Dr. Wolfgang Claus, Institut für Tierphysiologie (Gießen), zur Verfügung gestellt.

2.12.2 Puffer und Lösungen für Transportmessungen an Oozyten

OR-2 Ca²⁺ - freie Lösung (1 L)	NaCl	82,5 mM	4,82 g
	HEPES	5,0 mM	1,19 g
	KCl	2,5 mM	0,186 g
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1,0 mM	0,2033 g
	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	1,0 mM	0,178 g

- pH 7,8 mit KOH einstellen und autoklavieren

Modifizierte Barth's Lösung (1 L)	NaCl	88 mM	5,14 g
	HEPES	15 mM	3,57 g
	NaHCO ₂	2,4 mM	0,2 g
	KCl	1,0 mM	0,0745 g
	Ca(NO ₃) x 4 H ₂ O	0,3 mM	0,0708 g
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,41 mM	0,0603 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,82 mM	0,2 g

- pH 7,6 mit NaOH einstellen, autoklavieren
- vor Gebrauch 0,1 % Gentamicin hinzufügen

Natrium - Lösung (1 L)	NaCl	100 mM	5,84 g
	HEPES	10 mM	2,385 g
	KCl	2 mM	0,149 g
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1 mM	0,147 g
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1 mM	0,2033 g

- pH 7,5 mit 1 M Tris einstellen, kühl lagern

Kollagenase - Lösung	Kollagenase D		20 mg
	OR-2 Ca ²⁺ - freie Lösung		10 mL

Lysepuffer (1 l)	Aqua bidest		1 l
	SDS	10 %	100 g

2.13 Immunfluoreszenz

2.13.1 Puffer und Lösungen für Immunfluoreszenz an eukaryotischen Zellen

10 x PBS (1 L)	NaCl	1380 mM	80 g
	KCl	27 mM	2 g
	Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	100 mM	26,8 g
	KH ₂ PO ₄	18 mM	2,4 g

- pH 7,4 mit HCl einstellen und autoklavieren
- als 1 x verwenden

2 % PFA (50 mL), phosphatgepuffert	PFA	2 %	1 g
	ddH ₂ O (50 bis 60°C)		45 mL
	10 x PBS		5 mL

- 1 bis 2 Tropfen NaOH dazugeben
- Unter Rühren bei 50°C lösen
- pH 6,8 bis 7,2 mit HCl einstellen

Puffer A (110 mL)	Glycin 1 x PBS	20 mM	165,22 mg 110 mL
Puffer B (70 mL)	BSA Puffer A	1 %	700 mg 70 mL
Blockierlösung (70 mL)	Serum der Spezies, in welcher der 2. Antikörper generiert wurde Puffer B	4 %	2,8 mL 67,2 mL
DAPI/Methanol 1:5.000	DAPI (1 mg/mL in ddH ₂ O) Methanol		50 µL 250 mL
DAPI/PBS 1:5.000	DAPI (1 mg/mL in ddH ₂ O) PBS		50 µL 250 mL
Eindeckelmedium	ProLong Gold Antifade Reagent (Life Technologies)		
	<ul style="list-style-type: none"> • bei Raumtemperatur auftauen lassen • pro Deckgläschen ca. 5 – 10 µL blasenfrei vorlegen und 24 h bei Raumtemperatur trocknen lassen • Lagerung danach bei 4°C 		

2.14 Proteinanalyse

2.14.1 Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Proteine)

	Sammelgel, 4 % (15 mL)	Trenngel, 8 % (45 mL)
ddH ₂ O	9 mL	20,05 mL
0,5 M Tris HCl (pH 6,8)	3,75 mL	--
1,5 M Tris HCl (pH 8,8)	--	12,5 mL
SDS (10 %-ig)	0,15 mL	0,5 mL
Acrylamid (30 %-ig, 37,5:1)	1,95 mL	12,5 mL
APS (10 %)	75 µL	250 µL
Temed	15 µL	25 µL

10 x Tris-Glycin-SDS Elektrophoresepuffer (1 L)	Tris Glycin SDS	250 mM 1920 mM 1 %	30,3 g 144 g 10 g
--	-----------------------	--------------------------	-------------------------

- pH 8,3 mit HCl einstellen
- als 1 x verwenden

4 x Lämmli Puffer (10 mL)	SDS	8 %	0,8 g
	Glycerin	40 %	4 g
	β-Mercaptoethanol	20 %	2 mL
	Bromphenolblau	0,01 %	0,8 mg
	1 M Tris (pH 6,8)	0,25 M	2,5 mL
	ddH ₂ O		ad 10 mL

2.14.2 Puffer und Lösungen für die Western Blot Analyse

Kathodenpuffer (500 mL)	6-Aminohexansäure	40 mM	2,62 g
	Tris	25 mM	1,51 g
	Methanol	20 %	100 mL

- in geringer Menge Aqua bidest lösen
- dann Methanol hinzugeben
- mit Aqua bidest auf 500 mL auffüllen

Anodenpuffer (500 mL)	Tris	30 mM	1,82 g
	Methanol	20 %	100 mL

- in geringer Menge Aqua bidest lösen
- dann Methanol hinzugeben
- mit Aqua bidest auf 500 mL auffüllen

Konz. Anodenpuffer (500 mL)	Tris	300 mM	18,2 g
	Methanol	20 %	100 mL

- in geringer Menge Aqua bidest lösen
- dann Methanol hinzugeben
- mit Aqua bidest auf 500 mL auffüllen

10 x TBS (1 L)	NaCl	1370 mM	12,1 g
	Tris	100 mM	121,2 g

- pH 8,0 mit HCl einstellen
- als 1 x verwenden

1 x TBS-T (1 L)	1 x TBS		1 l
	Tween 20	0,05 %	121,2 g

Blockierlösung 5%	TBS-T		50 mL
--------------------------	-------	--	-------

(50 mL)	Milchpulver	5 %	2,5 g
Blockierlösung 10 % (50 mL)	TBS-T		50 mL
	Milchpulver	10 %	5 g
Coomasie-Färbelösung (220 mL)	Coomassie Brilliant Blue R250	≈ 0,4 %	0,5 g
	Ethanol	≈ 50 %	100 mL
	Essigsäure	≈ 10 %	20 mL
	ddH ₂ O		100 mL
Coomasie- Entfärbelösung (1 L)	Ethanol	≈ 30 %	300 mL
	Essigsäure	≈ 10 %	100 mL
	ddH ₂ O		600 mL

2.14.3 Filmentwicklung

Amersham Hyperfilm ECL	GE Gealthcare, Buckinghamshire, UK
Hypam Schnellfixierer (1:25 in H ₂ O)	Iford, Cheshire, England, UK
Rodinal B & W Film Developer (1:5 in H ₂ O)	Agfa, Leverkusen

2.14.4 Kommerziell erhältliche Kits und Materialien (für die Proteinanalyse)

BCA Protein Assay Kit	Novagen (Merck KGaA), Darmstadt
ProteoExtract Native Membrane Protein Extraction Kit	Merck Millipore, Darmstadt
ProteoJet Mammalian Cell Lysis RIPA Buffer (Protein-Extraktion)	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA,
TriReagent (RNA-Isolierung; Protein Extraktion)	Sigma, St. Louis, MI, USA,
Protease Inhibitor Cocktail	Life Technologies, Darmstadt
Rotilumin 1 & 2	Roth, Karlsruhe

2.14.5 Längenstandards

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Roti Mark Western Marker (Roth)	10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 120 kDa
Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific)	10, 15, 25, 35, 55, 70, 100, 130, 250 kDa

2.14.6 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

Primärantikörper	Epitop	Spezies	Hersteller
anti-V5	GKPIPPELLGLDST	Monoklonal, Maus	Invitrogen, Karlsruhe
anti-SOAT ₂₋₁₇	RANCSSSSACPANSSE	Polyklonal, Kaninchen	Eurogentec, Seraing Belgien (custom antibody)
anti-SOAT ₂₅₀₋₂₆₅	QSWQRCRTISLETGAQ	Polyklonal, Kaninchen	Eurogentec (custom antibody)
anti-SOAT ₃₄₉₋₃₆₄	EEGAIPTGPPGPMDC	Polyklonal, Kaninchen	Eurogentec (custom antibody)
anti-SOAT ₃₁₁₋₃₇₇	C-Terminus	Polyklonal, Kaninchen	Eurogentec (custom antibody)
anti-GAPDH	C-HQVVSSDFNSDT	Polyklonal, Ziege	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Sekundärantikörper	Epitop	Spezies	Hersteller
Anti-Kaninchen-IgG- Alexa Fluor 488	Kaninchen IgG (H+L)	Polyklonal, Ziege	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Maus-IgG-Alexa Fluor 488	Maus IgG (H+L)	Polyklonal, Ziege	Invitrogen, Karlsruhe
Cappel Peroxidase Ziege Anti- Kaninchen	Kaninchen IgG (WM)	Ziege	MP Biomedicals, Singapur
Anti-Kaninchen IgG- Cy3	Kaninchen IgG (H+L)	Polyklonal, Ziege	Dianova, Hamburg
Anti-Kaninchen IgG- FITC	Kaninchen IgG (H)	Polyklonal, Ziege	Sigma Aldrich, Taufkirchen
ZyMax Kaninchen Anti-Ziege IgG HRP Konjugat	Ziege IgG (H+L)	Polyklonal, Kaninchen	Invitrogen, Darmstadt
HRP Western Blot Anti-Mouse IgG Antibody	Maus IgG (H+L)	Polyklonal, Ziege	Rockland, Gilbertsville

Fluoreszenzfarbstoff

DAPI	Färbung von Zellkernen	Roche Diagnostics, Mannheim
------	------------------------	--------------------------------

2.15 Genotypisierung der Slc10a6-Knockout-Maus

10 x Lysepuffer (1 L)	NaOH	250 mM	1 g
	EDTA-Na	2 mM	74,46 mg
	ddH ₂ O		ad 100 mL

- als 1x verwenden

10 x Neutralisationspuffer (1 L)	Tris-HCl	400 mM	6,3 g
	ddH ₂ O		ad 100 mL

- als 1x verwenden

2.16 Chemische Substanzen

Acrylamid Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Agarose Ultra pur	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Bovines Serum Albumin, BSA	Roche, Mannheim
Bovines Serum Albumin, BSA Cohn Fraktion V	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Calciumchlorid Dihydrat [CaCl ₂ x 2 H ₂ O]	Merck, Darmstadt
Calciumnitrat Tetrahydrat [Ca(NO ₃) x 4 H ₂ O]	Merck, Darmstadt
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Cholinchlorid	Sigma Aldrich, Taufkirchen
DAPI, 4',6'-Diamidine-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid	Roche, Mannheim
DEPC, Diethylpyrocarbonat	Roth, Karlsruhe
D-Glucose	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat-Heptahydrat [Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O]	Merck, Darmstadt
DMEM, Dulbecco's modified eagle's serum	Life Technologies, Darmstadt; PAA, Pasching; Gibco, Karlsruhe
DMEM ohne Pyruvat	Life Technologies, Darmstadt
DMSO	Roth, Karlsruhe

EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure-Na ₂	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol (> 99,8 %), EtOH abs.	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
F12 Nutrient Mixture (HAM)	Life Technologies, Darmstadt; PAA, Pasching; Gibco, Karlsruhe
FKS, Fetales Kälber Serum	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Folin & Ciocalteu's Phenol Reagenz	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Formaldehyd, 37 %	Roth, Karlsruhe
Formamid	Merck, Darmstadt
Gentamicin	Sigma Aldrich, Taufkirchen; Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Harnstoff	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
2-Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin	Sigma Aldrich, Steinheim
Immersion liquid Typ N (Öl für Mikroskopie)	Leica, Wetzlar
IPTG, Isopropylthiogalactosid	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat [KH ₂ PO ₄]	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid [KCl]	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid [KOH]	Merck, Darmstadt
Kalium-Natrium-Tartrat	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Kollagenase Typ D	Roche Diagnostics, Mannheim
Kupfer(II)sulfat Pentahydrat [CuSO ₄ x 5 H ₂ O]	Merck, Darmstadt
Lämmli Puffer (2-fach Konzentrat)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
LB-Medium (Luria/Miller)	Roth, Karlsruhe
L-Glutamin (200 mM)	Gibco, Karlsruhe, PAA, Pasching
Magnesiumchlorid-Hexahydrat [MgCl ₂ x 6 H ₂ O]	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat-Heptahydrat [MgSO ₄ x 7 H ₂ O]	Merck, Darmstadt
MEM Non Essential Amino Acids (NEAA)	PAA, Pasching
Membrane blocking agent	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe

Methanol	Roth, Karlsruhe
Mineralöl für Molekularbiologie	Roth, Karlsruhe
Molekularbiologisches Wasser	Roth, Karlsruhe
N,N-Dimethyl-Formamid (DMF)	Sigma, Steinheim
Natriumacetat Trihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat [Na ₂ CO ₃]	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid [NaCl]	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat [NaHCO ₃]	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid [NaOH]	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd, PFA	Roche Diagnostics, Mannheim
Penicillin/Streptomycin (10.000 Units/mL; 10.000 µg/mL)	Gibco, Karlsruhe; PAA; Pasching
Phenolrot	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Poly-L-Lysin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Ponceau S Solution	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Roti-Phenol	Roth, Karlsruhe
Roti-Phenol-Chloroform Lösung	Roth, Karlsruhe
Rotiszint 22 eco Szintillatoröl	Roth, Karlsruhe
SOC Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure [HCl]	Roth, Karlsruhe
Sodium Dodecylsulfat (SDS)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Stickstoff, flüssig [N ₂]	Messer, Griesheim
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Serva, Heidelberg
Tetrazyklin Hydrochlorid	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma Aldrich, Taufkirchen; Fluka, Seelze
Trypsin EDTA (10x) 0,5 %/ 0,2 % in DPBS	PAA, PAsching, Österreich
Trypton/Pepton aus Casein	Roth, Karlsruhe
Tunicamycin	Roth, Karlsruhe
Tween 20, Polyoxyethylen-sorbitanmonolaurat	Roth, Karlsruhe
X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D- Galaktosid)	Thermo Fischer, Waltham, USA
Xylen Cyanol FF	Sigma Aldrich, Steinheim

Zeozin InvivoGen, Toulouse, Frankreich

Feinchemikalien

Androstendiol-3-sulfat	Steraloids, Newport, RI, USA
BSP, Bromosulfophthalein	Sigma, Steinheim
Cholesterolsulfat	Sigma, Steinheim
Dehydroepiandrosteron, DHEA	Sigma, Steinheim
Dehydroepiandrosteron-3-sulfat, DHEAS	Sigma, Steinheim
Estradiol-3-sulfat, E ₂ S	Steraloids, Newport, RI, USA
Estron	Sigma, Steinheim
Estron-3-sulfat, E ₁ S	Sigma, Steinheim
Pregnenolon-3-sulfat	Sigma, Steinheim
Taurocholat	Sigma, Steinheim
Testosteron	Sigma, Steinheim

2.17 Radioaktiv-markierte Substanzen

Substanz	Spezifische Aktivität (Ci/mmol)	Konzentration (µM)	fmol/dpm
[³ H] BSP	10,2	1	0,04456
[³ H] DHEAS	70,5	1	0,00644
[³ H] Estron-3-sulfat	45,6	1	0,00997
[³ H] Taurocholat	30 / 10	1,5 / 1	0,01515 / 0,045455
[³ H] Tropsiumchlorid	46	0,1	0,00988

2.18 Geräte

7300 Real Time PCR System	Life Technologies, Darmstadt
Analysenwaage AE 260 Delta Range	Mettler-Toledo, Gießen
Analysenwaage C-30 Microbalance	Cahn Instruments, Cerritos, CA, USA
Analysenwaage Precisa 3000C-6000D	DAK-Oerlikon, Zürich
Autoklav Sanoclav	Wolf, Geislingen
Autoklav Systec 3150 EL	Systec, Wettenberg
Benchmark Microplate Reader	Bio-Rad, München
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Bürker Zählkammer	Roth, Karlsruhe

CO ₂ -Inkubator	New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA; Leybold, Köln
<ul style="list-style-type: none">• Modell CO-24• Modell CO27	
CO ₂ -Inkubator, NU-4750	NuAire, Plymouth, MN, USA
Divac 2.4L Vakuumpumpe	Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK
Elektrophoresis Power Supply EPS600	Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK
Elektrophorese-Kammern	Werkstatt MZI, Gießen
<ul style="list-style-type: none">• 14,5 x 6,5 cm• 35,5 x 11,0 cm	
Fireboy eco	Integra Biosciences, Fernwald
Flüssigkeitsszintillationszähler Wallac 1409	Pharmacia, Freiburg
Fluoreszenz-Mikroskop DM5500B TL (BF +PH) + Fluo	Leica, Wetzlar
<ul style="list-style-type: none">• Software LAS AF 6000 mit 3D Deconvolution• S/W Kamera DFC340FX• Filter A4 UV (Ex: BP 360/40x, BS: 400, Em: BP 470/40)• Filter L5 (Ex: BP 480/40, BS: 505, Em: BP 527/30)• Filter Y3 (Ex: BP 545/30, BS: 565, Em: 610/75)• Filter N2.1 (Ex: BP515-560, BS: 580, Em: LP 590)• Objektiv N PLAN 5x/0.12 -/A 14.0• Objektiv HCX PL FL 10x/0.30 PH1 -/D 11.0• Objektiv HC PLAN APO 20x/0.70 0.17/C 0.59• Objektiv HCX PL APO 40x/0.85 CORR, 0.11-0.23• Okular HC PLAN s 10x/25 Br. M	

G24 Environmental Incubator Shaker	New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA
Gelschlitten	Werkstatt MZI, Gießen
<ul style="list-style-type: none"> • 12 x 18 cm • 7,5 x 5 cm 	
GloMax-Multi+ Detection System	Promega, Madison, WI, USA
HI 221 Calibration Check Microprocessor pH Meter	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Hybridisierungssofen HB-1000 Hybridizer	UVP, Upland, CA, USA
Image Master	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK
Laminar Flow, Clean Air, Typ DLF-REL6	Heraeus, Hanau
Laminar Flow, DanLAF VFR 1806	Claus Damm, Fredensborg, DK
Laminar Flow, NU-437-500-E	Nuaire, Plymouth, MN, USA
Mikroinjektor Nanoliter 2000	World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA
Mikromanipulator	Bachofer, Reutlingen
Mikroskop Fluovert	Leica, Wetzlar
Mikroskop M3Z	Wild, Heerbrugg
PerfectBlue ´Semi-Dry´-Blotter Sedec M, 20 x 20 cm	PeqLab, Erlangen
PerfectBlue Doppelgelsystem Twin L, 20 x 20 cm	PeqLab, Erlangen
PerfectBlue Doppelgelsystem Twin S, 10 x 10 cm	PeqLab, Erlangen
Pipetten 0,5 -10 µL; 2-20 µL; 10-100 µL; 20-200 µL; 100-1000µl	Biohit über Sartorius, Rosbach
Pipetten 20, 50, 100 µL; Mehrkanalpipette 40 µL	Eppendorf, Hamburg
Pipetten 2, 10, 20, 200, 1000, 5000 µL; Mehrkanalpipette 200 µL	Gilson, Middleton, WI, USA
Spannungsgeber (0-200 mA, 1 kV, 150 W)	Werkstatt MZI, Gießen
Taumler Heidolph Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
Thermocycler Primus 96 advanced gradient	PeqLab
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg

UV-Transilluminator	Bachofer, Reutlingen
Vakuumpumpe N86KN.18	KNF Neuberger GmbH, Freiburg
Vortex VF 2	Janke und Kunkel, Staufen
Wärmeplatte	LFB, Bromma, Schweden
Wärmeplatte	Werkstatt MZI, Gießen
Wärmeschrank	Melag, Berlin
Wasserbad WB7	Memmert, Schwalbach
Wasserbad SW 21	Julabo, Seelbach
Wasserbad GFL 1083	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Wasserbad TFB 45	Medite Medizintechnik, Burgdorf
Zentrifuge: Kühlzentrifuge 5471R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau
Zentrifuge: Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge: Tischzentrifuge 5415	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge: Vakuumzentrifuge Speed Vac SC 110	Salvant, Farmingdale, NY, USA
Zentrifuge: Centrifuge/Vortex Combispin FVL- 2400	PeqLab, Erlangen

2.19 Verbrauchsmaterialien

2.19.1 Zellkultur

CryoPure Gefäß, 2,0 mL mit Innengewinde & Silikonring	Sarstedt, Nümbrecht
Kulturschalen, 12,5 cm ²	BD Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Kulturschalen	Sarstedt, Nümbrecht
<ul style="list-style-type: none"> • 25 cm² • 75 cm² • 175 cm² 	
Kulturschalen, Ø 100 mm	Sarstedt, Nümbrecht
6-well Platten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
12-well Platten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
24-well Platten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
48-well Platten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pasteurpipetten, Glas	MAGV, Rabenau

Serologische Pipetten, Polystyrol (5 mL; 10 mL; 25 mL)	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter Filtropur S 0,2	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber, 25 cm Länge	Sarstedt, Nümbrecht

2.19.2 Proteinnachweis

Amersham Hybond ECL Nitrocellulose Membrane, 0,45 µm	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Deckgläschen, Ø 12 mm	Roth, Karlsruhe
Einmalkanülen Sterican	Braun, Melsungen
Einmalspritzen, 1 mL	Braun, Melsungen
FIA Platte, schwarz 96 K, F-Form, mittlere Bindung	Greiner Bio One, Frickenhausen
Mikrotestplatte 96 well, durchsichtig	Nunc, Wiesbaden; Sarstedt, Nümbrecht
Objektträger	Roth, Karlsruhe
Rotilabo-Blottingpapiere, Dicke 35 mm, 20 x 20 cm	Roth, Karlsruhe
Special autoklavable bags	Nerbe plus, Winsen/Luhe

2.19.3 Molekularbiologie

MicroAmp Optical 96 well Reaction Plate	Life Technologies, Darmstadt
Parafilm	Roth, Karlsruhe
Petrischalen	Nerbe plus, Winsen/Luhe
PCR-Tubes, 0,2 mL	Nerbe plus, Winsen/Luhe
Reaktionsgefäße (1,5 mL; 2 mL; 15 mL; 50 mL)	Sarstedt, Nümbrecht
RNaseZAP Wipes	Life Technologies, Darmstadt
Rundbodenröhrchen, 14 mL	BD Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Schraubdeckelgefäße (8 mL, 15 mL)	Sarstedt, Nümbrecht
UVetten	Eppendorf, Hamburg

2.19.4 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Latexhandschuhe	Roth, Karlsruhe
Nitrilhandschuhe	Roth, Karlsruhe

Pasteurpipetten, Plastik	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (10 µL, 200 µL, 1000 µL, 5000 µL)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (10 µL, 20 mL, 200 µL, 1000 µL)	Nerbe plus, Winsen/Luhe
PonyVial (H/I) (Minivial)	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Schraubdeckelgefäße (8 mL, 15 mL, 25 mL)	Sarstedt, Nümbrecht

2.20 Bioinformatische Programme und Datenbanken

BLAST, NCBI

- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Vergleich von Sequenzen gegen Datenbanken

Boxshade 3.21

- http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html
- Visualisierung von Sequenzalignments

ClustalW

- <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>
- Sequenzalignments

DNASar Version 8.0.2, Lasergene, Madison, USA

- EditSeq → Bearbeiten von Sequenzen
- MegAlign → Vergleichen und Alignen von Sequenzen

EMBL-EBI, European Bioinformatics Institute

- <http://www.ebi.ac.uk/>
- Datenbankportal Europa

Ensembl, EBI

- <http://www.ensembl.org/index.html>
- Gen Browser

FinchTV (Gospiza)

- <http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml>
- Auswertung von Sequenzspuren

HUGO Gene Nomenclature Committee

- <http://www.genenames.org/>
- Nomenklatur humaner Gene

NCBI

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Datenbankportal des National Center for Biotechnology Information, USA
- Literaturrecherche, Sequenzsuche, SNP-Suche

Oligo 4.0

- Primerauswahl

SLC Tables

- <http://www.bioparadigms.org/slc/intro.htm>
- Übersicht über alle Mitglieder der SLC10-Familie

TreeView 1.6.6

- <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>
- Darstellung von Verwandtschaftsdiagrammen

3 Methoden

3.1 Allgemeine Methoden in der Molekularbiologie

3.1.1 DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der DNA- bzw. RNA-Konzentration erfolgte mittels Absorptionsmessung im UV-Bereich im Photometer. Hierzu wurde die zu messende Lösung mit ddH₂O verdünnt, in eine Küvette aus Quarz pipettiert und im Photometer (Eppendorf) bei 260 nm (OD₂₆₀) ihre optische Dichte bestimmt. Als Leerwert (Blank) diente der Lösungspuffer der DNA bzw. RNA, der im gleichen Verhältnis wie die zu messenden Proben verdünnt wurde.

Die Berechnung der Konzentration erfolgte mit Hilfe der nachfolgenden Formel:

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \text{OD}_{260} \times E \times \text{Verdünnungsfaktor} / 1000 \mu\text{L}$$

E = Extinktionskoeffizient

E_{DNA} = 50 μg

E_{RNA} = 40 μg

Da auch die OD₂₈₀ bestimmt wurde, konnte zusätzlich eine Aussage zur Reinheit der DNA bzw. RNA gemacht werden. Der Quotient aus OD₂₆₀/OD₂₈₀ sollte für DNA-Proben zwischen 1,7 und 2,0 und bei RNA-Proben über 1,8 liegen.

3.1.2 Native Agarose-Gelelektrophorese

Die native Agarose-Gelelektrophorese diente dazu, DNA-Fragmente aufzutrennen und zu charakterisieren. Hierzu wurden standardmäßig 1 %-ige Agarosegele für die Darstellung von DNA-Fragmenten mit einer Größe von 500-10000 bp verwendet. Bei Fragmenten \leq 500 bp wurde der Agaroseanteil auf 1,5 - 2 % erhöht.

Zur Herstellung der Agarosegele wurden 1 - 2 g Agarose mit 100 mL 1 x TAE-Puffer in der Mikrowelle durch Aufkochen gelöst und nach Abkühlen auf ca. 60° C in die Gelkammern gegossen. Die ausgehärteten Gele wurden in die mit 1 x TAE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammern überführt. Die DNA-Proben wurden mit 6 x Ladepuffer vermischt und in die Geltaschen pipettiert. Zur Bestimmung der Fragmentgröße wurde der Längenstandard *GeneRuler DNA Ladder Mix* (MBI Fermentas) verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 5-10 V/cm. Nachdem die Bromphenolblaufront ca. 2/3 des Gels durchlaufen hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt und die Gele für mindestens 20 min in einer Ethidiumbromidlösung gefärbt. Nach anschließender Wässerung für 10 min wurden die Gele mit dem *Image Master* unter UV-Licht (Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) fotografiert. Alternativ zur

Ethidiumbromidlösung wurden einzelne Gele mit *GelRED-Färbelösung* (Biotium) gefärbt und ohne abschließende Wässerung fotografiert.

3.1.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem *Hi Yield Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit* (Süd-Laborbedarf GmbH). Bei diesem Kit wird zunächst das Agarosegel mit Hilfe einer chaotropen Salzlösung im Wasserbad aufgelöst. Anschließend wird die DNA an eine Glasfibersäule gebunden und durch Waschpuffer auf Ethanolbasis von Kontaminanten befreit, bevor die gereinigte DNA mittels eines Niedrig-Salz-Puffers eluiert wird.

Das mit Ethidiumbromidlösung gefärbte Gel wurde auf den UV-Transilluminator gelegt und die DNA-Fragmente mit UV-Licht sichtbar gemacht. Die Bande des gewünschten Fragments wurde mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in ein vorgewogenes 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von 500 µL DF-Puffer/300 mg Agarosegel wurde das Gefäß gevortext und für 15 min im Wasserbad bei 55° C inkubiert, wobei das Gefäß alle 3 min invertiert wurde. Nach Dissoziation des Agarosegels wurde das Gemisch auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurden 800 µL des Gemisches auf die DF-Säule des Kits gegeben und durch Zentrifugation (30 s bei 17.000 g) in ein Sammelröhrchen überführt. Dieser Schritt diente dazu, die DNA an die Glasfibersäule zu binden. Der Durchfluss wurde verworfen und der Schritt gegebenenfalls wiederholt, falls die Dissoziation des Gels mehr als 800 µL der aufzureinigenden Probe hervorgebracht hatte. Im Anschluss wurden 400 µL W1-Puffer auf die Säule pipettiert und durch Zentrifugation (30 s bei 17.000 g) die an der Säule gebundene DNA gewaschen. Nach Verwerfen des Durchflusses wurde die DNA mit 600 µL W1-Puffer erneut gewaschen. Nach Einwirkung des Puffers für 1 min erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 17.000 g für 30 s. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule durch eine 3-minütige Zentrifugation bei 17.000 g getrocknet. Anschließend wurde die Säule in ein neues 1,5 mL Eppendorfgefäß gesetzt und 40 µL Elutionspuffer in die Mitte der Säule gegeben. Nach 2 min wurde die Säule für 2 min bei 17.000 g zentrifugiert und somit die DNA in das Gefäß eluiert. Im Anschluss wurde die DNA mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

3.1.4 Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA

Die Spaltung der doppelsträngigen DNA erfolgte mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen nach den Temperatur- und Pufferangaben der Enzymhersteller.

Für den Restriktionsverdau von 1 µg Plasmid-DNA wurden 2,5 µL des entsprechenden Enzympuffers und 0,5 µL Enzym (10 U/µl) eingesetzt. Das Gemisch wurde mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 25 µL aufgefüllt und bei 37° C eine Stunde lang im Wasserbad inkubiert.

Danach erfolgte die Überprüfung der geschnittenen DNA mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese.

Für die restriktionsenzymatische Spaltung größerer Mengen DNA wurden die Volumina des Enzyms und des Puffers entsprechend angepasst.

3.1.5 Aufreinigung von Plasmid-DNA im Mini-Maßstab

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA im Mini-Maßstab wurde mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen) durchgeführt. Hierbei werden die generierten Bakterienkolonien zuerst lysiert und dann der Bakterien-Detritus von dem Lysat mittels Zentrifugation getrennt. Anschließend wird die Plasmid-DNA an eine Anionen-Exchange-Säule durch niedrige Salzkonzentrationen und optimierte pH-Bedingungen gebunden. Kontaminanten wie RNA, Proteine und Metaboliten werden durch mehrere Waschschrte mit Puffern, die eine mittlere Salzkonzentration aufweisen, entfernt. Zum Schluss wird die Plasmid-DNA eluiert, wobei ein Puffer mit hoher Salzkonzentration verwendet wird.

Für die DNA-Präparation wurden zunächst 4 mL LB-Medium und 4 µL Ampicillin in ein Reagenzglas vorgelegt und mit einer Bakterienkolonie angeimpft. Anschließend wurde die Kultur 16 Stunden bei 37° C und 220 rpm inkubiert.

Zum Anlegen einer haltbaren Glycerinkultur wurden 850 µL der über Nacht gewachsenen Bakteriensuspension mit 150 µL Glycerin vermischt, in flüssigem N₂ eingefroren und bei - 80° C gelagert.

2 mL der Bakteriensuspension wurden für die Aufreinigung der Plasmid-DNA verwendet. Hierzu wurde die Bakterienkultur zunächst 3 min lang bei 16.100 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das entstandene Bakterienpellet wurde mit Puffer *P1* vollständig resuspendiert. Im Anschluss erfolgte die zügige Zugabe von Puffer *P2*, an die sich ein 6-maliges Invertieren des Reaktionsgefäßes zum Durchmischen anschloss. Nach Hinzufügen des Puffers *N3* wurde das Reaktionsgefäß erneut 6 x geschwenkt und das Präzipitat anschließend bei 16.100 g 10 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde vom pelletierten Präzipitat getrennt und auf die *Qiaprep Säulen* überführt. Durch erneute Zentrifugation bei 16.100 g und 60 s wurde der Überstand durch die Silicamembran zentrifugiert und die Plasmid-DNA an die Membran gebunden. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 500 µL *PB* und 750 µL *PE* Puffer gewaschen, wobei nach jeder Zugabe die Säule für 60 s bei 16.100 g zentrifugiert und der Durchfluss jeweils verworfen wurde. Die Säule wurde im Anschluss durch eine Zentrifugation bei 16.100 g für 60 s getrocknet. Die Elution der an die Säule gebundenen Plasmid-DNA erfolgte durch die Zugabe von 50 µL *EB* Puffer (10 mM TrisHCl, pH 8,5) und einen letzten Zentrifugationsschritt (16.100 g, 60 s), bei der die Plasmid-DNA in ein neues

Reaktionsgefäß überführt wurde. Die DNA wurde im Anschluss entweder bei - 20° C gelagert oder unverzüglich weiterverwendet.

3.1.6 Aufreinigung von Plasmid-DNA im Midi-Maßstab

Zuerst wurde eine Vorkultur angelegt, indem eine Bakterienkolonie in 4 mL LB-Ampicillin-Medium angeimpft wurde und 16 h bei 37° C und 220 rpm inkubiert wurde. Die Vorkultursuspension wurde dann in 200 mL LB-Ampicillin-Medium überführt und erneut 16 h bei 37° C und 220 rpm inkubiert. Für die anschließende Aufreinigung der Plasmid-DNA wurde die Bakteriensuspension auf vier 50 mL Reaktionsgefäße aufgeteilt und durch Zentrifugation bei 4.300 g und 4°C pelletiert. Die Plasmid-DNA-Aufreinigung erfolgte entweder mit dem *NucleoBond Xtra Midi EF Kit* (Macherey-Nagel) (optimiertes Protokoll) oder mit dem *QIAGEN Plasmid Plus Midi Kit* (Qiagen).

Bei der Aufreinigung mit dem *NucleoBond Xtra Midi EF Kit* wurde das Bakterienpellet zuerst mit 8 mL *RES-EF* Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 8 mL *LYS-EF* Puffer hinzugefügt und das Reaktionsgefäß zur Durchmischung 5 x invertiert. Es erfolgte die zügige Zugabe von 8 mL *NEU-EF* Puffer zur Neutralisation des Lysats und eine Inkubation auf Eis für 5 min. Anschließend wurde das Zelllysat 25 min lang bei 4.300 g und 4° C zentrifugiert. Währenddessen wurde die Equilibrierung der *NucleoBond Xtra Säule* (Kapazität 250 µg DNA) mit integriertem *NucleoBond Xtra Filter* mit 15 mL *EQU-EF* durchgeführt. Nach dem Zentrifugieren wurde das Zelllysat auf die Säule geladen. Es folgte der erste Waschschrift mit 5 mL *FIL-E* Puffer. Im Anschluss wurde der *NucleoBond Xtra Filter* entfernt und die Säule mit 35 mL *ENDO-EF* Puffer und 15 mL *WASH-EF* Puffer erneut gewaschen. Danach erfolgte die Elution der säulengebundenen Plasmid-DNA mit 5 mL *ELU-EF* Puffer in ein neues Reaktionsgefäß. Die eluierte Plasmid-DNA wurde anschließend konzentriert und entsalzt. Hierfür wurden zum Eluat 4 mL Isopropanol gegeben. Nach anschließendem Invertieren wurde das Eluat 5 min auf Eis inkubiert und danach 90 min bei 4.300 g und 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde sofort dekantiert und das DNA-Pellet mit 2 mL 70 %-igem Ethanol durch Zentrifugieren (30 min, 4.300 g, 4° C) gewaschen. Der Überstand wurde zügig entfernt und die verbliebenen Ethanoltröpfchen mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgesaugt. Anschließend wurde das DNA-Pellet mit 100 - 200 µL *H₂O-EF* gelöst und die Konzentration der aufgereinigten DNA photometrisch bestimmt.

Bei Verwendung des *QIAGEN Plasmid Plus Midi Kit* (Qiagen) wurde das Bakterienpellet mit 4 mL *P1* Puffer versetzt und durch Vortexen resuspendiert. Darauf folgte die Zugabe von 4 mL *P2* Puffer und das 6-malige Invertieren des Reaktionsgefäßes. Nach einer Inkubation des Präzipitats (3 min) bei Raumtemperatur, wurden 4 mL *S3* Puffer hinzugefügt, das Reaktionsgefäß 6 x geschwenkt und im Anschluss 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wurde das Bakterienlysat mittels Stopfen durch den Filter in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 2 mL *BB* Puffer mit dem Lysat vermischt und das Gemisch anschließend auf den Extender gegeben. Mit Hilfe der Vakuumpumpe wurde das Lysat durch den Filter in der Säule gesaugt und die DNA an die Säule gebunden. Es folgten zwei Waschschriffe mit 0,7 mL *ETR* Puffer und 0,7 mL *PE* Puffer, die jeweils mittels Vakuumpumpe über die Säule abgesaugt wurden. Anschließend wurde die Säule durch Zentrifugation bei 16.100 g getrocknet. Die Plasmid-DNA konnte dann durch Zugabe von 200 µL *EB* Puffer in ein neues Reaktionsgefäß eluiert werden. Auch hier wurde anschließend die Konzentration der DNA im Photometer bestimmt.

3.2 Methoden zur Isolierung und Aufarbeitung von RNA

In dieser Arbeit wurde RNA aus stabil transfizierten Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und in qualitativen und quantitativen PCR-Analysen eingesetzt. Dies diente dazu, die stabile Integration und Transkription des Zielgens in den Zellen zu untersuchen.

Bei der Arbeit mit RNA ist zu beachten, dass die RNA überaus empfindlich gegenüber den ubiquitär vorhandenen und sehr stabilen RNasen ist. RNasen führen zur Degradation der RNA und somit zu einem Qualitätsverlust. Daher wurden alle hitzestabilen Materialien, die mit der RNA in Kontakt kamen, hitzesterilisiert und die Arbeitsfläche, sowie die Pipetten und Racks vor Beginn der Arbeit mit *RNaseZap Wipes* (Ambion über Life Technologies) oder *RNase AWAY Reagent* (Ambion über Life Technologies) gründlich gereinigt. Die RNA-Extraktion wurde, soweit es möglich war, bei 4° C (Zentrifugation) oder auf Eis durchgeführt, da RNasen eine verringerte Aktivität bei 4° C aufweisen.

3.2.1 Total-RNA Isolierung aus Zellen

Zur Isolierung von Total-RNA aus stabil transfizierten Zellen, wurden diese in 6 well-Platten kultiviert und die Genexpression, falls möglich, mittels Tetrazyklinzugabe induziert. Nach 72 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und dann abtrypsiniert (siehe Methoden der Zellkultur). Im Anschluss wurde die Zellzahl ermittelt und 5×10^6 Zellen in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 1 mL *TriReagent* (Sigma) und mehrmaliges Auf- und Abpipettieren, bis eine homogene Suspension vorlag. Diese wurde 10 min bei 15.000 g und 4° C zentrifugiert und der Überstand in ein neues 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Nach einer 5-minütigen Inkubation wurden 0,2 mL Chloroform hinzugegeben und das Gemisch 15 s durch kräftiges Schütteln gemischt. Es schloss sich eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur an. Durch die anschließende 15-minütige Zentrifugation bei 15.000 g und 4° C bildeten sich drei Phasen: eine rote organische Phase, in der sich die

Proteine befanden, eine Interphase, die die DNA enthielt und eine obere, wässrige Phase mit der RNA. Die wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt, mit 0,5 mL Isopropanol gemischt und für 5 - 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde das Gemisch 8 min bei 15.000 g und 4° C zentrifugiert, um die RNA am Boden des Reaktionsgefäßes in Form eines Pellets zu präzipitieren. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet mit 1 mL 75 %-igem Ethanol durch Zentrifugation bei 12.000 g, für 5 min bei 4°C gewaschen. Nach Entfernen des Ethanols trocknete das RNA-Pellet an der Luft und wurde im Anschluss durch Zugabe von DEPC behandeltem ddH₂O im Wasserbad bei 55° C gelöst. Zum Schluss wurde die Reinheit und Konzentration der RNA im Photometer bestimmt.

3.2.2 cDNA-Synthese aus Total-RNA

Die cDNA-Synthese aus Total-RNA erfolgte entweder mit dem *First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas) oder mit dem *SuperScript III First Strand Synthesis System* (Invitrogen über Life Technologies). Hierzu wurden zunächst RNA-Aliquots portioniert, die einen Gehalt von 1 µg RNA aufwiesen.

Bei Verwendung des *First Strand cDNA Synthesis Kits* von Fermentas wurde zuerst ein DNase-Verdau durchgeführt, um DNA-Kontaminationen zu entfernen. Hierzu wurde 1 µg RNA mit 1 µL 10 x Reaktionspuffer mit MgCl₂ und 1 µL DNase I vermischt und anschließend mit ddH₂O auf 10 µL Gesamtvolumen aufgefüllt. Das Reaktionsgemisch wurde für 30 min im Wasserbad bei 37° C inkubiert, bevor 1 µL EDTA (25 mM) hinzugegeben wurde und eine erneute Inkubation im Wasserbad erfolgte. Diese wurde für 10 min bei 65° C durchgeführt. Die Zugabe von EDTA, einem Komplexbildner verhindert, dass die RNA bei der Erhitzung auf 65° C mit zweiwertigen Kationen hydrolysiert, was bei hohen Temperaturen stattfinden kann und durch die Hydroxygruppe an der 2'-Position des Riboserings der RNA ermöglicht wird. Im Anschluss an den DNase-Verdau wurde die PCR-Reaktion angesetzt. Hierzu wurde die zuvor mit DNase verdaute RNA mit 1 µL *Random Hexamer Primern* versetzt und mit ddH₂O auf 11 µL Gesamtvolumen aufgefüllt. Random Hexamer Primer ermöglichen die cDNA-Synthese aus der insgesamt in der Probe vorhandenen RNA (rRNA und mRNA). Dies führt zu einer erhöhten Differenziertheit der generierten cDNA, allerdings kann dies die Spezifität und Sensitivität nachfolgender PCR-Reaktionen senken. Dies kann aber durch die Auswahl Gen-spezifischer Primer für die sich anschließenden PCR-Reaktionen ausgeglichen werden. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei 65° C im Wasserbad wurden 4 µL 5 x Reaktionspuffer, 1 µL *RiboLock RNase Inhibitor* (1 U), 2 µL 10 mM dNTP-Mix und 2 µL *M-MuLV-Reverse Transkriptase* (1 U) hinzugefügt und zuerst 5 min bei 25° C, dann 60 min bei 37° C und anschließend 5 Min bei 70° C inkubiert. Die cDNA wurde danach auf Eis aliquotiert und im Anschluss bei - 20° C gelagert. Die *M-MuLV-Reverse Transkriptase* (Moloney Murine

Leukemia Virus Reverse Transkriptase) ist eine DNA-Polymerase, die die RNA als Matrize benutzen kann und in der Lage ist, einen komplementären DNA-Strang zu der Matrize zu synthetisieren. Sie arbeitet bei 37° C und wird bei Temperaturen über 65° C deaktiviert.

Bei Verwendung des *SuperScript III First Strand Synthesis Systems* von Invitrogen wurde ebenfalls 1 µg RNA eingesetzt. Die RNA wurde mit 1 µL *Random Hexamer Primern* und 1 µL dNTP Mix vermischt und mit ddH₂O auf 13 µL Gesamtvolumen aufgefüllt. Es folgte eine Inkubation für 5 min bei 65° C im Wasserbad. Anschließend wurden die Proben auf Eis abgekühlt und mit 4 µL *5 x FS Puffer*, 1 µL 0,1 M DTT, 1 µL *RNase OUT* und 1 µL *SuperScript III Reverse Transkriptase* versetzt. Der Ansatz wurde zunächst 5 min bei 25° C inkubiert, bevor eine Inkubation bei 50° C für 60 min folgte. Die cDNA-Synthese wurde dann gestoppt, indem das Reaktionsgemisch 15 min lang auf 70° C erhitzt wurde. Im Anschluss wurde die cDNA in Aliquots von 2 µL portioniert und bei - 20° C gelagert. Die Verwendung der *SuperScript III Reverse Transkriptase* führt zu einer höheren Ausbeute bei der cDNA-Synthese, da sie zum einen hitzestabiler als andere Reverse Transkriptasen ist und zusätzlich eine deutlich geringere RNase H-Aktivität aufweist.

3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) wird verwendet, um spezifisch ausgewählte DNA-Abschnitte zu vervielfältigen. Diese Amplifikation wird durch das Enzym DNA-Polymerase katalysiert. Die DNA-Polymerase bindet an einen DNA-Einzelstrang (die sogenannte Matrize) und synthetisiert von den genspezifischen Primern ausgehend mit Hilfe von Einzelnukleotiden einen dazu komplementären Strang. Durch die zyklische Wiederholung von Denaturierung, Primeranlagerung und Primerelongation wird der von den Primern flankierte DNA-Abschnitt vervielfältigt. Dabei dienen die entstandenen PCR-Produkte als neue Matrizen für den nachfolgenden Zyklus, so dass die DNA-Vervielfältigung exponentiell verläuft.

Die PCR wurde in dieser Arbeit zum Nachweis spezifischer DNA-Abschnitte im Rahmen von Expressionsprofilen, Klonierungskontrollen und der Genotypisierung der *Slc10a6*-Knockout-Maus, zur Klonierung von Nukleinsäuren und zum Einfügen von Mutationen verwendet. Die einzelnen Techniken werden im Folgenden erklärt.

3.3.1 Allgemeine Regeln zur Primerauswahl

Die Auswahl der Primersequenzen erfolgte mit Hilfe des Programms *Oligo 4.0*. Hierbei wurde versucht, folgende Rahmenbedingungen einzuhalten, sofern dies möglich war:

- Die Primer trugen an ihrem 3'-Ende ein AC, AG, TC oder TG.
- Der (G/C)-Gehalt der Primer lag bei > 40 %.
- Um die Bildungen von Dimeren zu verhindern, wurden die Primer so ausgewählt, dass ihre 3'-Enden nicht untereinander und nicht mit sich selbst komplementär waren.
- ΔG für eine Loopbildung wurde so gewählt, dass es Werte > 0 annahm, um Sekundärstrukturen der Primer zu verhindern.
- Die Schmelztemperatur der Primer wurde mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$T_m = 69,3 + 41 \times (\text{Anzahl G} + \text{Anzahl C})/\text{Primerlänge} - 650/\text{Primerlänge}$$

Die Synthese der Primer wurde von den Firmen Eurofins MWG Operon und Metabion durchgeführt.

3.3.2 Besonderheiten bei der Auswahl von Klonierungsprimern

Als Grundlage für die Auswahl der Klonierungsprimer diente die mRNA der zu klonierenden Transportproteine. Damit das resultierende PCR-Produkt den gesamten Leserahmen des Zielgens umfasste, wurde der Vorwärtsprimer so ausgewählt, dass er immer das Startcodon enthielt. Das Stoppcodon hingegen war nicht in jedem Rückwärtsprimer implementiert, da die Klonierung in verschiedene Vektoren erfolgen sollte. Für die Klonierung in die Vektoren *pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO* und *pcDNA6.2/C-Em-GFP-TOPO* wurde der jeweilige Rückwärtsprimer so konstruiert, dass er mit der letzten Base vor dem Stoppcodon endete. Somit wurde sichergestellt, dass zum einen der vollständige Leserahmen des Zielgens im PCR-Produkt enthalten war und zum anderen das Fehlen des Stoppcodons das Ablesen des jeweiligen Tags (His-Tag, GFP-Tag) bzw. der V5-Sequenz bei der Transkription ermöglichte. Die Sequenzspezifität der Primer wurde mittels *BLAST*-Analyse überprüft, um das Risiko unspezifischer PCR-Produkte zu vermeiden.

3.3.3 PCR-Reaktionsansatz

Die Wahl der Polymerase erfolgte in Abhängigkeit von der PCR-Anwendung. Da für die Transfektion des Zielgens in Säugerzellen und der sich anschließenden Proteinexpression möglichst fehlerfreie Sequenzen erforderlich sind, benötigt man für die Generierung von PCR-Produkten, die in Klonierungsexperimenten eingesetzt werden sollen, Polymerasen mit einer hohen Lesegenauigkeit. Aus diesem Grund wurden bei den mit Klonierungsexperimenten verbundenen PCR-Reaktionen die *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Scientific)

verwendet. Bei der Kolonie-PCR, die dazu diente, die Integration und Orientierung des Zielgens im Vektor zu überprüfen, wurde der *Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix* (Thermo Scientific) verwendet. Diese Polymerase arbeitet extrem schnell und weist eine hohe Lesegenauigkeit auf. Somit kann, ohne Einbußen in der Korrektheit der Sequenz des Amplifikats, die Dauer des PCR-Experimentes im Gegensatz zu PCR-Reaktionen mit anderen Polymerasen deutlich verkürzt werden. Für TA-Klonierungen wurde ein A-Überhang am 3'-Ende des PCR-Produktes benötigt. Dieser ist durch die Verwendung der *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* aufgrund ihrer 3'→5'-Exonuklease-Aktivität nicht gegeben, so dass an die zu klonierenden PCR-Produkte vor der Ligation in den Vektor mit Hilfe der *DyNAzyme II DNA Polymerase* (Thermo Scientific) ein 3'-A-Überhang synthetisiert wurde. Diese Polymerase weist im Gegensatz zur *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* keine 3'→5'-Exonuklease-Aktivität auf, so dass der benötigte 3'-A-Überhang generiert wurde. Für jede Polymerase wurde ein speziell optimiertes Puffersystem verwendet, das sich wie folgt zusammensetzte:

	Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix	DyNAzyme II DNA Polymerase
Enzymbezogener Puffer	10 µL	Im Mastermix enthalten	5 µL
MgCl₂ (25 mM)	Im Puffer enthalten	-	-
dNTP-Mix (je 10 mM)	1 µL	Im Mastermix enthalten	-
dATP-Mix (10 mM)	-	-	1 µL
Vorwärts-Primer (10 pmol/µl)	1 µL	1 µL (0,5 µM)	-
Rückwärts-Primer (10 pmol/µl)	1 µL	1 µL (0,5 µM)	-
DNA (cDNA, Plasmid-DNA)	2 µL - 5 µL	eine gepickte Bakterienkolonie	0,15 -1,5 pmol
ddH₂O	Ad 50 µL	Ad 20 µL	Ad 50 µL
Enzym	0,5 µL	10 µL	0,5 µL

Bei größeren Versuchsansätzen wurde aus den oben genannten Komponenten ein Master Mix angefertigt, der zu jeder DNA-Probe in der entsprechenden Menge gegeben wurde. Je nach PCR-Applikation wurde die Menge der verwendeten DNA variiert. Für die Amplifikation von cDNA und Plasmid-DNA wurden 2-5 µL verwendet. Bei der Kolonie-PCR wurde eine Bakterienkolonie von dem Nährmedium gepickt und in das PCR-Reaktionsgefäß überführt. Für die Generierung der 3'-A-Überhänge wurden 0,15 bis 1,5 pmol des PCR-Produktes eingesetzt. Die Berechnung der Menge in µg erfolgte folgendermaßen:

$$1 \text{ pmol (dsDNA-Molekül)} \times N_{\text{bp}} \times 660 \text{ Da} / 2 \times 10^6 = \mu\text{g (dsDNA)}$$

mit N_{bp} = Anzahl der Basenpaare des PCR-Produktes

Für die PCR-Reaktion wurden die Reagenzien mit dem jeweiligen Template gemischt und im *Thermocycler Primus 96 advanced gradient* (Peqlab) inkubiert. Die generierten PCR-Produkte wurden bei + 4° C gelagert oder für die längerfristige Aufbewahrung bei - 20° C eingefroren. Für die Generierung von A-Überhängen am 3'-Ende der PCR-Produkte erfolgte die Inkubation entweder im zuvor genannten Thermocycler oder im Wasserbad bei 72° C für 20 min.

3.3.4 Touchdown-PCR

Die Touchdown-PCR wurde sowohl für die Klonierungsexperimente, wie auch für den Nachweis spezifischer DNA-Abschnitte zur Klonierungs- und Transfektionskontrolle eingesetzt. Ihr Vorteil besteht darin, dass zum einen durch hohe Anlagerungstemperaturen in den ersten Zyklen eine hohe Spezifität ermöglicht wird, und zum anderen die nachfolgenden niedrigeren Anlagerungstemperaturen zu einer hohen Ausbeute der Reaktion führen.

Es diente folgendes Protokoll als Grundlage:

Phusion High-Fidelity DNA Polymerase

Denaturierung	98 ° C	30 s
Denaturierung	98° C	10 s
Primer-Anlagerung	(T _m + 5°C)- 0,5° C pro Zyklus	30 s
Elongation	72° C	1 min/1 kb
Denaturierung	98° C	10 s
Primer-Anlagerung	T _m -Wert	30 s
Elongation	72° C	1 min/1 kb
Finale Elongation	72° C	10 min
Kühlung	4° C	∞

Die Anlagerungstemperatur der Primer wurde abhängig von der Anzahl der Nukleinsäuren der jeweiligen Primer kalkuliert. Für die ersten 10 Zyklen wurde der niedrigere der beiden T_m-Werte gewählt und um 5° C erhöht. Die so gebildete Ausgangstemperatur wurde pro Zyklus um 0,5° C gesenkt. Für die nachfolgenden 35 Zyklen wurde die Temperatur wie folgt kalkuliert:

- Primerlänge ≤ 20 Nukleinsäuren → T_m-Wert des Primers mit dem niedrigeren T_m-Wert
- Primerlänge > 20 Nukleinsäuren → T_m-Wert + 3° C des Primers mit dem niedrigeren T_m-Wert

3.3.5 Kolonie-PCR

Mittels der Kolonie-PCR konnte schnell ermittelt werden, welche Plasmide das Zielgen aufgenommen hatten. Zusätzlich ermöglichte diese PCR die Überprüfung der Orientierung des interessierenden Gens (*gene of interest*, GOI) im Plasmid. Dadurch konnte gezielt eine DNA-Aufreinigung der Plasmide durchgeführt werden, die das GOI in der Vorwärtsorientierung enthielten. Dies sparte Kosten und Arbeitszeit.

Für die Kolonie-PCR wurde folgendes Protokoll verwendet:

Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix

Denaturierung	98 ° C	5 min
Denaturierung	98° C	1 s
Primer-Anlagerung	$T_m + 3^{\circ}\text{C}$	5 s
Elongation	72° C	15 s/1 kbp
Elongation	72° C	10 min
Kühlung	4° C	∞

Es wurden 30 Zyklen durchgeführt, denen sich die finale Elongation anschloss.

Die Anlagerungstemperatur wurde folgendermaßen berechnet:

- Primerlänge ≤ 20 Nukleinsäuren $\rightarrow T_m$ -Wert des Primers mit dem niedrigeren T_m -Wert
- Primerlänge > 20 Nukleinsäuren $\rightarrow T_m$ -Wert + 3° C des Primers mit dem niedrigeren T_m -Wert.

3.3.6 PCR zur Generierungen von 3'-A-Überhängen

Da für die Klonierung die TOPO-Methode verwendet wurde, war ein A-Überhang am 3'-Ende des PCR-Produktes erforderlich. Aufgrund der 3' \rightarrow 5'-Exonuklease-Aktivität der für die PCR verwendeten *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* wurden allerdings PCR-Produkte ohne A-Überhang am 3'-Ende synthetisiert. Aus diesem Grund wurden daher die PCR-Produkte vor der Klonierung mit den entsprechenden Reagenzien (siehe Kapitel 3.3.3) gemischt und für 20 min bei 72° im Wasserbad oder im *Thermocycler Primus 96 advanced gradient* (Peqlab) inkubiert.

3.3.7 Zielgerichtete Mutagenese

Das *QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies) wurde für das Einfügen von Mutationen verwendet. Mit dieser Methode wurden zum einen die Mutanten generiert, die einen Einzelnukleotidpolymorphismus (*single nucleotide polymorphism*, SNP) enthielten, zum anderen wurde die Methode angewandt, um ein Stoppcodon in die V5-His-getaggtten Plasmide der OATPs und des OSCP1 einzufügen. Im *QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit* wird die *PfuTurbo DNA Polymerase* verwendet, die in der Lage ist, Plasmid-DNA-Stränge mit einer

sehr hohen Lesegenauigkeit zu replizieren, ohne dabei die angelagerten Mutageneseprimer vom Template zu entfernen. Die Mutageneseprimer wurden unter Berücksichtigung folgender Aspekte synthetisiert:

- Vorwärts- und Rückwärtsprimer hatten die gleiche, zueinander komplementäre Basensequenz und enthielten beide die gewünschte Mutation.
- Die Mutation befand sich in der Mitte der jeweiligen Primersequenz und war zu beiden Seiten von 10 bis 15 Basen der korrekten Sequenz flankiert.
- Die Mutageneseprimer bestanden aus 25 bis 45 Basen.
- Die Primer sollten idealerweise einen GC-Gehalt von mindestens 40 % aufweisen und mit einem oder mehreren G(s) oder C(s) aufhören.
- Die Schmelztemperatur betrug in der Regel $\geq 78^\circ\text{C}$ und wurde nach folgender Formel berechnet:

$$T_m = 81,5 + 0,41 (\% \text{ GC}) - (675/N) - \% \text{ Nichtübereinstimmung}$$

N = Anzahl der Basen des Mutageneseprimers

% GC und % Nichtübereinstimmung wurden mit ganzen Zahlen berechnet

- Es wurden 125 ng des jeweiligen Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer in der PCR-Reaktion eingesetzt. Die Stoffmenge des Primers konnte mit nachfolgender Formel kalkuliert werden:

$$X \text{ pmol des Primers} = [\text{ng des Primers} / (330 \times \text{Anzahl der Basen des Primers})] \times 1000$$

Für die Mutagenese-PCR wurden zuerst folgende Reagenzien mit 50 ng Plasmid-DNA gemischt:

Reaktionspuffer mit MgSO_4	5 μL
Vorwärtsprimer	2,5 μL
Rückwärtsprimer	2,5 μL
dNTPS	1 μL
Plasmid-DNA (5 ng/ μl)	10 μL
PfuTurbo Polymerase (2,5 U/ μl)	1 μL
ddH ₂ O	ad 51 μL

Der Reaktionsansatz wurde mit einem optimierten PCR-Protokoll im Thermocycler Primus 96 advanced gradient (Peqlab) inkubiert:

Denaturierung	95 ° C	2 min
Denaturierung	95° C	30 s
Primer-Anlagerung	55° C	1 min
Elongation	70° C	1 min/1 kbp
Finale Elongation	70° C	10 min
Kühlung	37° C	∞

Es wurden 16 Zyklen gefahren, bevor die finale Elongation gestartet wurde.

Die Abkühlung erfolgte auf 37° C, da im Anschluss an die PCR-Reaktion ein Verdau der noch vorhandenen methylierten und nicht-mutierten Ausgangsplasmide durchgeführt wurde. Dafür wurde 1 µL *DpnI* zu dem PCR-Ansatz hinzugefügt und für 1 h bei 37° C im Thermocycler oder im Wasserbad inkubiert. Für die anschließende Transformation der Plasmide in *XL1-Blue supercompetent cells* (Agilent Technologies) wurden 14 mL *BD Falcon Tubes* auf Eis vorgekühlt. Es wurden 50 µL der Bakteriensuspension in das *BD Flacon Tube* gegeben, mit 1 µL der Plasmid-DNA gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Hitzeschock-Transformation bei 42° C im Wasserbad für 45 s durchgeführt und der Ansatz nachfolgend 2 min lang auf Eis abgekühlt. Nach Hinzufügen von 500 µL *NZY⁺ broth Medium*, welches auf 42° C vorgewärmt worden war, wurden die transformierten Bakterien für 1 h bei 37° C und 225 rpm geschüttelt, bevor der Ansatz auf LB-Ampicillin-Platten ausplattiert und für 16 bis 20 h im Brutschrank bei 37° C inkubiert wurde. Mit den gewachsenen Kolonien wurden LB-Ampicillin-Kulturen zur Plasmid-DNA Isolierung mittels Mini-Präparation angeimpft.

3.3.8 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time PCR diente zur Erstellung von Genexpressionsprofilen in verschiedenen humanen Geweben. Es wurde das *Applied Biosystem 7300 Real TIME PCR System* verwendet. Die Gene Expression Assays für die jeweiligen Zielgene und die endogenen Kontrollgene wurden, wie unter Kapitel 2.5 beschrieben, ausgesucht. Hierbei wurde auf vorgefertigt erhältliche Assays zurückgegriffen (*made-to-order Assays*). Die Gene Expression Assays enthielten zum einen zwei genspezifische Primer, die wie bei einer

konventionellen PCR dazu dienen, den gewünschten DNA-Abschnitt zu vervielfältigen, und zum anderen kurze DNA-Sonden, die am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff *FAM* und am 3'-Ende mit einem *minor groove binder* (MGB) (bindet in der kleinen DNA-Furche und erhöht somit die Spezifität der Sonde) nicht-fluoreszierendem Quencher (*nonfluorescent quencher* (NFQ)) markiert waren. Das Prinzip des hier verwendeten Systems beruht darauf, dass der Fluoreszenzfarbstoff und der Quencher über die Sonde in enger räumlicher Nähe zu einander stehen und somit die Fluoreszenz unterdrückt wird. Da sowohl Primer wie auch die Sonde an dem komplementären Strang der DNA binden, baut die DNA-Polymerase bei der Elongation der Primer die Sondennukleotide durch ihre 5' → 3'-Exonukleaseaktivität ab. Dadurch werden der Fluoreszenzfarbstoff und der Quencher voneinander getrennt. Nach Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes kann dieser die Fluoreszenz emittieren, die dann wiederum vom Real-Time PCR Gerät detektiert und quantifiziert wird. Die Stärke des Fluoreszenzsignals steigt dabei proportional mit der Vervielfältigung der DNA an und lässt sich mit einem Funktionsgraphen abbilden.

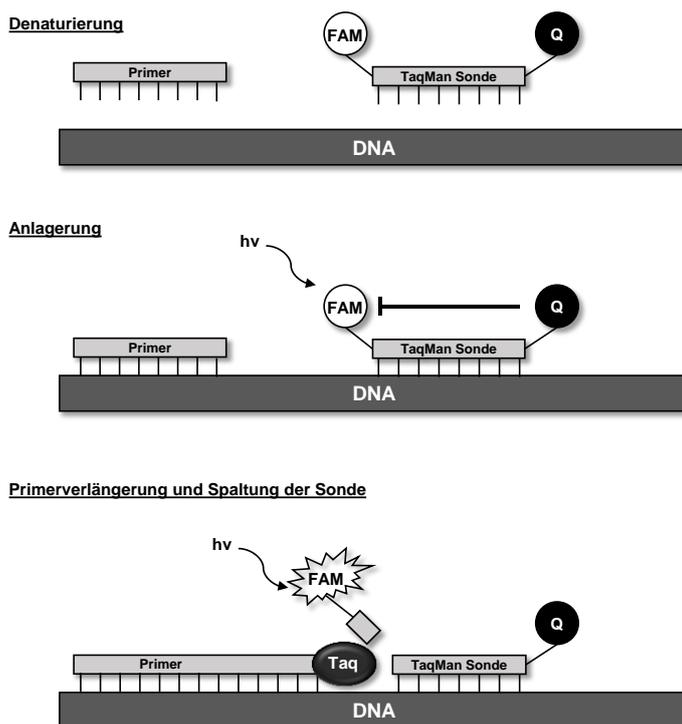


Abbildung 3.1: Prinzip der quantitativen Real-Time PCR mit dem TaqMan-System

Nachdem die DNA-Doppelstränge während der Denaturierung getrennt wurden, lagern sich Primer und Sonde an die DNA-Zielsequenz an. Durch die räumliche Nähe von Quencher (Q) und Fluoreszenz des Farbstoffs *FAM* wird das Fluoreszenzsignal trotz Anregung ($h\nu$) unterdrückt. Die Taq-Polymerase baut bei der Elongation des Primers die TaqMan-Sonde ab, so dass der Farbstoff *FAM* sich vom Quencher entfernen kann und nach Anregung sein Fluoreszenzsignal detektierbar ist.

Ansatz der quantitativen Real-Time PCR:

ddH ₂ O	6,25 µL
TaqMan Universal PCR Master Mix	12,50 µL
TaqMan Gene Expression Assay	1,25 µL
cDNA	5,00 µL

Der Reaktionsansatz wurde unter einer zuvor mit UV-Licht bestrahlten UV-Kammer zusammen pipettiert. Hierfür wurde zuerst ein Mastermix aus ddH₂O, *TaqMan Universal PCR Master Mix* und *TaqMan Gene Expression Assay* hergestellt, der dann wiederum in die 96-well Reaktionsplatte vorgelegt wurde. Zum Schluss wurde die cDNA hinzugegeben und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt. Hierbei wurden Luftblasen vermieden, da diese die Detektion der Fluoreszenz beeinflussen können. Anschließend wurde die 96 well-Platte mit einer Adhäsionsfolie verschlossen und mit Hilfe eines Plattenrotors abzentrifugiert. Danach wurde die Reaktionsplatte in den *ABI PRISM 7300* gegeben und die PCR-Reaktion mit folgendem Protokoll durchgeführt:

Denaturierung	95 ° C	10 min
Denaturierung	95° C	15 s
Primer-Anlagerung und Elongation	60° C	1 min

Die PCR-Reaktion lief über 45 Zyklen.

Für alle Assays wurde eine Standardreihe angefertigt, die Auskunft über die Zuverlässigkeit und Vergleichbarkeit der einzelnen Assays gab. Aus der Steigung der Standardkurve kann eine Aussage über die Effizienz der Real-Time PCR gemacht werden. Man spricht von einer Effizienz von 100 %, wenn sich die Menge des PCR-Produkts in der exponentiellen Phase der PCR je Zyklus verdoppelt.

Für die Standardreihe wurde kommerziell erhältliche humane Hoden-cDNA verwendet, die über fünf Zehnerpotenzen verdünnt wurde. Anschließend wurde eine Real-Time PCR mit oben beschriebenem Reaktionsansatz und Protokoll durchgeführt. Hierbei wurde mit einem dreifach Ansatz je Verdünnungsstufe gearbeitet. Bei der Auswertung wurde die Standardreihe mit Hilfe eines Funktionsgraphen abgebildet. Hierfür werden die C_T-Werte auf der y-Achse gegen die logarithmierte Verdünnung der eingesetzten cDNA aufgetragen. Die PCR-Reaktion weist eine

Effizienz von 100 % auf, wenn in der exponentiellen Phase der Amplifizierung alle 3,32 Zyklen das PCR-Produkt um ein 10-faches vervielfältigt wird.

Berechnung:

$$\log_2 10 = \ln_2 / \ln_{10} = 3,3219 \approx 3,32$$

Die Effizienz lässt sich mit folgender Formel schätzen:

$$E = (10^{-1/\text{Steigung}} - 1) \times 100$$

Beispiel mit E = 100 %:

$$E = (10^{-1/-3,32} - 1) \times 100 = 100,08 \%$$

Eine Steigung der Standardkurve von - 3,32 gibt somit eine Effizienz von 100 % an. Eine Steigung mit einem Wert niedriger als - 3,32 weist auf eine Effizienz von weniger als 100 % hin, wohingegen eine Steigung mit einem Wert über - 3,32 meistens auf eine schlechte Probenqualität oder einen Pipettierfehler zurückzuführen ist. Allgemein sind Effizienzwerte zwischen 90 % und 110 % akzeptabel. Je niedriger allerdings die Effizienz der PCR-Reaktion ist, desto niedriger ist auch ihre Sensitivität.

Ein weiterer wichtiger Parameter ist R^2 , ein statistischer Wert (Korrelationskoeffizient), der angibt, wie gut ein Wert einen anderen voraussagen kann. Wenn $R^2 = 1$, dann kann man exakt den x-Wert (Menge der eingesetzten cDNA) mit dem y-Wert (C_T -Wert) vorhersagen. Ein R^2 -Wert von $> 0,99$ ist erstrebenswert, da er eine große Sicherheit in der Korrelation der beiden Werte bietet.

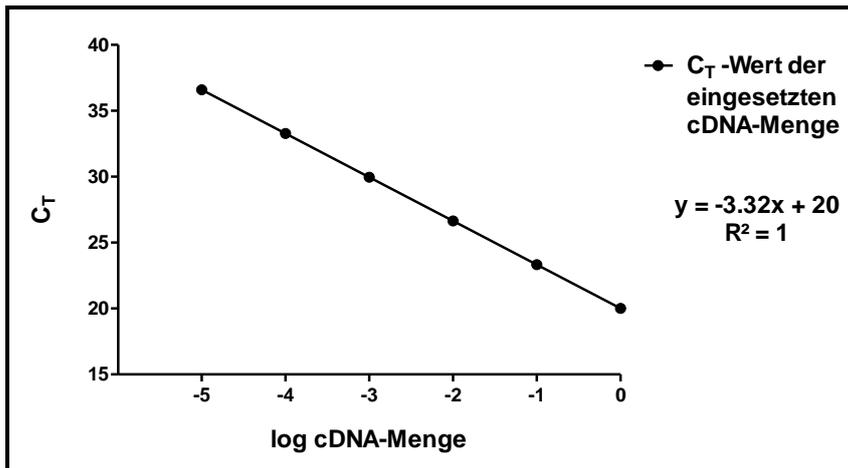


Abbildung 3.2: Real-Time PCR Standardreihe mit einer PCR-Effizienz von 100 %

Die Real-Time PCR Standardreihe ist graphisch als halb-logarithmische Regressionsgerade dargestellt. Die Verdünnungen der cDNA (x-Achse) sind logarithmiert gegen die C_T-Werte (y-Achse) aufgetragen. Da die Steigung der Standardkurve - 3,32 beträgt, liegt eine Effizienz von 100 % vor.

Die relative Expression der Zielgene wurde mit Hilfe der $\Delta\Delta C_T$ -Methode bestimmt. Dazu wurde zuerst der ΔC_T -Wert des Zielgens bestimmt, indem der C_T-Wert des endogenen Kontrollgens (*housekeeper gene*) vom C_T-Wert des Zielgens abgezogen wurde:

$$\Delta C_T = C_T (\text{Zielgen}) - C_T (\text{endogenes Kontrollgen})$$

Der $\Delta\Delta C_T$ -Wert wurde berechnet, indem der ΔC_T -Wert des Kalibrators, repräsentiert durch das am wenigsten exprimierende Gewebe, vom ΔC_T -Wert des Zielgens subtrahiert wurde. Anschließend erfolgte die Transformation nach der Formel $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Der so ermittelte Wert gibt schließlich die relative Expression des Zielgens als n-fache Expression des Kalibrators an.

3.4 DNA-Klonierung

Die Integration von DNA in einen Vektor (Plasmid) und deren Einbringung in eine Wirtszelle wird als Klonierung bezeichnet. Hierfür wird zuerst die DNA in einen Vektor ligiert, dann das entstandene Plasmid in die Wirtszelle (Bakterien) transformiert und diese anschließend in Nährmedium vermehrt. Die Bakterien können über Antibiotikaresistenzen auf die Aufnahme des Plasmids selektioniert werden. Anschließend kann man sie in hoher Zahl vermehren und die Plasmide mit Hilfe der DNA-Präparation (siehe Kapitel 3.1.5 und 3.1.6) isolieren. In dieser Arbeit dienen chemisch kompetente TOP10 *E. coli* Bakterien (Invitrogen) als Wirtszellen.

3.4.1 TOPO-Klonierung

Der codierende DNA-Bereich der interessierenden Transportergene wurde mittels Touchdown-PCR und der *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* generiert und im Anschluss mit dem *Hi Yield Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit* aufgereinigt. Es folgte die Kontrolle der aufgereinigten DNA über ein 1 %-iges Agarosegel. Da die verwendeten TOPO-Vektoren an ihrem 3'-Ende einen T-Überhang aufweisen, wurde für die Ligation ein 3'-A-Überhang am PCR-Produkt benötigt. Dieser wurde mit Hilfe der *DyNAzyme II DNA Polymerase* an die PCR-Produkte angehängt. Das Protokoll hierfür ist unter 3.3.6 beschrieben. Von diesem Ansatz wurden 4 µL mit 1 µL Salt Solution und 1 µL des TOPO-Vektors (*pcDNA5/FRT/TO-TOPO*, *pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO* oder *pcDNA6.2/C-EmGFP-TOPO*, alle von Invitrogen) vermischt und für 1 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss auf Eis gelagert. Während dieser Inkubationsphase werden der linearisierte TOPO-Vektor und das PCR-Produkt über die komplementären Enden ligiert. Hierbei wird die am Vektor gebundene *Topoisomerase I*, die der Klonierung den Namen gibt, abgespalten. Die *Topoisomerase I* bindet an doppelsträngige DNA und spaltet die DNA-Stränge an den Phosphodiester-Backbones. Hierbei geht die *Topoisomerase I* eine kovalente Bindung mit dem Phosphodiester-Backbone ein. Diese Bindung kann durch ein 5'-hydroxyliertes Ende eines anderen DNA-Strangs (in diesem Fall dem PCR-Produkt) wieder aufgebrochen werden, wobei die *Topoisomerase I* abgespalten wird. Für die Transformation wurden 2 µL des Ligationsansatzes verwendet. Der Rest des Ligationsansatzes wurde bei - 20° C aufbewahrt.

3.4.2 Transformation

Bei der Transformation werden die rekombinierten Plasmide über einen Hitzeschock in die Bakterienzellen eingebracht. Hierzu wurden chemisch kompetente TOP10 *E. coli* Bakterien (Invitrogen) auf Eis aufgetaut und in Anschluss mit 2 µL des Ligationsansatzes vorsichtig vermischt. Es folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis, bevor der Hitzeschock bei 42° C für genau 30 s durchgeführt wurde. Die Probe wurde danach sofort für 2 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden 250 µL *SOC-Medium* (Invitrogen), welches zuvor auf 37° C erwärmt wurde, hinzugegeben und die Bakteriensuspension bei 220 rpm und 37° C für 45 bis 60 min im Schüttelinkubator inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden LB-Ampicillin-Agarplatten auf 37° C vorgewärmt. Auf diese wurde die Bakteriensuspension in unterschiedlichen Mengen (50 µL, 100 µL, 150 µL) ausgestrichen und für 16 h bei 37° C im Wärmeschrank inkubiert. Die Zugabe von Ampicillin zum Nährmedium ermöglichte eine Selektion der Bakterien. Diejenigen Bakterien, die das Plasmid aufgenommen hatten, waren durch das im Plasmid vorhandene Ampicillin-Resistenzgen in der Lage, sich trotz Antibiotikazugabe zu vermehren, wohingegen die Bakterien ohne Fremd-DNA aufgrund der mangelnden Ampicillin-Resistenz nicht wachsen

konnten. Einzelne Bakterienkolonien wurden in LB-Ampicillin-Medium vermehrt und mit Hilfe der Kolonie-PCR auf das interessierende Gen kontrolliert (siehe Kapitel 3.3.5). Die DNA wurde anschließend über Mini-Präparation (siehe Kapitel 3.1.5) aufgereinigt. Teilweise wurde die DNA nicht mit Hilfe der Kolonie-PCR, sondern mittels Restriktionsverdau kontrolliert. Die aufgereinigte DNA wurde abschließend sequenziert, um die Korrektheit der Sequenz zu überprüfen.

3.4.3 Sequenzierung und Auswertung der Sequenzspuren

Die Sequenzierungen wurden durch die Firma GATC Biotech AG (Konstanz) durchgeführt. Hierfür wurde zuerst die Konzentration der Plasmid-DNA im Photometer bestimmt (siehe Kapitel 3.1.1). Da GATC zur Sequenzierung von Plasmid-DNA eine Konzentration von 30 - 100 ng/μl empfiehlt, wurde 1 μg der Plasmid-DNA in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß mit ddH₂O gemischt und auf 20 μL Gesamtvolumen aufgefüllt, was einer Konzentration von 50 ng/μl entspricht. Das Reaktionsgefäß wurde in einer firmeneigenen Transportbox zu GATC versendet. Für die Sequenzierung von PCR-Produkten wurde eine Konzentration von 10-50 ng/μl mit Hilfe von ddH₂O eingestellt.

Die Sequenzierprimer wurden ebenfalls in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß verschickt. Ihre Konzentration betrug 10 pmol/μl. Die Sequenzierergebnisse wurden per E-Mail zugestellt und auf dem Computer mit den Programmen *DNASTar* und *FinchTV* ausgewertet.



Abbildung 3.3: Screenshot einer Sequenzspur dargestellt mit dem Programm FinchTV

3.5 Heterologe Expression in *Xenopus laevis* Oozyten

Die Eizellen (Oozyten) des südafrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) werden in der Molekularbiologie häufig für die heterologe Expression von Membranproteinen verwendet. Neben der Lokalisation kann hiermit auch die Funktion der Proteine untersucht werden. In dieser Arbeit wurde die heterologe Expression der Transporter OATP6A1, OATP1C1 und

OSCP1 in den Oozyten als alternatives Modell zur Zellkultur für Transportmessungen und somit für die Funktionsanalyse genutzt. Es wurde das jeweilige V5-His-Plasmid verwendet, da der *pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO*-Vektor einen T7-Promotor besitzt, welcher die Synthese einer komplementären RNA (cRNA) ermöglicht. Die cRNA ist ähnlich strukturiert wie eine prozessierte messenger RNA (mRNA). Sie wurde mittels Mikroinjektion in die Oozyten eingebracht, die dann wiederum das entsprechende Protein translatierten und in ihre Membran einbrachten. Mit diesen injizierten Oozyten sollten die Transporteigenschaften der OATPs und des OSCP1 näher charakterisiert werden.

3.5.1 cRNA-Synthese

Für die cRNA-Synthese wurde zuerst in das V5-His-Plasmid der Transporter OATP6A1, OATP1C1 und OSCP1 ein doppeltes Stoppcodon mittels zielgerichteter Mutagenese eingebracht. Dies stellte sicher, dass weder das V5-Epitop, noch das His-Tag translatiert wurden und somit das Risiko einer Fehlsortierung der Proteine, bedingt durch die beiden Anhänge, reduziert werden konnte. Nach Überprüfung der Sequenz und der erfolgreichen Insertion der Stoppcodons konnte die cRNA-Synthese durchgeführt werden.

Hierfür wurde im ersten Schritt eine Linearisierung der V5-His-Plasmide der Transporter OATP6A1, OATP1C1 und OSCP1 durchgeführt. Hierzu wurde ein Restriktionsenzym ausgewählt, welches das Konstrukt zwar nahe des jeweiligen Stoppcodons schnitt, aber das interessierende Gen selbst nicht zerstörte. Für alle drei Transportplasmide wurde *KpnI* verwendet, da es die genannten Bedingungen erfüllte. Für den Restriktionsverdau wurde folgender Ansatz verwendet und 1,5 h bei 37° C im Wasserbad inkubiert:

Plasmid-DNA	5 µg in x µL
10x FastDigest Buffer	5 µL
FastDigest <i>KpnI</i>	5 µL
ddH ₂ O	ad 50 µL.

Im Anschluss wurde der Reaktionsansatz mit dem Klenow-Fragment gemischt, um den 3'-Überhang des Konstruktes, der durch das Enzym *KpnI* hervorgerufen wurde, abzubauen. Das Klenow-Fragment besitzt eine 3' → 5'-Exonukleaseaktivität, so dass nach der Inkubation mit dem Enzym glatte Enden, sogenannte *blunt ends*, entstehen. Diese verhindern ein Umschlagen der Polymerase und garantieren damit das korrekte Ablesen der DNA durch die RNA-Polymerase. Für die Generierung der *blunt ends* wurden 50 µL des Restriktionsverdaus mit 3,6 µL dNTP-Mix und 1 µL Enzym angesetzt und 15 min bei 25° C inkubiert, bevor die Reaktion durch Hinzugabe von 2 µL 0,5 M EDTA (funktioniert hier als Proteaseinhibitor) und

Erhitzung des Reaktionsansatzes auf 75° C für 20 min gestoppt wurde. Im Anschluss wurde die DNA mit Hilfe von Phenol gefällt und mit Ethanol präzipitiert. Hierfür wurden zuerst 50 µL des Reaktionsansatzes aus dem vorangegangenen Schritt mit 50 µL *TE* Puffer (Qiagen) vermischt, zu 100 µL vorgelegtem Phenol in ein 2 mL Reaktionsgefäß gegeben und mittels 30-sekündigem Puls-Vortexen gemischt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 13.200 g für 2 min. Es bildeten sich 3 Phasen: eine untere organische Phase, die Interphase und eine obere Phase, die die DNA enthielt. Die obere Phase wurde in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und erneut zur Aufreinigung mit 100 µL Phenol für insgesamt 30 s in Pulsen gevortext. Es folgte wieder die Zentrifugation bei 16.100 g für 5 min. Die obere Phase wurde abermals in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß gegeben, mit 1/10 Volumenanteil 3 M Natriumacetat und 2,5-fachem Volumenanteil 100 %-igem Ethanol durch mehrfaches Invertieren vermischt und 1 h bei - 20° C gekühlt. Im Anschluss wurde das Reaktionsgemisch 15 min lang bei 16.100 g zentrifugiert, um die DNA zu präzipitieren. Der Überstand wurde mittels Pipette verworfen, 500 µL eiskaltes Ethanol (70 %-ig) über den Rand des Reaktionsgefäßes vorsichtig hinzugegeben und die DNA erneut bei 16.100 g 15 min lang zentrifugiert. Der Überstand dieses Waschschruttes wurde ebenfalls vorsichtig abgezogen und das DNA-Pellet unter Vakuum 3 min lang getrocknet. Anschließend erfolgte die Lösung des DNA-Pellets bei Raumtemperatur in 5,5 µL *TE* Puffer. Die Kontrolle der aufgereinigten und präzipitierten DNA erfolgte über ein 1 %-iges Agarosegel. Die DNA-Konzentration der Proben wurde photometrisch bestimmt und Aliquots mit 1 µg linearisierter DNA bei - 20° C eingefroren. Mit Hilfe einer DNA-abhängigen RNA-Polymerase konnte nun aus der linearisierten Plasmid-DNA die cRNA synthetisiert werden. Hierfür wurde das *mMessage mMachin Kit* (Ambion by Life Technologies) verwendet. Nach Auftauen der Komponenten auf Eis wurden bei Raumtemperatur 1 µg linearisierte Plasmid-DNA, 5 µL nukleasefreies Wasser, 10 µL *NTP/CAP-Mix*, 2 µL 10 x Reaktions-Puffer und 2 µL Enzym Mix gemischt. Der Reaktionsansatz wurde 1 h bei 37° C inkubiert, bevor 1 µL der *TurboDNase* hinzu pipettiert wurde und eine weitere Inkubation bei 37° C für 15 min folgte. Die *TurboDNase* baut die noch vorhandene Plasmid-DNA, die als Matrize der RNA-Polymerase dient, ab. Dieser Schritt ist optional, da die Ausgangs-Plasmid-DNA nach der Transkriptionsreaktion nur noch in geringer Konzentration im Reaktionsgemisch vorliegt und zu keiner nennenswerten Beeinträchtigung der nachfolgenden Experimente führt.

Es folgte das Anfügen eines Poly-A-Schwanzes mit Hilfe des *Poly(A) Tailing Kits* von Applied Biosystems. Die Synthese eines Poly-A-Schwanzes an die zuvor hergestellte cRNA erhöht deren Stabilität und steigert die Translationseffizienz bei Verwendung der cRNA in Transfektions- oder Mikroinjektionsexperimenten. Bei Verwendung des *Poly(A) Tailing Kits* wird ein Poly-A-Schwanz von mehr als 150 Basen an das RNA-Transkript synthetisiert. Hierfür

wurden 20 µL des *mMessage mMachine* Reaktionsansatzes mit 36 µL nukleasefreiem Wasser, 20 µL 5 x *E-PAP*-Puffer, 10 µL 25 mM MnCl₂ und 10 µL 10 mM ATP gemischt. Anschließend wurden 4 µL *E-PAP* (*E. coli* Poly-A-Polymerase) hinzugefügt und die Reaktion bei 37° C für 1 h gestartet. Die nun „bekappte und geschwänzte“ (*capped and tailed*) RNA konnte bei -20° C gelagert werden.

Das im Anschluss verwendete *MEGAclear Kit* (Ambion by Life Technologies) diente der Entfernung von Nukleotiden, kurzen Oligonukleotiden, Proteinen und Salzen und führt zu einer aufgereinigten cRNA hoher Reinheit. Im *Megaclear Kit* werden 100 µL des *Poly(A) Tailing Kits* mit 350 µL *Binding Solution Konzentrat* und 250 µL Ethanol (100 %-ig) versetzt, durch Auf- und Abpipettieren vermischt, auf den Filtereinsatz des Reaktionsgefäßes gegeben und 1 min bei 12.100 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der Filter zweimal mit 500 µL Wash Solution gewaschen. Zwischen den Waschsritten wurde das Probengefäß 1 min lang bei 12.100 g zentrifugiert und der Durchfluss jeweils entfernt. Es folgte die Trocknung des Filters bei 12.100 g für 30 s. Der Filter wurde in ein neues Reaktionsgefäß umgesetzt und die RNA durch zweifache Zentrifugation bei 12.100 g für 1 min mit jeweils 50 µL Elutionspuffer eluiert. Im Anschluss folgte die Fällung mit 5 M Ammoniumacetat, um die cRNA aufzukonzentrieren. Hierzu wurden die aufgereinigte cRNA und das 5 M Ammonium Acetat im Verhältnis 1:10 vorsichtig durch Schnipsen des Reaktionsgefäßes gemischt, 2,5 Volumenanteilen Ethanol (100 %-ig) dazu pipettiert und für 30 min bei - 20° C inkubiert. Anschließend wurde die cRNA durch Zentrifugation für 15 min bei 16.100 g und 4° C präzipitiert. Der Überstand wurde abgezogen und das Pellet mit 500 µL 70 %-igem Ethanol gewaschen. Hierfür wurde ein erneuter Zentrifugationsschritt durchgeführt (15 min, 16.100 g, Raumtemperatur). Der Überstand wurde entfernt und das cRNA-Pellet mittels Vakuum 3 min lang bei 35° C getrocknet. Es folgte die Lösung des Pellets in 20 µL nukleasefreiem Wasser, bevor der cRNA-Gehalt mit Hilfe des Photometers bestimmt wurde. Im Anschluss wurde die Konzentration der cRNA auf 0,1 µg/µl eingestellt und in Aliquots á 6 µL bei - 80° C gelagert. Zusätzlich wurde 1 µL cRNA auf ein 0,8 %-iges Agarosegel aufgetragen und überprüft.

3.5.2 Oozytengewinnung

Die Oozyten wurden aus weiblichen *Xenopus laevis* Fröschen gewonnen. Die Entnahme der Oozyten erfolgte im Institut für Tierphysiologie in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Claus. Die Oozyten wurden in eine Petrischale mit einem Durchmesser von 10 cm gegeben, vorsichtig mit einer Pinzette aus den Ovarteilen gelöst und mit einer Kollagenase D-Lösung (12 mg Kollagenase D auf 30 mL OR2-Puffer) bei 18° C über Nacht inkubiert. Während der Kollagenisierung wird die Follikelhülle, die die Oozyten umgibt, angedaut und abgelöst. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von reinem OR2-Puffer gestoppt. Die Reste der

Follikelhüllen wurden durch 3-maliges Waschen mit OR2-Puffer und 3-maliges Waschen mit modifizierter Barth's Lösung entfernt. Anschließend wurden die Oozyten anhand folgender Kriterien für die Injektion ausgewählt:

- Teilungsstadium 5 bis 6 mit einem \varnothing von 1 bis 1,2 mm
- Fleckenlose, glatte Oberfläche
- Scharf getrennte Hemisphären (schwarzer Pol = animaler Pol, weißer Pol = vegetativer Pol)
- Guter, gleichmäßiger Turgor

Die für die cRNA-Injektion ausgewählten Oozyten wurden in modifizierter Barth's Lösung versetzt mit 0,1 % Gentamicin bei 18° C bis zur Injektion aufbewahrt.

3.5.3 Mikroinjektion der cRNA

Für die Injektion der cRNA in die Oozyten wurde eine Glaskapillare verwendet, deren Eingangsöffnung einen Durchmesser von 20 - 30 μm aufwies. Zuerst wurde in die Glaskapillare Mineralöl aufgezogen. Anschließend wurde sie auf den Kolben der elektrischen Nanoliterpumpe gesetzt und an dem Mikromanipulator fixiert. Die Kapillare wurde 3 x mit Nuklease-freiem Wasser gespült, bevor 6 μL der cRNA (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) aufgezogen wurden. Die Oozyten wurden auf eine Treppe für die Injektion bereitgelegt. Die Treppe war in einer Petrischale mit einem Durchmesser von 6 cm fest arretiert und diente der Fixation der Oozyten während der Injektion. Um ein Austrocknen der Oozyten zu vermeiden, wurde modifizierte Barth's Lösung in die Petrischale gegeben, so dass die Treppe und die Oozyten vollständig mit Flüssigkeit bedeckt waren. Die cRNA bzw. das Wasser (Negativkontrolle) wurde in den hellen Pol der Oozyte injiziert. Die Injektionsmenge betrug 46 nl, so dass pro Oozyte 4,6 ng cRNA verwendet wurden. Die injizierten Oozyten wurden für 72 h in modifizierter Barth's Lösung, versetzt mit 0,1 % Gentamicin, bei 18° C gelagert. Der Puffer wurde täglich gewechselt. Dabei wurden die Oozyten, die beschädigt oder abgestorben waren, aussortiert.

3.5.4 Transportmessungen an Oozyten

Für die Transportmessung wurden die Oozyten am Tag des Experiments erneut auf Beschädigungen und Vitalität überprüft. Es wurden nur vitale Oozyten für die Transportmessung verwendet. Die Oozyten wurden in eine 48-well Platte überführt. Hierfür wurden jeweils 15 bis 20 Oozyten einer cRNA in ein well gegeben. Ein well entsprach einem Messpunkt bzw. einer Messsubstanz. Die Transportmessung erfolgte bei Raumtemperatur.

Die Oozyten wurden zuerst 3 x mit Transportpuffer gewaschen und anschließend für 15 min in diesem equilibriert. Anschließend wurde der Transportpuffer vorsichtig abgesaugt und die Messlösung hinzugegeben. Die Messlösung setzte sich aus radioaktiv markierter und unmarkierter Substanz zusammen und war in Transportpuffer gelöst. Nach einer 1-stündigen Inkubation wurde die Messlösung abgesaugt und die Aufnahme der Substanz in die Oozyten durch 3-maliges Waschen mit eiskaltem Transportpuffer gestoppt. Es folgten zwei weitere Waschschriffe mit eiskaltem Transportpuffer in Petrischalen (\varnothing 10 cm) auf Eis, bevor die Oozyten in die Minivials vereinzelt wurden. Die Oozyten wurden mit 1 mL 10 % SDS versetzt, 60 min lang bei Raumtemperatur lysiert, im Anschluss mit 3 mL Szintillatoröl gemischt und gründlich gevortext, bevor der aufgenommene Anteil an Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillationscounter ermittelt wurde. Die Menge der aufgenommenen Substanz in die Oozyten konnte mit Hilfe von Substanz-spezifischen Umrechnungsfaktoren und unter Berücksichtigung des prozentualen Anteils radioaktiv-markierter Substanz in der Messlösung berechnet werden und wurde in fmol/Oozyte/X min angegeben.

3.6 Kultivierung eukaryotischer Zellen

In dieser Dissertationsschrift wurden neben der Zelllinie *Flp-In T-REx 293* und den daraus hervorgegangenen stabilen Zelllinien auch die Zelllinie *GripeTite 293 MSR* verwendet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte nach den allgemeinen Techniken des sterilen Arbeitens. Dies bedeutete, dass alle Arbeiten mit den Zellen unter einer sterilen Laminar Flow Sicherheitswerkbank durchgeführt wurden und sämtliche Materialien, die mit den Zellen in Kontakt kamen, vor ihrer Verwendung gereinigt, desinfiziert und/oder sterilisiert bzw. autoklaviert worden waren. Die Werkbank wurde zudem regelmäßig mit UV-Licht bestrahlt, um potenziell vorhandene Mikroorganismen abzutöten.

Die Zellen wurden standardmäßig in ihrem entsprechenden Medium (siehe Kapitel 2.10.2) in CO₂-Inkubatoren unter folgenden Bedingungen kultiviert: 95 % Wasserdampfsättigung, 5 % CO₂ bzw. 10 % CO₂ (*GripeTite 293 MSR* Zellen) und 37° C.

Die Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen entsprechend ihrer Eigenschaften mit Zeozin (*Flp-In T-REx 293* Zellen), Blastocidin (*Flp-In T-REx 293* Zellen, stabil transfizierte *Flp-In T-REx 293* Zelllinien), Hygromycin B (stabil transfizierte *Flp-In T-REx 293* Zelllinien) oder Geneticin (*GripeTite 293 MSR* Zellen) selektioniert.

3.6.1 Passagieren und Aussäen der Zellen

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in der Regel in 75 cm² Kulturschalen. Bei einer Konfluenz von 80-90 % wurden die Zellen gesplittet. Hierzu wurde das Medium mit einer Pasteurpipette

abgezogen, die Zellen mit 10 mL sterilem PBS gewaschen, anschließend 1 mL Trypsin-EDTA auf die Zellen gegeben und durch Schwenken gleichmäßig verteilt. Anschließend wurde die Zellkulturschale 1 - 2 min im CO₂-Inkubator bei 37° C inkubiert. Die Zellen wurden durch Klopfen von der Oberfläche der Kulturschale gelöst und die Trypsinierung durch Hinzugabe von 2 mL des entsprechenden Mediums gestoppt. Die Zellen wurden durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Hierbei konnten auch besonders festsitzende Zellen von dem Boden der Kulturschale abgelöst werden. Die Zellen wurden je nach Bedarf in einer Verdünnung von 1:2 bis 1:10 in eine neue Kulturschale überführt und mit der entsprechenden Menge Zellmedium versetzt.

Für das Aussäen der Zellen wurde zunächst die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die 6-, 12- oder 24-well Schalen wurden vor dem Aussäen 30 min lang mit Poly-L-lysin inkubiert, um die Adhärenz der Zellen an der Schalenoberfläche zu verbessern. Nach Abziehen des Poly-L-lysin wurde die gewünschte Anzahl Zellen auf die noch feuchte Oberfläche ausgesät. Da die GripeTite 293 MSR Zellen den *macrophage scavenger receptor* besitzen, der die Adhärenz der Zellen deutlich verstärkt, war eine Präinkubation der Schalen mit Poly-L-lysin bei ihnen nicht nötig.

3.6.2 Kryokonservierung der Zellen

Für die Kryokonservierung der Zellen wurden 150 µL DMSO (Kryoprotektant) in ein Kryovial vorgelegt, mit 1.350 µL der abtrypsinierten Zellsuspension (siehe Kapitel 3.6.1) gründlich gemischt und zunächst in einer Styroporschachtel für 2 h bei - 20° C runtergekühlt. Anschließend wurden die Zellen für 24 h bei - 80° C eingefroren, bevor sie zur Langzeitkonservierung in flüssigen Stickstoff (N₂) überführt wurden.

3.6.3 Auftauen der Zellen

Die Zellen wurden aus dem flüssigen Stickstoff genommen und im Wasserbad bei 37° C aufgetaut. Kurz bevor die Zellen komplett aufgetaut waren, wurde die Außenseite des Kryovials mit 70 %-igem Ethanol desinfiziert und unter der sterilen Laminar Flow Sicherheitswerkbank in ein 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt. Die Zellen wurden anschließend 5 min bei 450 g pelletiert. Das Eppendorfgefäß wurde ebenfalls desinfiziert und unter die Sterilwerkbank verbracht. Der Überstand wurde vorsichtig abgezogen, das Zellpellet mit frischem Medium resuspendiert und zunächst in eine 25 cm² Kulturschale überführt. Nachdem die Zellen sich abgesetzt hatten (nach einigen Stunden), wurde erneut das Medium gewechselt, um das ggf. noch vorhandene DMSO zu entfernen. Bei einer Konfluenz von 80-90 % wurden die Zellen in eine 75 cm² Kulturschale passagiert.

3.7 Transfektion eukaryotischer Zellen

Für die funktionelle und molekulare Charakterisierung von Proteinen werden in der Molekularbiologie verschiedene Expressionsmodelle verwendet. Ein Modell stellt die Expression in eukaryotischen Zellen dar. Hierzu wird ein Plasmid, welches das zu untersuchende Gen (*gene of interest*, GOI) unter Kontrolle eines Promoters enthält, mittels Transfektion in die Zelle eingebracht. Dort wird das GOI von der zelleigenen DNA-Polymerase als Matrize für die mRNA verwendet, die dann wiederum als Grundlage für die Translation des Zielproteins dient. Bei der Transfektion unterscheidet man zwischen der transienten und der stabilen Transfektion. Bei der transienten Transfektion wird das interessierende Gen nur kurzfristig in die Zelle eingebracht, wohingegen bei der stabilen Transfektion das GOI dauerhaft in das Genom der Wirtszelle integriert wird und somit auch an die Tochterzellen weitergegeben werden kann. Für längerfristige Untersuchungen einzelner Proteine sind stabil transfizierte Zelllinien von Vorteil, da das Protein gleichmäßig exprimiert wird und Schwankungen in der Transfektionsrate keine Rolle spielen.

3.7.1 Transiente Transfektion

Bei der transienten Transfektion wird die zu untersuchende cDNA kurzfristig mit Hilfe von Transfektionsreagenzien in die Wirtszelle eingebracht. In dieser Arbeit wurde als Transfektionsreagenz *Lipofectamine 2000* (Invitrogen) verwendet. Das Prinzip der Transfektion beruht hierbei auf der Liposomenformulierung, welche mit der DNA kondensiert und hocheffizient in die Zellen aufgenommen wird. Die transiente Transfektion wurde in 24-well Platten für Transportmessungen und Immunfluoreszenz-Untersuchungen sowie für die Proteinextraktion in 6-well Platten durchgeführt. Die Zellen wuchsen bis zu einer Konfluenz von 70 - 90 % im jeweiligen Standardmedium. Am Tag der Transfektion wurde das Antibiotikahaltige Medium durch Antibiotika-freies Medium (500 μ L für 24-well Platte, 2 mL für 6-well Platte) ersetzt, da Antibiotika die Transfektionsreaktion stören können. Für die Transfektion wurde zum einen 1 μ g DNA (24-well Platte) bzw. 4 μ g (6-well Platte), und zum anderen 2 μ L (24-well Platte) bzw. 10 μ L (6-well Platte) *Lipofectamine 2000* mit jeweils 50 μ L (24-well Platte) bzw. 250 μ L (6-well Platte) *OptiMEM* (Life Technologies) gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden beide Vorgemische vereinigt und für weitere 25-30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde das DNA/*Lipofectamine 2000*/*OptiMEM*-Gemisch tröpfchenweise auf die Zellen gegeben und diese für 6 bis 8 Stunden bei 37° C im CO₂-Inkubator inkubiert. Danach wurde das Gemisch abgezogen und die Zellen mit Standardmedium weiter kultiviert. Die Untersuchung der Zellen erfolgte 24 bis 48 h nach der Transfektion.

3.7.2 Stabile Transfektion

Die stabile Transfektion dient dazu, das GOI dauerhaft in das Genom der eukaryotischen Wirtszelle zu integrieren. In dieser Arbeit wurden stabil transfizierte Zelllinien mit Hilfe des *Flp-In T-REx-Systems* der Firma Invitrogen generiert. Als Ursprungszelllinie diente die HEK293-Zelllinie. Diese wurde mit Hilfe des *Flp-In T-REx-Systems* so modifiziert, dass zum einen die gerichtete Integration des GOI in das Genom der Wirtszelle möglich ist, und zum anderen die Expression des GOI unter Kontrolle eines Tetrazyklin-regulierten Promotors steht. Hierfür wurde die Ausgangszelllinie mit zwei verschiedenen Plasmiden transfiziert. Das eine enthielt die *Flp Recombination Target (FRT) site*, das andere wies den *Tetrazyklin Repressor* auf. Nach dieser Modifikation ist es möglich, über die FRT site das GOI gezielt in das Genom der Flp-In-HEK293-Zelllinie über *Flp Rekombinase* vermittelte DNA-Rekombination einzubringen und die Expression des Gens bzw. die Translation des interessierenden Proteins über Zugabe von Tetrazyklin zu induzieren. Das Einbringen des Gens an einer definierten Stelle des Genoms der Wirtszelle verhindert, dass Gene, die wichtige Vitalitätsfunktionen der Zelle steuern, geschädigt werden und somit das Wachstum der Zelle unbeeinträchtigt bleibt. Die stabile Transfektion der interessierenden Transportergene erfolgte ebenfalls mit Lipofektion (siehe Kapitel 3.7.1). Es wurde auch hier *Lipofectamine 2000* verwendet. Für die stabile Transfektion wurden pro interessierendem Gen $1,6 \times 10^6$ Flp-In-HEK293 Zellen in eine 6-well Schale mit Standardmedium ausgesät. Nachdem die Zellen eine Konfluenz von 90 % aufwiesen, wurde die Transfektion durchgeführt. Hierfür wurde zunächst das Medium abgesaugt und durch 2 mL Antibiotika-freies Standardmedium ersetzt. Ferner wurde folgender Transfektionsansatz vorbereitet:

Menge Plasmid mit GOI	Menge pOG44 Plasmid	Volumen OptiMEM für DNA-Ansatz	Volumen Lipofectamine 2000	Volumen OptiMEM für Lipofectamine-Ansatz	Gesamtvolumen
1 µg	7 µg	Ad 50 µL	24 µL	26 µL	100 µL

Sowohl der DNA- wie auch der Lipofectamine-Ansatz wurden in einem Reaktionsgefäß gemischt und 5 min vorinkubiert, bevor beide Ansätze vereinigt wurden. Es folgte eine Inkubation von 25-30 min bei Raumtemperatur. Das Volumenverhältnis zwischen DNA-Lösung (1 µg/µl) und Lipofectamine 2000-Lösung betrug 1:3. Im Anschluss wurden die Transfektionsansätze tröpfchenweise auf die Zellen gegeben und die Zellkulturplatte kurz geschwenkt, um die DNA und das Lipofectamine auf den Zellen zu verteilen. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation über Nacht im Brutschrank bei Standardbedingungen. Am nächsten

Tag wurde das Transfektionsgemisch und das Medium abgezogen, die Zellen 1 x mit PBS gewaschen und frisches Standardmedium auf die Zellen gegeben. Nach 24 h wurde erneut das Medium abgezogen, die Zellen 1 x mit PBS gewaschen und 500 μ L 0,05 %-iges Trypsin pro well auf die Zellen pipettiert. Nach einer 1-minütigen Inkubation im Brutschrank wurde die Trypsinierung mit 1,5 mL Standardmedium gestoppt und die Zellen in zwei mit Poly-L-lysin-beschichtete Petrischalen (\varnothing 10 cm) überführt. Das Medium wurde auf 10 mL Gesamtvolumen aufgefüllt und 30 μ L Hygromycin B (Endkonzentration 150 μ g/mL) zur Selektion hinzugefügt. Die Zellen, bei denen die stabile Transfektion nicht erfolgreich war, starben nach Zugabe des Selektionsantibiotikums ab. Nach ca. 14 bis 21 Tagen waren Einzelzellklone sichtbar, die gepickt und in 24-well Schalen überführt werden konnten. Hierzu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmalig mit PBS gewaschen und die Einzelzellklone mit einem Filzstift von außen an der Petrischale markiert. Im Anschluss wurden auf den zu pickenden Einzelzellklon einige μ L 0,05 %-iges Trypsin gegeben und der Klon durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren von der Petrischale abgelöst. Der Klon wurde dann mit Hilfe der Pipette in die 24-well Platte überführt und die enzymatische Wirkung des Trypsins durch Zugabe von 500 μ L Standardmedium, welches mit Hygromycin B versetzt war, gestoppt. Die Einzelzellklone wurden bis zu einer fast 100 %-igen Konfluenz in der 24-well Platte kultiviert und dann in eine Zellkulturflasche mit einer Wachstumsfläche von 12,5 cm² überführt. Die weitere Kultivierung der Zellen erfolgte wie unter 3.6 beschrieben. Das Selektionsantibiotikum wurde dem Medium solange hinzugesetzt, bis die Zellen mittels qualitativer PCR, Immunfluoreszenz und Transportmessungen auf das Vorhandensein des GOI und die funktionelle Expression des Zielproteins kontrolliert waren.

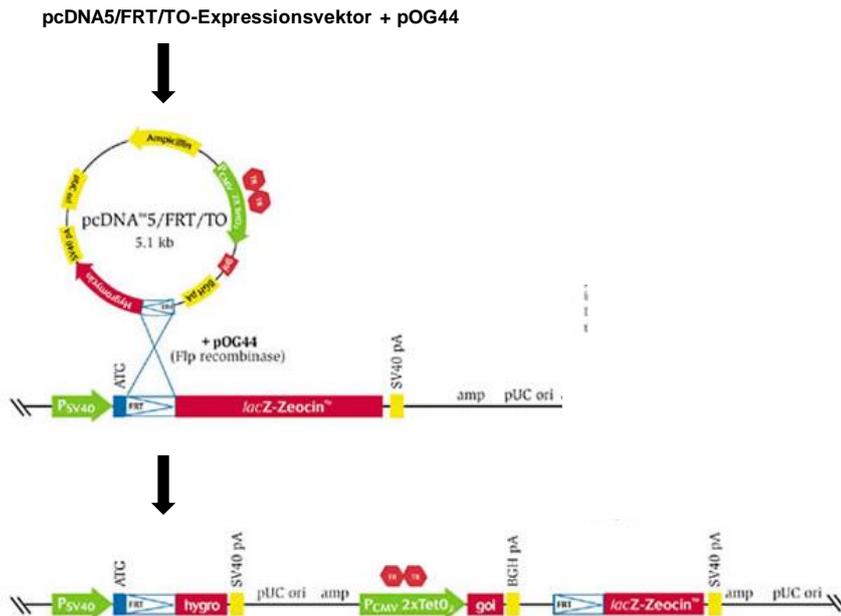


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der stabilen Transfektion mit dem Flp-In System.

Der Expressionsvektor mit dem *gene of interest* wird in das Genom der Flp-In Zellen über Rekombination an den *FRT sites* integriert. Die Rekombinase stellt hierbei das katalysierende Enzym dar, welches vom pOG44 kodiert wird und durch Co-Transfektion mit dem Expressionsplasmid in die Zellen eingebracht und anschließend von diesen exprimiert wird (Quelle: www.lifetechnologies.com).

3.7.3 Tetrazyklin-regulierte Proteinexpression

Für die Generierung der stabil transfizierten Zelllinien, die in dieser Arbeit Verwendung fanden, wurde das Flp-In T-REx-System von Invitrogen genutzt. Die Flp-In T-REx 293-Zelllinie weist neben der FRT site, auch das unter Kontrolle des CMV-Promotors stehende Tetrazyklin Repressor (*tetR*) Gen auf, das mit Hilfe des pcDNA6/TR-Plasmids in die Zellen stabil integriert wurde. Hierdurch exprimieren die Flp-In T-REx 293 Zellen konstitutiv den tetR. Dieser bindet in Form von 2 Homodimeren an die zwei *Tetracycline-Operator sites* ($TetO_2$), die zwischen dem CMV-Promotor und dem interessierenden Gen im eingebrachten Expressionsplasmid pcDNA5/FRT/TO sitzen. Dadurch kann die DNA-Polymerase das proteinkodierende Gen nicht ablesen und es findet keine Translation des Zielproteins statt. Bei der Zugabe von Tetrazyklin hingegen bindet dieses an die tetR-Homodimere, die dadurch ihre Konformation ändern und vom $TetO_2$ dissoziieren. Das GOI kann nun transkribiert werden. Die Tetrazyklin-Induktion sollte mindestens 24 h vor der funktionellen Untersuchung des Zielproteins stattfinden. Die optimale Tetrazyklinkonzentration zur Induktion der Proteinexpression beträgt 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Wenn Expressionsplasmide des T-REx-Systems in Zellen eingebracht wurden, die den tetR nicht bilden, war eine Tetrazyklin-Induktion nicht nötig, da diese Zellen das Protein konstitutiv exprimierten.

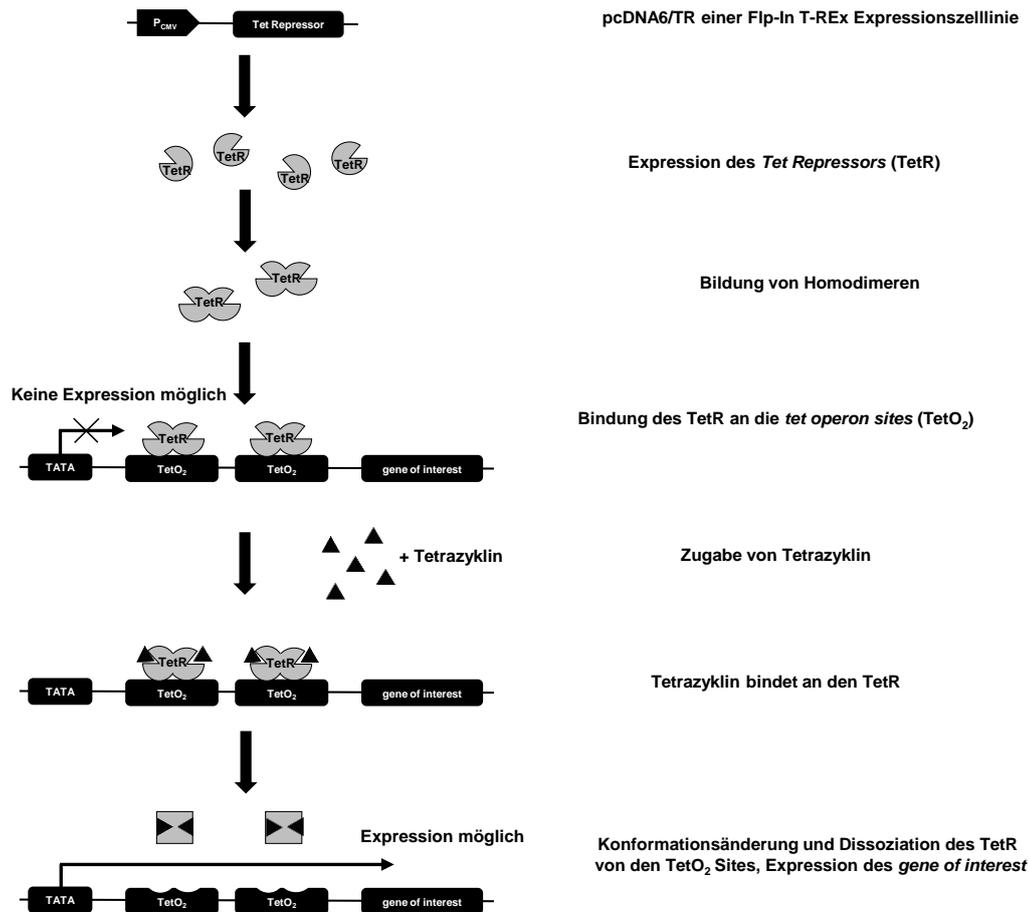


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung der Tetrazyklin-regulierten Genexpression in den Flp-In T-REx Zelllinien

Durch Einfügen des pcDNA6/TR-Vektors in die Flp-In-T-REx-Expressionszelllinie exprimiert die Zelllinie den Tetrazyklin-Repressor (TetR) konstitutiv. Dieser bindet als Homodimer an die *tet operon sites* (TetO₂), die dem interessierenden Gen vorangestellt sind, so dass die Polymerase das *gene of interest* nicht ablesen kann. Durch Zugabe von Tetrazyklin bindet dieses an den TetR, der daraufhin seine Konformation ändert und von den *tet operon sites* dissoziiert. Nun kann das *gene of interest* exprimiert werden. Schema modifiziert nach http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/flpintrex_man.pdf

3.8 Transportmessung an eukaryotischen Zellen mit radioaktiv-markierten Substanzen

Die funktionelle Charakterisierung der Membrantransporter erfolgte sowohl in stabil, wie auch in transient transfizierten Zellen. Für die Transportmessungen mit transient transfizierten Zellen wurden neben den GripeTite 293 MSR, auch CHO- und MDCK-Zellen verwendet. Für die Aufnahmestudien an stabil transfizierten Zellen wurden die generierten Flp-In-HEK293-Zelllinien genutzt. Die Proteinexpression wurde, sofern das verwendete Zellsystem es ermöglichte, mindestens 24 h, in der Regel aber 48 h vor dem Experiment durch die Zugabe von Tetrazyklin induziert. Bei den transient transfizierten Zellen wurde die Proteinexpression durch die Zugaben von 2 mM Natrium-Butyrat 24 h vor dem Experiment gesteigert.

Flp-In T-REx 293 Zellen (Flp-In-HEK293 Zellen), mit Leervektor transient transfizierte Zellen und untransfizierte Zellen dienten als Negativkontrollen.

3.8.1 Ansetzen der Messlösung und Vorbereitung der Zellen

Die Messlösung setzte sich aus der Substanz und dem jeweils verwendeten Transportpuffer (mit oder ohne Natrium) zusammen. Die Substanzmenge wurde durch zwei Anteile gebildet: einem radioaktiv-markierten und einem unmarkierten Anteil. Die entsprechende Menge der radioaktiv-markierten Stammlösung wurde in Transportpuffer gegeben und auf 37° C vorgewärmt. Die Kaltsubstanz wurde mit Hilfe einer Feinwaage abgewogen, in DMSO bei 37° C im Wasserbad gelöst und anschließend verwendet, um die Konzentration der Messlösung einzustellen. Da DMSO in hohen Konzentrationen zelltoxisch ist, wurde darauf geachtet, dass die maximale Endkonzentration an DMSO in der Messlösung weniger als 0,5 % betrug. Für Messungen in verschiedenen Transportpuffern oder Kinetikstudien mit unterschiedlichen Substanzkonzentrationen wurde eine höher konzentrierte Stammlösung angesetzt, die dann auf die einzelnen Messlösungen aufgeteilt und entsprechend verdünnt wurde.

Die Zellen wurden für die Radioaktivmessungen in 24-well Platten ausgesät. Die Messung fand statt, wenn die Zellen eine Konfluenz von 90 - 100 % erreicht hatten. Um die Handhabung der Platten während des Versuchs zu erleichtern und zeitgenaues Pipettieren und Stoppen zu ermöglichen, wurden die Platten mit Hilfe eines heißen Drahtes in Cluster oder einzelne wells geschnitten.

3.8.2 Aufnahmemessung

Vor der eigentlichen Messung wurden die Zellen zunächst 3 x mit vorgewärmten (37° C) PBS oder Natrium-freien Transportpuffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Equilibrierung mit 250 µL des jeweiligen Transportpuffers (Natrium-haltig, Natrium-frei) für 15 min. Hierzu wurde die 24-well Platte auf einer 37° C warmen Wärmeplatte auf einer Aluplatte positioniert, um einen gleichmäßigen Kontakt aller wells zur Wärmequelle herzustellen. Nach der Equilibrierung wurde die Transportmessung gestartet, indem der Transportpuffer abgezogen und 250 µL der vorgewärmten Messlösung auf die Zellen gegeben wurde. Mit Hilfe einer Stoppuhr wurde die Aufnahmezeit kontrolliert. Um den Transportversuch zu beenden, wurde die Messlösung abgekippt und die Zellen 5 x mit eiskaltem PBS gewaschen.

3.8.3 Flüssigszintillationsmessung

Nach der Aufnahmemessung wurden die Zellen lysiert. Hierfür wurden sie mit 400 µL Lysepuffer versetzt und über Nacht bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Das Lysat wurde aufgeteilt: 250 µL wurden in ein Minivial gegeben und mit 3 mL Szintillationsflüssigkeit gründlich gemischt, um im Anschluss die zellassoziierte Radioaktivität im Flüssigszintillationscounter zu ermitteln. Das restliche Lysat wurde für die Proteinbestimmung verwendet (siehe nachfolgendes Kapitel).

3.8.4 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte bei der Flüssigszintillationsmessung mit einer modifizierten Methode nach Lowry (Lowry et al. 1951). Die Reaktion beruht auf zwei Schritten. Der erste Schritt stellt eine Biuretreaktion dar. Hierbei bildet sich ein blau-violetter Komplex, der aus der Reaktion von Kupfer(II)-ionen mit Peptidbindungen hervorgeht. Im zweiten Schritt werden die zweiwertigen Kupferionen zu einwertigen Kupferionen reduziert. Letztere wiederum reduzieren das gelbe Folin-Ciocalteu-Reagenz, das im zweiten Schritt hinzugegeben wird, zu Molybdänblau. Die Intensität der Blaufärbung kann photometrisch bei 650 nm detektiert werden und dient der quantitativen Bestimmung des Proteingehaltes.

Hierfür wurden 3 x 20 µL des Zelllysats in die wells einer 96-well Platte pipettiert, mit 200 µL Lösung C gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor 40 µL Folinreagenz hinzugegeben wurden. Es folgte eine 2-stündige Inkubation bei Raumtemperatur, in der die Farbreaktion stattfand. Im Anschluss wurde die Extinktion bei 655 nm im ELISA-Reader gemessen. Neben den Proben wurde auch eine Standardreihe auf die 96-well Platte aufgetragen. Die Standardreihe setzte sich aus definierten Konzentrationen an Protein (0 - 800 µg) zusammen. Aus den Extinktionswerten der Standardreihe ergab sich mittels linearer Regression eine Eichgerade, die zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den Proben diente.

3.8.5 Auswertung der Aufnahmeversuche

Die Substanzmenge, die von den Zellen aufgenommen wurde, konnte, wie bei der Oozytenmessung (siehe Kapitel 3.5.4), unter Berücksichtigung des prozentualen Anteils der radioaktiv-markierten Substanz in der Messlösung und mit Hilfe substanzspezifischer Umrechnungsfaktoren berechnet werden. Zusätzlich wurde sie ins Verhältnis zur Proteinkonzentration der jeweiligen Probe gesetzt. Daher erfolgte die Angabe der aufgenommenen Substanzmenge in pmol/mg Protein. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des Programms *GraphPad Prism 5* graphisch dargestellt und statistisch ausgewertet.

3.9 Transportmessung an eukaryotischen Zellen mittels

Flüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie

Um die Funktion der Transportproteine zu charakterisieren, wurden Transportstudien mit radioaktiv-markierten Substanzen in stabil und transient transfizierten Zellen durchgeführt. Leider ist diese Methode in bestimmtem Maße limitiert, da nicht alle für diese Arbeit interessierenden Substanzen radioaktiv-markiert zur Verfügung standen. Aus diesem Grund wurde in Kooperation mit dem Labor von Herrn Professor Dr. Stefan A. Wudy, Abteilung für pädiatrische Endokrinologie und Diabetologie, Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen eine Methode entwickelt und etabliert, bei der die Aufnahme des intakten sulfatierten Steroidmoleküls in stabil transfizierte Zellen aus Zelllysaten mittels Flüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie (*liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS*) gemessen wird. Diese Methode bietet mehrere Vorteile. So können Substanzen, die nicht in radioaktiv-markierter Form verfügbar sind als Messsubstanz verwendet werden, ohne dass vorher die aufwändige Synthese der radioaktiv-gekoppelten Substanz durchgeführt werden muss. Ferner ist es mit LC-MS/MS möglich die Aufnahme des intakten Steroidmoleküls nachzuweisen. Bei der Verwendung radioaktiv-markierter Substanzen wird nur die Radioaktivität detektiert, nicht aber das Molekül selbst. Somit kann keine eindeutige Aussage bezüglich des Moleküls, das tatsächlich aufgenommen wurde, gemacht werden. Auch wird mit Hilfe der LC-MS/MS die Menge der aufgenommenen Substanz exakt bestimmt, wohingegen die transportierte Substanzmenge bei der Flüssigszintillationsmessung durch Berücksichtigung der verwendeten Standards und substanzspezifischer Umrechnungsfaktoren lediglich extrapoliert werden kann.

Für die Entwicklung und Etablierung der Methode wurden die stabil transfizierten Zelllinien SOAT-HEK293, NTCP-HEK293 und ASBT-HEK293 verwendet. Die Proteinexpression wurde 48 h vor dem Experiment durch die Zugabe von Tetrazyklin induziert. Nicht-induzierte Zellen sowie Flp-In-HEK293 Zellen dienten als Negativkontrollen.

3.9.1 Ansetzen der Messlösungen und Vorbereitung der Zellen

Die Messlösung setzte sich aus der unmarkierten Substanz und dem jeweils verwendeten Transportpuffer (mit oder ohne Natrium) zusammen. Die Substanz wurde mit Hilfe einer Feinwaage abgewogen und in DMSO oder Ethanol gelöst. Im Anschluss wurde sie mit der entsprechenden Menge Transportpuffer gemischt, um die gewünschte Konzentration der Messlösung zu erhalten. Aufgrund der zelltoxischen Eigenschaften der Lösungsmittel DMSO und Ethanol wurde darauf geachtet, dass der Anteil dieser an der Messlösung unter 0,5 % lag.

Wurden verschiedene Transportpuffer verwendet, wurde eine höher konzentrierte Stammlösung in Natrium-freien Transportpuffer angesetzt und diese dann auf die einzelnen Messlösungen aufgeteilt.

Die Zellen wurden wie für die Radioaktivmessungen in 24-well Platten ausgesät. Die Messung fand statt, wenn die Zellen eine Konfluenz von 90 - 100 % erreicht hatten. Die Handhabung der Platten während des Versuchs wurde erleichtert, indem die Platten mit Hilfe eines heißen Drahtes in Cluster oder einzelne wells geschnitten wurden.

3.9.2 Aufnahmemessung

Die Zellen wurden vor der eigentlichen Messung mit vorgewärmten (37° C) PBS oder Natrium-freien Transportpuffer 3 x gewaschen. Nach Equilibrierung mit 250 µL des jeweiligen Transportpuffers (Natrium-haltig, Natrium-frei) für 15 min, wurde der Puffer abgezogen und 250 µL der vorgewärmten Messlösung für eine definierte Zeitspanne auf die Zellen gegeben. Die Aufnahmestudie wurde gestoppt durch Abkippen der Messlösung und 5-maliges Waschen mit eiskaltem PBS.

3.9.3 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mittels BCA-Protein-Assay. Hierfür wurden die Zellen mit 400 µL ddH₂O versetzt und durch 3 Frier-Tau-Zyklen (- 80° C, 37° C) lysiert. Mit einem Teil des Lysats wurde der BCA-Protein-Assay wie unter 3.11.4 beschrieben durchgeführt. Das restliche Lysat wurde auf Eis zur Analyse in das Labor von Herrn Professor Wudy verbracht.

3.9.4 Flüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS)

Die Flüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS) bietet den Vorteil, dass eine komplexe Probe zunächst mit Hilfe der Chromatographie aufgetrennt wird und anschließend die interessierende Substanz (der Analyt) in der Massenspektrometrie identifiziert und/oder quantifiziert werden kann.

In dieser Arbeit wurden die Zelllysate der Transportmessungen im Labor von Herrn Professor Wudy untersucht. Sie wurden dafür mittels Flüssig-Phasen-Extraktion aufgearbeitet. Nach ihrer Auftrennung durch die Flüssigkeitschromatographie wurde der jeweilige Analyt mittels Elektrospray-Ionisation (ESI) ionisiert, im *Triple-Quadrupol mass spectrometer (TSQ, Quantum Ultra, Thermo Fischer Scientific, Dreieich)* seinem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) entsprechend selektiert und anschließend detektiert (Galuska et al. 2013).

3.9.5 Auswertung der Aufnahmeversuche

Durch mathematische Berechnungen, bei denen sowohl die im Rahmen der LC-MS/MS-Analyse verwendeten Deuterium-Standards, als auch die Messlösung mit Substanz berücksichtigt wurde, konnte die Menge des Analyts im Zelllysate exakt in ng/mL Zelllysate bestimmt werden. Das Ergebnis der LC-MS/MS wurde anschließend ins Verhältnis zum Proteingehalt der lysierten Zellen gesetzt und graphisch als fmol aufgenommene Substanz/ μ g Protein mit Hilfe des Programms *Graph Pad Prism 5* dargestellt und statistisch bewertet.

3.10 Immunfluoreszenz

In dieser Arbeit wurden abhängig vom Protein entweder die native Form (SOAT, SOAT-Mutanten) oder die V5-His-markierten Proteine (OATP6A1, OATP1C1, OSCP1) mittels indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen. Hierzu wurden verschiedene Primärantikörper verwendet, die nachfolgend aufgelistet sind (siehe auch Seite 66).

Primärantikörper	Epitop	Spezies	Hersteller
anti-V5	GKPIPPLLGLDST	Maus, monoklonal	Invitrogen
anti-SOAT ₂₋₁₇	RANCSSSSACPANSSE	Kaninchen, polyklonal	Eurogentec
anti-SOAT ₂₅₀₋₂₆₅	QSWQRCRTISLETGAQ	Kaninchen, polyklonal	Eurogentec
anti-SOAT ₃₄₉₋₃₆₄	EEGAIPTGPPGPMDC	Kaninchen, polyklonal	Eurogentec
anti-SOAT ₃₁₁₋₃₇₇	C-Terminus	Kaninchen, polyklonal	Eurogentec

Die Primärantikörper wurden mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundärantikörpern nachgewiesen. Die Färbung des Zellkerns erfolgte mit DAPI, einem Farbstoff der sich in die Furchen der DNA-Stränge einlagert und somit in intakten Zellen den Zellkern nachweist.

3.10.1 Herstellung des SOAT₃₁₁₋₃₇₇-Antikörpers

Der Antikörper SOAT₃₁₁₋₃₇₇ wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) generiert. Im Institut für Veterinärpharmakologie und -toxikologie wurde zunächst das Epitop zur Immunisierung mit Hilfe des *Cherry Codon T7 expression kits* für chemisch

kompetente Zellen (Delhi Genetics über Eurogentec) hergestellt. In diesem Kit werden sowohl der *pSCherry2*-Vektor für die Klonierung des interessierenden Gens, als auch die kompetenten *E. coli* Stämme, die für die Klonierung und die Expression des Proteins benötigt werden, zur Verfügung gestellt. Das interessierende Gen kann bei diesem System so in den *pSCherry2*-Vektor kloniert werden, dass es unter Kontrolle des T7-Promotors exprimiert wird und das translatierte Protein das Cherry-Tag an seinem N-terminalen Ende trägt. Die Sequenz des Cherry-Tags ist bereits im *pSCherry2*-Vektor integriert und codiert die Bindungsstelle des Häms im Cytochrom. Wenn die Bakterien das *pSCherry2*-Plasmid aufnehmen und das Fusionsprotein aus Cherry-Tag und interessierendem Protein exprimieren, kann der Farbstoff Häm gebunden werden. Dies führt zu einer Rotfärbung der Bakterienkolonien. Somit ist das Fusionsprotein während der verschiedenen Phasen (Proteinexpression, -extraktion und -purifikation) makroskopisch sichtbar und mittels Absorptionsmessung im Photometer bei einer Wellenlänge von 413 nm quantitativ bestimmbar. Da der *pSCherry2*-Vektor ferner eine Enterokinase K-Schnittstelle aufweist, ist es möglich, das Cherry-Tag vom Fusionsprotein mittels Restriktionsverdau zu trennen. Um nun das Epitop für die Immunisierung der Kaninchen herzustellen, wurde der SOAT-C-Terminus in den *pSCherry2*-Vektor kloniert und das Fusionsprotein mit Hilfe des Expressionsstamm *E. coli* SE1 (Delhi Genetics über Eurogentec) exprimiert. Hinter der Sequenz, die den C-Terminus des SOAT-Proteins codiert, wurde ein Stoppcodon eingefügt, um die Translation des nachfolgenden His-Tags zu verhindern. Es folgte die Aufreinigung des Fusionsproteins über Sepharose-Säulen des *Strep-tag Starter Kits 3C* (IBA, Göttingen). Im Anschluss daran wurde der Restriktionsverdau mit der *Enterokinase K* durchgeführt, um das Cherry-Tag vom SOAT-C-Terminus zu trennen. Dieser wurde dann mit dem ungeschnittenen Cherry-Tag-C-Terminus Protein gemischt und von Eurogentec zur Immunisierung der Kaninchen verwendet. Die Generierung des Immunisierungspeptids wurde maßgeblich von Dr. Jörg Alber durchgeführt. Es wurde sowohl das ungeschnittene wie auch das geschnittene SOAT-C-Terminus-Protein verwendet, da es aufgrund der kurzen Länge des SOAT-C-Terminus schwierig war, ausreichende Mengen des Epitops herzustellen und die Antigenität des Cherry-Tags am N-terminalen Ende des Epitops als vernachlässigbar galt. Die Kaninchenserum wurden auf ihre Antigenität mit Hilfe der Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay Analysis (ELISA) gegen den SOAT-C-Terminus überprüft. Die beiden Kaninchen mit der stärksten Immunreaktion auf das Immunisierungs-Epitop wurden zur Antikörpergewinnung verwendet. Die beiden Seren wurden einer Affinitätsreinigung unterzogen und zur weiteren Verwendung von Eurogentec zur Verfügung gestellt.

3.10.2 Indirekte Immunfluoreszenz mit dem SOAT₃₁₁₋₃₇₇-Antikörper

Für die indirekte Immunfluoreszenz wurden die entsprechenden SOAT-HEK293 Zellen (SOAT-Wildtyp-Zellen und SOAT-Mutanten-Zellen) in 24-well Platten mit Deckgläschen ausgesät. Zur besseren Adhärenz der Zellen waren die Platten vor dem Aussäen 30 min mit Poly-L-lysin beschichtet worden. Die Proteinexpression wurde mit Tetrazyklin mindestens 24h vor Durchführung der Immunfluoreszenz induziert und die Zellen bis zu einer Konfluenz von 70 - 80 % kultiviert. Zellen ohne Tetrazyklin-Induktion fungierten als Negativkontrolle. Für die Immunfluoreszenz wurde das Zellmedium abgezogen und die Zellen 1 x 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend folgte die Fixation der Zellen mit 2 %-igem phosphatgepuffertem Paraformaldehyd (PFA) für 15 min. Die Zellen wurden danach 2 x 5 min mit PBS gewaschen, bevor eine 5-minütige Inkubation mit Puffer A erfolgte. Im Anschluss wurden die Zellen mit dem Detergens 0,2 % Triton X-100 für 5 min lang permeabilisiert. Es folgte die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen. Hierzu wurden die Zellen 30 min mit einer Blockierlösung inkubiert, die sowohl bovines Serumalbumin (BSA), als auch Ziegen Serum enthielt. Im nächsten Schritt folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper. Dieser wurde in der Konzentration 1:100 der Blockierlösung zugesetzt und entweder 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4° C inkubiert. Der Primärantikörper wurde abgezogen, die Zellen 3 x 5 min mit PBS gewaschen und der Sekundärantikörper Ziege Alexa Fluor 488-gekoppelt anti-Kaninchen (1:800) in Blockierlösung auf die Zellen gegeben. Nach einer 1-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen zunächst 3 x 5 min mit PBS gewaschen, anschließend 5 min mit DAPI/Methanol (1:5.000) inkubiert und final mit Methanol, ebenfalls für 5 min, gewaschen und fixiert. Nachdem die Zellen luftgetrocknet wurden, konnten sie mit ProLong Gold Antifade (Invitrogen) auf Objektträgern eingedeckelt werden. Nach einer 24-stündigen Trocknungsphase bei Raumtemperatur wurden die Objektträger bei 4° C lichtgeschützt aufbewahrt. Unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers wurden detektiert, indem SOAT-HEK293-Zellen nur mit Blockierlösung und Sekundärantikörper inkubiert wurden.

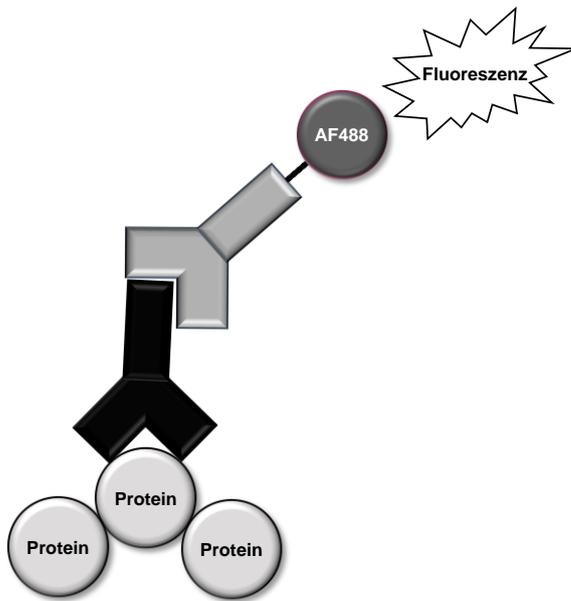


Abbildung 3.6: Prinzip des Proteinnachweises mit Hilfe von Fluoreszenz-markierten Antikörpern.

Die Proteine werden vom Primärantikörper detektiert. An diesen bindet der Fluoreszenz-gekoppelte Sekundärantikörper. Nach Anregung im Fluoreszenzmikroskop wird das Fluoreszenzsignal sichtbar und ermöglicht die Lokalisation des Proteins in Zellen oder Geweben bzw. ihren jeweiligen Substrukturen.

3.10.3 Indirekte Immunfluoreszenz mit dem Maus anti-V5-Antikörper

Für die Lokalisation der Transportproteine über die Detektion des V5-Epitops wurde die Immunfluoreszenz nach demselben Protokoll wie unter 3.10.2 durchgeführt. Allerdings dienten hierbei der Maus anti-V5 (1:5.000, Invitrogen) als Primärantikörper und der Ziege Alexa Fluor 488-gekoppelte anti-Maus (1:800) als Sekundärantikörper.

Für die Immunfluoreszenz an transient transfizierten Zellen wurden GripeTite 293 MSR-Zellen ausgesät. Aufgrund des *Macrophage Scavenger Receptors (MSR)* weisen diese Zellen eine hohe Adhärenz an Oberflächen auf, so dass auf die Beschichtung der Deckgläschen mit Poly-L-lysin verzichtet werden konnte. Die Zellen wurden mit den V5-His-Transporter-Konstrukten oder dem pcDNA5/FRT/V5-His-Leervektor (Negativkontrolle) transfiziert.

3.10.4 Indirekte Immunfluoreszenz mit dem SOAT₂₋₁₇-Antiserum

Das SOAT₂₋₁₇-Antiserum bietet die Möglichkeit, SOAT über das N-terminale Ende des Proteins zu detektieren (Döring 2009). Hierfür wurden SOAT-HEK293 Zellen (SOAT-Wildtyp- und -Mutanten-Zellen) auf Deckgläschen, die mit Poly-L-lysin beschichtet wurden, in 24-well Platten bis zu einer Dichte von 80 - 90 % kultiviert. Mittels Tetrazyklin-Zugabe wurde die Proteinexpression induziert. Nicht-induzierte Zellen dienten als Negativkontrolle. Für die Immunfluoreszenz wurde das Medium abgezogen, die Zellen 3 x 5 min mit PBS gewaschen und anschließend 1 h mit dem SOAT₂₋₁₇-Antiserum in der Verdünnung 1:10 in PBS bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut 3 x 5 min mit PBS gewaschen

und im Anschluss der Sekundärantikörper Ziege Alexa Fluor 488-gekoppelt anti-Kaninchen (1:800) in PBS auf die Zellen gegeben. Nach einer 1-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Sekundärantikörper abgezogen und die Zellen nach 3-maligem Waschen mit PBS mit DAPI/PBS (1:5.000, 5 min) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden kurz luftgetrocknet und im Anschluss mit *ProLong Gold Antifade* (Invitrogen) auf Objektträgern eingedeckelt.

3.10.5 Bestimmung der indirekten Fluoreszenz im Photometer

Für die Bestimmung der Stärke des Fluoreszenzsignals im Photometer wurden die Zellen nicht auf Deckgläschen kultiviert, sondern in Poly-L-lysin beschichteten 24-well Platten. Die Zellen wurden prozessiert wie unter 5.11.4 beschrieben, allerdings erfolgte die Färbung der Zellkerne mit DAPI/PBS (1:5.000, 5 min). Der finale Waschschrift wurde anstatt mit Methanol mit PBS für 5 min durchgeführt. Im Anschluss wurden die Zellen mit 400 µL ddH₂O versetzt und über drei Frier-Tau-Zyklen lysiert. Das Lysat wurde aufgeteilt: Für die Fluoreszenzmessung wurden 3 x 100 µL in eine schwarze 96-well Mikrotiterplatte (Greiner Bio One) pipettiert und die Fluoreszenzstärke des Lysats im *GloMax-Multi+ Detection System* (Promega) bei einer Wellenlänge von 520 nm gemessen. Das restliche Zelllysate wurde zur Proteinbestimmung verwendet. Diese wurde mit dem BCA-Assay durchgeführt (siehe Kapitel 3.11.4). Anschließend wurde die Fluoreszenzstärke/mL in Bezug zum Proteingehalt/mL gesetzt und mit Hilfe des Programms *Graph Pad Prism 5* dargestellt und statistisch bewertet.

3.10.6 Mikroskopie

Die Aufnahme der Fluoreszenzbilder erfolgte mit der Kamera SW Kamera DFC 340 FX des Fluoreszenzmikroskops Leica DM5500B. Die Auswertung und Bearbeitung der Bilder wurde mit dem Programm *LAS AF6000* mit *3D Deconvolution* von Leica Microsystems durchgeführt.

3.11 Western Blot

Der Western Blot diente dazu, die Transportproteine SOAT, OATP6A1-V5His, OATP1C1-V5His und OSCP1-V5His in den stabil transfizierten HEK293 Zellen nachzuweisen und ihre jeweilige Größe zu kontrollieren. Die Detektion erfolgte mit den Primärantikörpern anti-SOAT₃₁₁₋₃₇₇ (Eurogentec) und Maus anti-V5 (Invitrogen). Zur Kontrolle, dass die aufgetragenen Proben die gleiche Menge an Zellproteinen aufwiesen, wurde zusätzlich das Protein GAPDH mittels Ziege anti-GAPDH (1:25000, Sigma-Aldrich) nachgewiesen. Als Negativkontrollen wurden Zellen, die nicht mit Tetrazyklin-induziert waren (Nachweis von SOAT) und die Flp-In-HEK293 Zellen ohne Insert (Nachweis von SOAT, OATP6A1-V5-His,

OATP1C1-V5-His und OSCP1-V5-His) verwendet. Ferner wurden unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers durch fehlende Inkubation mit dem Primärantikörper visualisiert. Die Spezifität des Primärantikörpers wurde im Falle des anti-SOAT₃₁₁₋₃₇₇-Antikörpers durch Vorinkubation des Antikörpers mit dem Immunisierungspeptid (Peptidblockierung) überprüft.

3.11.1 Proteinextraktion

Für die Proteinextraktion aus Zellen wurden verschiedene Verfahren angewandt, da zytosolische Proteine in der Regel leichter zu extrahieren sind als membranassoziierte Proteine und im Rahmen dieser Dissertation die am besten geeignete Methode für die jeweils verwendete Zelllinie etabliert werden sollte. Ferner war die Wahl der Extraktionsmethode abhängig von der Fragestellung und der weiteren Prozessierung der Proben. Der *RIPA-Puffer* (Sigma-Aldrich) wurde gewählt, da er sehr gut geeignet ist, sowohl Gesamtzell-Extrakte zu gewinnen, als auch membrangebundene Proteine in Lösung zu bringen. Der Vorteil des *Proteo Extract Native Membrane Protein Extraction Kit* (Calbiochem) besteht darin, zytosolische Proteine von den membranassoziierten Proteinen zu trennen, so dass die Proteine einer oder beiden Fraktionen zugeordnet werden können. Für Proben, die gleichzeitig der RNA- oder DNA-Gewinnung dienen, wurde *TriReagent* (Sigma-Aldrich) verwendet.

3.11.2 Proteinextraktion mit RIPA-Puffer

Für die Proteinextraktion mit *RIPA-Puffer* (*Radioimmunoprecipitation assay buffer*, Sigma-Aldrich) wurden die Zellen in Petrischalen (Ø 10 cm) ausgesät und bis zu einer Dichte von 100 % kultiviert. RIPA-Puffer wirkt denaturierend und enthält mehrere Detergentien (SDS, Natrium-Deoxycholat, NP40/Triton X-100), die vor allem geeignet sind, Zell- und Kernmembranen aufzulösen und somit auch die darin enthaltenen Proteine zu extrahieren. Bei den SOAT-HEK293 Zellen wurde die Proteinexpression durch Zugabe von Tetrazyklin induziert. Als Negativkontrollen dienten die nicht-induzierten SOAT-HEK293 Zellen und die Flp-In-HEK293 Zellen ohne Insert. Für die Proteinextraktion wurde zunächst das Zellmedium abgezogen. Es schlossen sich 3 Waschschrte mit jeweils 10 mL PBS an. Anschließend wurden je Petrischale 400 µL *RIPA-Puffer* und 2 µL *Protease-Inhibitor* (Fermentas) zugesetzt. Die Petrischale wurde geschwenkt, um den RIPA-Puffer gleichmäßig zu verteilen, und anschließend 15 - 20 min auf eisgekühlten Aluplatten inkubiert. Während dieser Inkubationsphase wurden die Zellen mehrmals durch vorsichtiges Klopfen von der Petrischale gelöst. Der *RIPA-Puffer* und das Zelllysat bildeten ein schleimiges Gemisch, welches mittels Zellschaber von der Oberfläche der Petrischale abgelöst und in ein vorgekühltes 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt wurde. Das Zell-*RIPA-Puffer*-Gemisch wurde dann vorsichtig mit

Hilfe einer 2 mL Spritze und einer aufgesetzten Kanüle (*Sterican Kanüle*, 20 G x 1 ½", Länge 40 mm, Gr.1, Braun, Melsungen) durch Auf- und Abpipettieren mechanisch zerkleinert. Anschließend folgte eine 15-minütige Inkubation auf Eis, bevor der Zelldetritus durch Zentrifugation (15 min, 17.000 g, 4° C) von den im Überstand befindlichen Proteinen getrennt wurde. Der Überstand wurde in vorgekühlte 1,5 mL Eppendorfgefäße überführt und der Proteingehalt mit Hilfe des BCA-Assays ermittelt.

3.11.3 Proteinextraktion mit *Proteo Extract Native Membrane Protein Extraction Kit*

Für die Extraktion der Proteine mit dem *Proteo Extract Native Membrane Protein Extraction Kit* (Calbiochem) wurden die Zellen in einer 6-well Schale kultiviert und die Proteinexpression gegebenenfalls mit Tetrazyklin induziert. Auch hier wurde zuerst das Zellmedium abgezogen, die Zellen mit PBS gewaschen und im Anschluss mit einem Zellschaber abgelöst und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt, bevor sie bei 400 g in 10 min bei 4° C pelletiert wurden. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 0,8 mL Waschpuffer resuspendiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 400 g für 10 min bei 4° C. Danach wurde der Überstand erneut verworfen und der vorherige Waschschrift wiederholt. Im Anschluss wurden die löslichen Proteine extrahiert, indem 0,8 mL *Extraktionspuffer I* und 4 µL *Protease Inhibitor Cocktail* zum Zellpellet hinzugegeben wurden. Nach Resuspension des Pellets erfolgte das langsame, kontinuierliche Invertieren auf einem Drehrad bei 4° C für 15 min. Durch Zentrifugation bei 22.000 g und 4° C für 15 min wurde der Überstand, der die löslichen Proteine enthielt, von dem Zellpellet getrennt. Nachdem der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert wurde, konnte das Pellet mit 0,4 mL *Extraktionspuffer II* und 4 µL *Protease Inhibitor Cocktail* vorsichtig resuspendiert und erneut auf dem Drehrad (30 min, 4° C) inkubiert werden. Es folgte die Zentrifugation bei 22.000 g für 15 min bei 4° C. Zum Schluss wurde der Überstand (mit den membranassoziierten Proteinen) in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und die Proteingehalte der beiden Fraktionen mit dem BCA-Assay bestimmt.

3.11.4 Proteinbestimmung mittels BCA Protein Assay Kit

Der BCA-Protein-Assay basiert auf der Reduktion zweiwertiger Kupfer-Ionen (Cu^{2+}) durch ihre Interaktion mit Proteinen einer Probe in alkalischer Lösung zu einwertigen Kupfer-Ionen (Cu^+), die dann nach Zugabe von Bicinchoninsäure (engl. *bicinchoninic acid*, BCA, 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure) mit dieser einen Chelat-Komplex bilden, der zu einer konzentrationsabhängigen Violettfärbung des Reaktionsansatzes führt. Die komplexierten, monovalenten Kupfer-Ionen sind im Photometer bei 562 nm detektierbar. Zusätzlich zu der

Absorption der Proben wird auch die Absorption einer Standardreihe mit definierten Proteinmengen (0 - 1000 µg) gemessen. Durch die lineare Regression der Extinktion der Standardreihe wird eine Eichgerade berechnet, aus der die Proteinkonzentration der Proben abgeleitet werden kann. Dies ermöglicht eine quantitative Aussage über den Proteingehalt der Proben. Ein weiterer Vorteil der Methode besteht darin, dass sie durch die Anwesenheit zahlreicher chemischer Verbindungen und Detergenzien nicht maßgeblich beeinflusst wird.

In dieser Arbeit wurde für die Proteinbestimmung das *BCA Protein Assay Kit* von Novagen verwendet. Dieses Kit enthält zum einen die *BCA-Solution* mit der Bicinchoninsäure in 0,1 M NaOH, zum anderen 4 % Kupfersulfat (*cupric sulfate*) und einen BSA-Standard zur Erstellung der Standardreihe.

Die Proteinbestimmung wurde auf einer 96-well Platte durchgeführt. Zunächst wurden 25 µL jeder Probe in ein well vorgelegt. Dann wurden 200 µL *BCA-Solution* und 4 µL 4 % Kupfersulfat hinzugefügt. Die Platte wurde mit einer Adhäsionsfolie verschlossen und für 30 s auf einem Plattenschüttler gemischt. Die Farbentwicklung erfolgte während der 30-minütigen Inkubation im Wärmeschrank bei 37° C. Nach Abkühlen der Platte wurde die Absorption bei 570 nm im Photometer gemessen. Bei jeder Probe wurde eine dreifach Bestimmung des Proteingehaltes durchgeführt. Zusätzlich zu den Proben wurde eine Standardreihe auf die 96-well Platte aufgetragen, die der Erstellung der Eichgeraden diente, aus der der Proteingehalt der einzelnen Probe extrapoliert werden konnte.

3.11.5 Gellauf und Blotting

Die Auftrennung der Proteine erfolgte auf einem SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PAGE). Hierzu wurden 35 µg Protein der Zellysate 1:4 mit 4 x *Lämmli-Puffer* gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Zusätzlich wurden 5 µL *Protein Ladder* zur Visualisierung der Protein-Separierung und des erfolgreichen Blottens, sowie 5 µL *Roti Mark Western Marker* (Roth) zur exakten Größenbestimmung aufgetragen. Letzterer gibt nach Inkubation der geblotteten Membran mit *Roti Lumin I* und *II* (Roth) Chemilumineszenzsignale ab, die auf dem ECL-Film direkt detektierbar sind. Die Auftrennung der Proteine erfolgte auf einem 8 %-igen SDS-PAGE über Nacht bei 50 V. Nach Entfernen des Sammelgels wurden die Proteine mit Hilfe des *semi-dry* Blotting-Verfahrens auf die *Hybond ECL Nitrocellulose Membran* (GE Healthcare) geblottet. Hierzu wurden zunächst die Filterpapiere, die Nitrocellulosemembran und das SDS-PAGE mit den drei verschiedenen Transferpuffern equilibriert (siehe **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Die Transferpuffer stellen ein elektrisch leitendes Medium dar, so dass die Proteine in Lösung gehalten werden und ihre Bindung an die Membran nicht behindert wird. Da sich die Transferpuffer vom Elektrophoresepuffer unterscheiden, muss das Gel im Transferpuffer equilibriert werden. Die Transferpuffer enthalten Methanol. Dies ist notwendig

für die effiziente Bindung der Proteine an die Membran. Da Methanol eine Schrumpfung des Gels hervorrufen kann, ist die vorangehende Equilibrierung des Gels im Transferpuffer obligatorisch. Ferner wird das SDS während der Equilibrierung entfernt, was zu einer besseren Bindung der Proteine an die Nitrocellulosemembran führt. Um ein besseres Blotting-Ergebnis zu erzielen, wurde mit einem diskontinuierlichen Transferpuffersystem gearbeitet. Es wurden ein konzentrierter und ein einfacher Anodenpuffer eingesetzt, die aber einen identischen pH-Wert aufwiesen. Ihre Aufgabe bestand darin, die an der Anode (+) im Überschuss gebildeten Protonen zu neutralisieren. An der Kathodeseite (-) hingegen wurde ein Kathodenpuffer verwendet, der einen niedrigeren pH-Wert als die anderen beiden Puffer hat, da er Säure enthält. Die negativ geladenen Ionen der Säure wandern nun als sogenanntes „trailing ion“ hinter den Proteinen her durch das Gel in die Membran und begrenzen so die Proteinfront. Dadurch wird der Proteintransfer in die Membran effizienter.

Tabelle 3.1: Equilibrierungsschema der Blotting-Komponenten

Transferpuffer	Anzahl Filterpapiere	SDS-PAGE oder Nitrocellulosemembran
Konzentrierter Anodenpuffer	3 Stk.	-
Anodenpuffer	3 Stk.	Nitrocellulosemembran
Kathodenpuffer	3 Stk.	SDS-PAGE

Die Komponenten des *semi-dry*-Blots wurden im *Perfect Blue „Semi-Dry“-Elektroblotter* (PeqLab) wie in Abbildung 3.7 gezeigt aufgebaut.

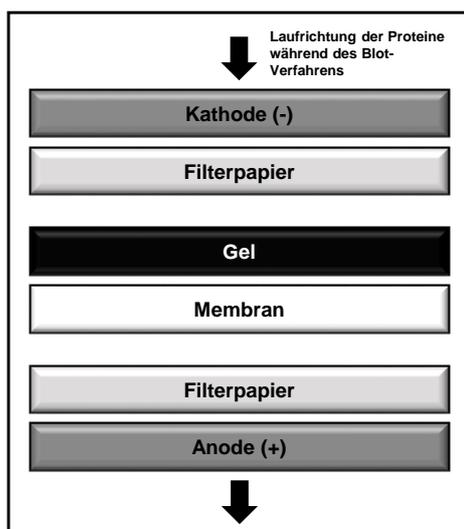


Abbildung 3.7: Schematischer Aufbau der Blotting-Kammer

Mit einem 50 mL Reaktionsgefäß wurden vorsichtig eventuell vorhandene Luftblasen entfernt, indem das Gefäß über das Gelsandwich gerollt wurde. Überschüssiger Transferpuffer wurde anschließend vom Blotter entfernt. Der Blot erfolgte bei 1,5 mA/cm für 2 h. Durch die Übertragung des vorgefärbten Proteinmarkers konnte überprüft werden, ob der Blot erfolgreich war. Zusätzlich wurde die Membran mit Ponceau S-Lösung (Sigma-Aldrich) 5 min inkubiert, um die geblotteten Proteine durch die reversible Bindung des Azofarbstoffes an die positiv geladenen Aminogruppen der Proteine sichtbar zu machen. Anschließend wurde das Ponceau S durch Waschen mit TBS-T wieder entfernt.

3.11.6 Absättigung und Antikörper-Inkubation der Membran

Die Membran wurde für 1 h bei Raumtemperatur in Blockierlösung (10 % Milchpulver in TBS-T) auf dem Taumler geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurde die Blockierlösung abgezogen, der Primärantikörper in Blockierlösung hinzugefügt und die Membran 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4° C inkubiert. Als Primärantikörper wurden folgende Antikörper eingesetzt:

Name	Hersteller	Verwendete Konzentration	Detektiertes Protein
anti-SOAT ₂₋₁₇	Eurogentec	1:10	SOAT
anti-SOAT ₂₅₀₋₂₆₅	Eurogentec	1:50	SOAT
anti-SOAT ₃₄₉₋₃₆₄	Eurogentec	1:50	SOAT
anti-SOAT ₃₁₁₋₃₇₇	Eurogentec	1:100	SOAT
anti-mSoat ₃₂₉₋₃₄₄	Eurogentec		SOAT, mSoat
anti-V5	Invitrogen	1:5.000	OATP6A1-V5His, OATP1C1-V5His, OSCP1-V5His
anti-GAPDH	Sigma-Aldrich	1:25.000	GAPDH

Am nächsten Tag wurde die Membran 3 x für 5 min, 1 x für 10 min und 2 x für 5 min mit TBS-T gewaschen, bevor der Sekundärantikörper in Blockierlösung für 1 h bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben wurde. Als Sekundärantikörper dienten der Cappel Peroxidase Ziege anti-Kaninchen (1:5000, MP Biomedicals), der ZyMax Kaninchen anti-Ziege HRP Konjugat (1:5000, Invitrogen) und HRP Western Blot Anti-Maus IgG Antikörper (1:20000, Rockland). Dem sekundären Antikörper wurde *RotiMark Western HRP-Konjugat* (Roth) in der Verdünnung 1:5000 hinzugefügt, um den Größenmarker auf dem ECL-Film sichtbar zu machen. Nach Abziehen des Sekundärantikörpers, wurde die Membran mit TBS-T 3 x 5 min,

1 x 10 min und 2 x 5 min gewaschen, bevor die Detektion der immunmarkierten Proteine in der Dunkelkammer erfolgte.

3.11.7 Detektion

Für die Detektion wurden zunächst *Roti-Lumin I* und *II* im Verhältnis 1:1 gemischt und 5 min präinkubiert, bevor das Gemisch so auf die Membran aufgetragen wurde, sodass diese gleichmäßig bedeckt war. Nach einer 1-minütigen Einwirkzeit, wurde das Roti-Lumin-Gemisch entfernt und die Membran in eine durchsichtige Folie eingeschweißt. Dies ist wichtig, da so verhindert wird, dass die auf der Membran verbliebenen Roti-Lumin-Reste den ECL-Film benetzen. In der Dunkelkammer erfolgte dann die Detektion der immunmarkierten Proteine. Hierfür wurde die eingeschweißte Membran in einer Röntgenkassette auf einen *Amersham Hyperfilm ECL-Film* (GE Healthcare) gelegt. Die Umsetzung des Roti-Lumins (Luminol) durch die *Horseradish peroxidase* (HRP) des Sekundärantikörpers führt zur Freisetzung von Chemilumineszenzsignalen, die den Film belichten.

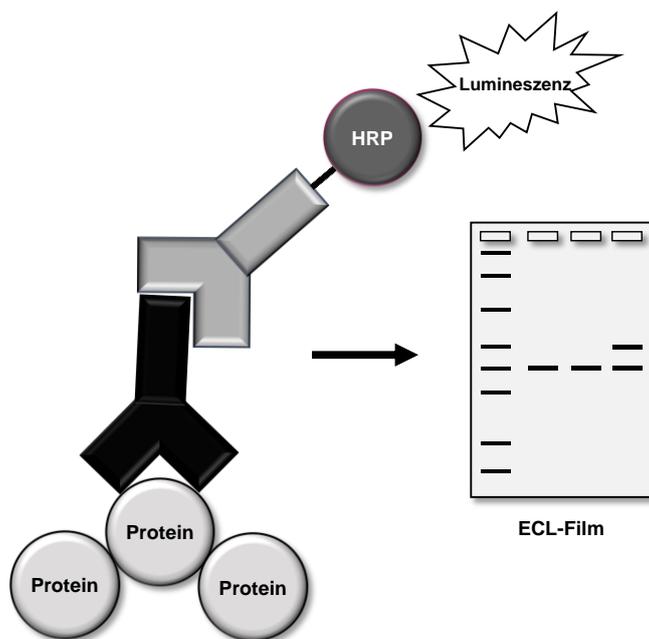


Abbildung 3.8: Prinzip des Proteinnachweises mit Hilfe von HRP-markierten Antikörpern in der Western Blot-Analyse.

Das an der Nitrocellulosemembran fixierte Protein wird vom primären Antikörper (schwarz, Y) erkannt. Der Sekundärantikörper (grau, Y) detektiert den gebundenen Primärantikörper. Am Sekundärantikörper ist die *Horseradish Peroxidase* (HRP) gekoppelt, die das Substrat Luminol unter Freisetzung von Lumineszenz umsetzt. Dieses wird in der Dunkelkammer auf dem ECL-Film als schwarze Bande visualisiert.

Die Belichtungszeit wurde je nach Signalstärke des Proteins gewählt und gegebenenfalls angepasst und betrug zwischen 1 und 10 min. Nach der Exposition wurde der Film für 3 min im Entwicklerbad *Rodinal B & W Developer* (Agfa) geschwenkt, bevor die Reaktion durch eine 60-sekündige Inkubation mit 2 %-iger Essigsäure gestoppt wurde. Anschließend wurden die

Signale im *Hypam Schnellfixierer* (Ilford) für ca. 5 min fixiert. Nachdem der Film gewässert und getrocknet war, erfolgte die Begutachtung und Auswertung der Signale. Die Bestimmung der Proteingröße wurde mit Hilfe des Roti Mark Western Markers vorgenommen.

3.11.8 Densitometrische Auswertung der Western Blot Analyse

Im Rahmen der Untersuchung der SOAT-Polymorphismen wurde das Verhältnis der jeweiligen Gesamtproteinmengen der SOAT-Varianten analysiert. Hierfür wurden die Western Blots densitometrisch ausgewertet. Die Beurteilung konnte entweder anhand eines eingescannten Blots erfolgen oder mit Hilfe der *Image Station 440CF* (Kodak, Rochester, NY, USA), bei dem die Nitrocellulosemembran nach Hinzufügen des Roti-Lumin-Gemisches und einer 1-minütigen Wartezeit über einen Zeitraum von 1,5 min fotografiert wurde. Anschließend erfolgte die Auswertung mit Hilfe der Software *Paintshop Pro Photo X2* am PC. Hierzu wurden die interessierenden Bereiche markiert und ihre Fläche in Pixeln bestimmt. Die für den ausgewählten Bereich vom Programm berechnete mittlere Intensität wurde um die Hintergrundintensität korrigiert und mit der Fläche multipliziert. Anschließend wurde die gemessene Intensität der SOAT-WT-Banden gleich 100 % gesetzt und die Intensität der SOAT-Mutanten-Banden dazu prozentual ins Verhältnis gesetzt.

3.12 Die *Slc10a6*-Knockout-Maus

Im Rahmen dieser Arbeit und des DFG-Projektes „Membrane transporters for sulfated steroid hormones - gatekeeper of the sulfatase pathway“ (FOR 1396 „Sulfated steroids in reproduction, Projekt Nr. 2), in welches diese Dissertation implementiert war, konnte zwar gezeigt werden, dass SOAT eine bedeutende Rolle im humanen Hoden zu spielen scheint (Fietz et al. 2013), seine exakte physiologische Bedeutung konnte aber noch nicht vollständig geklärt werden. Von Grosser et al. (2013) wurde gezeigt, dass der murine Soat mit dem humanen SOAT in Bezug auf Expression, Lokalisation und Funktion vergleichbar ist. Daher sollte ein Soat-Knockout-Maus-Modell (*Slc10a6*-Knockout-Maus) etabliert werden.

3.12.1 Generierung der *Slc10a6*-Knockout-Maus

Die *Slc10a6*-Knockout-Maus wurde am Texas A&M Institute for Genomic Medicine (TIGM, College Station, Texas, USA) durch einen gerichteten Austausch (*Gene Targeting*) der Exone 2 und 3 des *Slc10a6*-Gens gegen eine *IRES/bGeo/PolyA-Kassette* mit Hilfe der homologen Rekombination generiert. Die Bestandteile dieser Kassette haben verschiedene Funktionen. Die *Internal Ribosomal Entry Site* (Interne Ribosomale Eintrittsstelle, IRES) vermittelt die Bindung zwischen mRNA und den Ribosomen, so dass das Reporter-gen *bGeo* translatiert

werden kann. *bGeo* bezeichnet das funktionelle Fusionsgen aus dem β -Galaktosidase- und dem Neomycin-Resistenzgen. Mit Hilfe des *bGeo*-Markers werden die Stammzellen identifiziert, bei denen das *Gene Targeting* erfolgreich war. Die Polyadenylierungssequenz (*PolyA*), die am Ende der Kasette lokalisiert ist, dient der mRNA-Stabilisierung und verbessert ihre Translatierbarkeit.

Das *Gene Targeting* wurde in embryonalen Stammzellen (ES) des Mausstamms 129S5/SvEvBrd (129S5) vorgenommen. Die mittels *bGeo*-Marker positiv selektionierten ES wurden in Blastozysten des Mausstamms C57BL/6N injiziert. Die ES vermischten sich mit der inneren Zellmasse (IZM) der Blastozyste. Somit entwickelte sich ein Mosaik-Embryo der Anteile beider Mausstämme (129S5 und C57BL/6N) besaß. Die gentechnisch veränderte Blastozyste wurde in eine Ammenmutter implantiert, die die Embryonen austrug. Die geborenen Jungtiere werden als Chimären bezeichnet. Sie besitzen ein geflecktes Fell, da die injizierte ES nicht nur das gentechnisch modifizierte Gen aufwies, sondern auch ein Gen enthielt, was die Fellfarbe weiß codiert. Die C57BL/6N-Blastozyste hingegen enthält das Gen für dunkles Fell. Dies bedingt die gefleckte Fellfarbe der Chimären. Die männlichen Chimären wurden mit C57BL/6N-Weibchen verpaart. Hieraus resultierten entweder genetisch modifizierte Nachkommen oder unveränderte Nachkommen (Wildtypen, wt). Die genetisch veränderten Nachkommen konnten mit Hilfe von PCR und Southern Blot eindeutig identifiziert werden. Spermien der generierten F1-Generation wurden bei TIGM in kryokonservierter Form erworben, dort rederiviert und in der *in vitro*-Fertilisation eingesetzt. Die daraus resultierenden heterozygoten Mäuse (F2) wurden dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie geliefert.

Erzeugung der *Slc10a6*-Knockout-Maus

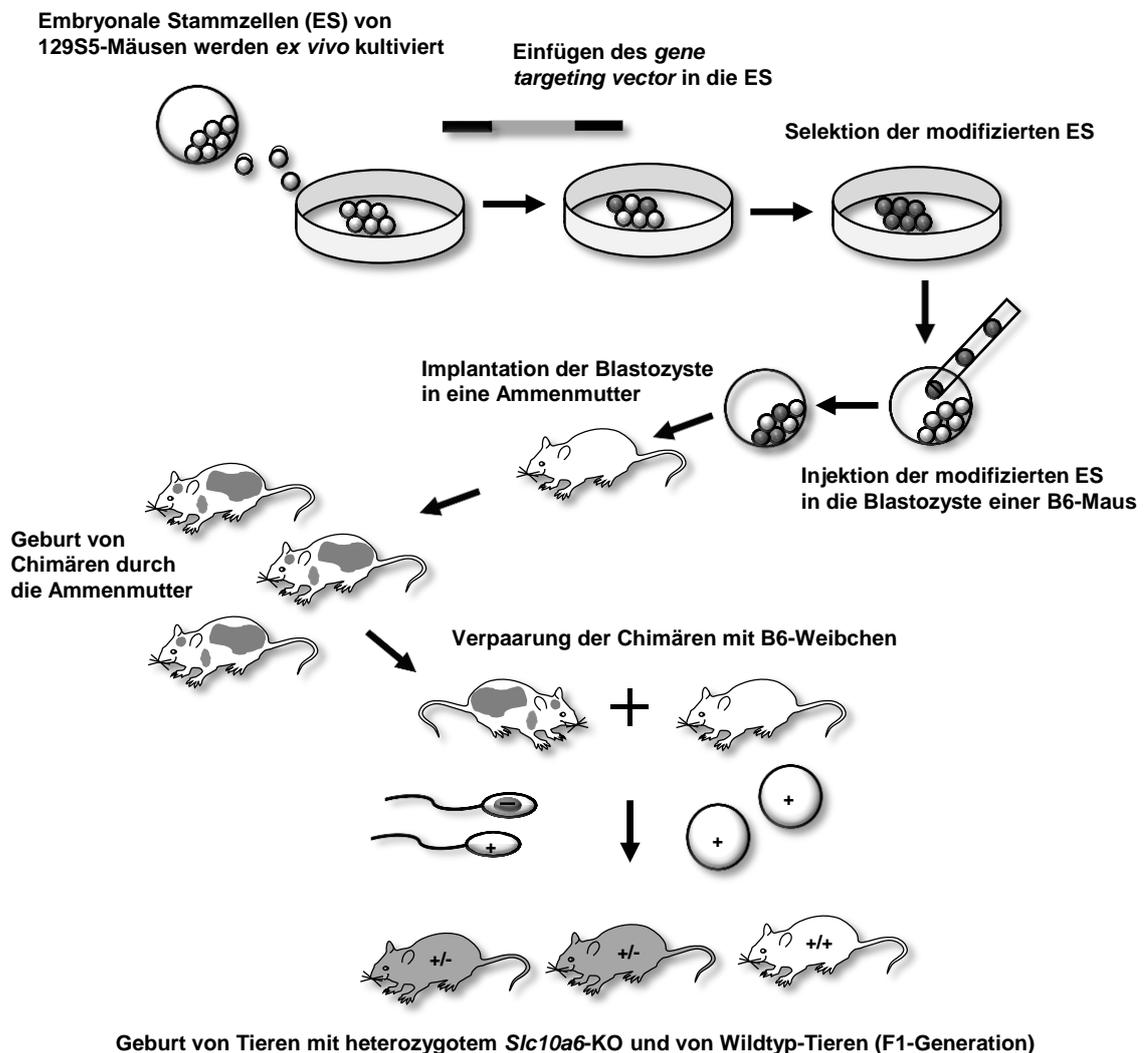


Abbildung 3.9: Generierung der *Slc10a6*-Knockout-Maus-Linie

Embryonale Stammzellen (ES) des Mausstammes 129S5 werden mit dem *gene targeting vector* transfiziert und anschließend auf die Integration des Vektor überprüft. Es folgt die Injektion der positiven ES in eine Blastozyste des C57BL/6N-Stammes (B6), die anschließend von einer Ammenmutter ausgetragen wurde. Die Nachkommen stellen aufgrund ihres genetischen Mosaiks Chimären dar. Die Chimären wurden mit B6-Weibchen verpaart. Die daraus resultierende F1-Generation bestand somit aus B6-Wildtyp-Tieren und heterozygoten *Slc10a6*-Knockout (KO)-Tieren. Die Spermien der F1-Generation, die den *Slc10a6*-KO enthielten wurden bei TIGM kryokonserviert und nach Erwerb der *Slc10a6*-Knockout-Maus-Linie durch das Institut für Pharmakologie und Toxikologie wieder aufgetaut und zur *in vitro* Fertilisation (IVF) von B6-Eizellen verwendet. +: Wildtyp-Allel, -: Knockout-Allel, +/-: Wildtyp-Tier, +/-: heterozygotes KO-Tier. Schema angelehnt an Röhl (Fredholm et al. 2007)

3.12.2 Rückkreuzung der *Slc10a6*-Knockout-Maus auf ihren genetischen Hintergrund

Die von TIGM gelieferten, heterozygoten *Slc10a6*-Knockout-Mäuse wiesen in ihrem Genom sowohl Anteile des 129S5-, als auch des C57BL/6N-Stammes auf. Da in weiterführenden Studien der Phänotyp der homozygoten *Slc10a6*-Knockout-Maus charakterisiert und mit dem

Phänotyp der Wildtyp-Mäuse verglichen werden soll, war es nötig, die heterozygoten *Slc10a6*-Knockout-Mäuse auf einen definierten genetischen Hintergrund (Generierung *kongener* Mäuse) zurückzukreuzen, um einen aussagekräftigen Vergleich mit den Wildtyp-Tieren des ausgewählten Hintergrund-Stammes vornehmen zu können. Bei der *Slc10a6*-Knockout-Maus erfolgt die Rückkreuzung auf den C57BL/6N-Inzuchtstamm. Dieser Stamm bietet den Vorteil, dass sein genetischer Hintergrund genau definiert und standardisiert ist. Hinzu kommt, dass sowohl die in unserem Institut verwendete *Slc10a4*-, wie auch die *Slc10a5*-Knockout-Maus ebenfalls einen C57BL/6N-Hintergrund aufweist, und somit auch Vergleiche der Knockout-Maus-Modelle der *Slc10*-Familie untereinander möglich sind. Da die ES des C57BL/6N-Mausstammes schlechter zu prozessieren sind, als die ES der 129S5-Mäuse, werden meist letztere für die genetische Modifikation verwendet. Leider weisen die 129S5-Mäuse im Vergleich zu den C57BL/6N-Tieren eine niedrigere Wurfgröße auf, so dass bei der Generierung von Knockout-Mäusen die Vorteile beider Mausstämme in Form von 129S5-Stammzellen und C57BL/6N-Blastozysten genutzt werden. Die Rückkreuzung der *Slc10a6*-Knockout-Maus fand in der Tierhaltung des TIGM statt. Hierzu wurden zuerst heterozygote *Slc10a6*-Knockout-Weibchen mit C57BL6/N-Männchen verpaart, um im ersten Schritt das Y-Chromosom des C57BL/6N-Stammes zu konservieren. Die daraus resultierenden heterozygoten Männchen wurden anschließend mit C57BL/6N-Wildtyp-Weibchen verpaart. In diesem Schritt wird die mitochondriale DNA konserviert. Die heterozygoten Männchen einer jeden Runde wurden mit Hilfe des *Speed Congenics Program* der Firma Taconic (New York, NY, USA) auf ihren Rückkreuzungsgrad hin untersucht. Das beste Männchen (= höchster prozentualer Rückkreuzungsgrad) einer jeden Runde wurde zur weiteren Verpaarung mit C57BL/6N-Weibchen eingesetzt. Durch diese verbesserte Rückkreuzungsstrategie kann die Anzahl der Rückkreuzungsrunden auf 5 - 7 reduziert werden, wohingegen die konventionelle Rückkreuzung ohne Kontrolle des Rückkreuzungsgrad 10 Rückkreuzungsrunden benötigt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rückkreuzung begonnen und koordiniert. Momentan befinden sich die Mäuse in der 4. Rückkreuzungsrunde und weisen das *Generations-Äquivalent* NE = 6 auf.

3.12.3 Genotypisierung der *Slc10a6*-Knockout-Maus

Um den Genotyp der generierten Mäuse aus der Rückkreuzung und der Anpaarung der heterozygoten F1-Tiere zu bestimmen, wurden Ohrbiopsien, die beim Absetzen im Rahmen der Einzeltiermarkierung durch den Tierpfleger genommen wurden, verwendet. Aus diesen wurde mittels alkalischer Lyse (Truett et al. 2000) die DNA gewonnen, die in der Genotypisierungs-PCR als Template diente. Die Biopsien wurden dafür mit jeweils 75 µL 1 x Lysepuffer versetzt und 45 min im Thermoschüttler bei 96° C und 300 rpm inkubiert. Im

Anschluss wurden 75 µL Neutralisationspuffer hinzugegeben und die Proben nach Durchmischung auf Eis abgekühlt. Für die Genotypisierungs-PCR wurden 5 µL des Gewebelysats eingesetzt. Das restliche Lysat wurde bei - 20° C gelagert.

Für die PCR wurde folgender Ansatz in PCR-Cups pipettiert:

Komponente	Menge/Probe
ddH ₂ O	9,0 µL
5 x Phusion Puffer	4,0 µL
10 mM dNTPs	0,4 µL
Primer 1	0,2 µL
Primer 2	0,2 µL
DMSO (100 %)	1,0 µL
Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	0,2 µL
Probenlysat	5,0 µL
Gesamtvolumen	20,0 µL

Die Genotypisierungs-PCR war als Multiplex-PCR angelegt. Es wurden drei verschiedene Primer verwendet. Die Vorwärtsprimer waren für den jeweiligen Genotyp spezifisch (Wildtyp oder Knockout), der Rückwärtsprimer war für beide Genotyp-Sequenzen geeignet.

Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	Fragmentlänge	Fragment/Bande
mSoat-Genotyp_F2	mSoat-Genotyp_R2	250 bp	Wildtyp-spezifisch
LacZ_F	mSoat-Genotyp_R2	314 bp	Knockout-spezifisch

Die PCR wurde im *Thermocycler Primus 96 advanced gradient* (Peqlab) durchgeführt:

Denaturierung	98 ° C	30 s
Denaturierung	98° C	10 s
Primer-Anlagerung	72° C - 0,5° C pro Zyklus	30 s, 10 x
Elongation	70° C	30 s
Denaturierung	98° C	10 s
Primer-Anlagerung	67° C	30 s, 35 x
Elongation	72° C	30 s
Finale Elongation	72° C	10 min
Kühlung	4° C	∞

Zur Negativkontrolle diente ein Reaktionsansatz, bei dem anstelle des Gewebelysats ddH₂O eingesetzt wurde.

Die Fragmente wurden auf einem 2 %-igen Agarosegel aufgetrennt und mit Hilfe von *GeRED-Färbelösung* (Biotium) visualisiert (siehe Kapitel 3.1.2).

3.12.4 Speed congenics

Speed congenics bedeutet die beschleunigte Rückkreuzung gentechnisch veränderter Mäuse auf einen gewünschten genetischen Hintergrund mittels Marker-assestierter Selektionsprotokolle (MASP). Für das *Speed Congenics Program* von Taconic wurden Schwanzbiopsien (0,5 - 1 cm, Entnahme unter Isofluran-Narkose) der heterozygoten Männchen genommen, in Ethanol (70 %-ig) gegeben und gekühlt (4° C) zu Taconic geschickt. Dort wurde für die Untersuchung ein Marker Panel mit 1449 SNPs verwendet, mit dem auf 20 Chromosomen inklusive des X-Chromosoms das Genom der rückgekreuzten und der Wildtyp-Maus miteinander verglichen wurden. Das Ergebnis wurde in Prozent des Rezipienten-Genoms (genetischer Hintergrund, auf den zurückgekreuzt wird) angegeben, woraus das Generationsäquivalent NE ermittelt werden konnte (Markel et al. 1997). Da beim *Slc10a6*-Gen der chromosomale Ort bekannt ist, konnte zusätzlich angegeben werden, wie groß die Übereinstimmung in diesem Bereich zwischen der Knockout-Maus und dem Wildtyp war. Somit konnte das am besten geeignete Männchen über den prozentualen Anteil des

Rezipienten-Genoms und die Übereinstimmung im Bereich des ausgeknockten Gens ausgewählt werden. Mit diesem Männchen wurde die Rückkreuzung fortgesetzt.

3.12.5 Anpaarung der heterozygoten *Slc10a6*-Knockout-Maus

Da in der Literatur bisher keinerlei Daten zur *Slc10a6*-Knockout-Maus verfügbar sind, ist nicht bekannt, ob die homozygote *Slc10a6*-Knockout-Maus überhaupt lebensfähig ist. Daher wurden heterozygote *Slc10a6*-Knockout-Mäuse der F1-Generation miteinander verpaart (Tierversuchsvorhaben GI 18/11 Nr. 14/2013, erlassen an Katharina Bakhaus und Dr. Gary Grosser) und die generierten Mäuse auf ihre Vitalität sowie Veränderungen an Lunge, Haut und Hoden untersucht. Die Mäuse standen ab der Geburt unter Beobachtung und wurden anhand der Beurteilungsbögen zur Einschätzung der Belastung genetisch veränderter Versuchstiere (Version 1.2 / 24.07.2013, Workshop „Dokumentation und Veröffentlichung der Belastungseinstufung für genetisch veränderte Versuchstiere“, Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin) und des für dieses Tierversuchsvorhaben erstellte *Score Sheet* beurteilt, bevor sie durch zervikale Dislokation im Alter von 20 Wochen getötet wurden. Es folgte die Organentnahme von Lunge, Haut, Geschlechtsorganen und der akzessorischen Geschlechtsdrüsen. Bei den männlichen Tieren wurde die Größe und das Gewicht der Hoden bestimmt. Die Organe wurden für die Etablierung der Immunhistochemie, der Transmissionselektronenmikroskopie und des Western Blots verwendet.

4 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden die Membrantransporter SOAT (*SLC10A6*, Gene ID: 345274, NM_197965.2 (mRNA), NP_932069.1 (Protein)), OATP6A1 (*SLCO6A1*, Gene ID: 133482, NM_173488.3 (mRNA), NP_775759.3 (Protein)), OATP1C1 (*SLCO1C1*, Gene ID: 53919, NM_00114594.1 (mRNA), NP_001139417.1 (Protein)) und OSCP1 (Gene ID: 127700, NM_145047.4 (mRNA); NP_65948.4 (Protein, Isoform I)) funktionell untersucht, um ihre Bedeutung für die Aufnahme von sulfatierten Steroiden in eukaryotische Zellen zu definieren.

4.1 Quantitative Real-Time-PCR der ausgewählten Carrier in verschiedenen humanen Geweben

Zuerst wurde die relative mRNA Expression der ausgewählten Transportproteine SOAT, OATP6A1, OATP1C1 und OSCP1 in verschiedenen humanen Geweben mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR untersucht, um entsprechende Expressionsprofile zu ermitteln.

4.1.1 Validierung der ausgewählten Gene Expression Assays

Es wurden zunächst Standardreihen für die ausgewählten TaqMan Assays angefertigt, um eine Auskunft über die Zuverlässigkeit für die Quantifizierung zu erhalten. So kann aus der Steigung der Standardkurve eine Aussage über die Effizienz der Real-Time PCR gemacht werden. Man spricht von einer Effizienz von 100 %, wenn die Menge des PCR-Produkts sich in der exponentiellen Phase der PCR je Zyklus verdoppelt. Effizienzwerte zwischen 90-110 % werden allgemein als akzeptabel angesehen. Neben den Assays für die einzelnen Transportergene, wurde auch der Assay für den Housekeeper β -Actin überprüft. Die Gene Expression Assays für β -Actin, SOAT und OATP1C1 wiesen eine gute Effizienz mit Werten zwischen 92,18 % und 95,75 % auf. Der Effizienzwert des OATP6A1-Assays hingegen lag mit 114,19 % geringfügig über dem akzeptablen Wertebereich. Der Assay für den OSCP1 hatte nur eine Effizienz von 62,63 %, was in mehreren unabhängigen Experimenten bestätigt wurde. Dies deutet auf eine geringe Sensitivität des Assays für das Target hin.

Tabelle 4.1: Effizienz der ausgewählten Gene Expression Assays für β -Actin, SOAT, OSCP1, OATP6A1 und OATP1C1.

Gene Expression Assay	Effizienz	Steigung der halb-logarithmischen Regressionsgerade
β -Actin	95,75 %	-3,428 \pm 0,0249
SOAT (<i>SLC10A6</i>)	92,18 %	-3,525 \pm 0,2759
OSCP1	62,63 %	-4,735 \pm 0,1065
OATP6A1 (<i>SLCO6A1</i>)	114,19 %	-3,023 \pm 0,0923
OATP1C1 (<i>SLCO1C1</i>)	95,30 %	-3,440 \pm 0,1175

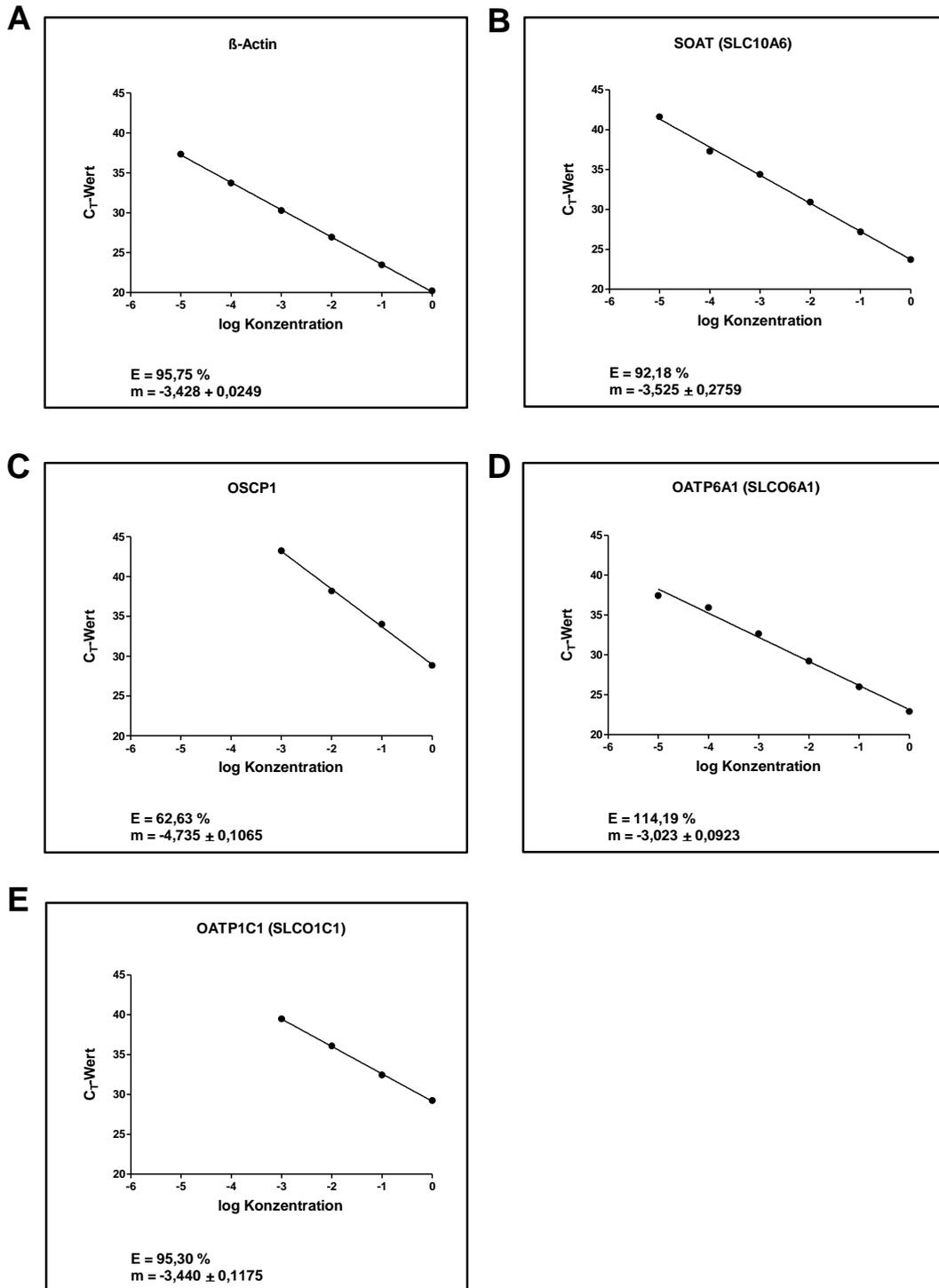


Abbildung 4.1: Ermittlung der Effizienz der ausgewählten Gene Expression Assays für β -Actin, SOAT, OSCP1, OATP6A1 und OATP1C1.

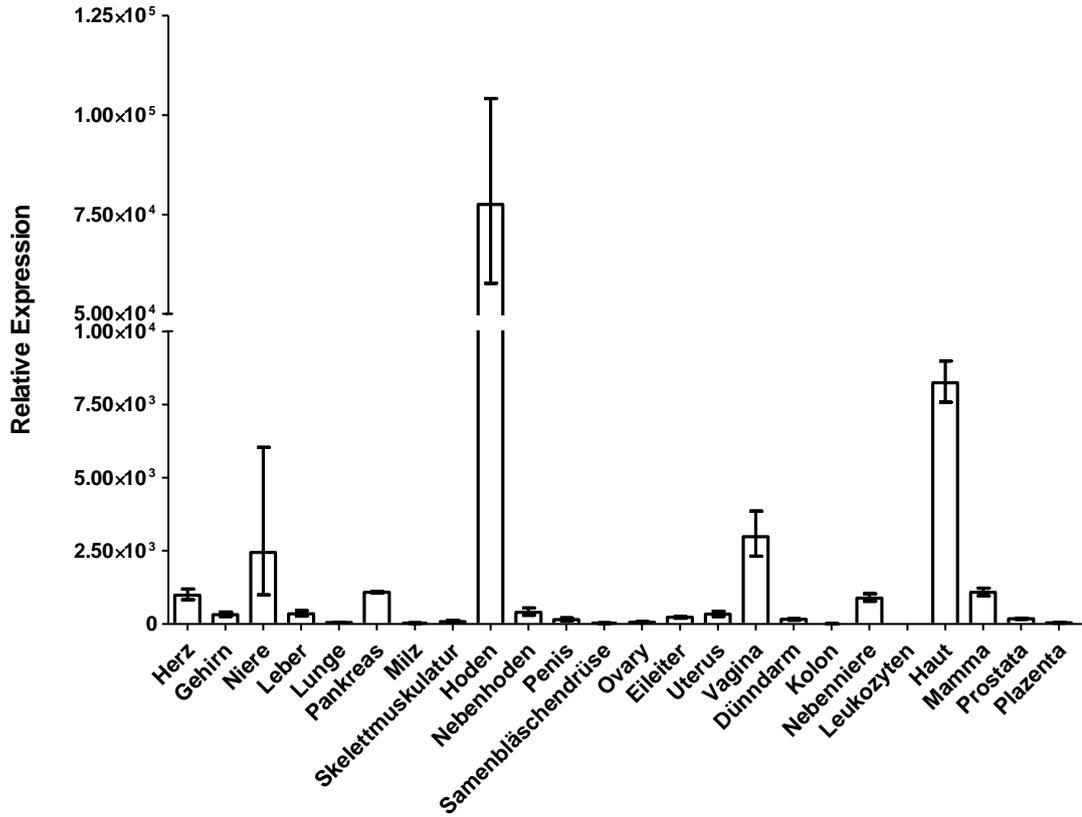
Um die Standardkurve für den jeweiligen Gene Expression Assay zu generieren, wurde von humaner Hoden-cDNA (Biochain) eine Verdünnungsreihe über fünf Zehnerpotenzen angelegt, die dann mit dem entsprechenden Gene Expression Assay (A: β -Actin, B: SOAT (SLC10A6), C: OSCP1, D: OATP6A1 (SLC06A1), E: OATP1C1 (SLC01C1)) in der Real-Time PCR eingesetzt wurde. A-E zeigen die Standardreihen als halb-logarithmische Regressionsgerade mit den logarithmierten Konzentrationen der cDNA auf der x-Achse und den C_T -Werten der jeweiligen Verdünnungsstufe auf der y-Achse. Mit Hilfe der Formel $E = (10^{-1/\text{Steigung}} - 1) \times 100$ ließ sich die Effizienz E des jeweiligen Gene Expression Assays berechnen. Die Steigung wurde mit dem Programm *Graph Pad Prism 5* ermittelt.

4.1.2 Erstellen von Expressionsprofilen für SOAT, OATP6A1, OATP1C1 und OSCP1 in verschiedenen Geweben mittels quantitativer Real-Time PCR

Mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR konnte von jedem der ausgewählten Carrier systematisch ein Expressionsprofil in verschiedenen Geweben erstellt werden. Es zeigte sich, dass alle vier Transporter im Hoden eine sehr hohe relative mRNA Expression aufweisen. SOAT war in diesem Organ prädominant exprimiert, allerdings wies er auch in der Haut eine hohe relative Expression auf. Daneben war SOAT sowohl in der weiblichen Brustdrüse (Mamma), als auch in der Vagina stark exprimiert. Die prädominante Expression des SOAT im Hoden war bereits früher gezeigt worden (Geyer et al. 2007), allerdings wurde damals deutlich weniger Gewebe untersucht und keine vergleichende Studie mit anderen Transportproteinen durchgeführt. Vor allem die hohe Expressionsrate in der Haut ist ein interessanter Neubefund. Eine deutliche Expression in der Plazenta, wie sie in vorangegangenen Untersuchungen (Geyer et al. 2007) beobachtet worden war, konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Neben dem SOAT wiesen auch der OATP6A1 und der OSCP1 eine prädominante Expression im Hoden auf. Der OATP6A1 wurde außerdem noch stark im Nebenhoden exprimiert, wohingegen der OSCP1 eine deutliche Expression im Eileiter zeigte. Anders präsentierte sich der OATP1C1. Seine höchste relative Expression wurde im Gehirn gefunden, gefolgt von einer niedrigeren, aber deutlichen Expression im Hoden. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass alle vier Transportproteine eine hohe relative mRNA Expression im Hoden aufweisen und daher für die vorliegende Arbeit interessante Kandidaten für einen Transport sulfatierter Steroide im Hoden darstellten.

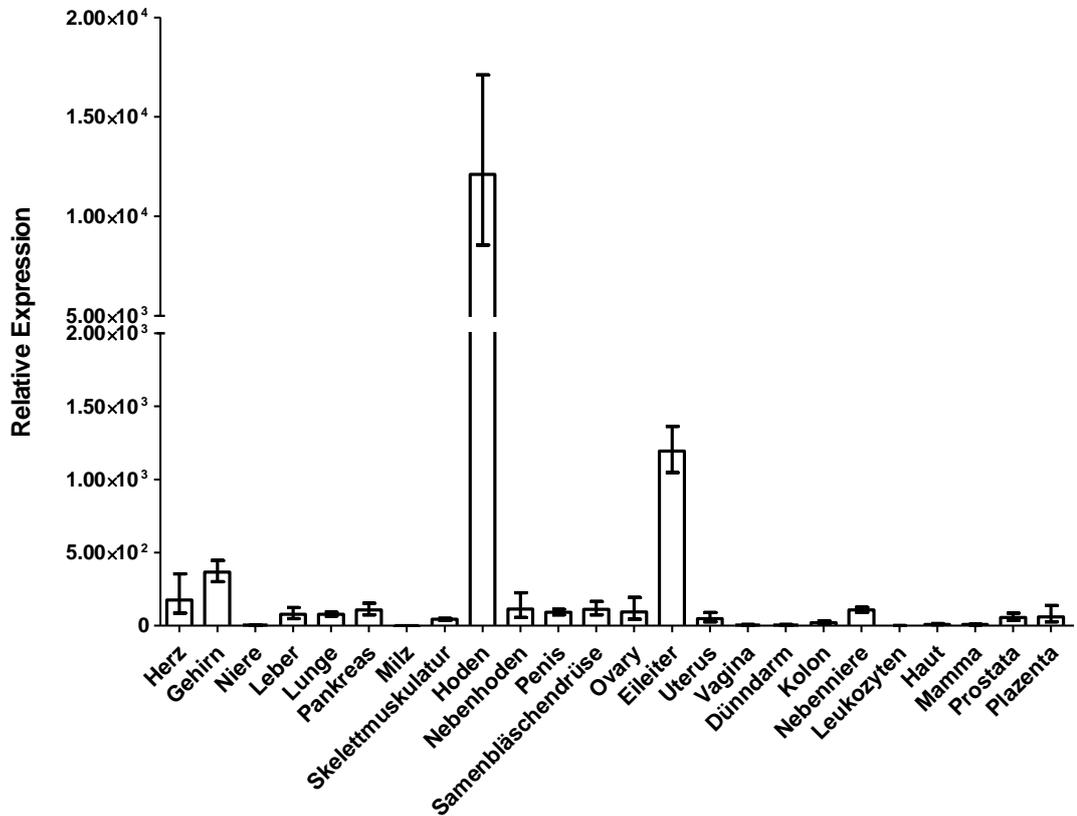
A

Relative Expression von SOAT (*SLC10A6*)

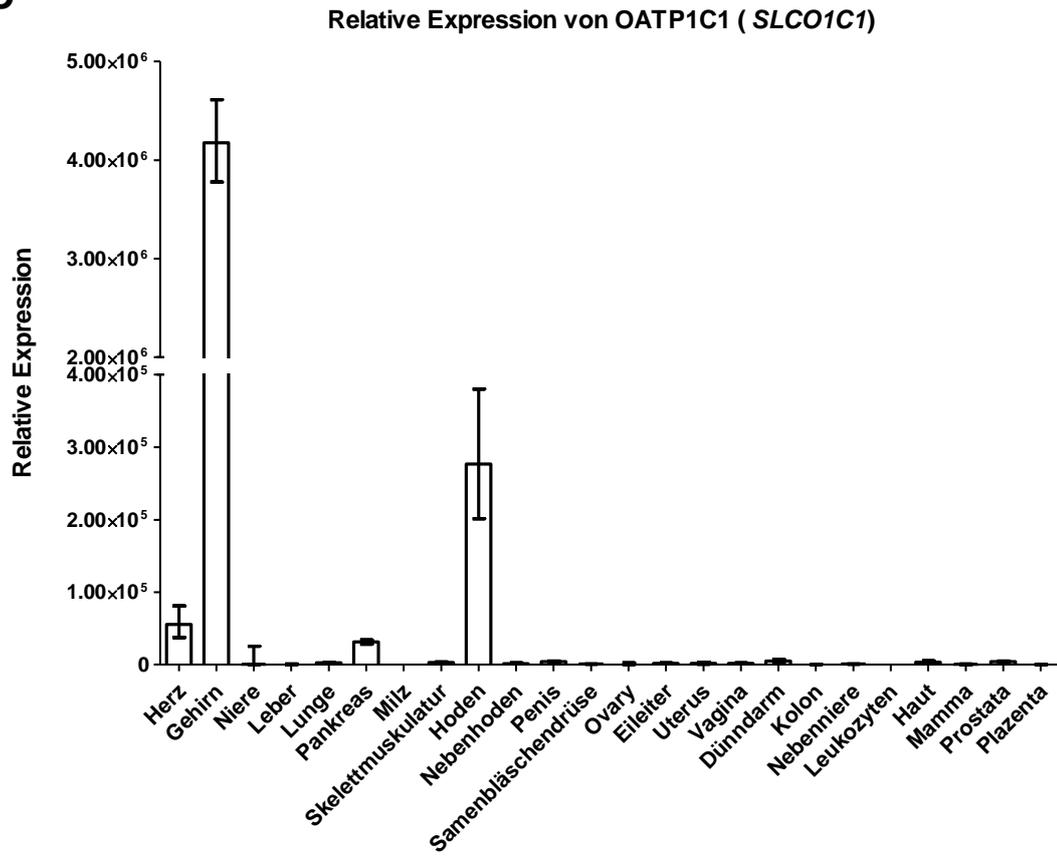


B

Relative Expression von *OSCP1*



C



D

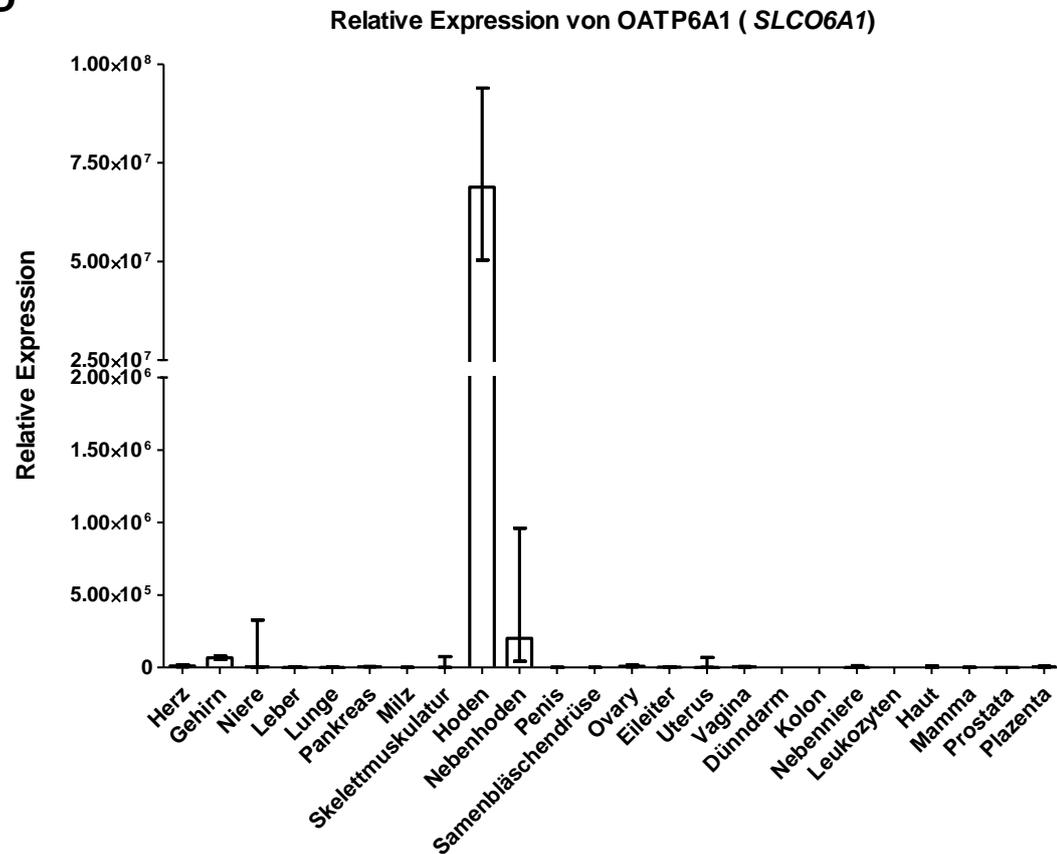


Abbildung 4.2: Expressionsprofil von SOAT, OSCP1, OATP6A1 und OATP1C1 in verschiedenen humanen Geweben.

Die relative mRNA Expression von SOAT (A), OSCP1 (B), OATP6A1 (C) und OATP1C1 (D) wurde mittels quantitativer Real-Time PCR Analyse ermittelt. Hierzu wurden TaqMan *Gene Expression Assays* (Life Technologies) für die Zielgene ausgewählt und cDNA von mehreren *Human Multiple Tissue cDNA Panels* (Biochain) verwendet. Die Berechnung der relativen Expression erfolgte mit der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode. Auf der y-Achse ist die relative Expression des jeweiligen Gewebes als n-fache Expression des Kalibratorgewebes (Gewebe mit der niedrigsten Expression) dargestellt. Die quantitative Real-Time PCR wurde im Dreifach-Ansatz durchgeführt. β -Actin diente als Housekeeper-Gen.

4.2 Funktionelle Charakterisierung der Transportproteine

4.2.1 Funktionelle Charakterisierung der Transportproteine im transient transfizierten Zellkulturmodell

Für die funktionelle Charakterisierung der Proteine OATP6A1, OATP1C1 und OSCP1 wurde zunächst der jeweilige Leserahmen in verschiedene Expressionsvektoren kloniert. Hierzu wurde die codierende Sequenz des OATP6A1 und des OSCP1 aus kommerziell erhältlicher Hoden-cDNA amplifiziert und in die Vektoren *pcDNA5/FRT/TO TOPO* und *pcDNA5/FRT/V5His TOPO* über eine *Topoisomerase I* vermittelte TA-Klonierung eingefügt. Während die Sequenzen, die in den *pcDNA5/FRT/TO-TOPO*-Vektor eingebracht wurden ein Stoppcodon aufwiesen, wurden in den *pcDNA5/FRT/V5His-TOPO*-Vektor die jeweiligen Sequenzen ohne Stoppcodon eingefügt. Dies ermöglichte die Bildung eines Fusionsproteins, welches aus dem interessierenden Protein und dem V5His-Tag bestand und über das Tag mittels spezifischem Antikörper nachgewiesen werden konnte. Nach Transformation in TOP10 *E. coli* wurden die Plasmide mittels Mini-Plasmid-Präparation gewonnen und die Sequenzkorrektheit überprüft. Die Plasmide, die mit der in GenBank hinterlegten Sequenz übereinstimmten, wurden transient in GripTite 293 MSR Zellen transfiziert und in Transportstudien auf eine Aufnahme von sulfatierten Steroiden wie E₁S und DHEAS überprüft. Leider zeigten weder der OATP6A1, noch der OSCP1 eine Aufnahme der Substrate im Vergleich zu GripTite 293 MSR Zellen, die mit NTCP-Konstrukten transient transfiziert waren. Der OATP1C1 ließ sich nur schwer aus Hoden-cDNA amplifizieren und wurde daher aus Gehirnmateriale amplifiziert. Die Sequenzierung des Amplifikats ergab die als Isoform 3 (Accession No.: NM_001145945.1) in *Gene Bank* hinterlegte Sequenz. Der Isoform 3 fehlen im Gegensatz zu der in der Literatur bereits beschriebenen Isoform 2 (Pizzagalli et al. 2002) 147 bp, was zu einem Fehlen von 49 aa *in frame* führt. Es war nicht möglich, die Isoform 2 aus den zur Verfügung stehenden cDNAs (Hoden, Gehirn) zu amplifizieren, so dass mit der Isoform 3 weitergearbeitet wurde. Auch die anschließende Klonierung erwies sich als schwierig und war nur in den *pcDNA5/FRT/V5His TOPO* Vektor möglich. Das OATP1C1-V5His-Konstrukt wurde ebenfalls in GripTite 293 MSR-Zellen transient transfiziert und in Transportstudien mit verschiedenen Substanzen überprüft. Allerdings zeigte OATP1C1

ebenfalls keine Aufnahme der ausgewählten Substanzen. Auch der Versuch, einen Transport in CHO-Zellen darzustellen, scheiterte (siehe Abbildung 4.3). Die Transfektionsrate der transienten Transfektionen konnte aufgrund des angefügten V5His-Tags in einer parallel zu den Transportstudien durchgeführten Immunfluoreszenz überprüft werden. Die Transfektionsraten der OSCP1-V5His- und OATP6A1-V5His-Konstrukte waren besser als beim OATP1C1-V5His-Konstrukt. Allerdings waren alle drei Proteine nicht eindeutig in der Zellmembran lokalisiert. Es konnten Signale im Zytoplasma und im Bereich um den Zellkern detektiert werden.

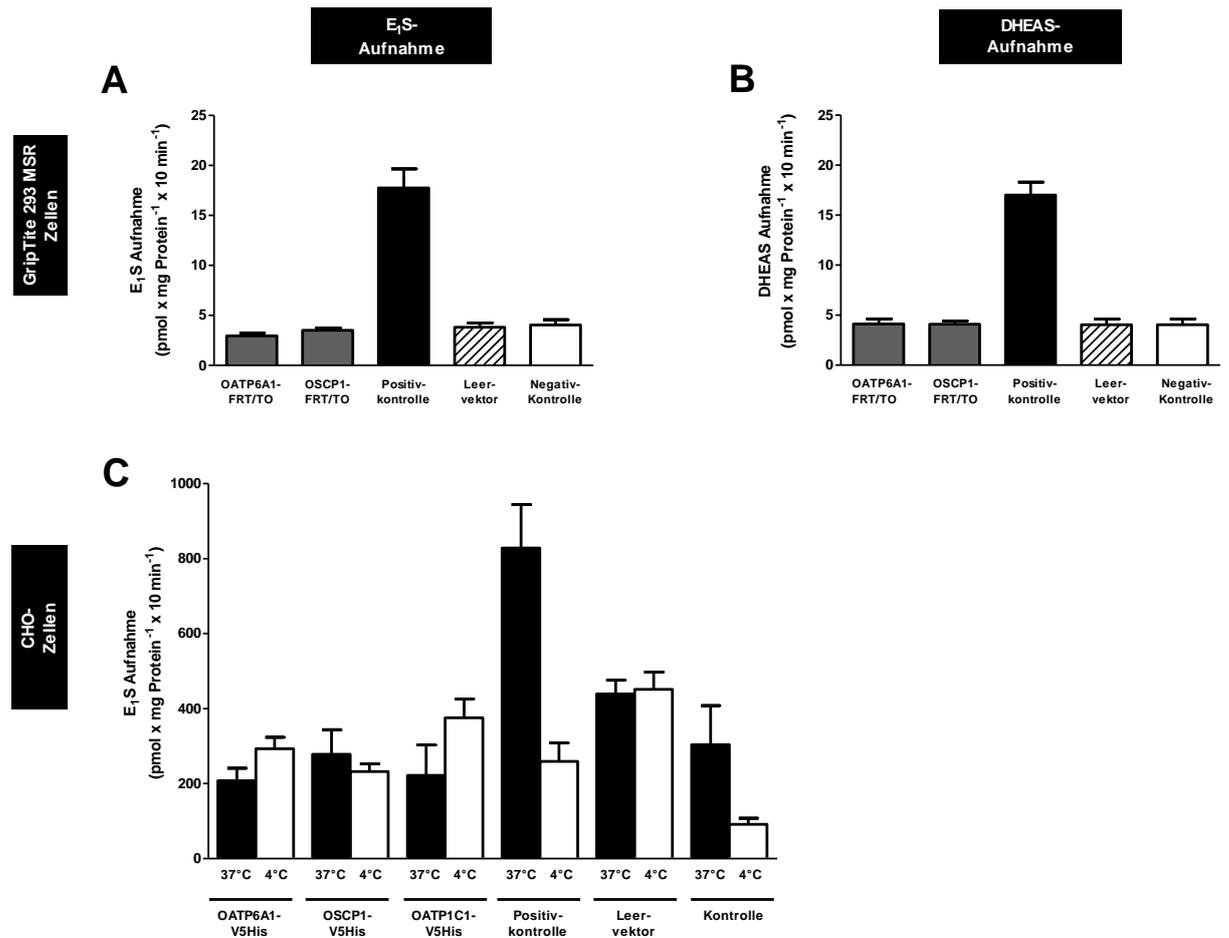


Abbildung 4.3: Aufnahmestudien mit GripTite 293 MSR- und CHO-Zellen, die mit OATP6A1, OATP1C1, OSCP1, NTCP oder SOAT transient transfiziert wurden.

(A,B) OATP6A1-FRT/TO, OSCP1-FRT/TO und NTCP-FLAG (Positivkontrolle, schwarze Balken) wurden in GripTite 293 MSR Zellen transient transfiziert, nach 48 h mit PBS gewaschen und anschließend für 10 min mit 1 μM [³H]E₁S (A) und 1 μM [³H]DHEAS (B) bei 37° C inkubiert. Die Aufnahme wurde durch Waschen mit eiskaltem PBS gestoppt und die zellassoziierte Radioaktivität im Flüssigszintillationscounter gemessen. Als Kontrollzellen wurden sowohl mit Leervektor (pcDNA5/FRT/TO TOPO Vektor) transfizierte GripTite 293 MSR Zellen (gestreifte Balken), als auch untransfizierte GripTite 293 MSR Zellen (Negativkontrolle, weiße Balken) verwendet.

(C) OATP6A1-V5His, OATP1C1-V5His, OSCP1-V5His, SOAT-V5His (Positivkontrolle) und der pcDNA5/FRT/V5His-Leervektor wurden in CHO-Zellen transient transfiziert. Nach 48 h wurde die Aufnahme von 10 μM [³H]E₁S (C) gemessen, indem die Zellen bei 37° C (■) und bei 4° C (□) für 10 min mit dem jeweiligen Substrat in Natrium-haltigem Transportpuffer inkubiert wurden. Im Anschluss wurden die Zellen lysiert und die zellassoziierte Radioaktivität mit dem Flüssigszintillationscounter gemessen. Als Negativkontrolle wurden untransfizierte CHO-Zellen verwendet.

(A-C) Dargestellt sind jeweils die MW \pm SD eines repräsentativen Experimentes mit Vierfachbestimmung.

4.3 Generierung und funktionelle Charakterisierung der stabil transfizierten OATP6A1-, OATP1C1- und OSCP1-HEK293 Zelllinien

Da sich die transiente Transfektion als ungeeignet erwies, eine funktionelle Charakterisierung der Proteine OATP6A1, OATP1C1 und OSCP1 vorzunehmen, wurden die Plasmide OATP6A1-FRT/TO, OATP6A1-V5His, OSCP1-FRT/TO, OSCP1-V5His und OATP1C1-V5His in Flp-In T-REx 293 Zellen (Invitrogen) stabil transfiziert. Da sowohl der OATP6A1, wie auch der OSCP1 mit und ohne Tag vorlagen, wurden mit beiden Konstrukten Zelllinien generiert. Somit bot sich die Möglichkeit, sowohl mit dem unmarkierten Protein, als auch mit dem Fusionsprotein die Transportstudien durchzuführen und über das V5His-Tag zumindest in den OATP6A1-V5His-HEK293 und den OSCP1-V5His-HEK293 Zellen das jeweilige Protein zu detektieren und die Lokalisation im Zellkulturmodell zu bestimmen.

4.3.1 Etablierung der stabilen OATP6A1-, OATP1C1- und OSCP1-Zelllinien

Nachdem die stabile Transfektion, wie unter 3.7.2 beschrieben, durchgeführt worden war, wurden selektionierte Einzelklone auf das Insert mit Hilfe einer qualitativen PCR überprüft. Hierzu wurde RNA mit TriReagent aus den Zellen isoliert und in der RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Diese wurde anschließend in der jeweiligen *Full length*-PCR eingesetzt. Mit ihr wurde überprüft, ob die neu generierten Zelllinien das *gene of interest* enthielten. Eine sich anschließende Sequenzierung der PCR-Produkte ermöglichte außerdem eine genaue Überprüfung der in die Zellen neu eingefügten Sequenz. Das Amplifikat des OATP6A1 wies eine spezifische Größe von 2.186 bp auf (Abbildung 4.4A). Die Sequenzanalyse ergab den offenen Leserahmen (*open reading frame*, orf) des OATP6A1-Gens mit den flankierenden Primersequenzen. In der qualitativen PCR der stabil transfizierten OSCP1-HEK293 Zellen wurde ein PCR-Produkt mit einer Größe von 1.166 bp generiert (Abbildung 4.4C). Die Sequenzauswertung zeigte auch hier den *orf* des OSCP1-Gens mit den flankierenden Primersequenzen. Die PCR-Reaktion, bei der cDNA der OATP1C1-V5His-HEK293 Zellen als Template eingesetzt wurde, lieferte ein Amplifikat von 2.014 bp, welches den Leserahmen der Isoform 3 des OATP1C1-Transkripts enthielt (Abbildung 4.4E). In den Zelllinien mit den V5His-getaggten Proteinen OATP6A1 und OSCP1 wurden ebenfalls die Transkripte der entsprechenden Sequenz nachgewiesen. Somit konnte für alle neu generierten HEK293-Zellen die stabile Transfektion mit dem jeweiligen cDNA-Konstrukt bestätigt werden. Die Zelllinien, die mit dem V5His-Tag ausgestattet waren, wurden außerdem im Western Blot analysiert, um die Expression des Proteins durch Detektion des Tags zu überprüfen. Im Zelllysate der stabil transfizierten OATP6A1-V5His-HEK293 Zellen konnte das OATP6A1-V5

Protein mit einem Anti-V5 Antikörper mit einem Molekulargewicht von 70 kDa kDa detektiert werden (Abbildung 4.4B). Dies liegt leicht unter dem errechneten Molekulargewicht von 82,89 kDa (79,2 kDa für OATP6A1 und 3,7 kDa für das V5His-Tag). Der Western Blot der stabil transfizierten OSCP1-V5His-HEK293 Zellen zeigte ein Signal auf der Höhe von ca. 46 kDa. Dies entsprach dem vorausberechneten Molekulargewicht von 46,9 kDa (43,3 kDa für OSCP1 und 3,7 kDa für das V5His-Tag) (Abbildung 4.4D). In den Zelllysaten der stabil transfizierten OATP1C1-V5His-HEK293 Zellen konnte in mehreren unabhängig voneinander durchgeführten Western Blot Analysen nur eine Bande mit dem Molekulargewicht von ca. 45 kDa detektiert werden (Abbildung 4.4F). Diese liegt deutlich unter dem vorausberechneten Molekulargewicht von 76,9 kDa (73,3 kDa für OATP1C1 + 3,7 kDa für das V5His-Tag).

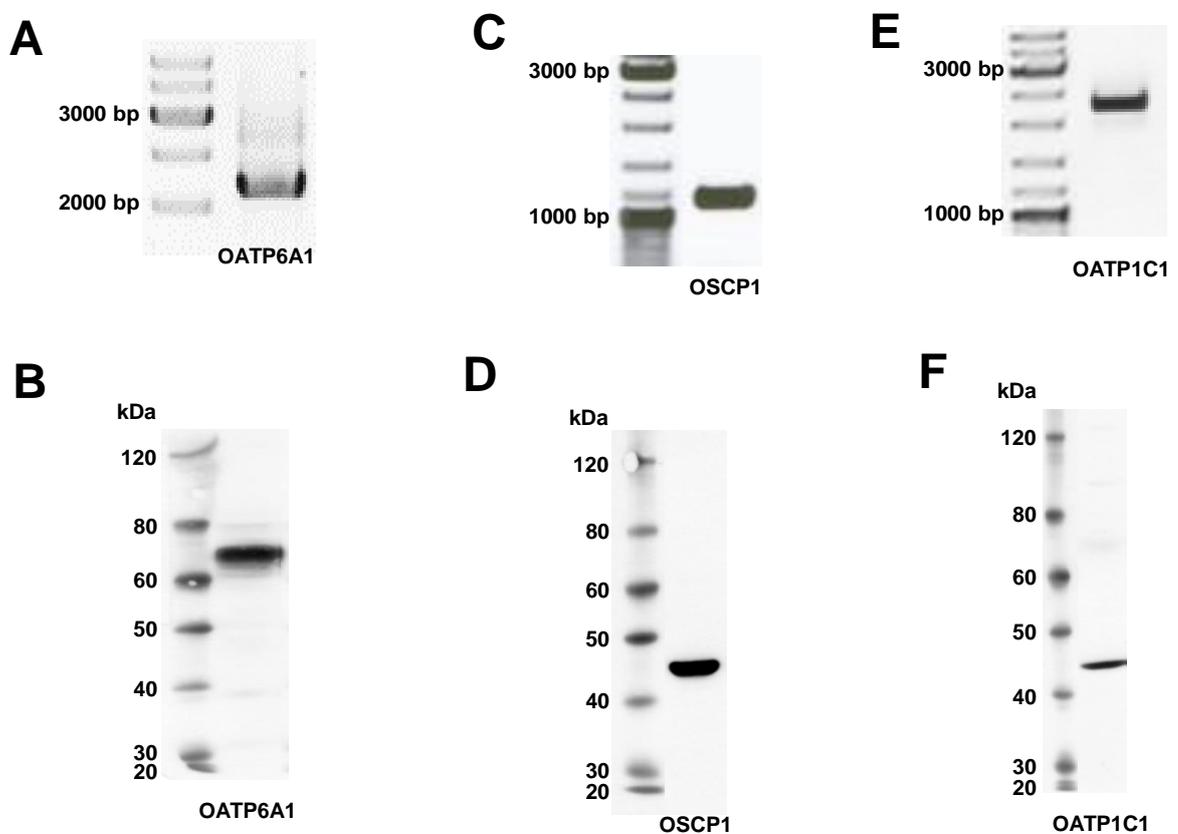


Abbildung 4.4: Qualitative PCR- und Western Blot Analyse der stabil transfizierten HEK293-Zelllinien mit den Transportproteinen OATP6A1, OATP6A1-V5His, OSCP1, OSCP1-V5His und OATP1C1-V5His.

(A) Qualitative PCR der stabil transfizierten OATP6A1-HEK293 Zellen nach RNA-Extraktion ergab ein Amplifikat mit einer spezifischen Größe von 2.186 bp.

(B) In der Western Blot Analyse der stabil transfizierten OATP6A1-V5His-HEK293 Zellen wurde das OATP6A1-Protein bei ca. 70 kDa detektiert. Das vorausberechnete Molekulargewicht beträgt 82,9 kDa.

(C) In der qualitativen PCR der stabil transfizierten OSCP1-HEK293 Zellen wurde ein *full length*-Amplifikat mit einer Größe von 1.166 bp generiert.

(D) In der Western Blot Analyse der stabil transfizierten OSCP1-V5His-HEK293 Zellen wurde in den extrahierten Proteine eine spezifische Bande mit dem Molekulargewicht von 46 kDa detektiert. Dies entspricht dem vorausberechneten Molekulargewicht.

(E) Nach der RNA-Extraktion wurde ein PCR-Produkt mit einer Größe von 2.014 bp amplifiziert, was den *orf* der Isoform 3 des *OATP1C1*-Gens enthielt.

(F) In der Western Blot Analyse ließ sich lediglich eine Bande von ca. 45 kDa detektieren, die deutlich unter dem vorausberechneten Molekulargewicht von ca. 76,9 kDa liegt.

4.3.2 Funktionelle Charakterisierung der OATP6A1-, OATP1C1- und OSCP1-Zelllinien

Nachdem mit der qualitativen PCR und dem Western Blot gezeigt werden konnte, dass die neu generierten Zelllinien das jeweilige Konstrukt enthielten, folgte die funktionelle Charakterisierung der Proteine. Hierzu wurden sowohl die Tetrazyklin-induzierbaren HEK293-Zelllinien, wie auch die V5His-getaggtten HEK293 Zellen eingesetzt. Zuerst wurde für alle drei Transporter ein Substratscreening durchgeführt. Hierbei wurden neben den sulfatierten Steroiden E₁S und DHEAS auch andere potentielle Substrate wie Taurocholat, Bromosulfophthalein, Paraaminohippursäure und Trosipiumchlorid getestet. Während bei den Tetrazyklin-induzierbaren HEK293-Zelllinien die Kultivierung der zu messenden Zellen mit oder ohne Tetrazyklin-Induktion (Kontrolle) stattfand, wurden die HEK293-Zelllinien mit den V5His-markierten Proteinen bei 37° und 4° C (Kontrolle) gemessen. In diesen Versuchen zeigten alle drei Proteine weder in der fusionierten Form (OATP6A1-V5His, OSCP1-V5His, OATP1C1-V5His), noch in der ungetaggtten (OATP6A1, OSCP1) Form eine Aufnahme der jeweils angebotenen Substanz. Es wurden daraufhin die Messzeiten von 10 bis 15 min, welche bei SOAT genügen, um eine Substrataufnahme zu messen, auf bis zu 60 min pro Messung verlängert, um den Proteinen ausreichend Zeit für eine Aufnahme der Substanzen zu geben. Aber auch dies führte zu keinem positiven Ergebnis. Da parallel erfolgreich Transportstudien mit SOAT-HEK293 Zellen stattfanden, bei denen die gleichen Substanzen zum Einsatz kamen, konnten methodische Fehler ausgeschlossen werden.

4.3.2.1 OATP6A1

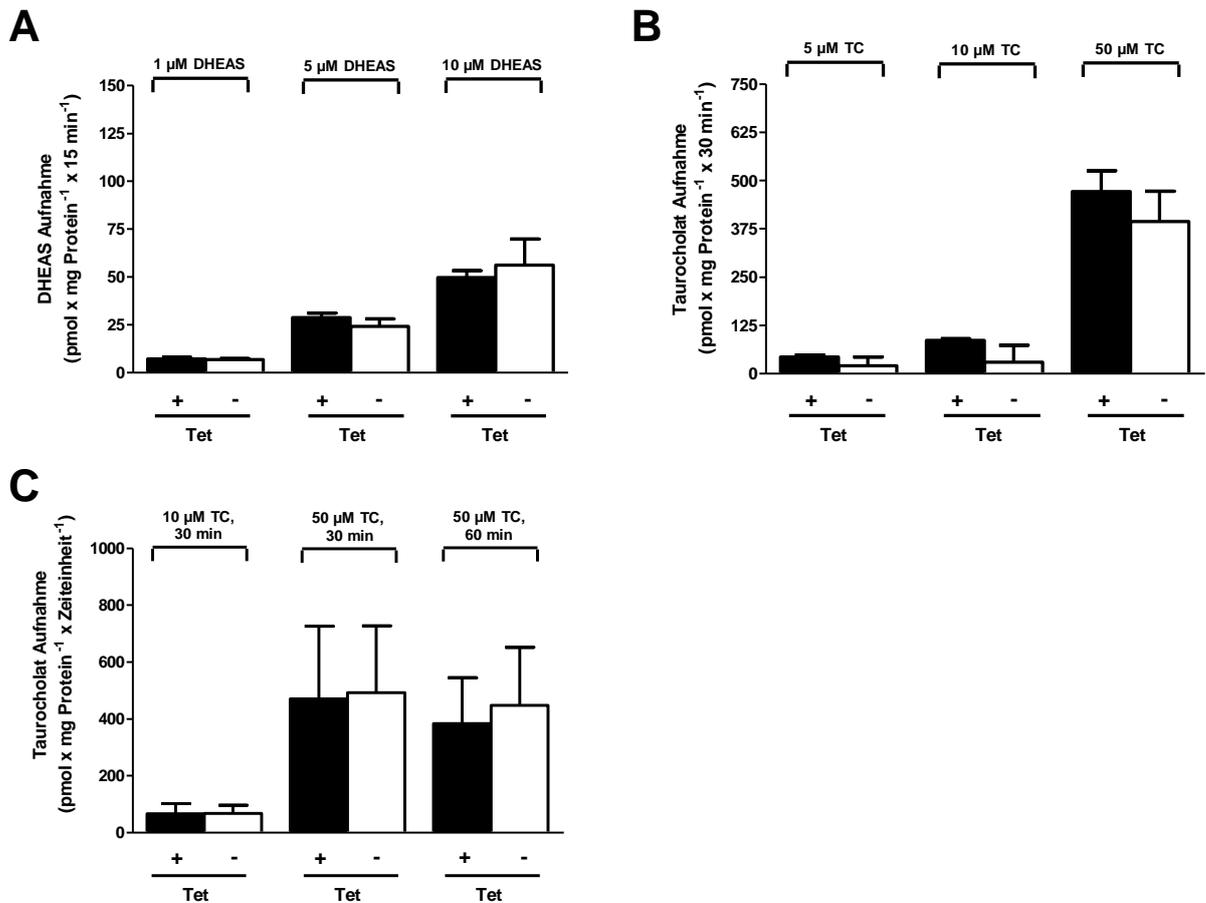


Abbildung 4.5: Aufnahme von $[^3\text{H}]$ DHEAS und $[^3\text{H}]$ Taurocholat (TC) in stabil transfizierte OATP6A1-HEK293 Zellen.

Zur Generierung der OATP6A1-HEK293 Zelllinien wurden sowohl das OATP6A1-FRT/TO Plasmid, wie auch das OATP6A1-FRT/V5-His Plasmid jeweils in Flp-In-HEK293 Zellen stabil transfiziert. Nach Selektion mit Blasticidin (Tet-Repressor, OATP6A1-FRT/TO Plasmid) und Hygromycin (Insert, beide Plasmid-Varianten) erfolgte die Kultivierung der Zellen in 24 well-Schalen mit (+) und ohne Tetrazyklin (-) bis zur 90 - 100 %-igen Konfluenz. Für die Aufnahmestudie wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen $[^3\text{H}]$ DHEAS (A, 1 μM , 5 μM , 10 μM) bzw. $[^3\text{H}]$ Taurocholat (B, 5 μM , 10 μM , 50 μM) in Natrium-haltigem Transportpuffer für 15 min (A) bzw. 30 min (B) inkubiert, bevor die Aufnahme mit eiskaltem PBS gestoppt und die Zellen lysiert wurden. Im Anschluss wurde die zellassoziierte Radioaktivität im Flüssigszintillationscounter ermittelt und in Bezug zum Proteingehalt gesetzt.

(C) Neben der Konzentrationsabhängigkeit wurde auch die zeitabhängige Aufnahme von Taurocholat untersucht. Hierzu wurden die Zellen mit 10 bzw. 50 μM $[^3\text{H}]$ Taurocholat entweder für 30 oder 60 min inkubiert, bevor sie gewaschen und lysiert wurden. +Tet: OATP6A1-HEK293 Zellen mit Tetrazyklin-induzierter Proteinexpression, -Tet: OATP6A1-HEK293 Zellen ohne Tetrazyklinzugabe.

(A-C) Dargestellt sind jeweils die MW \pm SD von zwei (A, B) bzw. drei (C) repräsentativen Experimenten mit Vierfachbestimmung (n=8 bzw. n=12).

4.3.2.2 OSCP1

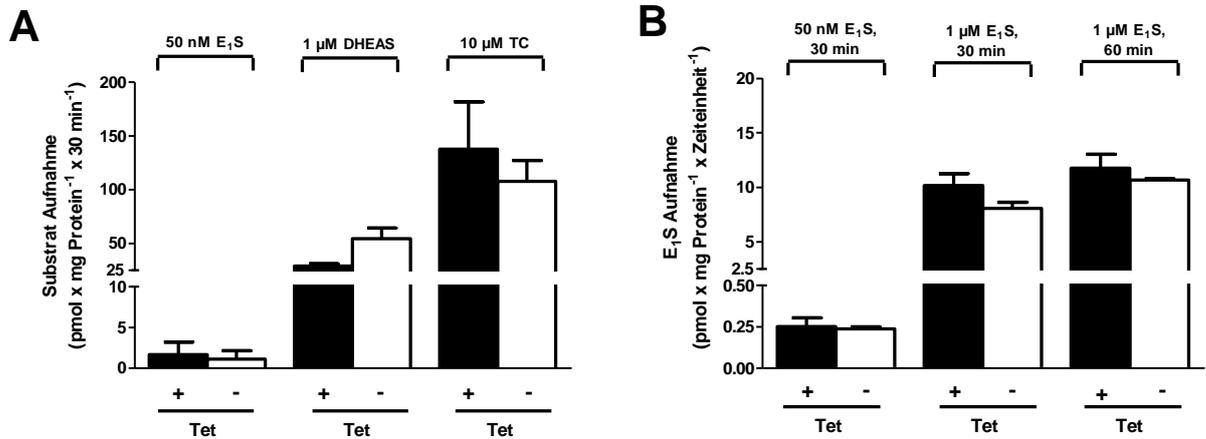


Abbildung 4.6: Substratscreening und zeitabhängige Aufnahme in stabil transfizierte OSCP1-HEK293 Zellen.

Die OSCP1-HEK293 Zelllinien wurden generiert, indem sowohl das OSCP1-FRT/TO Plasmid, als auch das OSCP1-FRT/V5-His Plasmid jeweils in Flp-In-HEK293 Zellen stabil transfiziert wurden. Nachdem die Zellen mit Blasticidin (Tet-Repressor) und Hygromycin (Insert) selektiert wurden, erfolgte die Kultivierung der Zellen in 24 well-Schalen mit (+Tet) und ohne Tetrazyklin (-Tet) bis zur 90-100 %-igen Konfluenz. Für das Substratscreening (A) wurden die Zellen mit 50 nM [³H]E₁S, 1 μM [³H]DHEAS und 10 μM [³H]Taurocholat (TC) in Natrium-haltigem Transportpuffer für 30 inkubiert, bevor die Aufnahme mit eiskaltem PBS gestoppt und die Zellen lysiert wurden. Im Anschluss wurde die zellassoziierte Radioaktivität im Flüssigszintillationscounter ermittelt und in Bezug zum Proteingehalt gesetzt. Für die Überprüfung der zeitabhängigen Aufnahme von E₁S wurden die Zellen mit 50 nM bzw. 1 μM [³H]E₁S für 30 bzw. 60 min inkubiert, bevor sie gewaschen und lysiert wurden (B). +Tet: OSCP1-HEK293 Zellen mit Tetrazyklin-induzierter Proteinexpression, -Tet: OSCP1-HEK293 Zellen ohne Tetrazyklinzugabe. (A, B) Dargestellt sind jeweils die MW ± SD von einem (A) bzw. zwei (B) repräsentativen Experimenten mit Vierfachbestimmung (n=4 bzw. n=8).

4.3.2.3 OATP1C1

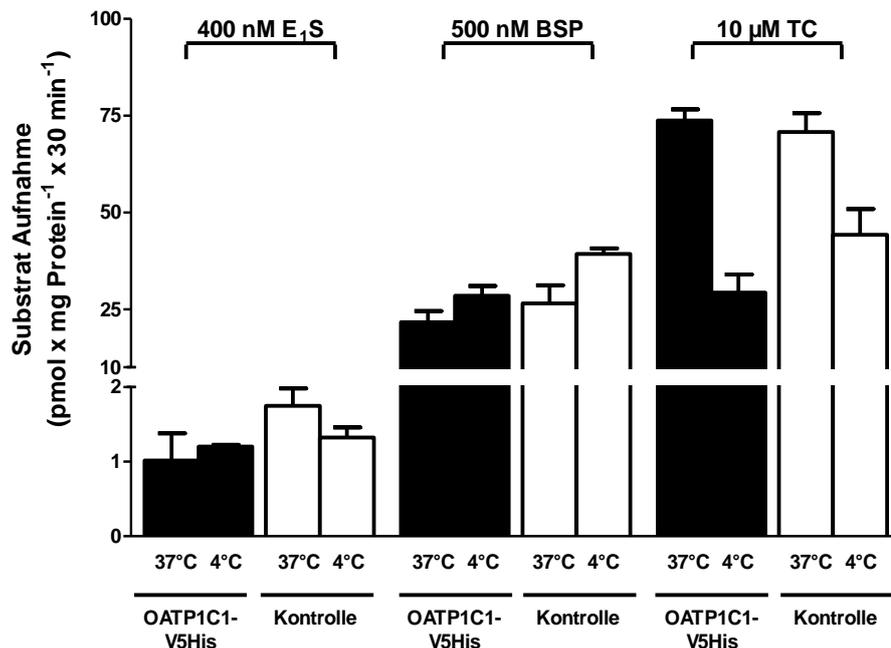


Abbildung 4.7: Aufnahmemessungen an stabil transfizierten OATP1C1-HEK293 Zellen

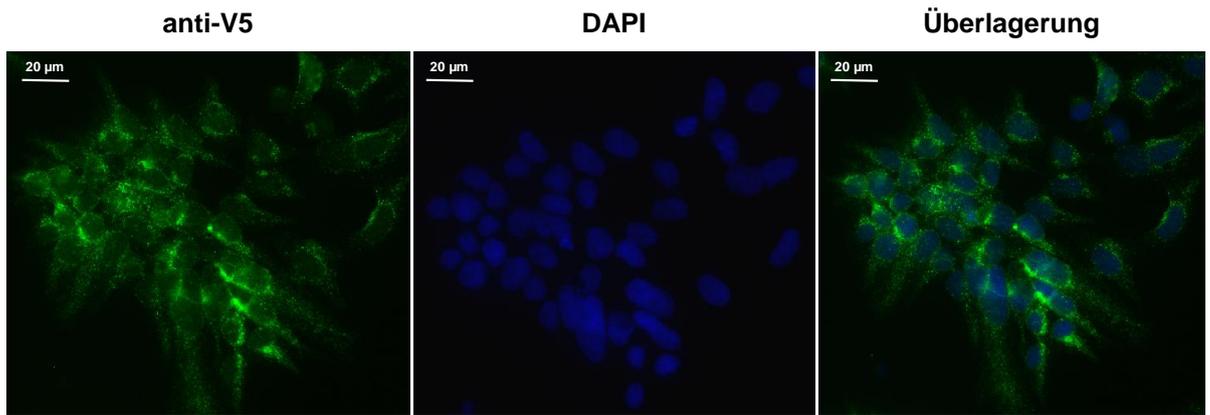
Zur Generierung der OATP1C1-V5His-HEK293 Zelllinie wurde das OATP1C1-V5His Plasmid in Flp-In-HEK293 Zellen stabil transfiziert. Nach Selektion mit Hilfe von Hygromycin (Insert) wurden die Zellen in 24 well-Schalen konfluent kultiviert. Für die Überprüfung potentieller Substrate wurden die Zellen mit 400 nM [³H]E₁S, 500 nM [³H]Bromosulphthalein (BSP) und 10 μM [³H]Taurocholat (TC) in Natrium-haltigem Transportpuffer für 30 min bei 37° C und 4° C inkubiert, bevor die Aufnahme mit eiskaltem PBS gestoppt und die Zellen lysiert wurden. Im Anschluss wurde die zellassoziierte Radioaktivität im Flüssigszintillationscounter ermittelt und in Bezug zum Proteingehalt gesetzt. Als Kontrolle dienten Flp-In-HEK293 Zellen. Dargestellt sind die MW ± SD eines repräsentativen Experimentes mit Dreifachbestimmung.

4.3.3 Immunfluoreszenz der OATP6A1-, OATP1C1- und OSCP1-Zelllinien

Da weder in den stabilen Zelllinien mit den ungetaggten Proteinen, noch in den HEK293 Zelllinien mit Expression der getaggten Proteine OATP6A1, OSCP1 und OATP1C1 ein Transport nachgewiesen werden konnte, wurde zumindest in den letztgenannten Zelllinien die Proteinexpression mittels Immunfluoreszenz überprüft. Dies sollte klären ob die Zielproteine wirklich exprimiert werden und wie deren Sorting in der Zelle aussieht.

4.3.3.1 Immunfluoreszenz der OATP6A1-V5His-HEK293 Zelllinie

Der Nachweis der V5His-markierten Proteine erfolgte über indirekte Immunfluoreszenz (siehe Kapitel 3.10.2 und 3.10.3). Die OATP6A1-V5His-HEK293 Zelllinie exprimiert das V5His-markierte OATP6A1 Protein wie in Abbildung 4.8 zu erkennen ist. Allerdings ist das Fluoreszenzsignal nicht in der Plasmamembran lokalisiert, sondern konzentriert sich in Form von intrazellulären Vesikeln, welche nicht näher spezifiziert werden konnten.



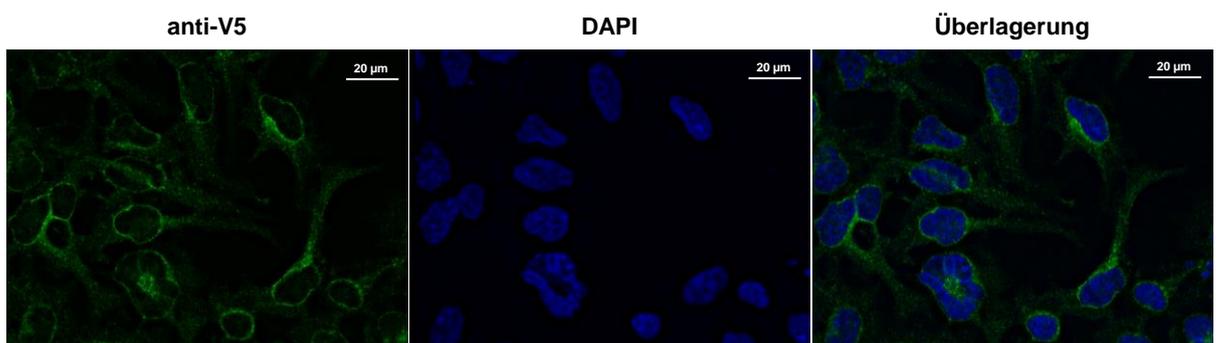
OATP6A1-V5His-HEK293 Zellen

Abbildung 4.8: Immunfluoreszenz der stabil transfizierten OATP6A1-V5His-HEK293 Zellen.

Für die Immunfluoreszenz wurden die OATP6A1-V5His-HEK293 Zellen auf Deckgläschen in 24-well Schalen ausgesät und für 72 h kultiviert, bevor die Immunzytochemie durchgeführt wurde. Hierzu diente der Maus anti-V5 (1:5.000, Invitrogen) als Primär- und der Ziege Alexa Fluor 488-gekoppelte anti-Maus (1:800, grün, Invitrogen) als Sekundärantikörper. Beide wurden jeweils 1 h bei RT auf die Zellen gegeben. Im Anschluss folgte die Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Dargestellt ist die Maximalprojektion eines Z-Stapels in der 40-fachen Vergrößerung. Das OATP6A1-V5His-Protein ist in intrazellulären vesikulären Strukturen lokalisiert, aber nicht in der Plasmamembran.

4.3.3.2 Immunfluoreszenz der OSCP1-V5His-HEK293 Zelllinie

Die stabil transfizierten OSCP1-V5His-HEK293 Zellen exprimierten ebenfalls das interessierende Protein. Hier zeigte sich eine homogene Verteilung des Fluoreszenzsignals im Zytoplasma der untersuchten Zellen mit einer deutlichen Akkumulation rund um den Zellkern. Eine Lokalisation in der Plasmamembran konnte nicht nachgewiesen werden.



OSCP1-V5His-HEK293 Zellen

Abbildung 4.9: Immunfluoreszenz der stabil transfizierten OSCP1-V5His-HEK293 Zellen.

Die OSCP1-V5His-HEK293 Zellen wurden auf Deckgläschen in 24-well Schalen ausgesät und nach 72 h mit dem Maus anti-V5 (1:5000) als Primär- und dem Ziege Alexa Fluor 488-gekoppelte anti-Maus (1:800, grün) als Sekundärantikörper jeweils 1 h bei RT inkubiert. Die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI (blau). Dargestellt ist die Maximalprojektion eines Z-Stapels nach *Non Blind Dekonvolution* Berechnung mit Reduzierung des Fluoreszenzhintergrundes und Umskalierung der Fluoreszenzintensität. Vergrößerung 63-fach.

4.3.3.3 Immunfluoreszenz der OATP1C1-V5His-HEK293 Zelllinie

Bei der Auswertung der Immunfluoreszenzstudie an den stabil transfizierten OATP1C1-V5His-HEK293 Zellen zeigte sich eine Lokalisation des Proteins in Strukturen angrenzend an den Zellkern und im Zytoplasma, aber wiederum keine Lokalisation in der Plasmamembran.

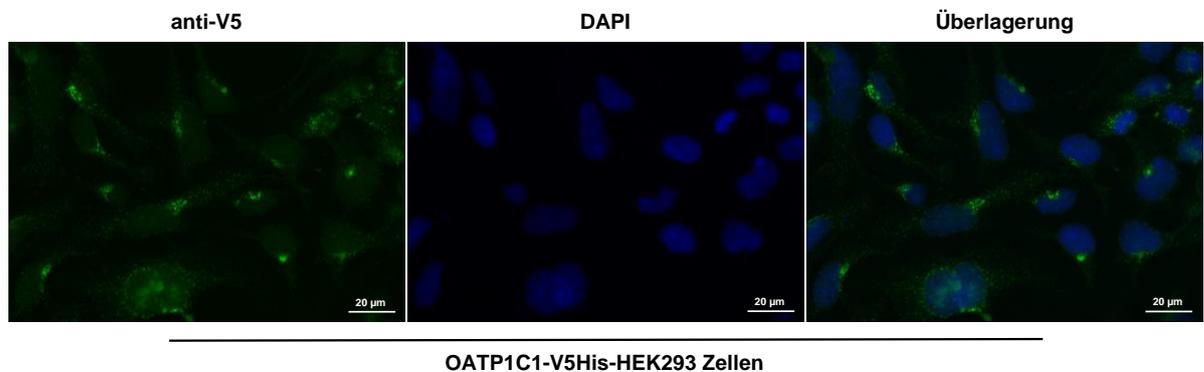


Abbildung 4.10: Immunfluoreszenz der stabil transfizierten OATP1C1-V5His-HEK293 Zellen.

Die OATP1C1-V5His-HEK293 Zellen wurden für die Fluoreszenzmikroskopie auf Deckgläschen in 24-well Schalen 72 h kultiviert, bevor sie zunächst mit dem Maus anti-V5 (1:5000) für 1 h bei RT inkubiert wurden. Nach mehreren Waschschritten folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper Ziege Alexa Fluor 488-gekoppelte anti-Maus (1:800, grün), ebenfalls 1 h bei RT. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Dargestellt ist die Maximalprojektion nach Z-Fokussierung (Z-Stapel, aufgenommen in der 63-fachen Vergrößerung).

4.4 Heterologe Expression in *Xenopus laevis* Oozyten

Neben den transient und stabil transfizierten HEK293-Zellkulturen sollte mit *Xenopus laevis* Oozyten ein weiteres Expressionmodell für die zu untersuchenden potentiellen Membrantransporter für sulfatierte Steroide verwendet werden. Daher wurden der OATP6A1, der OSCP1 und der OATP1C1 auch in diesem Modell exprimiert und funktionell untersucht. Hierfür wurde zunächst ein Stoppcodon in das V5His-Plasmid des jeweiligen Konstruktes mit Hilfe der zielgerichteten Mutagenese (siehe Kapitel 3.3.7) eingefügt, um die Expression des V5His-Tags zu verhindern und somit eine mögliche Fehlsortierung des Proteins in den Oozyten zu vermeiden. Nachdem die erfolgreiche Insertion über Sequenzanalyse bestätigt war, wurde von den linearisierten cDNA-Konstrukten cRNA transkribiert, die anschließend in die *Xenopus laevis* Oozyten injiziert wurde. Die Transportversuche wurden mit E₁S und DHEAS sowie im Falle des OATP6A1 auch mit Taurocholat durchgeführt. Die Injektion von NTCP-cRNA diente als Positivkontrolle. Allerdings konnte auch in diesem Expressionmodell keine Transportfunktion für OATP6A1, OATP1C1 und OSCP1 nachgewiesen werden, so dass der weitere Schwerpunkt der Arbeit allein auf das verbleibende Transportprotein SOAT gelegt wurde.

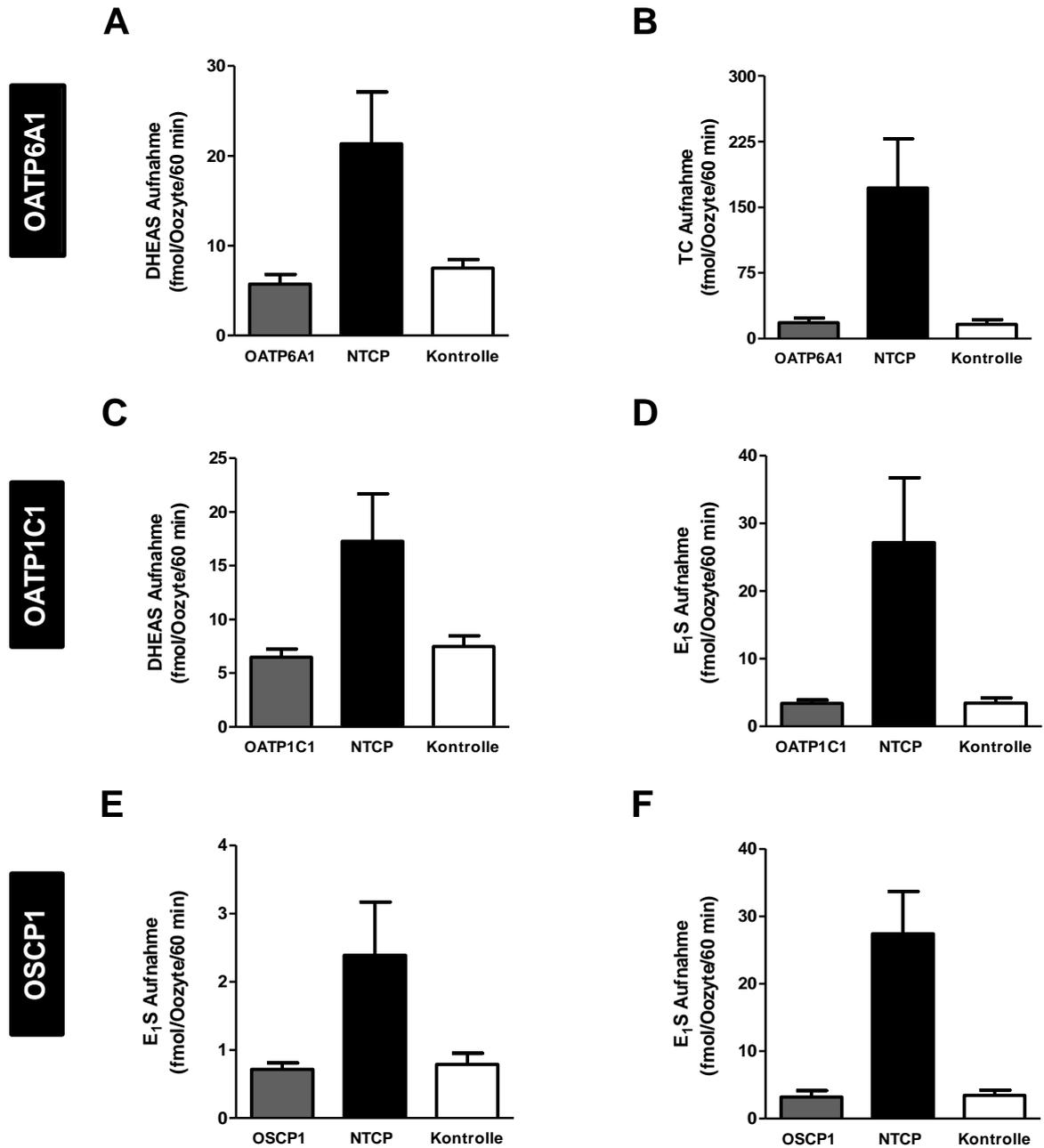


Abbildung 4.11: Aufnahme von $[^3\text{H}]\text{DHEAS}$, $[^3\text{H}]\text{Taurocholat (TC)}$ und $[^3\text{H}]\text{E}_1\text{S}$ in OATP6A1-, OATP1C1-, OSCP1- und NTCP-injizierte *Xenopus laevis* Oozyten.

Es wurden jeweils 4,6 ng der entsprechenden cRNA in *Xenopus laevis* Oozyten injiziert. Nach einer Expressionszeit von 72 h erfolgte die Aufnahmemessung. Hierfür wurden die Oozyten 60 min mit 500 nM $[^3\text{H}]\text{DHEAS}$ (A, C), 5 μM $[^3\text{H}]\text{TC}$ (B), 50 nM $[^3\text{H}]\text{E}_1\text{S}$ (E) oder 500 nM $[^3\text{H}]\text{E}_1\text{S}$ (D, F) inkubiert. Als Positivkontrolle wurden NTCP-injizierte Oozyten (schwarze Balken) verwendet. Oozyten, bei denen lediglich H_2O injiziert wurde, dienten als Negativkontrolle (weißer Balken). Dargestellt sind die MW \pm SD von 8-19 Oozyten eines repräsentativen Experiments.

4.5 Funktionelle Charakterisierung des SOATs

Der humane *Sodium-dependent Organic Anion Transporter* SOAT wurde bereits seit 2004 in verschiedenen Dissertationen am Institut für Pharmakologie und -toxikologie untersucht (Geyer 2005; Döring 2009; Karakus 2009; Funk 2009). Da SOAT Natrium-abhängig sulfatierte Steroidhormone transportiert und prädominant im Hoden exprimiert wird (siehe Kapitel 1.7.3.1 und Abbildung 4.2), stellte er für diese Arbeit ein ganz wesentliches Target dar. Die Schwerpunkte der vorliegenden Arbeit waren zum einen das Substratspektrum des SOAT zu erweitern und den Einfluss freier und sulfatierter Steroide auf sein Transportverhalten näher zu untersuchen sowie zum anderen die natürlich vorkommenden Einzelnukleotidpolymorphismen (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) des *SLC10A6*-Gens zu charakterisieren und eventuelle Einflüsse auf die Funktion und Lokalisation des resultierenden Proteins zu ermitteln.

4.5.1 Messung intakter sulfatierter Steroidmoleküle aus Zelllysaten mittels LC-MS/MS und Vergleich mit der Flüssigszintillationsmessung

In vorangegangenen Arbeiten (Döring 2009; Grosser 2013) sind bereits zahlreiche Substrate des SOATs identifiziert worden. Dazu wurde die Flüssigszintillationsmessung (*liquid scintillation counting*, LSC) genutzt. Bei dieser Methode werden die Zellen, die das interessierende Protein überexprimieren mit einer Messlösung inkubiert, die das Substrat sowohl unmarkiert, als auch in radioaktiv-markierter Form enthält. Nach Beenden der Transportmessung werden die Zellen dabei zunächst mit NaOH-SDS lysiert, bevor im Flüssigszintillationscounter die zellassoziierte Radioaktivität aus den Zelllysaten bestimmt wird. Diese Methode ist etabliert und in der Literatur häufig beschrieben. Allerdings hat sie den Nachteil, dass nur die Radioaktivität des Zelllysats gemessen wird und nicht die Substanz selbst. Die aufgenommene Substanzmenge wird durch Berechnungen aus dem Wert der Radioaktivität extrapoliert und ist somit nur eine Abschätzung und keine absolute Quantifizierung. Ein weiterer Nachteil der Methode besteht darin, dass nicht alle interessanten Substanzen radioaktiv-markiert zur Verfügung stehen. Ferner ist die Synthese der radioaktiv-markierten Stoffe aufwendig und teuer, so dass viele Substanzen leider nicht in der radioaktiv-markierten Form käuflich zu erwerben sind. Da in dieser Arbeit aber neue, potentielle Substrate untersucht werden sollten und es außerdem interessant ist, die von SOAT transportierten Substanzmengen exakt benennen zu können, wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. S. Wudy eine Methode entwickelt und etabliert (Galuska et al. 2013), bei der die aufgenommene Menge des intakten Steroidsulfat-Moleküls in die stabil

transfizierten SOAT-HEK293 Zellen aus Zelllysaten mittels LC-MS/MS genau bestimmt werden kann.

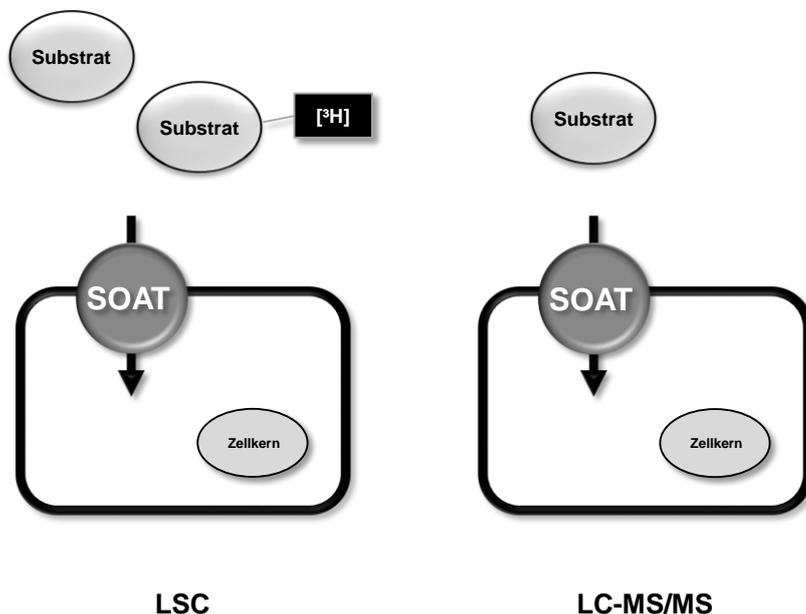


Abbildung 4.12: Schematische Darstellung der Transportmessung mit und ohne radioaktiv-markierten Substanzen.

Bei der Radioaktivmessung (LSC) werden unmarkierte und radioaktiv-markierte Substanzen der Messlösung hinzugefügt. Bei der Transportmessung mit Analyse über LC-MS/MS hingegen wird nur die unmarkierte Substanz verwendet.

Die Zellexperimente wurden im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Veterinärmedizin durchgeführt, wohingegen die Etablierung der LC-MS/MS-Methode für die Zelllysate im Labor von Herrn Prof. Dr. Wudy stattfand. Hieran waren maßgeblich Frau Dr. C. Galuska und Herr A. Sanchez-Guijo beteiligt. Die Auswertung und die graphische Darstellung der Daten erfolgte allerdings wieder in der Veterinärpharmakologie durch die Verfasserin der Dissertationsschrift. Die Zellen wurden bei dieser Methode, wie unter 3.9 beschrieben, mit ddH₂O versetzt und über drei Frier-Tau-Zyklen lysiert, da NaOH-SDS die LC-MS/MS stören würde. Die Methode wurde sowohl an den SOAT-HEK293 Zellen, als auch an den NTCP-FLAG-HEK293 Zellen und den ASBT-FLAG-HEK293 Zellen etabliert, die im Institut für Pharmakologie und Toxikologie zur Verfügung standen. Diese Zelllinien wurden ausgewählt, da SOAT und NTCP sulfatierte Steroide transportieren und somit die Positivkontrolle darstellten, wohingegen ASBT keine Transportaktivität für Steroidsulfate aufweist und daher zusammen mit den Flp-In-HEK293 Zellen die Negativkontrolle repräsentierte. In Abbildung 4.13 ist die Aufnahme von E₁S und DHEAS in die verschiedenen HEK293 Zelllinien vergleichend dargestellt. In beiden Methoden transportierten SOAT und NTCP Natrium-abhängig sowohl E₁S, wie auch DHEAS. Der ASBT hingegen zeigte, wie auch die Kontrolle

(Flp-In-HEK293 Zellen) keine nennenswerte Aufnahme der beiden Substanzen. Überraschend war, dass auch die absoluten Werte der beiden Messmethoden für beide Substrate keine großen Unterschiede aufwiesen. Sowohl beim LSC, als auch in der LC-MS/MS war die E₁S-Aufnahme durch NTCP größer als durch SOAT. Der Transport von DHEAS in die Zellen war im Gegensatz dazu bei SOAT stärker. Dies konnte mit beiden Methoden gezeigt werden. Die LC-MS/MS ist somit die ideale Methode, um die Menge der in die Zelle aufgenommenen intakten Steroidsulfat-Moleküle zu bestimmen. Sie liefert dabei nicht nur vergleichbare, sondern vor allem exaktere Werte wie das LSC, da sie im Gegensatz zu diesem die Substanz selbst nachweist.

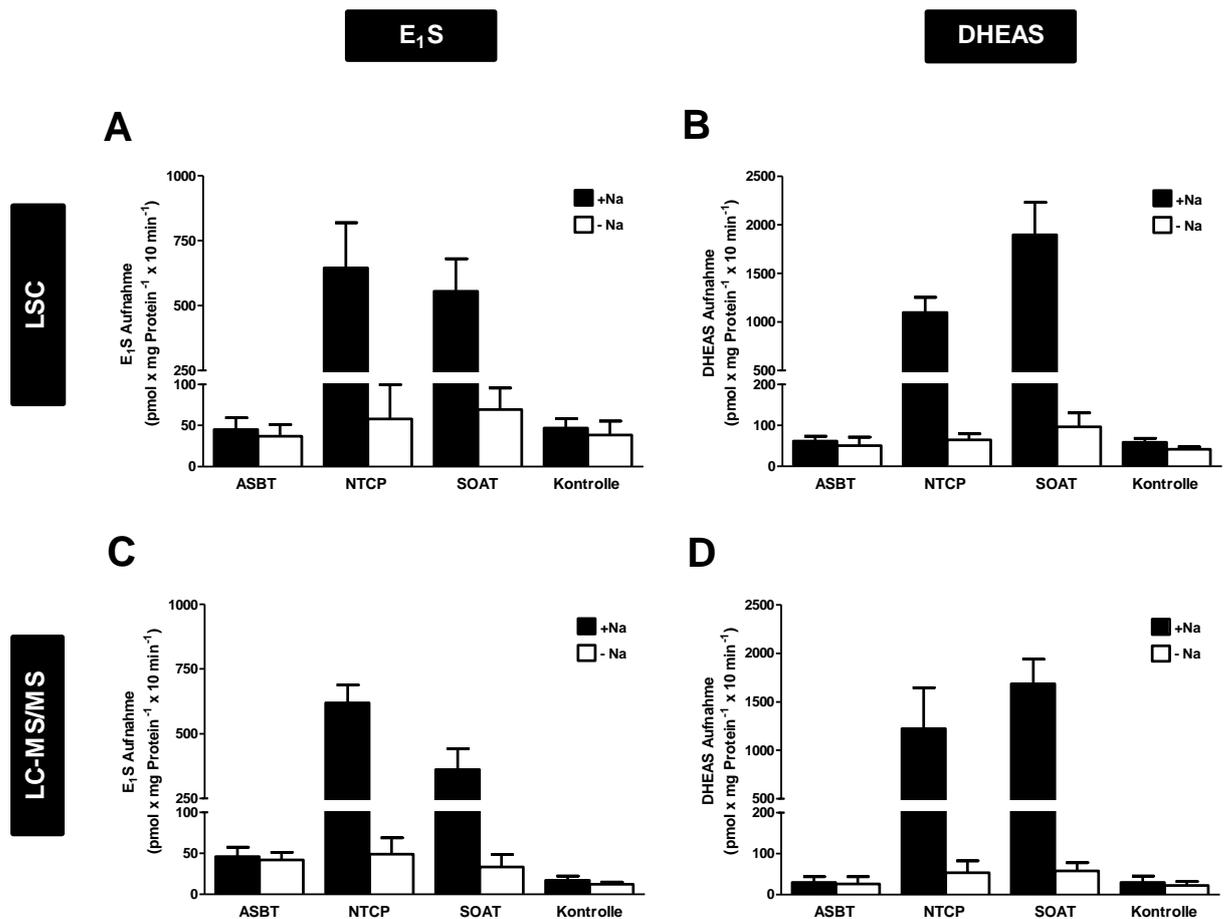


Abbildung 4.13: Vergleich der Aufnahme von radioaktiv-markiertem und unmarkiertem E₁S und DHEAS in stabil transfizierte HEK293 Zelllinien mit anschließender Ermittlung der aufgenommenen Substratmenge mittels Flüssigszintillationsmessung (LSC) und Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS).

Die stabil transfizierten Zelllinien ASBT-FLAG-HEK293, NTCP-FLAG-HEK293 und SOAT-HEK293 wurden in 24-well Platten ausgesät und die Proteinexpression mit Tetrazyklin induziert. Nach 72 h erfolgte die Aufnahmemessung, indem die Zellen entweder mit 10 μ M [³H]E₁S (A) bzw. 10 μ M [³H]DHEAS (B) oder mit 10 μ M unmarkiertem E₁S (C) bzw. 10 μ M unmarkiertem DHEAS (D), jeweils gelöst in Natrium-haltigem (■) oder Natrium-freiem (□) Transportpuffer, für 10 min inkubiert wurden. Nach Abgießen der Messlösung und Waschen der Zellen mit eiskaltem PBS, wurden die Zellen mit ddH₂O versetzt und mit Hilfe von drei Frier-Tau-Zyklen lysiert. Im Anschluss wurde die Aufnahme des jeweiligen Substrats im Flüssigszintillationscounter (radioaktiv markierte Substanz (A, B)) oder mittels LC-MS/MS (unmarkierte Substanz (C, D)) gemessen und auf den Proteingehalt der Probe bezogen. Als Negativkontrolle dienten nicht transfizierte Flp-In-HEK293 Zellen. Dargestellt sind jeweils die MW \pm SD von zwei unabhängigen Experimenten (n=8).

4.5.2 Erweiterung des Substratspektrums des SOAT

Wie eben schon erwähnt sind viele Substanzen, die potentielle Substrate des SOAT darstellen, nicht in radioaktiv-markierter Form erhältlich. Mit Etablierung der LC-MS/MS für die Messung intakter Steroidsulfate aus Zelllysaten, konnte das Problem der mangelnden Verfügbarkeit umgangen werden und neue Substrate des SOAT identifiziert werden. SOAT transportierte sehr spezifisch sulfatierte Steroide und zwar nicht nur E₁S, DHEAS und PREGS, sondern auch Estradiol-3-sulfat (E₂S) und Androstendiol-3-sulfat (Fietz et al. 2013). Diese beiden Substanzen lagen bislang nur unmarkiert vor und wurden mit Hilfe der LC-MS/MS als neue Substrate des SOAT identifiziert. Dass zwei weitere Steroidsulfate zum Substratspektrum des SOAT gehören, bekräftigt seine Bedeutung als spezifischer Steroidsulfat-Transporter.

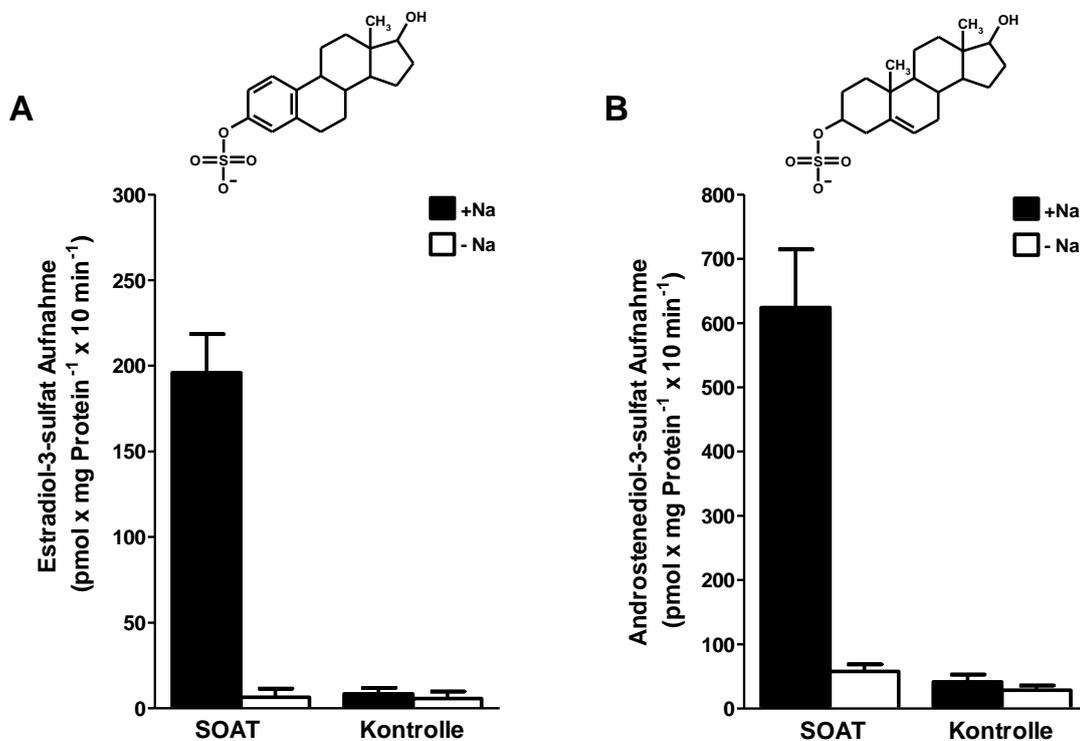


Abbildung 4.14: Identifizierung neuer Substrate des Membrantransporters SOAT.

Stabil transfizierte SOAT-HEK293 wurden ausgesät und nach Induktion der Proteinexpression mit Tetrazyklin für 72 h kultiviert, bevor das Medium abgezogen und nach Equilibrierung mit Natrium-haltigem (■) oder Natrium-freiem (□)Transportpuffer die Messlösung (A: 10 µM Estradiol-3-sulfat, B: 10 µM Androstenediol-3-sulfat) auf die Zellen gegeben wurde. Nach 10 min wurde die Messlösung abgekippt, die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit ddH₂O über drei Frier-Tau-Zyklen lysiert. Die aufgenommene Menge Estradiol-3-sulfat bzw. Androstendiol-3-sulfat wurde durch Analyse des Lysats mit Hilfe der LC-MS/MS bestimmt und auf die Proteinmenge des Lysats bezogen. Flp-In-HEK293 Zellen wurden als Negativkontrolle (Kontrolle) eingesetzt. Die Abbildungen zeigen jeweils die MW ± SD zweier unabhängiger Experimente (n=8).

4.5.3 Einfluss der im fötalen Kälberserum (FKS) enthaltenen Steroide auf die Aufnahme von DHEAS durch SOAT

Das nächste Ziel dieser Arbeit war den SOAT-vermittelten Transport in Anwesenheit sogenannter Steroidmixe, die sich sowohl aus freien, als auch aus sulfatierten Steroiden zusammensetzten, zu untersuchen. Hierfür wurde zunächst eine Studie durchgeführt, bei der die SOAT-HEK293 Zellen in Anwesenheit von fötalem Kälberserum (FKS) und in Anwesenheit von aufgereinigtem, steroidfreiem Kälberserum (Dextran-coated Charcoal-treated Fetal Calf Serum, DCC-FKS) vor dem Transportversuch kultiviert wurden. Dies sollte zeigen, ob die Anwesenheit verschiedener, im FKS enthaltener Steroide einen generellen Einfluss auf den SOAT-vermittelten Transport hat und für die Untersuchung der Steroidmixe eine steroidfreie Kultivierung vorgenommen werden muss. Es zeigte sich, dass die Verwendung von steroidhaltigem FKS zur Kultivierung der SOAT-HEK293 Zellen keinen Unterschied in der Aufnahme von DHEAS durch SOAT im Vergleich zu den SOAT-HEK293 Zellen macht, die mit DCC-FKS ausgesät wurden. Daher wurden die nachfolgenden Transportstudien, in denen Steroidmixe eingesetzt wurden, mit Zellen durchgeführt, deren Kultivierung in steroidhaltigem FKS und somit in dem Standardmedium der Zellen stattgefunden hatte.

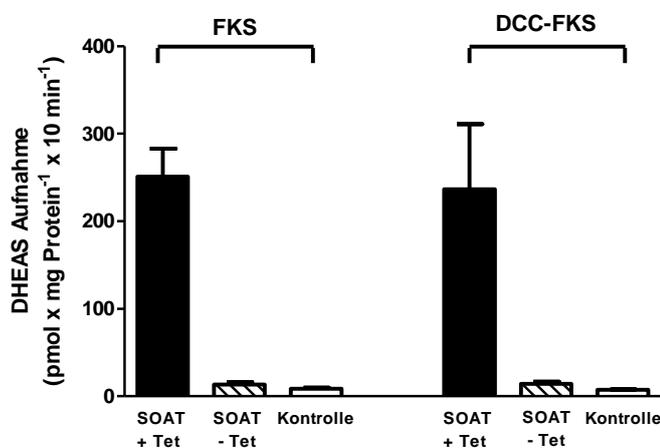


Abbildung 4.15: Aufnahme von $[^3\text{H}]$ DHEAS in SOAT-HEK293 Zellen nach Inkubation mit fötalem Kälberserum bzw. aufgereinigtem fötalem Kälberserum.

SOAT-HEK293 Zellen wuchsen mit (schwarzer Balken) und ohne (gestreifter Balken) Tetrazyklin-Induktion für vier Tage in Anwesenheit von fötalem Kälberserum (FKS) oder in Anwesenheit von aufgereinigtem fötalem Kälberserum (Behandlung mit Dextran überzogener Aktivkohle, DCC-FKS), bevor sie mit $1 \mu\text{M}$ $[^3\text{H}]$ DHEAS in Natrium-haltigem Transportpuffer für 10 min inkubiert wurden. Nach Stoppen der Aufnahme durch Waschen mit eiskaltem PBS und Lyse der Zellen, wurde die zellassoziierte Radioaktivität im Flüssigszintillationscounter bestimmt. Als Negativkontrolle dienten Flp-In-HEK293 Zellen (Kontrolle, weißer Balken).

4.5.4 Transportversuche mit Steroidgemischen

Da im menschlichen Körper Steroidhormone und ihre sulfatierten Formen in der Regel nicht isoliert als Einzelsubstanzen, sondern in Form von Steroidgemischen vorliegen, war es natürlich interessant, herauszufinden, ob diese physiologisch vorkommenden Gemische Auswirkungen auf die Transporter-vermittelte Aufnahme der sulfatierten Steroide in die Zellen haben. Aus diesem Grund wurden Transportstudien mit verschiedenen Steroidmischen durchgeführt. Zuerst wurde ein Versuchsaufbau gewählt, bei dem die SOAT-HEK293 Zellen mit einem Gemisch aus E₁S, PREGS und DHEAS inkubiert wurden. Die Konzentrationen betragen jeweils 10 µM. Diese für E₁S und PREGS vermeintlich hohe Konzentration (physiologisch: E₁S: 10 nM, PREGS: 1 µM) dienten dazu, in einem ersten Screening festzustellen, was überhaupt transportiert wird, wenn mehrere Substrate gleichzeitig angeboten werden und in welchen Mengen die sulfatierten Steroide in solch einem Fall in die Zellen aufgenommen werden. Die Analyse der Zelllysate erfolgte mittels LC-MS/MS, da es bei dieser Methode möglich ist, gleichzeitig mehrere intakte Steroidsulfate in einer Probe zu analysieren, was mit dem LSC nicht möglich wäre, da dort die gemessene Radioaktivität nicht den einzelnen Substanzen zuzuordnen ist. Die Konzentration von 10 µM ist in der LC-MS/MS bei den meisten sulfatierten Steroiden sehr gut nachweisbar und somit ideal, um herauszufinden, ob überhaupt eine Aufnahme stattfindet. In Abbildung 4.16 ist zu sehen, dass alle in dem Gemisch angebotenen Steroidsulfate (E₁S, PREGS und DHEAS) in die Zellen aufgenommen wurden. Es zeigt sich, dass bei gleicher Konzentration der angebotenen Steroidsulfate PREGS in größeren Mengen transportiert wird als DHEAS und E₁S. Das Verhältnis der Aufnahme der Steroidsulfate zueinander betrug PREGS:DHEAS:E₁S ≈ 15:4:1. Hierzu wurde die aufgenommene Menge im Ansatz ohne Natrium von der aufgenommenen Menge des Ansatzes mit Natriumzusatz im Puffer subtrahiert. Der nächste Schritt war, die Konzentrationen an physiologische Gegebenheiten zu adaptieren. Hierzu wurden SOAT-HEK293 Zellen mit einem Steroidmix bestehend aus 10 nM E₁S, 1 µM PREGS und 10 µM DHEAS inkubiert. Es zeigte sich, dass die Aufnahme von PREGS um den Faktor 10 korrelierend mit der Konzentration sank. Demgegenüber verdoppelte sich die Aufnahmemenge des DHEAS. Die E₁S-Aufnahme nahm deutlich ab (Faktor 400) bei diesem Versuchsansatz. Interessanterweise wurde in beiden Studien auch in den Lysaten der Kontrollzellen (Flp-In-HEK293) eine verhältnismäßig große Menge PREGS gefunden, wohingegen die Aufnahme von DHEAS und E₁S in diesen Zellen vernachlässigbar gering war.

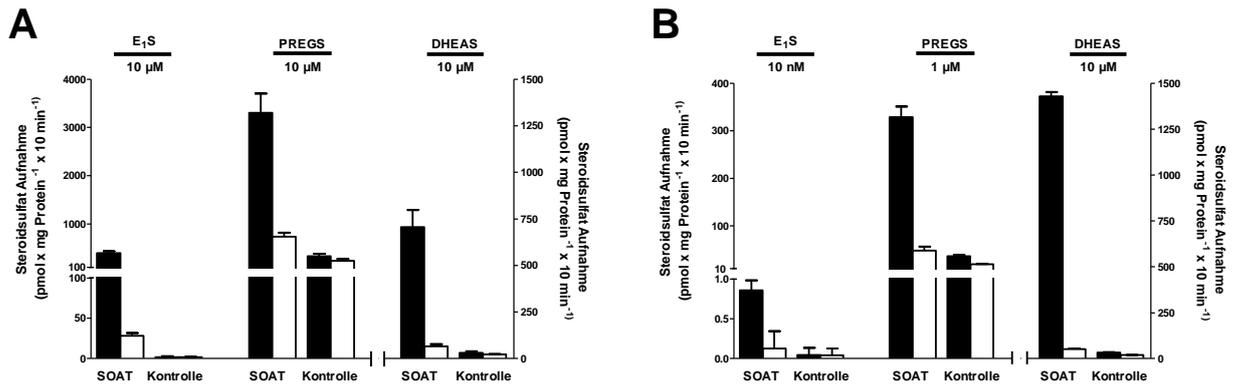


Abbildung 4.16: Aufnahme von Steroidsulfat-Mixen in physiologischen und supraphysiologischen Konzentrationen in SOAT-HEK293 Zellen und Flp-In-HEK293 Zellen.

Tetrazyklin-induzierte SOAT-HEK293 Zellen und Flp-In-HEK293 Zellen (Kontrolle) wurden mit Natrium-haltigen (■) oder Natrium-freien (□) Transportpuffer inkubiert, der entweder einen Steroidmix mit 10 µM E₁S, 10 µM PREGS und 10 µM DHEAS (A) oder einen Steroidmix in physiologischen Konzentrationen (B, 10 nM E₁S, 1 µM PREGS und 10 µM DHEAS) enthielt. Die aufgenommene Menge an sulfatierten Steroiden wurde mittels LC-MS/MS ermittelt. Die Graphen zeigen die MW ± SD eines repräsentativen Experiments mit Vierfachbestimmung. Auf der linken y-Achse ist die Aufnahme von E₁S und PREGS, auf der rechten y-Achse die Aufnahme von DHEAS dargestellt.

Es wurden ferner Transportstudien durchgeführt, in denen steigende Konzentrationen (0 µM, 0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM und 100 µM) des Substrates E₁S verwendet wurden, wohingegen die Konzentrationen der Substrate PREGS und DHEAS aber konstant bei 1 µM für PREGS und 10 µM für DHEAS blieben. Es zeigte sich, dass in den Konzentrationen von 0 bis 0,1 µM keine in der LC-MS/MS detektierbare Menge E₁S in die Zellen durch SOAT transportiert wurde. Die Verwendung von Messlösungen mit 1 µM (Messlösung Nr. 4) bzw. 10 µM E₁S (Messlösung Nr. 5) hingegen führte zu einer messbaren Aufnahme von E₁S. Bei der Verwendung der Messlösung mit der höchsten E₁S-Konzentration (Messlösung Nr. 5) kam es zu deutlichen Veränderungen des Transports. Die Aufnahme von PREGS war in Versuchsansatz 1 und 2 bzw. 3 und 4 konstant und schien bei steigenden Konzentrationen von E₁S stimuliert zu werden und ebenfalls anzusteigen. Ein ähnliches Bild, allerdings deutlicher, zeigte der Transport von DHEAS. Auch hier wurde die Aufnahme zunächst durch steigende Konzentrationen E₁S gefördert. Interessanterweise sank die Aufnahme der beiden Substrate massiv, wenn die Konzentration von E₁S im Steroidmix 100 µM betrug. So verminderte sich die Aufnahme von DHEAS um ca. 94 %, die Aufnahme von PREGS um zwei Drittel auf ca. 38 %. Im Gegensatz dazu stieg die Transportrate von E₁S um den Faktor 14,5, was einer Steigerung von mehr als 1000 % entspricht. E₁S scheint somit sowohl eine stimulierende, als auch eine hemmende Wirkung innerhalb eines Steroidgemisches einnehmen zu können.

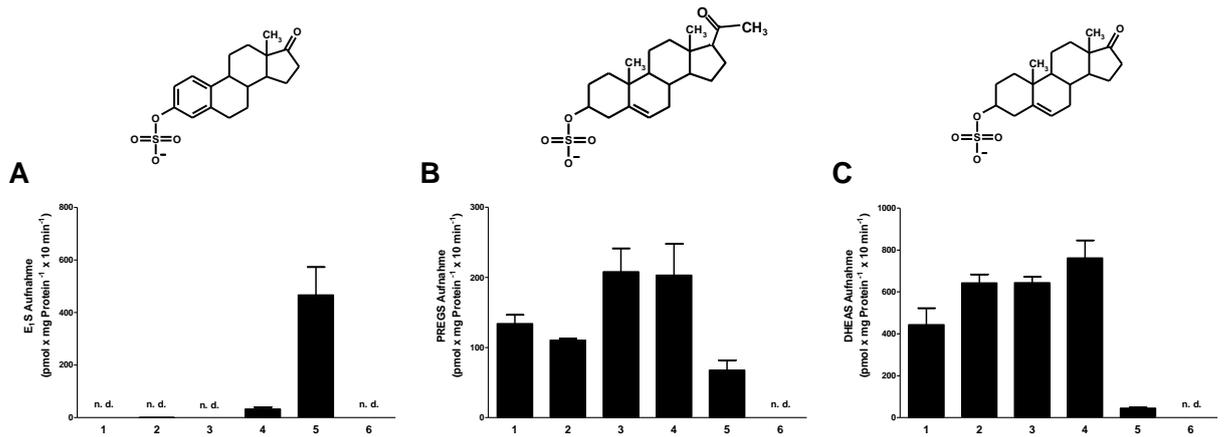


Abbildung 4.17: Aufnahme von Steroidsulfat-Mixen mit steigenden E₁S-Konzentrationen in SOAT-HEK293 Zellen.

SOAT-HEK293 Zellen wurden mit verschiedenen Messlösungen (1-6, siehe Tabelle 4.2) inkubiert, die steigende Konzentrationen E₁S enthielten. In den Messlösungen 1-5 waren, zusätzlich zum E₁S, 1 μM PREGS und 10 μM DHEAS enthalten. In Messlösung 6 befand sich nur E₁S, aber kein PREGS oder DHEAS. Die aufgenommene Menge der Steroidsulfate wurde nach Zellyse mit ddH₂O und drei Frier-Tau-Zyklen in der LC-MS/MS bestimmt. Die Graphen stellen die Aufnahme von E₁S (A), PREGS (B) und DHEAS (C) nach Inkubation mit den jeweiligen Steroidmischen dar. MW \pm SD (jeweils n=3) eines repräsentativen Experiments. n. d.: nicht detektierbar (Menge unterhalb der Nachweisgrenze).

Tabelle 4.2 Messlösungen mit steigenden Konzentrationen E₁S

Messlösung Nr.	E ₁ S	PREGS	DHEAS
1	-	1 μM	10 μM
2	0,01 μM	1 μM	10 μM
3	0,1 μM	1 μM	10 μM
4	1 μM	1 μM	10 μM
5	100 μM	1 μM	10 μM
6	0,01 μM	-	-

In weiteren Transportstudien wurde der Einfluss freier Steroide auf die Aufnahme von E₁S, PREGS und DHEAS untersucht. Es stellte sich heraus, dass die Anwesenheit geringer Mengen freien Estrons (0,5 nM, E₁) zu einer Steigerung der Aufnahme von E₁S (Abbildung 4.18, dunkelgrauer Balken, A) in die Zellen führt, die 400 % über der Kontrolle (gesetzt als 0 %) liegt. Im Gegensatz dazu wurde die Aufnahme von PREGS (B) und DHEAS (C) durch die Anwesenheit von freiem E₁ nicht gesteigert. Die Zugabe verschiedener E₁-Konzentrationen (0,5 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM) zum Steroidmix führte zu keiner Steigerung der E₁S-Aufnahme. Ein Versuchsansatz bei dem 0,5 nM Testosteron zum Steroidgemisch hinzugegeben wurden, führte ebenfalls zu keiner erhöhten Aufnahme der sulfatierten Steroide (Abbildung 4.18, hellgraue Balken, A-C)).

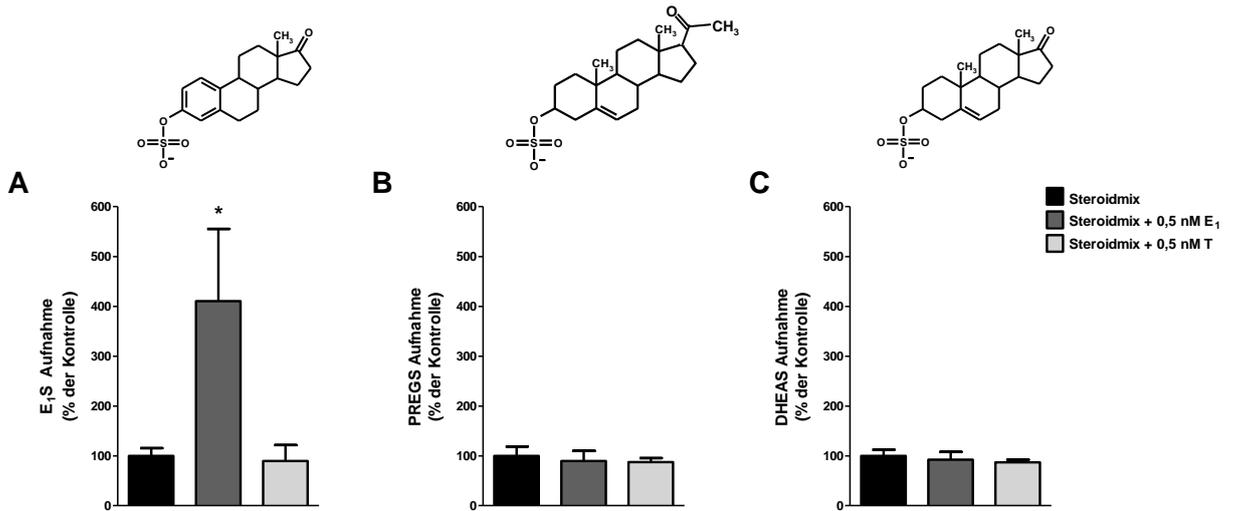


Abbildung 4.18: Aufnahme von Steroidsulfat-Mixen in physiologischen Konzentrationen in SOAT-HEK293 Zellen.

SOAT-HEK293 Zellen wurden mit einem Steroidmix, der 10 nM E₁S, 1 µM PREGS und 10 µM DHEAS in Natriumhaltigem Transportpuffer enthielt, inkubiert (schwarzer Balken). Die aufgenommene Menge an sulfatierten Steroiden wurde mittels LC-MS/MS ermittelt. Der Steroidmix wurde außerdem mit 0,5 nM Estron (E₁) (dunkelgrauer Balken) und 0,5 nM Testosteron (T, hellgrauer Balken) ergänzt und ebenfalls auf SOAT-HEK293 Zellen gegeben. Auch hier wurde die aufgenommene Menge der Steroidsulfate mit Hilfe der LC-MS/MS bestimmt. Die Graphen stellen die prozentuale Aufnahme von E₁S (A), PREGS (B) und DHEAS (C) dar, nachdem die aufgenommene Menge (gleichgesetzt mit 100 %) der Kontrollzellen (Flp-In-HEK293 Zellen) von der Aufnahmemenge der SOAT-HEK293 Zellen abgezogen wurde. Die Werte stellen MW ± SD (jeweils n=4) dar. * Signifikant unterschiedlich zur Kontrolle mit p<0,05 (Student's *t* test, A).

Zusätzlich zu der Konzentration von 0,5 nM Testosteron wurde der Versuch auch mit einer deutlich höheren Testosteronkonzentration von 100 µM durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Aufnahme von E₁S, PREGS und DHEAS durch die Anwesenheit größerer Mengen Testosteron beeinflusst wird. Es stellte sich aber heraus, dass die Aufnahme der Substrate auch durch die hohe Testosteronkonzentration nicht gesteigert oder deutlich gesenkt wurde.

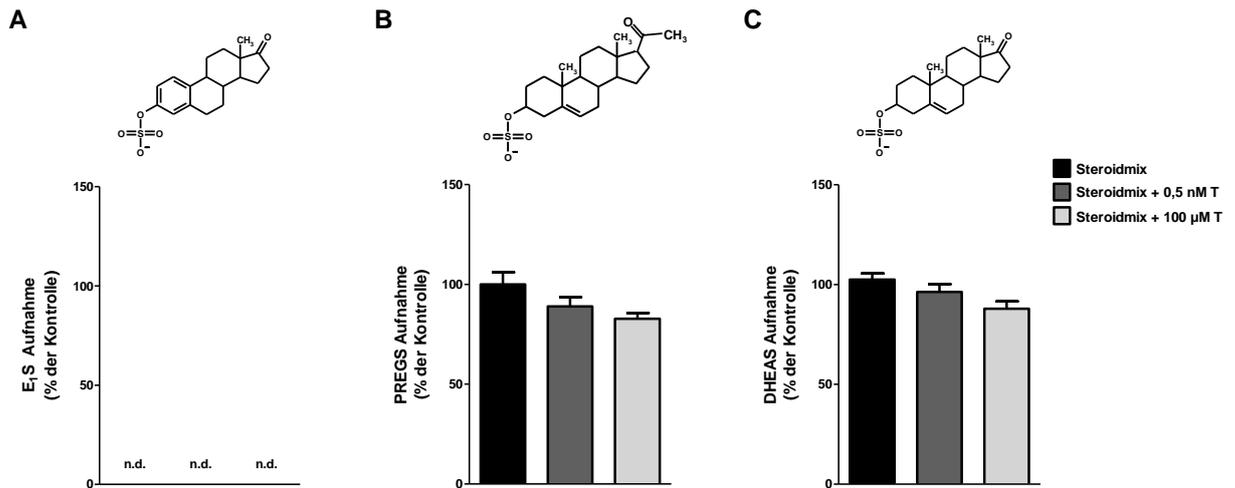


Abbildung 4.19: Aufnahme des Steroidsulfat-Mixes in Anwesenheit von unterschiedlichen Testosteronkonzentrationen in SOAT-HEK293 Zellen.

Die Aufnahme der sulfatierten Steroide E₁S (A), PREGS (B) und DHEAS (C) in SOAT-HEK293 Zellen wurden nach Inkubation mit einem Steroidmix bestehend aus 10 nM E₁S, 1 µM PREGS und 10 µM DHEAS in Natrium-haltigem Transportpuffer in der LC-MS/MS bestimmt (schwarzer Balken). Daneben erfolgte die Inkubation mit einem Steroidmix, dem allerdings zusätzlich zwei unterschiedliche Testosteronkonzentrationen (T, 0,5 nM, dunkelgrauer Balken, 100 µM Testosteron, hellgrauer Balken) zugesetzt wurden. Auch hier wurde die aufgenommene Menge der Steroidsulfate mit Hilfe der LC-MS/MS bestimmt. Die Graphen stellen die prozentuale Aufnahme von E₁S, PREGS und DHEAS dar, nachdem die aufgenommene Menge (gesetzt als 100 %) der Kontrollzellen (nicht induzierte SOAT-HEK293 Zellen) von der Aufnahmemenge der induzierten SOAT-HEK293 Zellen abgezogen wurde. Die Werte stellen MW ± SD von zwei repräsentativen Experimenten (n=8) dar. n.d: nicht detektierbar (unterhalb der Nachweisgrenze).

Ein weiterer Ansatz enthielt neben 10 nM E₁S, 1 µM PREGS und 10 µM DHEAS die freien Formen (0,5 nM E₁, 17 nM DHEA) der Steroidsulfate sowie 0,5 nM Testosteron. Pregnenolon ließ sich in der Konzentration von 20 µM nur schwer lösen und fiel in den Transportpuffern regelmäßig aus, so dass diese Substanz der Messlösung nicht hinzugefügt werden konnte. In diesem Versuchsansatz wurde keine erhöhte Aufnahme von E₁S in die SOAT-HEK293 im Vergleich zu den Zellen, die nur mit den physiologischen Konzentrationen von E₁S, PREGS und DHEAS ohne Zugabe freier Steroide inkubiert wurden, festgestellt. Die aufgenommenen Mengen der Steroidsulfate unterschieden sich nicht zwischen dem Ansatz mit freien Steroiden und dem Ansatz bei dem keine freien Steroide hinzugefügt wurden und waren mit denen der Experimente aus Abbildung 4.16B vergleichbar.

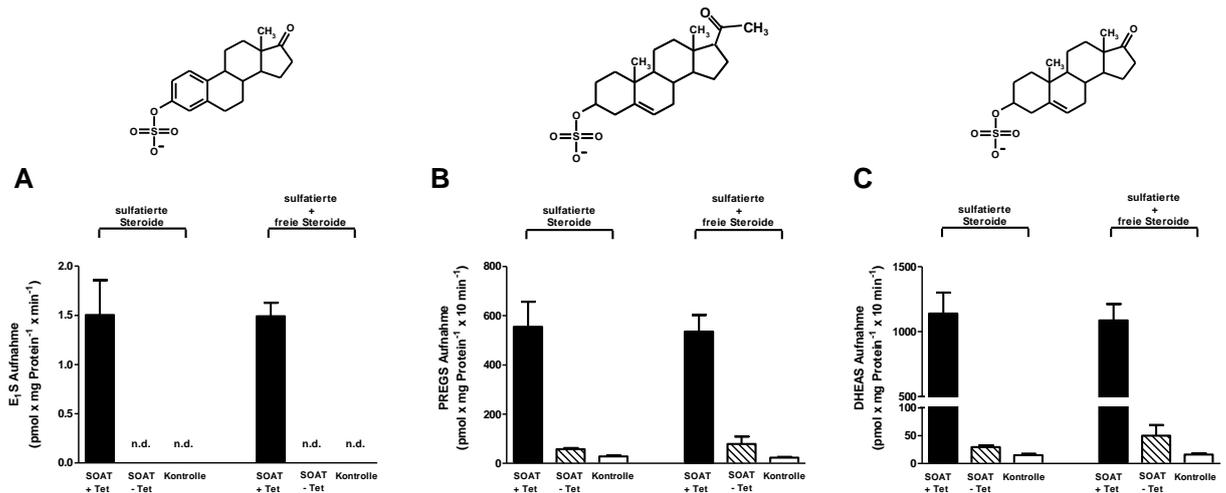


Abbildung 4.20: Aufnahme eines Steroidsulfatmixes bestehend aus 10 nM E1S, 1 µM PREGS, 10 µM DHEAS, 0,5 nM E1, 17 nM DHEA und 0,5 nM Testosteron in SOAT-HEK293 Zellen.

Tetrazyklin-induzierte (schwarze Balken) und nicht induzierte (gestreifte Balken) SOAT-HEK293 Zellen wurden mit einem Steroidmix, der 10 nM E1S, 1 µM PREGS, 10 µM DHEAS, 0,5 nM E1, 17 nM DHEA und 0,5 nM Testosteron in Natrium-haltigem Transportpuffer enthielt, inkubiert (schwarze Balken). Die aufgenommene Menge an E1S (A), PREGS (B) und DHEAS (C) wurde mittels LC-MS/MS nach Zellyse mit ddH₂O und drei Frier-Tau-Zyklen ermittelt. Als Kontrollzellen wurden Flp-In-HEK293 Zellen (weiße Balken) verwendet. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment (MW ± SD, n=4). N.d.: nicht detektierbar, unter der Nachweisgrenze.

4.6 Nachweis des SOAT-Proteins mit dem Antikörper anti-SOAT₃₁₁₋₃₇₇

Zur Detektion des SOAT-Proteins gibt es eine Vielzahl von kommerziell erhältlichen Antikörpern, leider erwiesen sich die meisten als ungeeignet, um das SOAT-Protein in den stabil transfizierten SOAT-HEK293 Zellen oder im Gewebe (Hoden, Plazenta) zu detektieren. Das SOAT₂₋₁₇-Antiserum kann zwar das Protein mittels Immunfluoreszenz in nicht fixierten und permeabilisierten Zellen detektieren, eignet sich aber nicht in der Western Blot Analyse (Döring 2009) oder der Immunhistochemie. Es wurde daher ein Antikörper gegen den kompletten C-Terminus des SOAT generiert (siehe Kapitel 3.10.1), der im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde. Es zeigte sich, dass dieser Antikörper das rekombinant in SOAT-HEK293-Zellen exprimierte humane SOAT-Protein im Western Blot und in der Immunfluoreszenz eindeutig detektiert.

4.6.1 Western Blot Analyse der SOAT-HEK293-Zellen mit dem anti-SOAT₃₁₁₋₃₇₇-Antikörper

In Abbildung 4.21 und Abbildung 4.22 sind Western Blot Analysen der stabil transfizierten SOAT-HEK293 Zellen mit und ohne Tetrazyklin-Induktion und der Flp-In-HEK293 Zellen (Kontrolle) dargestellt. Der Antikörper detektiert das SOAT-Protein mit verschiedenen scheinbaren Molekulargewichten von 40 kDa, 48 kDa und 54 kDa. Das vorausberechnete

Molekulargewicht des SOATs beträgt 41,2 kDa, was vermutlich durch die Bande bei 40 kDa repräsentiert wird. Die anderen beiden Banden weisen auf ein posttranslational modifiziertes Protein hin. Das SOAT-Protein besitzt drei potentielle N-Glykosylierungsstellen (N⁴, N¹⁴, N¹⁵⁷) auf. Es ist bereits bekannt, dass zumindest eine dieser Glykosylierungsstellen im SOAT glykosyliert vorliegt (Döring 2009). In der Arbeit von Frau Döring wurde eine Bande bei 46 kDa detektiert, die nach PNGase F-Behandlung verschwand. Da hier eine Bande im Bereich von ca. 48 kDa detektierbar ist, weist das auf eine glykosylierte Form des SOAT-Proteins hin. In der hier vorliegenden Arbeit wurden die SOAT-HEK293 nach dem Aussäen mit Tunicamycin kultiviert, um posttranslationale Glykosylierungen zu unterdrücken (Abbildung 4.22). Bei den mit Tunicamycin-behandelten, Tetrazyklin-induzierten SOAT-HEK293 Zellen änderte sich tatsächlich das Bandenmuster, wobei eine dominante Band bei einem scheinbaren Molekulargewicht von 35 kDa in Erscheinung trat. Zwar ist somit nicht eindeutig zu erklären, wie viele Stellen im SOAT-Protein posttranslational modifiziert werden, aber es zeigt sich, dass das SOAT-Protein im Zellkulturmodell glykosyliert vorzuliegen scheint.

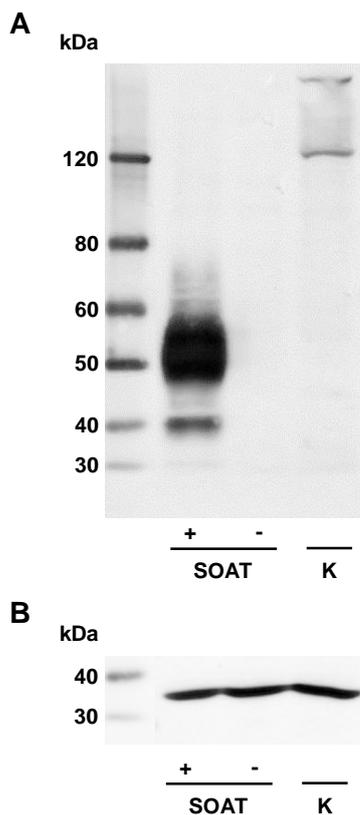


Abbildung 4.21: Western Blot Analyse der stabil transfizierten SOAT-HEK293 Zellen mit und ohne Tetrazyklin-Induktion und der Flp-In-HEK293 Zellen mit dem Antikörper anti-SOAT₃₁₁₋₃₇₇.

Die stabil transfizierten SOAT-HEK293 Zellen wurden in Anwesenheit (+) bzw. Abwesenheit (-) von Tetrazyklin bis zu einer Konfluenz von 100 % kultiviert. Nach Proteinextraktion mit RIPA-Puffer und Bestimmung des Proteingehalts mittels BCA-Assay, wurden 35 µg Protein auf einem 8%-igen SDS-PAGE über Nacht bei 50 V aufgetrennt und im Anschluss auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet. Nach einer 1-stündigen Inkubation in 10 %-igem Milchpulver in TBS-T, folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper anti-SOAT₃₁₁₋₃₇₇ (1:100, bei

RT), bevor nach 3-maligem Waschen mit TBS-T, der Sekundärantikörper Cappel Peroxidase Ziege anti-Kaninchen (1:5.000) für 1 h bei RT auf die Membran gegeben wurde. Die Detektion erfolgte mittels Chemilumineszenz auf einem ECL-Film. Das SOAT-Protein ist in den Tetrazyklin-induzierten SOAT-HEK293 Zellen (+) detektierbar. Im Gegensatz dazu ist in den nicht induzierten SOAT-HEK293 Zellen (-) und in den Flp-In-HEK293 Zellen (K) kein Protein nachweisbar. Die Kontrolle (B) erfolgte mit dem anti-GAPDH Antikörper (1: 25.000, 1 h bei RT).

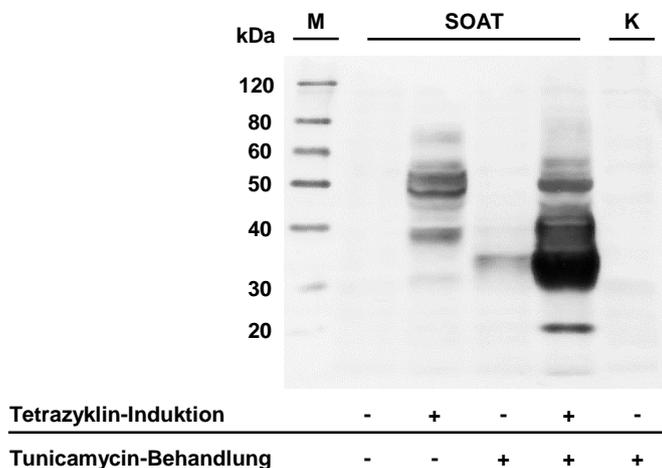


Abbildung 4.22: Western Blot Analyse der stabil transfizierten SOAT-HEK293 Zellen nach Behandlung mit Tunicamycin.

Die SOAT-HEK293 Zellen wurden ausgesät und für 3 Tage in An- bzw. Abwesenheit von Tetrazyklin und Tunicamycin (3 µg/µl) kultiviert, bevor die Proteine mit eiskaltem RIPA-Puffer extrahiert wurden. Es folgte die Auftrennung auf einem SDS-PAGE (8 %-ig) und im Anschluss das Blotten auf eine Nitrocellulosemembran. Nach Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen mit 10 %-igem Milchpulver in TBS-T, wurde die Membran 1 h bei RT mit dem primären Antikörper anti-SOAT₃₁₁₋₃₇₇ (1:100) inkubiert, bevor nach 3-maligem Waschen mit TBS-T der sekundäre Antikörper Cappel Peroxidase Ziege anti-Kaninchen (1:5.000) für 1 h bei RT auf die Membran gegeben wurde. Die Detektion erfolgte mit Hilfe von Chemilumineszenz. Dargestellt sind die SOAT-HEK293 Zellen mit (+) und ohne Tetrazyklin-Induktion (-) sowie die Flp-In-HEK293 Zellen (K). In den Zellen, die mit Tunicamycin (+) kultiviert wurden, weisen die SOAT-Protein-Banden niedrigere scheinbare Molekulargewichte auf gegenüber den Zellen, die ohne Tunicamycinzusatz wuchsen. Dies deutet daraufhin, dass das SOAT-Protein im Zellkulturmodell glykosyliert vorliegt. M: Marker.

4.6.2 Vergleich des Präimmunserums und des Serums des immunisierten Kaninchens mit dem aufgereinigten Antikörper anti-SOAT₃₁₁₋₃₇₇

Zur Generierung des anti-SOAT₃₁₁₋₃₇₇-Antikörpers wurden durch die Firma Eurogentec (Belgien) mehrere Kaninchen mit dem Immunierungspeptid immunisiert. Es folgten mehrere Blutentnahmen zur Überprüfung der Immunisierungsreaktion im ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). Anhand der ELISA-Ergebnisse wurde das Kaninchen ausgewählt, dessen Serum zur Gewinnung des anti-SOAT₃₁₁₋₃₇₇-Antikörpers diente. Da aus dieser Immunisierung nicht nur der aufgereinigte Antikörper, sondern auch das Präimmunserum und das Antiserum des Kaninchens zur Verfügung standen, konnten Präimmunserum, Serum und der aufgereinigte Antikörper im Western Blot miteinander verglichen werden.

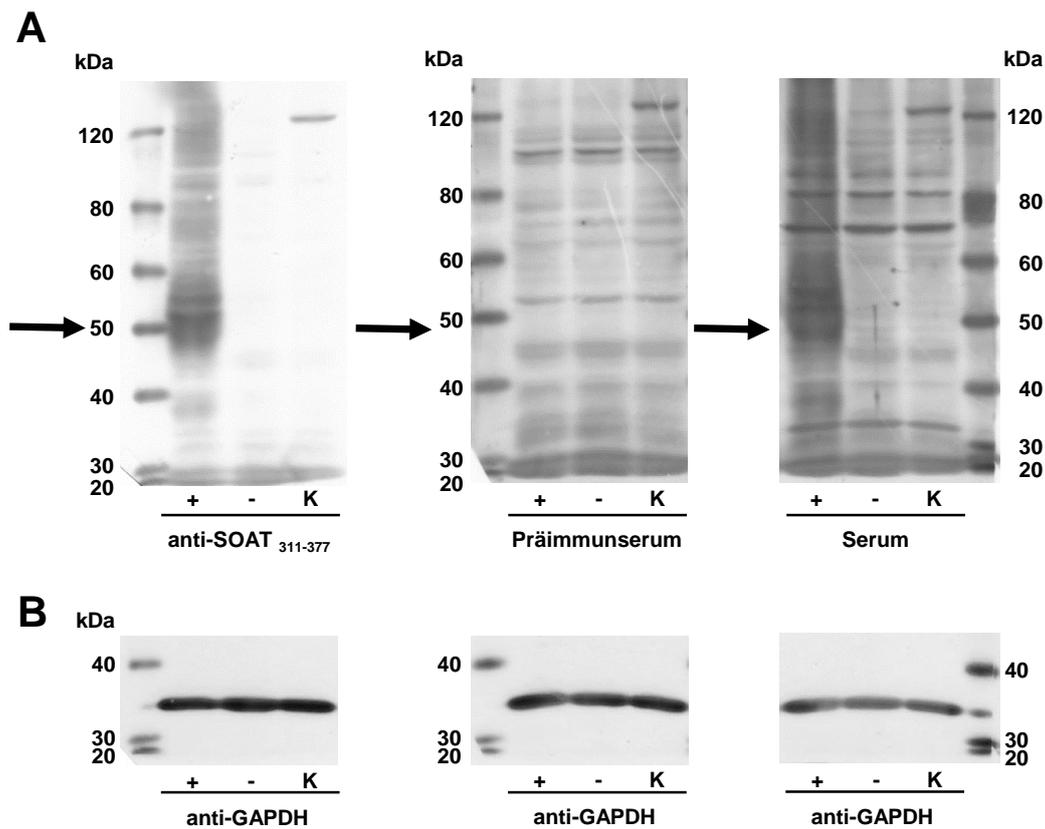


Abbildung 4.23: Vergleichende Western Blot Analyse mit dem Antikörper anti-SOAT₃₁₁₋₃₇₇, dem Präimmunsrum der immunisierten Kaninchen und dem Serum der Kaninchen nach Immunisierung mit dem SOAT-Peptid an stabil transfizierten SOAT-HEK293 Zellen sowie Flp-In-HEK293 Zellen.

(A) Zunächst erfolgte die Inkubation der geblotteten Proteine mit dem primären Antikörper. Hierfür wurde entweder der anti-SOAT₃₁₁₋₃₇₇ (1:100), das Präimmunsrum (unverdünnt) oder das Serum (unverdünnt) des zu Immunisierung verwendeten Kaninchens 1 h bei RT auf die Membran gegeben. Als Sekundärantikörper wurde der Cappel Peroxidase Ziege anti-Kaninchen (1:5.000, 1 h bei RT) verwendet. Im Bereich von 50 kDa (Pfeil) ist sowohl nach Inkubation mit dem anti-SOAT₃₁₁₋₃₇₇-Antikörper (links), als auch nach Inkubation mit dem Antiserum (rechts) das SOAT-Protein detektierbar, wohingegen das Präimmunsrum (Mitte) kein entsprechendes Bandenmuster aufweist. Neben den Tetrazyklin-induzierten SOAT-HEK293 Zellen (+) wurden auch die nicht induzierten SOAT-HEK293 Zellen (-) und die Flp-In-HEK293 Zellen (K) überprüft. Bei beiden Zelllinien ist sowohl bei Verwendung des anti-SOAT₃₁₁₋₃₇₇ Antikörpers, als auch bei der Verwendung des Antiserums keine SOAT-spezifische Bande detektierbar.

(B) Die in (A) verwendeten Membranen wurden gestrippt und im Anschluss mit einem anti-GAPDH Antikörper (1:25.000) für 1 h bei RT inkubiert. Nach 3-maligem Waschen mit TBS-T wurde der sekundäre Antikörper ZyMax Kaninchen anit-Ziege HRP *Konjugat* (1:5.000) für 1 h bei RT auf die Membran aufgetragen. Im Anschluss erfolgte auch hier die Detektion über Chemilumineszenz. In allen Proben ist GAPDH mittels spezifischer Bande bei 35 kDa nachweisbar.

In Abbildung 4.23 ist zu sehen, dass mit dem aufgereinigten Antikörper und dem Serum nach Immunisierung das SOAT-Protein im Bereich von 46 bis 54 kDa detektiert wird, wohingegen im Präimmunsrum das spezifische Bandenpattern in dem Bereich fehlt. Dies zeigt, dass die Immunisierung des Kaninchens erfolgreich war und eine entsprechende Immunreaktion stattfand, aus der ein SOAT-spezifischer Antikörper hervorging. Ferner ist zu beobachten, dass die Detektion des SOAT-Proteins nur in den Tetrazyklin-induzierten SOAT-HEK293 Zellen erfolgte, nicht aber in den nicht-induzierten und in den Kontrollzellen (Flp-In-HEK293

Zellen), was ebenfalls die Spezifität des Antikörpers belegt. Die stärkere Hintergrundfärbung des Präimmunserums und des Antiserums ist damit zu begründen, dass in beiden Fällen keine spezifische Aufreinigung erfolgt ist, wie dies bei dem anti-SOAT₃₁₁₋₃₇₇ Antikörper durch Affinitätsreinigung gegen das Immunisierungspeptid der Fall war. Allerdings unterschied sich das als unspezifisch angesehene Bandenmuster in beiden Fällen nicht zwischen den Tetrazyklin-induzierten und nicht-induzierten Zellen und kann daher als unspezifisch angesehen werden.

4.6.3 Peptidblockierung des Antikörpers anti-SOAT₃₁₁₋₃₇₇

Die Spezifität des Antikörpers anti-SOAT₃₁₁₋₃₇₇ für das Immunisierungspeptid, welches den C-Terminus des SOAT-Proteins repräsentiert, konnte mit Hilfe der Peptidblockierung im Western Blot zusätzlich bestätigt werden. Nach Präinkubation des Antikörpers mit dem Immunisierungspeptid im 100-fachen Überschuss fehlte das Signal des SOAT-Proteins im Western Blot, wohingegen der nicht-präinkubierte Antikörper den SOAT im Bereich von 46 bis 54 kDa eindeutig detektierte.

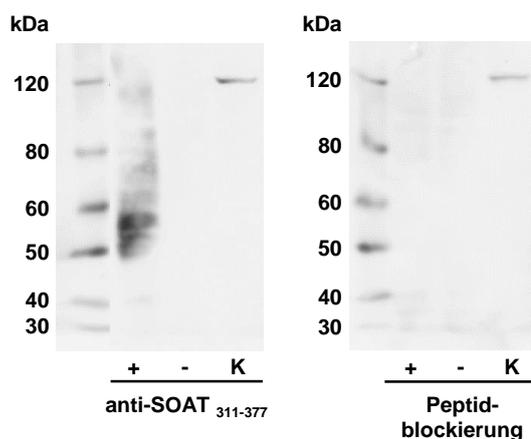


Abbildung 4.24: Peptidblockierung zur Überprüfung der Spezifität des Antikörpers anti-SOAT₃₁₁₋₃₇₇

Um die Spezifität des anti-SOAT₃₁₁₋₃₇₇-Antikörpers zu überprüfen, wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt, bei der die aus den SOAT-HEK293 Zellen extrahierten Proteine sowohl mit dem Antikörper selbst (1:100, links), als auch mit dem zuvor mit dem Immunisierungspeptid im 100-fachen Überschuss präinkubierten Antikörper (rechts) behandelt wurden. Die SOAT-spezifischen Banden sind nach der Peptidblockierung nicht detektierbar, was die Spezifität des Antikörpers gegenüber dem Immunisierungspeptid bestätigt. +: Tetrazyklin-induzierte SOAT-HEK293 Zellen, -: nicht Tetrazyklin-induzierte SOAT-HEK293 Zellen, K: Kontrolle (Flp-In-HEK293 Zellen)

4.6.4 Nachweis des SOAT-Proteins mittels Immunfluoreszenz unter

Verwendung des Antikörpers anti-SOAT₃₁₁₋₃₇₇

Der anti-SOAT₃₁₁₋₃₇₇ Antikörper wurde nicht nur im Western Blot, sondern auch in der Immunfluoreszenz an den stabil transfizierten SOAT-HEK293 Zellen validiert. Die Tetrazyklin-induzierten SOAT-HEK293 Zellen fluoreszierten deutlich und zeigten eine membranständige

Veränderung oder gar einem Verlust seiner Funktion führen kann, war ein Ziel dieser Arbeit, diese natürlich vorkommenden SNPs im *SLC10A6*-Gen auf ihre Funktion hin zu untersuchen. Mit Hilfe der zielgerichteten Mutagenese wurden die bis Anfang 2012 bekannten SOAT-Varianten R185T, I196T, V199I, L204F der nicht-synonymen Polymorphismen in das SOAT-V5His cDNA-Konstrukt eingefügt und in GripTite 293 MSR Zellen nach transienter Transfektion auf ihre Transportfunktion unter Verwendung der Substrate E₁S und DHEAS untersucht. Die Konstrukte SOAT-S6F und SOAT-I114V standen aus früheren Arbeiten von Marcela Moncada und Barbara Döring am Institut zur Verfügung. Es zeigte sich, dass die SOAT-Variante L204F sowohl für E₁S, als auch für DHEAS eine niedrigere Aufnahme der Substrate aufwies im Vergleich zu den anderen überprüften SOAT-Varianten. Die S6F-Variante war bereits 2009 (Döring 2009) auf ihre Funktionalität in *Xenopus laevis* Oozyten untersucht worden und zeigte dabei keine abweichenden Transporteigenschaften im Vergleich zum SOAT-Wildtyp. Da diese Variante nur eine erniedrigte Aufnahme von E₁S, aber nicht von DHEAS aufweist, wurde ihre Funktion als Wildtyp vergleichbar eingestuft. Parallel durchgeführte Immunfluoreszenzstudien mit dem Anti-V5-Antikörper zeigten, dass die Transfektionsraten der einzelnen SOAT-Varianten nicht von der des Wildtyps abweichen und untereinander vergleichbar waren, so dass eine geringere Transfektionsrate der SOAT-L204F-Mutante als Ursache der reduzierten Aufnahmeleistung ausgeschlossen wurde.

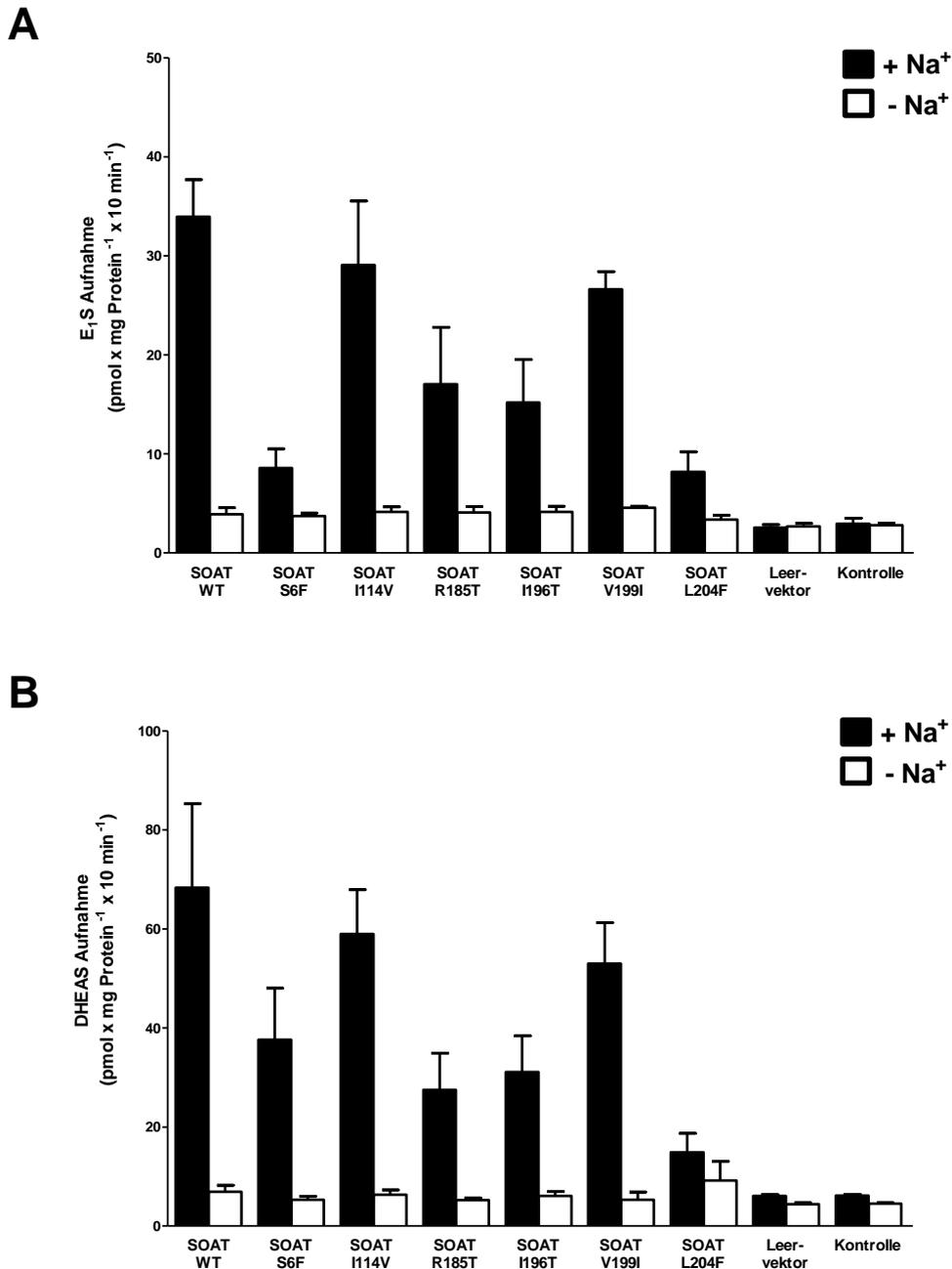


Abbildung 4.26: Aufnahme von 1 μM [^3H]E1S und 1 μM [^3H]DHEAS in GripTite 293 MSR Zellen, die mit verschiedenen polymorphen SOAT cDNA-Konstrukten transient transfiziert wurden.

Die im *SLC10A6*-Gen natürlich vorkommenden Polymorphismen S6F, I114V, R185T, I196T, V199I und L204F wurden aus dem SOAT-V5His-Plasmid mittels zielgerichteter Mutagenese generiert und transient in GripTite 293 MSR Zellen transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde durch Zugabe von 2 mM Na⁺-Butyrat die Proteinexpression verstärkt, bevor nach weiteren 24 h die Transportmessung durchgeführt wurde. Die Zellen wurden nach 3-maligem Waschen mit PBS oder Natrium-freiem Transportpuffer für 10 min mit 1 μM [^3H]E1S (A) oder 1 μM [^3H]DHEAS (B) mit (■) und ohne (□) Natrium inkubiert. Die Aufnahme wurde durch Abkippen der Transportlösung und durch mehrfaches Waschen mit eiskaltem PBS gestoppt. Es folgte die Lyse der Zellen und die Bestimmung der zellassoziierten Radioaktivität im Flüssigszintillationscounter. Außerdem wurde der Proteingehalt berechnet und in Relation zur aufgenommenen Substratmenge gesetzt. Die Graphen zeigen die MW \pm SD von zwei unabhängigen Experimenten mit Vierfachbestimmung (n=8). Als Kontrolle dienten sowohl mit Leervektor transfizierte (LV), als auch untransfizierte GripTite 293 MSR Zellen (Kontrolle).

4.7.1 Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit des SOAT-V5His-Transportes

Da bisher die Kinetik der SOAT-vermittelten Aufnahme nur an den SOAT-HEK293 Zellen durchgeführt worden war (Döring 2009) und in diesen das SOAT-Protein ohne Tag exprimiert wird, wurde in dieser Arbeit zunächst die initiale Aufnahmegeschwindigkeit des Fusionsproteins SOAT-V5His untersucht, um mögliche Abweichungen gegenüber der ungetaggen Variante zu detektieren. Hierfür wurde das Substrat DHEAS verwendet. Es zeigte sich, dass die Aufnahme von 1 μM DHEAS über 1 min linear verläuft. Da die konzentrationsabhängige Aufnahme von DHEAS in der linearen Phase des Transports bestimmt werden sollte, fand diese Messung bei 1 min statt. Die DHEAS-Aufnahme wurde gegen die steigende Konzentration des Substrats aufgetragen und führte zu einem Sättigungsverlauf, der charakteristisch für eine Michaelis-Menten-Kinetik ist. Dieser Versuch diente dazu, die geeigneten Konzentrationen für die Kinetikbestimmung und den Zeitpunkt der linearen Phase der DHEAS-Aufnahme durch das Fusionsprotein SOAT-V5His zu determinieren, da die SOAT-Mutanten S6F, I114V, R185T, I196T, V199I, L204F im V5His-Plasmid vorlagen.

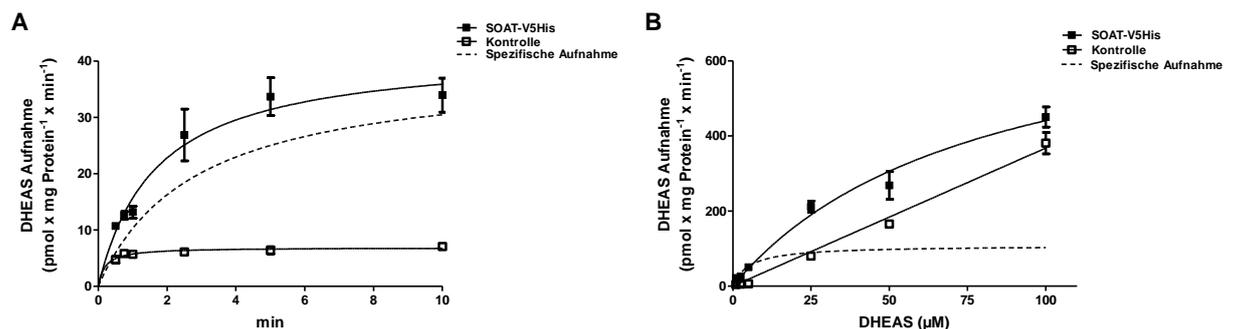


Abbildung 4.27: Zeit- und konzentrationsabhängiger Transport von DHEAS in mit SOAT-V5His transient transfizierte GripTite 293 MSR Zellen.

GripTite 293 MSR Zellen wurden mit SOAT-V5His transient transfiziert und nach 48 h für die Aufnahmemessungen eingesetzt. (A) zeigt die Aufnahme von 1 μM [³H]DHEAS in SOAT-V5His-GripTite 293 MSR-Zellen (■) und Kontrollzellen (□) zu folgenden Zeitpunkten: 15 s, 30 s, 45 s, 60 s, 2,5 min, 5 min und 10 min.

(B) Aufnahme von steigenden Konzentrationen (1 μM , 5 μM , 10 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM) [³H]DHEAS bei einer Messdauer von 1 min in SOAT-V5His-MSR-Zellen (■) und Kontrollzellen (□).

Die zellassoziierte Radioaktivität wurde im Flüssigszintillationscounter bestimmt und der Proteingehalt mit der Methode nach Lowry ermittelt. Als Kontrolle dienten untransfizierte GripTite 293 MSR Zellen. Die spezifische Aufnahme (---) des Substrates wurde durch Subtraktion der Aufnahmemenge der Kontrollzellen von der Aufnahmemenge der SOAT-V5His-GripTite 293 MSR Zellen ermittelt und mit Hilfe der nicht-linearen Regression nach Michaelis-Menten graphisch dargestellt.

4.7.2 Konzentrationsabhängige Aufnahme von DHEAS in verschiedene SOAT-Varianten

Zunächst wurde die konzentrationsabhängige Aufnahme der SOAT-Varianten im transient transfizierten Zellkulturmodell unter Zuhilfenahme der GripTite MSR 293 Zellen bestimmt. Da

hier aber keine aussagekräftigen, reproduzierbaren Ergebnisse möglich waren, wurden die SOAT-Varianten I114V und L204F in HEK293 Zellen stabil transfiziert. Hierzu wurden die SNPs wieder mittels zielgerichteter Mutagenese in den SOAT eingefügt. Hierfür wurde der SOAT-pcDNA9 verwendet, da er in den stabil transfizierten SOAT-HEK293 Zellen vorliegt und somit eine Vergleichbarkeit der SOAT-HEK293 Zelllinien untereinander erzielt wird. Die stabile Transfektion der Zellen erfolgte wie unter 3.7.2 beschrieben. Nach Selektion der Klone wurden die Kinetikstudien mit steigenden Konzentrationen DHEAS (1 μM , 5 μM , 10 μM , 25 μM , 50 μM , 75 μM , 100 μM , 150 μM) durchgeführt. Die DHEAS-Aufnahme der jeweiligen SOAT-Variante wurde gegen die verwendeten, aufsteigenden Konzentrationen aufgetragen und im Anschluss die spezifische Aufnahme der SOAT-Variante mit Hilfe der Kontrollzellen (Flp-In-HEK293 Zellen) bestimmt. Aus der spezifischen Aufnahme wurden dann durch Anwendung der nicht-linearen Regression nach Michaelis-Menten die kinetischen Parameter K_m (Michaelis-Menten-Konstante) und der V_{\max} (maximale Aufnahmegeschwindigkeit) berechnet.

In Abbildung 4.28 ist die spezifische Aufnahme der SOAT-Varianten I114V und L204F im Vergleich mit dem SOAT-Wildtyp dargestellt. Die spezifische Aufnahme der SOAT-L204F-Mutante ist deutlich niedriger, als die des Wildtyp-SOATs und der SOAT-I114V-Variante.

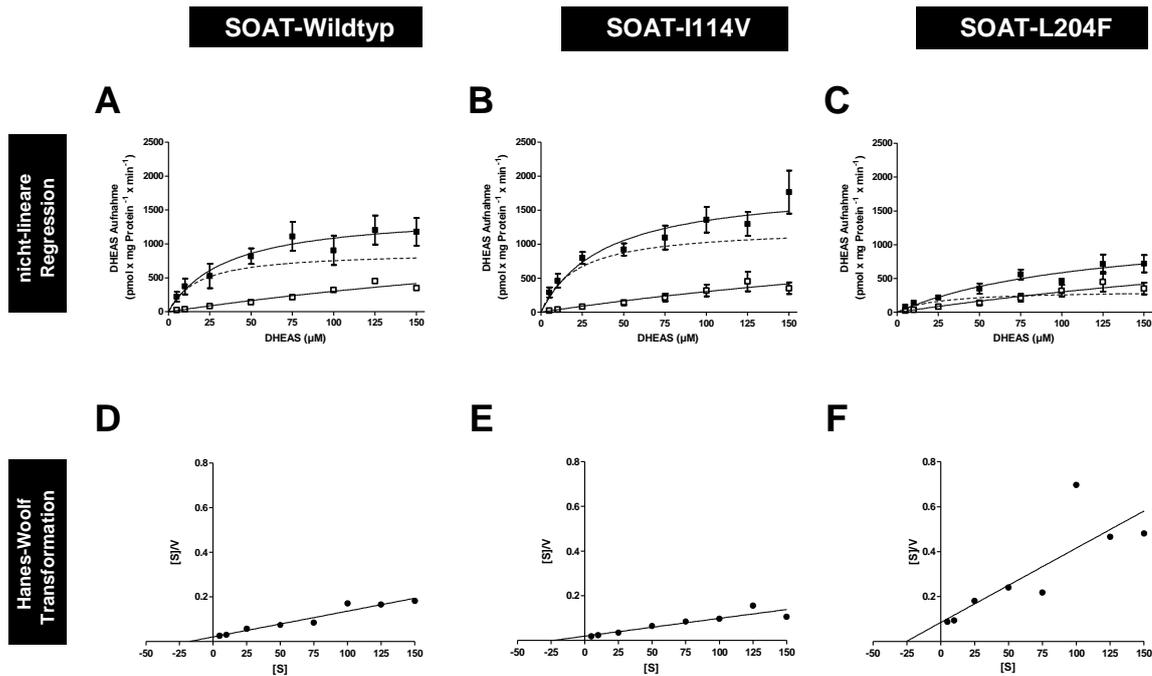


Abbildung 4.28: Konzentrationsabhängige Aufnahme von DHEAS in SOAT-HEK293, SOAT-I114V-HEK293 und SOAT-L204F-HEK293 Zellen.

Tetrazyklin-induzierte SOAT-HEK293 Varianten (■) und Kontrollzellen (□) wurden mit 1 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 75 µM, 100 µM, 150 µM [³H]DHEAS für jeweils 1 min bei 37° C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen gewaschen und lysiert, sowie die zellassoziierte Radioaktivität im Flüssigszintillationscounter gemessen. Zusätzlich zu der SOAT-Wildtyp Variante (A) wurden auch die SOAT Polymorphismen SOAT-I114V (B) und SOAT-L204F (C) untersucht. Dargestellt ist die konzentrationsabhängige Aufnahme (—■—) und die spezifische Aufnahme (---) von [³H]DHEAS der jeweiligen SOAT-Variante. Die Berechnung der spezifischen Aufnahme erfolgte, indem die Aufnahmemenge der Kontrollzellen von der Aufnahmemenge der verwendeten SOAT-HEK293 Variante subtrahiert wurde. Die SOAT-spezifische Aufnahme wurde für die Berechnung der kinetischen Parameter V_{max} und K_m herangezogen, die mit Hilfe des Programms *Graph Pad Prism 5* ermittelt wurden.

(A, B, C) Nicht-lineare Regression nach Michaelis-Menten. Abgebildet sind MW ± SD von drei unabhängigen Experimenten mit Drei- bzw. Vierfachbestimmung.

(D, E, F) Lineare Auftragung der SOAT-spezifischen Aufnahme mittels Hanes-Woolf Transformation. Bei dieser Darstellung wird der Quotient aus der jeweiligen Substratkonzentration [S] und der dazugehörigen Aufnahmegeschwindigkeit v gegen [S] aufgetragen. Daraus ergibt sich eine Regressionsgerade mit der Steigung $1/V_{max}$. Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der y-Achse bildet das Verhältnis K_m/V_{max} ab, der Schnittpunkt mit der x-Achse entspricht $-K_m$.

4.7.3 Vergleich der kinetischen Parameter V_{max} und K_m

Da sich der kinetische Parameter V_{max} des SOAT Polymorphismus L204F von dem des SOAT-Wildtyps und der Variante I114V in den ersten Experimenten unterschied, wurden die Kinetikstudien mehrfach wiederholt, um festzustellen, ob diese Beobachtung reproduzierbar ist. Dabei stellte sich in mehreren unabhängigen Experimente heraus, dass die maximale Aufnahmegeschwindigkeit des SOAT-L204F immer deutlich unter der des SOAT-Wildtyps und des SOAT-I114V lag. Bei einem Vergleich der in diesen Transportmessungen ermittelten V_{max} - und K_m -Werte zeigten Berechnungen, die mit dem Programm *Graph Pad Prism 5* durchgeführt wurden, dass die maximale Aufnahmegeschwindigkeit des SOAT-L204F signifikant ($p < 0,05$, Student's *t* test) niedriger ist, als die der anderen beiden untersuchten SOAT-Varianten. Im Gegensatz dazu zeigten die K_m -Werte der SOAT-Polymorphismen keinen signifikanten

Unterschied untereinander bzw. zum SOAT-Wildtyp. Dies bedeutet, dass die Affinität des Substrates DHEAS zu den einzelnen SOAT-Varianten identisch ist, sich diese aber in ihrer Transportrate unterscheiden.

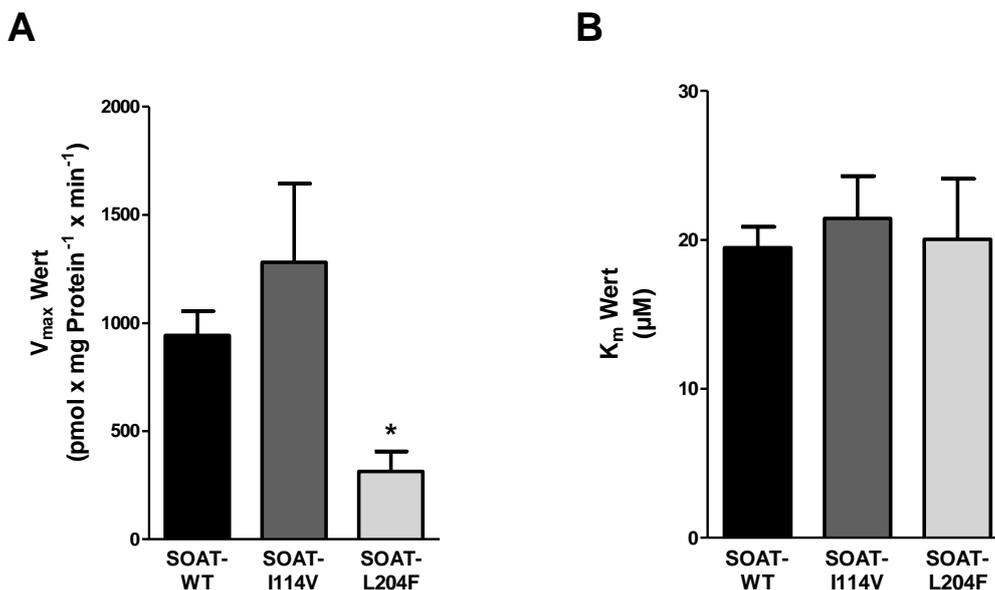


Abbildung 4.29: Vergleich der kinetischen Parameter V_{max} und K_m der SOAT-spezifischen Aufnahme von DHEAS durch verschiedene SOAT-Varianten.

Die kinetischen Parameter V_{max} (A) und K_m (B) für die SOAT-spezifische Aufnahme von DHEAS durch verschiedene SOAT Varianten wurde mit Hilfe des Programms *Graph Pad Prism 5* mittels nicht linearer Regressionsanalyse ermittelt und zwischen den SOAT Varianten verglichen: SOAT-Wildtyp (WT, schwarzer Balken), SOAT-I114V (dunkelgrauer Balken) und SOAT-L204F (hellgrauer Balken). Die SOAT Variante L204F weist einen signifikant niedrigeren V_{max} Wert auf, als der SOAT-Wildtyp bzw. der SOAT-I114V Polymorphismus. V_{max} und K_m sind als MW \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. * Signifikant niedriger mit $p < 0,05$ (Student's *t* test).

4.7.4 Western Blot Analyse der stabil transfizierten SOAT-Polymorphismen

Die SOAT-Polymorphismen SOAT-I114V und SOAT-L204F wurden in der Western Blot Analyse mit dem Bandenmuster des SOAT-Wildtyps verglichen. Beide Varianten zeigten wie der Wildtyp ein Bandenmuster bestehend aus drei Einzelbanden, die zwischen 46 und 55 kDa lagen.

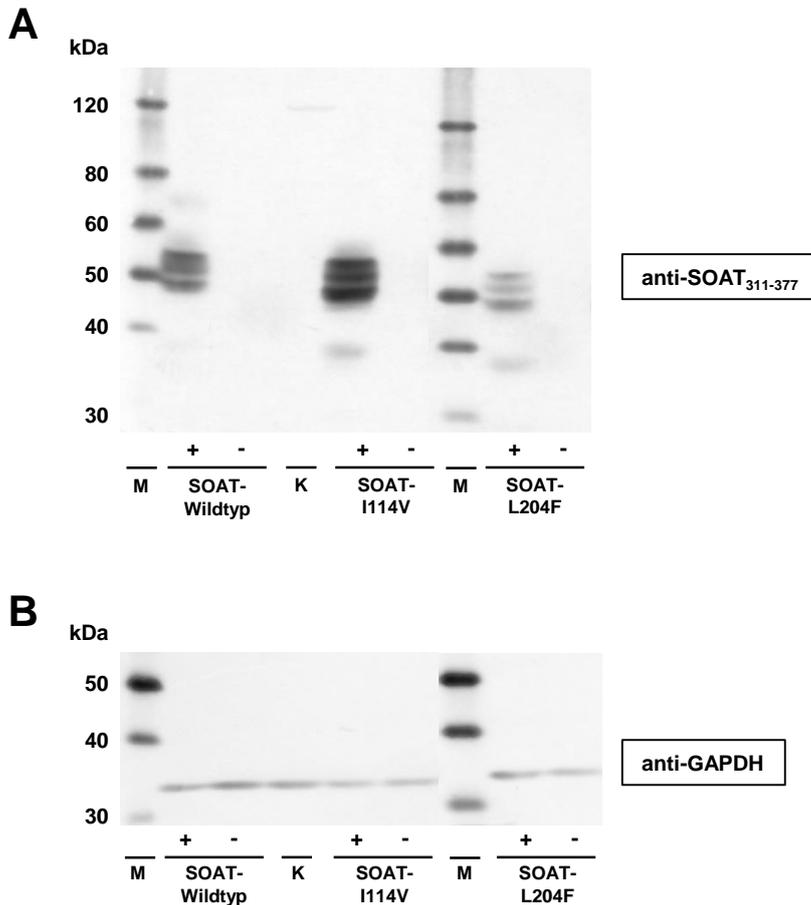


Abbildung 4.30: Western Blot Analyse der stabil transfizierten SOAT-HEK293 Mutanten mit und ohne Tetrazyklin-Induktion.

Die SOAT-Expression der stabil transfizierten SOAT-HEK293 Wildtyp-Zellen wurde mit der Expression der stabil transfizierten SOAT-HEK293 Mutanten I114V und L204F verglichen. Hierfür wurden Proteine aus Tetrazyklin-induzierten (+) und nicht-induzierten (-) Zellen extrahiert und das SOAT-Protein im Western Blot mit dem Antikörper anti-SOAT₃₁₁₋₃₇₇ (1:100) detektiert (A). Das Bandenmuster der beiden SOAT-Polymorphismen ist gleich dem des SOAT-Wildtyp Proteins und im Bereich von 45 bis 55 kDa zu finden. Ferner ist nachgewiesen, dass die Expression nur unter Tetrazyklin-Zugabe erfolgt; ohne Tetrazyklin-Induktion kann das SOAT-Protein nicht nachgewiesen werden. Als Kontrolle des Proteinauftrags wurde in allen Proteinextrakten (mit und ohne Tetrazyklin-Induktion) GAPDH mittels anti-GAPDH Antikörper (1:25.000, Sigma-Aldrich) (B) nachgewiesen.

4.7.5 Vergleichende Immunfluoreszenz der stabil transfizierten SOAT-Polymorphismen

Neben dem Western Blot wurden die stabil transfizierten SOAT-Mutanten auch in der Immunfluoreszenz untersucht. Hierzu wurde der anti-SOAT₃₁₁₋₃₇₇ Antikörper eingesetzt (siehe Abbildung 4.31). Alle drei SOAT-Varianten zeigten eine ähnliche Expressionsrate. In der Detailaufnahme konnte allerdings eine stärkere Färbung der SOAT-L204F-HEK293 Zellen im Zytoplasma und eine Akkumulation des überexprimierten Proteins um den Zellkern herum detektiert werden, wohingegen sich das Protein des SOAT-Wildtyps und der SOAT-I114V-Variante membranständig zeigte. Dies deutet auf eine unzureichende Sortierung des SOAT-L204-Proteins in die Plasmamembran der HEK293 Zellen hin.

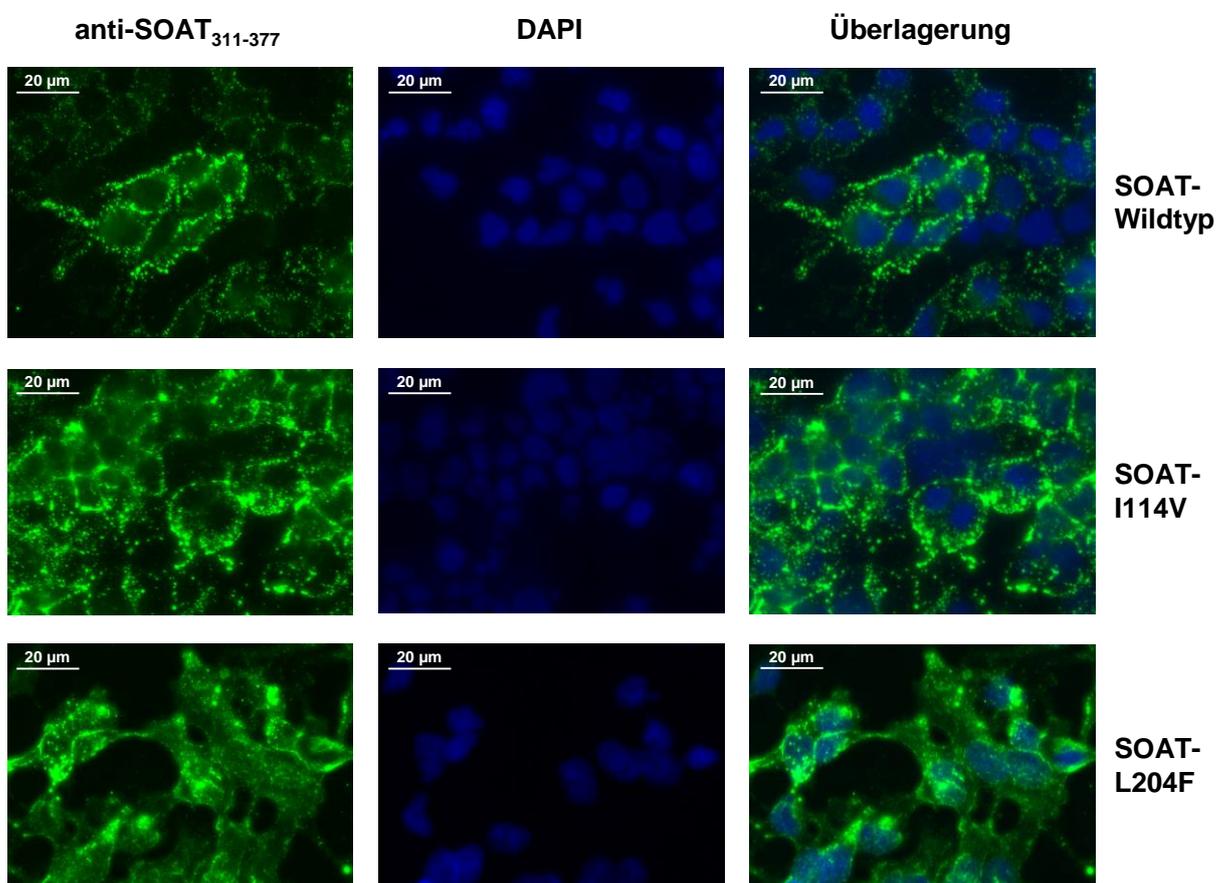
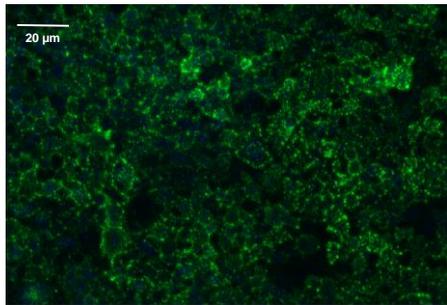
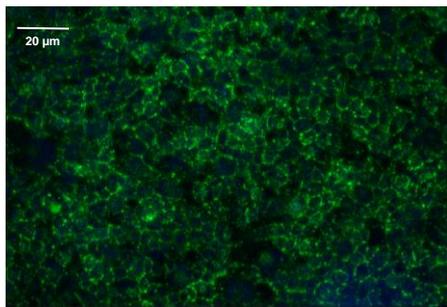
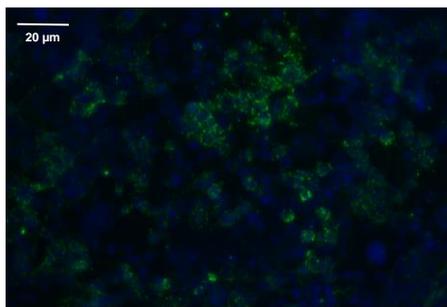
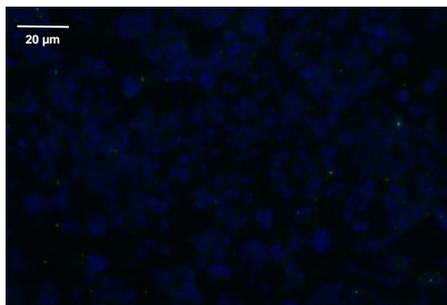


Abbildung 4.31: Vergleichende Immunfluoreszenzuntersuchung der SOAT-Varianten nach Inkubation mit dem SOAT₃₁₁₋₃₇₇ Antikörper.

Die SOAT-Wildtyp-, SOAT-I114V- und SOAT-L204F-HEK293 Zellen wurden auf Deckgläschen in 24-well Schalen mit Tetrazyklin kultiviert. Nach 72 h wurde der SOAT₃₁₁₋₃₇₇ Antikörper (1:100) für 1 h bei RT auf die Zellen gegeben. Es folgte eine 1-stündige Inkubation mit dem Sekundäntikörper Ziege Alexa Fluor 488-gekoppelt anti-Kaninchen (1:800), bevor die Färbung der Zellkerne mit DAPI/Methanol (1:5000) durchgeführt wurde. Im Anschluss erfolgte die Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop mit Hilfe der *LAS AF6000 Software* (Leica Microsystems) in der 63-fachen Vergrößerung. Es ist deutlich zu erkennen, dass das SOAT-L204F-Protein im Bereich um den Zellkern akkumuliert und verstärkt im Zytoplasma detektiert werden kann.

4.7.6 Vergleich der Membranlokalisation der SOAT-Polymorphismen mit Hilfe der Immunfluoreszenz

Für die Detektion des SOAT-Proteins steht neben dem anti-SOAT₃₁₁₋₃₇₇ Antikörper, der gegen den C-Terminus des Proteins gerichtet ist, auch das gegen das N-Terminale Ende des Proteins gerichtete SOAT₂₋₁₇-Antiserum zur Verfügung. Da der N-Terminus des in der Plasmamembran lokalisierten SOATs extrazellulär liegt (Geyer et al. 2007; Döring 2009), ermöglicht das SOAT₂₋₁₇-Antiserum die Detektion des SOATs in der Membran an nicht-permeabilisierten Zellen. Diese Methode wurde für die SOAT-Polymorphismen genutzt, um zu überprüfen, ob das Protein der SOAT-Variante L204F tatsächlich in geringerem Umfang in die Zellmembran sortiert wird, wie das SOAT-Wildtyp- und das SOAT-I114V-Protein. Neben der Beurteilung der an SOAT-gebundenen Fluoreszenz (über den Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper Ziege Alexa Fluor 488-gekoppelt anti-Kaninchen) unter dem Fluoreszenzmikroskop, wurde das Fluoreszenzsignal zusätzlich im Fluoreszenzreader in den lysierten Zellen bestimmt und ins Verhältnis zum Proteingehalt des Zelllysates gesetzt. Hierbei zeigte sich bereits bei der mikroskopischen Betrachtung, dass sich die Zellen der SOAT-L204F-Variante weniger immunreaktiv zeigten als die SOAT-Wildtyp- bzw. SOAT-I114V Zellen.

SOAT₂₋₁₇-Antiserum**SOAT-HEK293 Zellen****SOAT-I114V-HEK293 Zellen****SOAT-L204F-HEK293 Zellen****Flp-In-HEK293 Zellen****Abbildung 4.32: Vergleichende Fluoreszenzmikroskopie der SOAT-Varianten nach Inkubation mit dem SOAT₂₋₁₇-Antiserum**

Die SOAT-HEK293 Varianten SOAT-Wildtyp, SOAT-I114V und SOAT-L204F wurden auf Deckgläschen in 24-well Schalen mit Tetrazyklin kultiviert. Nach 72 h wurde das Medium abgezogen und das SOAT₂₋₁₇-Antiserum (1:10) für 1 h bei RT auf die Zellen gegeben. Es folgte eine 1-stündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper Ziege Alexa Fluor 488-gekoppelt anti-Kaninchen (1:800), bevor die Färbung der Zellkerne mit DAPI/PBS (1:5000) durchgeführt wurde. Im Anschluss erfolgte die Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop mit Hilfe der *LAS AF6000 Software*. Dargestellt ist die Maximalprojektion des Z-Stapels in der 20-fachen Vergrößerung. Es ist deutlich zu erkennen, dass bei den SOAT-L204F-HEK293 Zellen weniger Protein in der Zellmembran detektiert werden kann.

Die photometrische Messung ergab, dass das detektierte Fluoreszenzsignal des SOAT-L204F-Polymorphismus nach Abzug der unspezifischen Hintergrundfluoreszenz viermal schwächer war, als das der SOAT-HEK293 Zellen und der SOAT-I114V-HEK293 Zellen. Nicht mit SOAT transfizierte Flp-In-HEK293 Zellen dienten hierbei als Kontrolle. Um zu überprüfen, ob in den SOAT-L204F-Zellen insgesamt weniger SOAT-Protein exprimiert wird als in den beiden anderen Zelllinien, wurden Western Blot Analysen angeschlossen, bei denen das SOAT-Protein mit Hilfe des anti-SOAT₃₁₁₋₃₇₇-Antikörper aus dem Gesamtzelllysate nachgewiesen wurde. Die Western Blot Analyse wurde mehrfach wiederholt und densitometrisch ausgewertet. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der SOAT-Expression zwischen SOAT-L204F und dem SOAT-Wildtyp, während die die SOAT-I114V Expression sogar etwas über der Wildtyp-Kontrolle lag. Dies deutet daraufhin, dass die SOAT-L204F-Variante gleich stark exprimiert wird, das SOAT-L204F-Protein aber in geringeren Mengen in die Zellmembran transloziert wird, als das SOAT-Wildtyp-Protein.

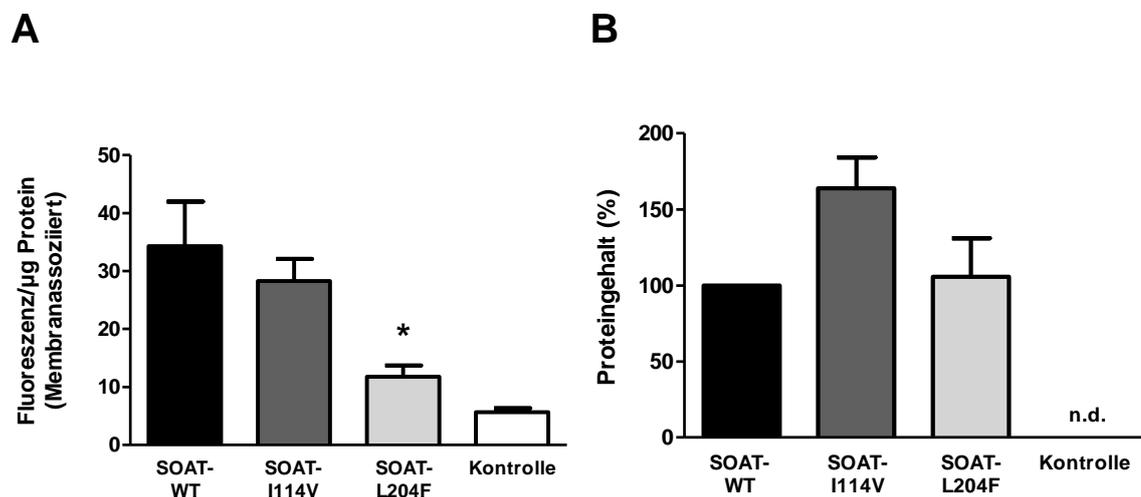


Abbildung 4.33: Überprüfung der Membranlokalisierung der SOAT-Varianten mittels Immunfluoreszenz und vergleichender densitometrischer Beurteilung des Gesamtproteins im Western Blot

(A) Die SOAT-HEK293 Varianten SOAT-Wildtyp (WT), SOAT-I114V und SOAT-L204F wurden in 24-well Schalen ausgesät und die Proteinexpression mit Tetrazyklin induziert. Nach 72 h wurde das Medium abgezogen und das SOAT₂₋₁₇-Antiserum (1:10) für 1 h bei RT auf die Zellen gegeben. Es folgte die 1-stündige Inkubation mit dem Sekundäntikörper Ziege Alexa Fluor 488-gekoppelt anti-Kaninchen (1:800), bevor die Färbung der Zellkerne mit DAPI/PBS (1:5000) durchgeführt wurde. Die Zellen wurden mit ddH₂O über 3 Frier-Tau-Zyklen lysiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz der Zelllysate im *GloMax-Multi+ Detection System* bei 520 nm gemessen. Neben den Tetrazyklin-induzierten Zellen wurden auch nicht-induzierte Zellen der SOAT-HEK293 Varianten und Flp-In-HEK293 Zellen (Kontrolle) untersucht. Dargestellt ist der Mittelwert (n=8) der Fluoreszenz der Tetrazyklin-induzierten SOAT-Varianten nach Abzug des Mittelwertes (n=8) der Fluoreszenz der nicht-induzierten Varianten, bezogen auf den Proteingehalt der Zellen aus 2 unabhängigen Experimenten. Die SOAT-L204-Mutante weist signifikant weniger Fluoreszenz/membranassoziiertem Protein auf als der SOAT-Wildtyp und die SOAT-I114V-Variante. * Signifikant niedriger mit $p < 0,0001$ (Student's *t* test).

(B) Aus den SOAT-HEK293 Varianten SOAT-Wildtyp (WT), SOAT-I114V und SOAT-L204F wurde Gesamtprotein extrahiert und auf einem SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion des SOAT-Proteins erfolgte mit dem anti-SOAT₃₁₁₋₃₇₇ Antikörper (1:100, 1 h bei RT) und dem Cappel Peroxidase Ziege anti-Kaninchen (1:5000, 1 h bei RT). Im Anschluss wurde die densitometrische Auswertung mit Hilfe der *Image Station 440CF* und dem Programm *Paintshop Pro Photo X2* durchgeführt. Die Signalstärke der SOAT-WT-Banden wurde auf 100 % gesetzt und die Schwärzung der Mutantenbanden dazu prozentual in Bezug gesetzt. Abgebildet sind die MW \pm SD aus drei unabhängigen Western Blot Analysen. In den Kontrollzellen (Flp-In-HEK293) war keine Bande detektierbar (0%, n.d. nicht detektierbar).

4.8 *Slc10a6*-Knockout-Maus

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rückkreuzung der *Slc10a6*-Knockout-Maus koordiniert und eine erste Charakterisierung der homo- und heterozygoten Knockout-Mäuse durchgeführt.

4.8.1 Rückkreuzung der *Slc10a6*-Knockout-Maus

Die Rückkreuzung der *Slc10a6*-Knockout-Maus auf ihren genetischen Hintergrund wurde im TIGM (Texas, USA) durchgeführt, wobei die Planung der Rückkreuzung und das Auswählen des Männchens in enger Zusammenarbeit erfolgten. Um die Rückkreuzung zu beschleunigen, wurde das *Speed Congenics Program* von Taconic (New York, USA) genutzt. Durch Überprüfung von insgesamt 1449 SNPs des Hintergrundstammes (C57BL/6N) bei den rückgekreuzten Männchen wurde der jeweilige Rückkreuzungsgrad des Einzeltieres bestimmt. Das Männchen, welches den höchsten Rückkreuzungsgrad und die stärkste Übereinstimmung im Bereich des *Slc10a6*-Gens aufwies, wurde in der folgenden Verpaarungsrunde als Vatertier eingesetzt. Durch diese gezielte Auswahl konnte bereits in der 4. Verpaarungsrunde ein Generationsäquivalent von NE=6 (C57BL/6N-Anteil: 98,48 %) erreicht werden. Die Rückkreuzung der *Slc10a6*-Knockout-Maus wird allerdings mit Abgabe dieser Arbeit noch nicht vollständig abgeschlossen sein.

4.8.2 Anpaarung der heterozygoten Knockout-Maus

In dem Versuchsvorhaben „Rückkreuzung und homozygote Anpaarung der *Slc10a6*-Knockout-Maus“ (Kurzbezeichnung, Versuchsvorhaben Nr.: V 54-19 c 20 15 h 01 GI 18/11 Nr. 14/2013) wurden die heterozygoten F1-Tiere, die aus der Rederivation der kryokonservierten Spermien mit heterozygotem *Slc10a6*-Knockout generiert wurden, miteinander verpaart, um die Lebensfähigkeit der homozygoten *Slc10a6*-Knockout-Maus zu überprüfen und eine vorläufige Belastungseinschätzung der homo- und heterozygoten Tiere vorzunehmen. In fünf Würfen wurden insgesamt 30 Nachkommen generiert. Die durchschnittliche Wurfgröße betrug 6 Nachkommen/Wurf. Es wurden 15 Weibchen und 13 Männchen geboren. In einem Wurf verstarben zwei Tiere innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Geburt, wobei eins der Tiere deutlich kleiner war als die Wurfgeschwister. Bei dem anderen Tier war eine starke dunkelrote Verfärbung im Nabelbereich zu sehen, die auf ein Hämatom hindeutete, so dass hier ein Nachbluten der Nabelgefäße als Todesursache vermutete wurde. Die Pflege des Nachwuchses durch das heterozygote Muttertier erfolgte vorbildlich. Das im Käfig anwesende Vatertier war ebenfalls in die Brutpflege involviert. Die Nachkommen wurden im Alter von 3-4

Wochen abgesetzt, ohrmarkiert und eine Schwanzbiopsie zur Feststellung des Genotyps mittels PCR (siehe Kapitel 3.12.3) entnommen.

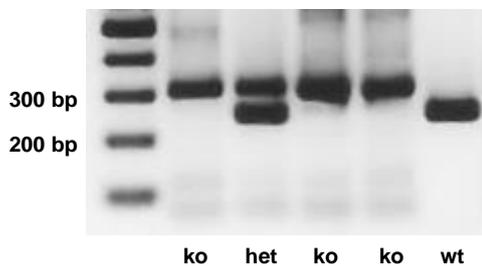


Abbildung 4.34: PCR zur Genotypisierung der homo- und heterozygoten *Slc10a6*-Knockout-Mäuse und der Wildtyp-Maus.

Die Schwanzbiopsien wurden mit einem sterilen Skalpell genommen und in einem modifizierten Verfahren nach Truett et al. (2000) lysiert. Die gewonnene DNA wurde in der Multiplex-PCR unter Verwendung der Genotypisierungs-Primer LacZ-F (ko), mSoat-Genotyp-F-2 (wt) und mSoat-Genotyp-R-2 (wt, ko) eingesetzt. Die Amplifikate wurden im Anschluss auf einem 2 %-igen Agarosegel nach Anfärbung mit GelRed visualisiert. Das PCR-Produkt mit einer Größe von 270 bp diente dem Nachweis der Wildtyp-DNA (wt). Das Knockout-spezifische Amplifikat (ko) hingegen wies eine Größe von 340 bp auf. Proben, in denen sowohl eine Knockout-, wie auch eine Wildtyp-Bande detektiert wurden, repräsentierten heterozygote Tiere (het).

Dieser Vorversuch mit der nicht rückgekreuzten *Slc10a6*-Knockout-Maus diente dazu, einen ersten Eindruck der Maus zu bekommen, da sie bisher in der Literatur nicht beschrieben ist, und eventuell auftretende schwerwiegende, belastende Merkmale des Phänotyps aufzudecken. Ferner wurde eine pathohistologische Untersuchung durchgeführt, um Auffälligkeiten in den Hauptexpressionsorganen des murinen Soat (Hoden, Haut, Lunge) zu detektieren, die auf einen belastenden Phänotyp bzw. auf Schwierigkeiten bei der Zucht der homozygoten Knockout-Tiere schließen lassen. Es zeigte sich, dass die homozygote *Slc10a6*-Knockout-Maus im Untersuchungszeitraum (bis zur 20. Lebenswoche) lebensfähig war. Die homozygoten Knockout-Tiere (ko) wiesen im Vergleich zu den heterozygoten (het) und den Wildtyp-Tieren (wt) keine Abweichungen in der Gewichtsentwicklung auf. Ferner waren auch im Handling (wöchentliche Gewichtskontrolle, Umsetzen in neue Käfige, Untersuchung auf Auffälligkeiten) keine Unterschiede zwischen den drei Genotypen (wt, het, ko) oder den beiden Geschlechtern festzustellen. Die Mäuse zeigten alle ein neugieriges, exploratives Verhalten. Bei zwei Weibchen trat ab der 8. bzw. 9. Lebenswoche Haarausfall an einzelnen (Gesicht) bzw. mehreren Körperstellen (Kopf, Rippenbogen) auf. Bei einem der zwei Weibchen erstreckte sich die haarlose Region auf den Bereich des rechten Rippenbogens und maß in der Länge ca. 2 cm. Ferner war bei diesem Weibchen auch eine ca. 1,5 cm lange und 0,5 cm breite haarlose Stelle auf dem Kopf beginnend an der Stirn bis zum Genick zu sehen. Das andere Weibchen zeigte den Haarausfall dreiecksförmig zwischen Augen und Nase. In der 12. Lebenswoche zeigte ein männliches Mitglied des gleichen Wurfes Haarausfall an den

Vordergliedmaßen. Dieser begann im Zehenbereich und stieg zum Ellbogengelenk auf. Ein Männchen aus einem vorangegangenen Wurf wies ab der 14. Lebenswoche auf der rechten Körperseite zwischen Rücken und Flanke eine ca. 1,5 cm lange und 0,3 cm breite haarlose Stelle auf. Bei allen vier Tieren war die Haut in den haarlosen Bereichen unverändert und rosa-grau gefärbt. Da die *Slc10a6*-Knockout-Maus auf einem 129S5- und einem C57BL/6N-Hintergrund basiert, war die Rosafärbung der Haut dem 129S5-Stamm zuzuschreiben und die grauen Regionen auf den B6-Hintergrund zurückzuführen. Die Hautfärbung im Bereich der kahlen Stellen war somit als unauffällig zu bewerten. Um eine Infektion mit Milben auszuschließen, die den Haarausfall hätte hervorrufen können, wurde eine parasitologische Untersuchung durchgeführt. Das KOH-Präparat war allerdings negativ, so dass eine Infektion mit Ektoparasiten ausgeschlossen werden konnte. Ferner wurde eine mykologische Untersuchung eingeleitet, auch diese ergab keinen Befund. Interessanterweise waren alle vier Mäuse homozygote Knockouts. Erst im weiteren Verlauf trat der Haarausfall auch bei heterozygoten und Wildtyp-Tieren auf. Allerdings waren auch hier keine Hautauffälligkeiten zu sehen. Insgesamt waren die Läsionen bei diesen Tieren kleiner und vereinzelter.

Da nach dem aktuellen Tierschutzgesetz neue gentechnisch-veränderte Tiere einer Belastungsbeurteilung unterzogen werden müssen, um sie, vorausgesetzt es wurde keine Belastung festgestellt, ohne genehmigungspflichtigen Tierversuchsantrag züchten zu dürfen, wurde diese Belastungseinschätzung anhand der Formblätter vom 24.06.2013 (Version 1.2 / 24.07.2013, Workshop „Dokumentation und Veröffentlichung der Belastungseinstufung für genetisch veränderte Versuchstiere“, Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, siehe Kapitel 3.12.5) durchgeführt. In diesem Formblatt wurden unter anderem Ernährungszustand, Körperhaltung, Verhalten, Motorik, Fell, Körperöffnungen und die Reaktion auf das Handling beurteilt. Außerdem wurde auf Auffälligkeiten wie Tumore, Entzündungen, Verletzungen, Kannibalismus, Lautäußerungen und Rektumprolaps geachtet. Bis auf den Haarausfall der generierten Tiere, waren keine Besonderheiten bei den heterozygoten und homozygoten *Slc10a6*-Knockout-Mäusen zu detektieren. Es ist daher bisher davon auszugehen, dass die *Slc10a6*-Knockout-Maus bis zum untersuchten Alter von 20 Wochen keinen belastenden Phänotyp aufweist.

5 Diskussion

Steroidhormone haben im Organismus vielfältige regulatorische Aufgaben und sind in mehrere Regelkreisläufe des Körpers eingebettet (siehe Kapitel 1.1, 1.3.1.2, 1.3.2, 1.4.2). Neben der globalen Wirkung im Gesamtorganismus, wird auch die intrazelluläre Bildung und Wirkung von Steroidhormonen in der Literatur diskutiert, welche auch als intrakrine Wirkung bezeichnet wird (Labrie 1991). Hierbei spielt die Bildung aktiver Steroidhormone aus ihren sulfatierten inaktiven Formen über den *Sulfatase pathway* eine besondere Rolle (Payne und Jaffe 1975; Labrie 1991; Labrie et al. 2000a). Bisher konnte die Bedeutung dieser lokalen Wirkung von Steroidhormonen allerdings nicht eindeutig geklärt werden. Diese Arbeit hatte das Ziel, den zellulären Import von Steroidsulfaten und deren Bedeutung als Präkusoren für die Produktion aktiver Steroide in Zielzellen im Sinne einer intrakrinen Wirkung.

5.1 OATP6A1, OATP1C1, OSCP1 und SOAT – Membrantransporter für sulfatierte Steroide im Hoden?

Die OATPs stellen eine Transporterfamilie mit einem weit gefassten Substratspektrum dar (Hagenbuch und Meier 2003; Grube et al. 2006; Roth et al. 2012; Hagenbuch und Stieger 2013), wovon einige auch sulfatierte Steroide transportieren (Geyer et al. 2004b; Grube et al. 2006). Bisher wurden mit den beiden GST-Proteinen der Ratte (GST-1 und GST-2) und dem humanen OATP1C1 zwei Transportproteine identifiziert, die zum einen sulfatierte Steroide transportieren und zum anderen im Hoden exprimiert werden (Pizzagalli et al. 2002; Suzuki et al. 2003b). Da der humane OATP6A1 bislang nicht näher charakterisiert wurde, sollte dieser im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht werden. Der OATP1C1 hingegen transportiert neben E₁S vor allem T₄ und rT₃ mit K_m-Werten von 90,4 nM und 127,7 nM (Pizzagalli et al. 2002). Dies führte dazu, dass bisherige Arbeiten sich hauptsächlich auf die Bedeutung der OATP1C1 Expression im Gehirn als möglicher Schilddrüsenhormontransporter konzentrierten (Roberts et al. 2008; Alkemade et al. 2011; Mayerl et al. 2012; Schnell et al. 2013; Mayerl et al. 2014). Seine potentielle Bedeutung für die Versorgung des Hodens mit Schilddrüsenhormonen oder Steroidsulfaten wurde daher in der Literatur nicht näher betrachtet. Ein weiterer untersuchter Transporter, der OSCP1, stellte sich bis dato als ein multispezifischer Transporter in der Literatur dar, dessen physiologische Relevanz im Hoden in vorangegangenen Studien nicht geklärt werden konnte (Kobayashi et al. 2005; Hiratsuka et al. 2008). Auch für SOAT waren bislang die zelluläre Lokalisation und die physiologische Bedeutung im Organismus und speziell im Hoden nicht näher untersucht worden. In dieser Arbeit wurde nun systematisch analysiert, welcher der ausgewählten Transporter im Hoden in den *Sulfatase Pathway* involviert sein könnte.

5.1.1 Expression

Zunächst wurde die Expression der Kandidatentransporter untereinander verglichen. Hierfür wurden insgesamt 24 verschiedene Gewebe in der quantitativen Real-Time PCR untersucht. Es zeigte sich, dass alle vier Transporter im Hoden prädominant (SOAT, OATP6A1, OSCP1) oder dominant (OATP1C1) exprimiert werden. Diese Expressionsmuster deuten darauf hin, dass die vier Transporter eine wichtige Funktion in diesem Organ übernehmen könnten. Neben dem Hoden weist SOAT eine deutliche Expression in der Haut auf. Dies ist eine interessante Entdeckung, da in der Haut auch die Steroidsulfatase eine wichtige Rolle spielt (Labrie et al. 2000a). Studien zeigten bereits, dass kultivierte epidermale Keratinozyten steroidmetabolisierende Enzyme besitzen, wie die StS, und sowohl E₁S wie auch DHEAS in E₁ und DHEA umwandeln können (Milewich et al. 1988). Ferner sind auch Enzyme der Steroidbiosynthese (3 β -HSD, 17 β -HSD, 5 α -Reduktase) in diesen Zellen vorhanden (Milewich et al. 1988; Dumont et al. 1992a). Die Haut ist somit in der Lage, aus dem Blut aufgenommenes DHEAS in den Keratinozyten mit Hilfe der StS in DHEA zu überführen und anschließend die Androgene Testosteron und DHT, sowie die Östrogene E₁ und E₂ zu formieren, die dann entsprechende Wirkungen hervorrufen können (Milewich et al. 1988). Neben den Keratinozyten besitzen auch die Sebozyten eine entsprechende Enzymausstattung, so dass sie als Teil der *pilosebaceous unit* maßgeblich zur Androgensynthese in der Haut beitragen (Takayasu et al. 1980; Courchay et al. 1996; Zouboulis 2004). Da SOAT sowohl E₁S wie auch DHEAS transportiert, ist es möglich, dass er die Aufnahme der beiden Steroidsulfate in die Zelle vermittelt, da wie bereits in der Einleitung erläutert (siehe Kapitel 1.6.1) sulfatierte Steroide aufgrund ihrer hydrophilen Eigenschaften die Zellmembran nicht mittels Diffusion passieren können und somit über ein Transportsystem in die Zelle aufgenommen werden müssen. Zusätzlich zum Hoden und zur Haut wird SOAT beim Menschen auch in der Niere, dem Herzen, dem Pankreas, der Vagina, der Nebenniere und der Mamma exprimiert. In der Niere könnte SOAT eine Funktion bei der Rückresorption der Steroidsulfate einnehmen. Der ASBT/Asbt, der innerhalb der SLC10-Familie den nächsten Verwandten des SOATs mit 41,6 % Sequenzidentität darstellt (Geyer et al. 2006a; Geyer et al. 2007), wurde auch in der Niere nachgewiesen (Christie et al. 1996; Craddock et al. 1998). Er ist hier im proximalen Tubulus lokalisiert und seine Hauptaufgabe dort besteht in der Reabsorption glomerulär gefilterter Gallensäuren (Christie et al. 1996). Es daher möglich, dass SOAT in der Niere ebenfalls in die Rückgewinnung ausgeschiedener Stoffe involviert ist. Die Expression von SOAT in der Mamma, die 2007 auch schon von Geyer et al. gezeigt werden konnte (Geyer et al. 2007), könnte in Zusammenhang mit hormonabhängigen Mammakarzinomen stehen. Untersuchungen mit Hilfe eines Proliferationsassays zeigten bereits, dass eine mit hSOAT transfizierte, hormonsensitive Brustkrebszelllinie (T47D) eine 10-fach höhere Sensitivität für

E₁S gegenüber den mit Leervektor transfizierten Kontrollzellen aufwies (Karakus 2009). Da sich dieser Effekt durch den selektiven Estrogenrezeptormodulator Tamoxifen und auch durch den StS-Inhibitor STX64 und die SOAT-Inhibitoren 2- und 4-SMP blockieren ließ, ist eine funktionelle Bedeutung des SOAT in der Mamma wahrscheinlich. SOAT wies auch in der Vagina eine deutliche Expression auf. In der Vagina sind eine Vielzahl von Östrogenrezeptoren vorhanden (Blakeman et al. 2000), so dass hier ebenfalls eine Aufnahme sulfatierter Östrogene durch SOAT möglich wäre. Sehr frühe Studien von Lalumiere wiesen die StS in der Vagina nach (Lalumiere et al. 1976). Daher ist der *Sulfatase Pathway* in diesem Organ ebenfalls denkbar. In der Nebenniere ist die StS auch detektierbar (Reed et al. 2005). Eine Transportfunktion des SOAT kann somit in diesem Organ zu einer Reaktivierung der Steroidsulfate führen. Da die Nebenniere allerdings selbst in der Lage ist, sowohl Steroidhormone, wie auch ihre sulfatierten Formen selbst zu synthetisieren, ist die Bedeutung eines Steroidsulfattransportes für den Import sulfatierter Steroide in diesem Organ fraglich. Die SOAT-Expression im Herzen ist ebenfalls interessant. In den letzten Jahren wurde vermehrt über eine lokale Steroidproduktion im Herzgewebe diskutiert, allerdings lag bislang der Schwerpunkt in den Studien auf den Mineralokortikoiden (Kayes-Wandover und White 2000; Young et al. 2001). Östrogene haben einen Einfluss auf die Expression kardialer Proteine und zwar sowohl auf mRNA-Ebene, als auch auf Proteinebene (Murphy und Steenbergen 2014). Neben posttranslationalen Modifikationsunterschieden zwischen Mann und Frau, wird auch cardiale microRNA durch Östrogene reguliert (Queiros et al. 2013). So wurde die Expression verschiedener microRNAs untersucht, die im Zusammenhang mit der durch Drucküberladung des Herzens bedingten kardialen Fibrose stehen. Es konnte durch Verwendung von Wildtyp- und ER β -defizienten Mäusen eine östrogenabhängige Zusammensetzung der microRNA-Struktur gezeigt werden, die zu der geschlechtsabhängigen Ausprägung der kardialen Fibrose führt (Queiros et al. 2013). Dies ist ein Beispiel der Bedeutung der Östrogene für die Funktion des Herzens und die geschlechtsabhängige Ausprägung der verschiedenen kardialen Dysfunktionen. Ob allerdings aus der Zirkulation freie oder sulfatierte Steroide rekrutiert werden, und somit auch im Herzen eine Versorgung mit Androgenen und Östrogenen durch den *Sulfatase Pathway* besteht, ist momentan noch offen. Bei letzterem könnte SOAT die Funktion des Östrogensulfat-Transporters einnehmen, was seine Expression in diesem Organ erklären würde.

Neben dem SOAT weisen auch der OATP6A1 und der OSCP1 eine sehr organspezifische Expression im Hoden auf. Der OSCP1 ist außerdem noch im Eileiter und im Gehirn stark exprimiert. Hiratsuka hat bei der Maus das OSCP1-Protein im Gehirn lokalisiert, was die in dieser Arbeit erhobenen Daten bestätigen (Hiratsuka et al. 2011). Im Eileiter könnte der OSCP1 die Aufnahme von Stoffen vermitteln, welche die Bewegung der Zilien modulieren. So

werden bei Maus und Mensch Steroidhormone, wie das Progesteron mit der Höhe der Frequenz des Zilienschlags in Verbindung gebracht (Nutu et al. 2009). Es ist also vorstellbar, dass der OSCP1 entweder die Steroide in die Zelle transportiert oder aber andere für die Zilienbewegung benötigten Stoffe. Das von Kobayashi et al. definierte Substratspektrum umfasste eine Vielzahl von verschiedenen Molekülen (Kobayashi et al. 2005), so dass eine Transportaufgabe in diesem Gewebe nicht abwegig erscheint. Die Klärung der subzellulären Lokalisation des OSCP1 im Eileiter würde dazu beitragen, seine mögliche Funktion dort besser zu verstehen.

Der OATP1C1 ist neben dem Hoden massiv im Gehirn exprimiert. In der Literatur wird er hauptsächlich als Schilddrüsenhormontransporter beschrieben (Pizzagalli et al. 2002). Im Gehirn ist OATP1C1 an der Blut-Hirn-Schranke lokalisiert und könnte somit an der Aufnahme von Schilddrüsenhormonen in das Gehirn beteiligt sein (Roberts et al. 2008). Im Hoden sind Schilddrüsenhormone ebenfalls von Bedeutung. Sie wirken auf die Entwicklung der Hoden ein und modulieren bzw. regulieren die Spermatogenese und die Leydigzell-Funktion (Maran 2003; Mendis-Handagama und Siril Ariyaratne 2005; Marchlewska et al. 2011). Hierbei könnte der OATP1C1 durch eine Aufnahme von Schilddrüsenhormonen in den Hoden von Bedeutung sein.

5.1.2 Transport der Kandidatencarrier

Nachdem das Expressionsprofil der Kandidatentransporter ermittelt war, folgte als nächster Schritt die Evaluierung der Transportcharakteristika, um festzustellen, welcher von den vier Kandidatentransportern im Hoden eine Funktion im Sulfatase Pathway innehaben könnte und welcher der vier der bedeutendste Carrier für den Hoden zu sein scheint.

5.1.2.1 Der OSCP1, ein Transportprotein oder nur ein Transporthilfsprotein?

In dieser Studie wurden die Transporteigenschaften des OSCP1 sowohl im Zellexpressionsmodell als auch im *Xenopus leavis* Oozyten-Expressionsmodell untersucht. Allerdings ließ sich weder in den verschiedenen Zellkulturmodellen (transient transfizierte Zellen, stabil transfizierte Zellen, verschiedene Zelllinien) noch in den *Xenopus leavis* Oozyten als zweites Expressionsmodell ein messbarer Transport darstellen. Dies steht im Widerspruch zu den von Kobayashi und Izuno erhobenen Daten, denen zufolge nach sowohl der OSCP1 der Ratte, als auch der OSCP1 der Maus DHEAS transportieren und der humane OSCP1 eine Aufnahme von E₁S zeigte (Kobayashi et al. 2005; Izuno et al. 2007; Kobayashi et al. 2007). Die Transportmessungen wurden zunächst in transient transfizierten GripTite 293 MSR Zellen durchgeführt, da für das SOAT-Protein bereits Daten in diesen Zellen vorlagen. Es sollte so die Vergleichbarkeit der Daten gewährleistet werden. In diesen Messungen zeigte die

Positivkontrolle in Form des SOAT- bzw. NTCP-Proteins eine deutliche Aufnahme der Substrate, für das OSCP1-Protein hingegen war kein Transport detektierbar. Das gleiche Phänomen war auch in den zusätzlich verwendeten CHO-Zellen zu beobachten. Ein methodischer Fehler konnte durch die mitgeführte, funktionierende Positivkontrolle ausgeschlossen werden. Daher wurde im nächsten Schritt das OSCP1-Konstrukt in den V5His-Vektor subkloniert. Dies ermöglichte die Überprüfung der Expression mittels Anti-V5-Antikörper in den transfizierten Zellen. Die parallel zu den Transportversuchen durchgeführte Immunfluoreszenz zeigte eine ausreichende OSCP1-Proteinexpression. Damit war eine mangelhafte Transfektionseffizienz als Ursache der fehlenden Transportaktivität ausgeschlossen. Die Lokalisation des Proteins konnte aber eindeutig dem Zytoplasma der Zelle zugeordnet werden, so dass sich die Frage stellte, ob das Protein zum Zeitpunkt der Transportmessung noch nicht richtig sortiert war, oder ob der OSCP1 in den verwendeten *in vitro*-Systemen eine zytosolische Lokalisation aufweist.

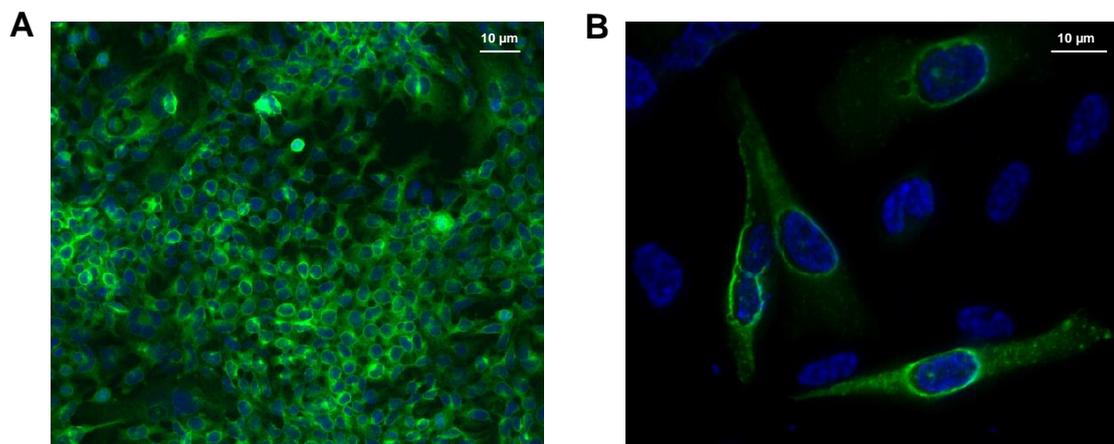


Abbildung 5.1: Immunfluoreszenz der mit OSCP1-V5His transfizierten GripTite 293 MSR Zellen.

Für die Immunfluoreszenz wurde das OSCP1-V5His Plasmid mittels Lipofektion in GripTite 293 MSR transient transfiziert und für 48 h kultiviert, bevor die Immunzytochemie durchgeführt wurde. Der Maus anti-V5 Antikörper (1:5.000) wurde hierbei als Primär- und der Ziege Alexa Fluor 488-gekoppelte anti-Maus (1:800, grün) als Sekundärintikörper eingesetzt. Beide wurden jeweils 1 h bei RT auf die Zellen gegeben. Im Anschluss folgte die Zellkernfärbung mit DAPI (blau). (A) Übersichtsaufnahme zur Darstellung der sehr guten Transfektionseffizienz. (20-fache Vergrößerung). (B) Maximalprojektion eines Z-Stapels in der 63-fachen Vergrößerung. Das OSCP1-V5His-Protein ist hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden neben transient transfizierten Zellen auch stabil transfizierte Zellen für die Transportstudien verwendet. Hierfür wurde sowohl eine mit V5-His-Tag markierte OSCP1-HEK293 Zelllinie, als auch eine OSCP1-HEK293 Zelllinie mit ungetagtem OSCP1 generiert. In Transportstudien zeigten allerdings beide keine Transportaktivität für die Testsubstrate. Um einen möglichen Transport zu forcieren, wurden verschiedene Messzeiten und unterschiedliche Konzentrationen getestet. Zusätzlich wies die generierte OSCP1-HEK293 Zelllinie das TetRepressor-System auf, welches bei der SOAT-HEK293 Zelllinie

(Geyer et al. 2007; Döring 2009) und auch bei anderen im Institut verwendeten Zelllinien (ASBT-HEK293 und NTCP-HEK293 Zellen (Grosser 2013)) etabliert ist und zuverlässig funktioniert. Durch die regelmäßige Selektion mit Blastocidin (Selektion auf den Tet-Repressor) und Hygromycin B (Selektion auf das Insert) konnte ein Verlust des Inserts innerhalb der Zelllinie und ein Versagen des TetRepressor-Systems ausgeschlossen werden. Dies wirft die Frage auf, ob es sich bei OSCP1 überhaupt um einen klassischen Membrantransporter handelt. Neben der Zelllinie mit ungetagtem OSCP1, wurde auch eine OSCP1-V5His-HEK293 Zelllinie generiert. Diese wurde ebenfalls im Transportassay überprüft, aber auch hier zeigte das OSCP1-Protein keine Aufnahme. Allerdings war es nun möglich, die Proteinexpression und die Proteinlokalisierung mit Hilfe des V5His-Tags zu ermitteln. Mittels Western Blot konnte eine Bande bei 45 kDa detektiert werden, was mit dem vorausgerechneten Molekulargewicht von 43,3 kDa unter Berücksichtigung des V5His-Tags übereinstimmt. Das murine OSCP1-Protein ist im Western Blot ebenfalls bei 45 kDa detektiert worden und konnte mit dieser Methode im Hodenhomogenat von ICR-Mäusen nachgewiesen werden (Hiratsuka et al. 2008). Eine subzelluläre Fraktionierung der Hodenhomogenate zeigte allerdings bereits, dass das OSCP1-Protein der Maus hauptsächlich im Zytoplasma und mit einem deutlich geringeren Anteil im Kern lokalisiert ist (Hiratsuka et al. 2008). Zusätzlich zu den Hodenhomogenaten wurden ein OSCP1-GFP (*green fluorescent protein*) Konstrukt von der Gruppe um Hiratsuka generiert und in HeLa Zellen transfiziert. Hier wurde das murine OSCP1-Protein ebenfalls nur im Zytosol detektiert (Hiratsuka et al. 2008). In den Studien von Kobayashi und Izuno wurde der OSCP1/OSCP1 in der Zellmembran der Synzytiotrophoblasten der humanen Plazenta (Kobayashi et al. 2005) und in der Basalmembran der Sertolizellen von Maus und Ratte lokalisiert (Kobayashi et al. 2005; Izuno et al. 2007; Kobayashi et al. 2007). Während die Detektion des humanen OSCP1 in der Plazenta nachvollziehbar erscheint, da die histologische Struktur der Plazenta in der entsprechenden Publikation erkennbar ist (Kobayashi et al. 2005), sollte die Immunhistochemie an Hodenschnitten der Maus durchaus kritisch betrachtet werden (Kobayashi et al. 2007). In den dargestellten Bildern der entsprechenden Publikation ist die histologische Struktur des Hodens nicht eindeutig zu erkennen (Kobayashi et al. 2007). So fehlen deutliche Tubuli seminiferi und auch die Zuordnung der auf den Bildern dargestellten Zellpopulation zu den im Hoden ansässigen Zelltypen gestaltet sich schwierig. Daher erscheint es fragwürdig, ob das murine OSCP1-Protein wirklich in den Sertolizellen exprimiert wird. Die immunhistologische Darstellung des Rattenhodens liefert hier zumindest unter histologischen Aspekten eine bessere Antwort (Izuno et al. 2007). Die Tubulusstruktur ist in der entsprechenden Publikation eindeutig zu erkennen und sowohl Sertolizellen, als auch Keimzellpopulationen sind definierbar (Izuno et al. 2007). Allerdings wird eine Lokalisation des OSCP1-Proteins in der Basalmembran der

Sertolizellen postuliert, was nicht eindeutig nachzuvollziehen ist (Izuno et al. 2007). Die Basalmembran der Sertolizellen lagert sich der *Lamina propria*, die den Tubulus umgibt an und ist histologisch nur schwer von ihr zu unterscheiden. Die starke Färbung in diesem Bereich weist eher auf eine Markierung der *Lamina propria* hin, was dadurch bekräftigt wird, dass die Färbung an den Stellen des Tubulus, an denen sich die *Lamina propria* vom Tubulus abgelöst hat, verschwindet (Izuno et al. 2007). Somit ist nicht eindeutig erkennbar, ob das Oscp1-Protein der Maus und der Ratte wirklich in den Sertolizellen exprimiert wird und dort in der Membran lokalisiert ist. Die Gruppe um Hiratsuka hat ebenfalls die zelluläre Lokalisation des murinen Oscp1-Proteins im Hoden untersucht. In ihrer Studie zeigte sich das Protein nur in den Keimzellen, nicht aber in den Sertolizellen (Hiratsuka et al. 2008). Dies wurde nicht nur auf Proteinebene durch die Immunhistochemie (IHC) an murinem Hoden gezeigt, sondern auch mittels *in situ* Hybridisierung für die mRNA evaluiert, die ebenfalls nur Signale in Teilen der Keimzellpopulation hervorrief, nicht aber in den Sertolizellen (Hiratsuka et al. 2008). In der IHC war außerdem zu erkennen, dass der Oscp1 im Zytoplasma der jeweiligen Keimzelle vorhanden war und kein eindeutig membranständiges Expressionsmuster aufwies (Hiratsuka et al. 2008). Da die Aminosäuresequenzen der OSCP1/Oscp1-Proteine von Maus und Mensch zu 85 % identisch sind (Kobayashi et al. 2007), ist anzunehmen, dass beide Proteine vergleichbare Funktionen und Lokalisationen aufweisen. Von unserer Arbeitsgruppe konnte die mRNA-Expression des humanen OSCP1 im Hoden determiniert werden (Fietz et al. 2013). Die RT-PCR aus Hodenmaterial, welches mittels Laser-assesiertem Zell-Picking (LACP) aus Hodenschnitten gewonnen wurde, zeigte dabei, dass der humane OSCP1 in den Keimzellen exprimiert wird (Fietz et al. 2013). Mit Hilfe von Biopsien, die verschiedene Stadien der gestörten Spermatogenese aufwiesen (siehe Kapitel 1.3.1.4.6) wurde weiterhin ermittelt, dass der humane OSCP1 in Spermatiden und zu einem kleinen Teil in Spermatozyten exprimiert wird (Fietz et al. 2013).

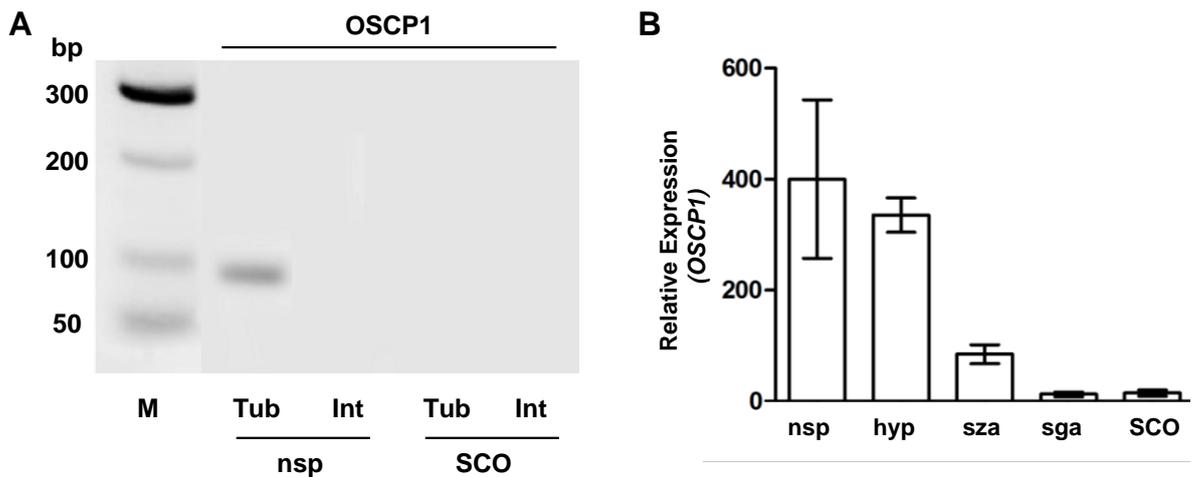


Abbildung 5.2 Qualitative und quantitative mRNA Expressionsanalyse des humanen OSCP1 in Biopsien mit normaler und gestörter Spermatogenese.

(A) Die mRNA des humanen OSCP1 wurde mittels qualitativer PCR nach LACP in Hodenbiopsien mit normaler Spermatogenese (nsp) in den *Tubuli seminiferi* (Tub), aber nicht im Interstitium (Int) detektiert, wohingegen beim SCO weder in den Tubuli, noch im Interstitium ein OSCP1-spezifisches Amplifikat nachgewiesen werden konnte. Dies deutet auf eine Expression des humanen OSCP1 in den Keimzellen hin. M: Marker.

(B) Die quantitative Realtime-PCR mit Biopsien verschiedener Spermatogenesedefekte (n=5-12) zeigt eine Expression des OSCP1 bei normaler Spermatogenese und Hypospermatogenese (hyp). Bei einem Arrest der Spermatozyten (sza) bzw. der Spermato gonien (sga), sowie beim SCO ist weniger OSCP1 mRNA vorhanden. Dies weist auf die Spermatoziden als Hauptexpressionsort für OSCP1 hin (Fietz et al. 2013).

Dies stimmt mit dem Expressionmuster des murinen *Oscp1* überein (Hiratsuka et al. 2008). Ferner konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das artifizielle OSCP1-Protein in der stabilen OSCP1-V5His HEK293 Zelllinie im Zytoplasma und im Bereich des Zellkerns akkumuliert, was ebenfalls mit der Lokalisation des murinen *Oscp1*-Proteins in den von Hiratsuka transfizierten HeLa Zellen übereinstimmt. Zusammenfassend stellt sich nun die Frage, ob der OSCP1/*Oscp1* unabhängig von der Spezies wirklich ein Membranprotein darstellt und ob seine Funktion überhaupt die eines Membrantransporters darstellt. Die Studien von Kobayashi und Izuno deuten daraufhin, dass der OSCP1/*Oscp1* ein multispezifischer Transporter ist, der aufgrund seiner Lokalisation in den Sertolizellen in die selektive Aufnahme von Stoffen über die Blut-Hoden-Schranke beteiligt sein könnte. In der vorliegenden Arbeit hingegen konnte für sulfatierte Steroide keine Aufnahme im Zellkulturmodell oder im *Xenopus laevis* Oozyten-Expressionsmodell nachgewiesen werden. Zu anderen Substraten lassen sich nur eingeschränkt Aussagen machen, da sie in dieser Arbeit nicht explizit untersucht wurden. Den hier erhobenen Daten nach ist es somit wahrscheinlich, dass das humane OSCP1-Protein ein zytosolisches Protein darstellt, wobei keine Hinweise auf eine Interaktion mit sulfatierten Steroidhormonen gefunden werden konnten. Hieraus stellt sich die Frage, ob dieser Kandidatentransporter trotz seiner spezifischen Lokalisation im Hoden eine Bedeutung in der Versorgung des Hodens, speziell

in der Versorgung der Keimzellen mit Steroidsulfaten wahrnimmt oder ob das OSCP1/Oscp1-Protein zwar am Transportgeschehen innerhalb der Zelle beteiligt ist, allerdings dabei nicht selbst aktiv transportiert, sondern für andere Transporter eine Hilfsfunktion übernimmt. Letzteres wurde zumindest von Hiratsuka et al. postuliert, nachdem das Oscp1-Protein der Maus von ihm sowohl im Hoden, wie auch im Gehirn im Zytosol der jeweils exprimierenden Zellpopulation gefunden wurde (Hiratsuka et al. 2008; Hiratsuka et al. 2011). Um dies vollständig zu klären, müssen weitere Transportstudien mit anderen Substraten durchgeführt werden und die Lokalisation des Proteins in anderen Organen (z. B. im Eileiter) ermittelt werden. Erst dann lässt sich die möglich physiologische Funktion dieses Proteins weiter diskutieren. Insgesamt wird es aber als unwahrscheinlich angesehen, dass der humane OSCP1 eine bedeutende Rolle im *Sulfatase Pathway* im Hoden übernimmt. Daher wurde er im weiteren Verlauf dieser Arbeit nicht näher untersucht.

5.1.2.2 Der OATP6A1

Der humane OATP6A1 stellte ebenfalls einen Kandidatentransporter für diese Studie dar. In der Literatur sind bislang nur die nahen Verwandten des humanen OATP6A1, der GST-1 und der GST-2 der Ratte, näher charakterisiert worden. Der OATP6A1 ist, wie in Kapitel 4.1.2 gezeigt wurde, exklusiv im Hoden exprimiert. Ähnlich wie beim OSCP1-Protein wurde eine systematische Funktionsanalyse durchgeführt mit Hilfe verschiedener Expressionsmodelle (Zellkulturmodell und *Xenopus leavis* Oozyten-Expressionsmodell). Ferner wurde das Zellkulturmodell durch die Verwendung unterschiedlicher Zelllinien, die Verlängerung der Messzeiten und das Anbieten verschiedener potentieller Substrate variiert, um einen Transport des OATP6A1-Proteins darzustellen, was aber in dieser Studie leider nicht gelungen ist. Für die stabil transfizierte Zelllinie wurde wiederum das Tet-Repressor-System verwendet, um die Proteinexpression bewusst zu kontrollieren, aber in den Transportstudien war kein Unterschied zwischen den Tetrazyklin-induzierten und den nicht-induzierten OATP6A1-HEK293 Zellen festzustellen. Es ist bereits bekannt, dass das Tet-Repressor-System die Expression des Transgens nicht zu 100% unterdrückt und somit einige wenige Zellen auch ohne Tetrazyklin-Zugabe das transfizierte Konstrukt exprimieren (Meyer-Ficca et al. 2004). Dies lässt sich vor allem in der Immunzytochemie mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern sehr schön darstellen, allerdings kann eine regelmäßige Selektion mit Blasticidin diesem Problem vorbeugen. Da die OATP6A1-HEK293 Zelllinie in regelmäßigen Abständen entsprechend selektioniert wurde, erscheint es unwahrscheinlich, dass hier der Grund für die fehlende Transportaktivität des OATP6A-Proteins liegt. Ähnlich wie beim OSCP1 wurde auch für den OATP6A1 eine stabil transfizierte Zelllinie mit dem V5His-getaggten Protein generiert. Das OATP6A1-Protein konnte im Western Blot und in der Immunfluoreszenzanalyse der

OATP6A1-V5His-HEK293 Zellen mit dem Anti-V5-Antikörper nachgewiesen werden, so dass zumindest die Transkription und Translation des OATP6A1 in den HEK293-Zellen bestätigt wurde. In der Immunfluoreszenzanalyse fiel auf, dass auch das OATP6A1-V5His-Protein hauptsächlich im Bereich um den Zellkern akkumuliert. Die Akkumulation deutet auf eine Lokalisation des Proteins im ER oder im Golgi-Apparat hin. Somit stellt sich die Frage, warum keine eindeutige Lokalisation in der Zellmembran detektierbar war. Eine mögliche Ursache hierfür könnte eine Fehlsortierung aufgrund des V5His-Tags sein, was in der Literatur immer wieder kontrovers diskutiert wird. Allerdings liegen im Institut für Pharmakologie und Toxikologie verschiedene Zelllinien mit entsprechendem C-terminalem Tag vor (ASBT-FLAG HEK293 Zellen, NTCP-FLAG HEK293 Zellen, SOAT-GFP HEK293 Zellen), die alle intakt in die Zellmembran einsortiert werden und hier eine entsprechende Transportfunktion zeigen. Auch Studien, bei denen der SOAT-V5His transient in Grip Tite 293 MSR Zellen transfiziert wurde, führten zu einem positiven Transportergebnis. Daher ist ein Sorting-Problem des humanen OATP6A1-Proteins zwar durchaus denkbar, es erklärt aber nicht, warum die Tetrazyklin-induzierbare OATP61-HEK293 Zelllinie keinen Transport zeigt. Suzuki publizierte 2003 Transporte für DHEAS, TC, T₃ und T₄ durch die beiden GST-Proteine der Ratte (Suzuki et al. 2003b). Bei der Ratte liegen zwei Formen des *gonad specific transporters* vor (GST-1 und GST-2), die eine Sequenzidentität von 42 % auf der Stufe der Aminosäuren aufweisen (Suzuki et al. 2003b). Mittlerweile werden die beiden GST-Proteine der Ratte als Oatp6b1 (GST-1, neue Genbezeichnung: *Slco6b1*) und Oatp6c1 (GST-2, neue Genbezeichnung: *Slco6c1*) bezeichnet. Obwohl sie zu anderen Subfamilien gehören als der humane OATP6A1, stimmen sie mit diesem zu 45,3 % (GST-1) und 39,0 % (GST-2) überein. In den Transportstudien von Suzuki wurden unterschiedliche Präferenzen in Bezug auf die Substrate ermittelt. Der GST-1 der Ratte transportierte TC mit einer Ratio von 4,3 im Vergleich zur Kontrolle. Ein ähnliches Ergebnis für TC mit einer Ratio von 3,1 lieferte der GST-2. Dieser transportierte auch DHEAS mit einer Ratio von 3,0, wohingegen der GST-1 DHEAS nur mit einer Ratio von 1,9 in die Zelle transportierte. Auch beim Schilddrüsenhormon T₄ unterscheiden sich die beiden Transport-Raten (Ratio zur Kontrolle 2,6:1 für GST-1 und 1,8:1 für GST-2) (Suzuki et al. 2003b). In der vorliegenden Arbeit wurden, wie bereits zuvor erwähnt, dem humanen OATP6A1-Protein verschiedene Substrate (TC, DHEAS, E₁S) angeboten, um zu überprüfen, ob das humane Protein ein ähnliches Transportspektrum aufweist wie die beiden Rattenvarianten. Dies wurde nicht nur im Zellkulturmodell evaluiert, sondern auch in *Xenopus laevis* Oozyten. Die Transportdaten der Rattenproteine wurden von Suzuki ebenfalls im *Xenopus laevis* Oozyten-Expressionsmodell ermittelt. Bei einem Vergleich der Protokolle unterschieden diese sich nur in der Menge der injizierten cRNA. Während es im Institut für Pharmakologie und Toxikologie üblich ist, 4,6 ng/Oozyte zu injizieren (Geyer et al. 2004b;

Döring 2009), verwendeten Suzuki und seine Kollegen 25 ng/Oozyte (Suzuki et al. 2003b). Da bei Verwendung von 4,6 ng die Positivkontrolle (NTCP) funktionierte und diese cRNA-Menge auch in anderen Arbeitsgruppen eingesetzt wird (Kullak-Ublick et al. 2001), ist ein methodischer Fehler unwahrscheinlich und die unterschiedlichen Injektionsmengen als Ursache unwahrscheinlich. Allerdings ist in der Literatur bereits beschrieben, dass jeweils homologe Carrier von Mensch und Ratte zum Teil sehr unterschiedliche Transporteigenschaften aufweisen. So zeigte der humane OATP1A2 einen deutlich geringeren Transport für TC in *Xenopus laevis* Oozyten im Vergleich zu seinen Rattenhomologen Oatp1a1, Oatp1a4 und Oatp1a5 (Geyer et al. 2004b). Somit unterscheiden sich die Transportcharakteristika anderer OATPs/Oatps ebenfalls speziesspezifisch. Man kann daher mutmaßen, dass der humane OATP6A1 gegebenenfalls trotz seiner sehr spezifischen Gewebeexpression keine Transportfunktion für sulfatierte Steroide im Hoden innehat und gegebenenfalls ein komplett anderes Substratspektrum als die beiden GST-Proteine der Ratte aufweist. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. M. Bergmann aus dem Institut für Veterinär Anatomie, -histologie und -embryologie, Gießen, konnte die Lokalisation des humanen OATP6A1 im Hoden genauer definiert werden.

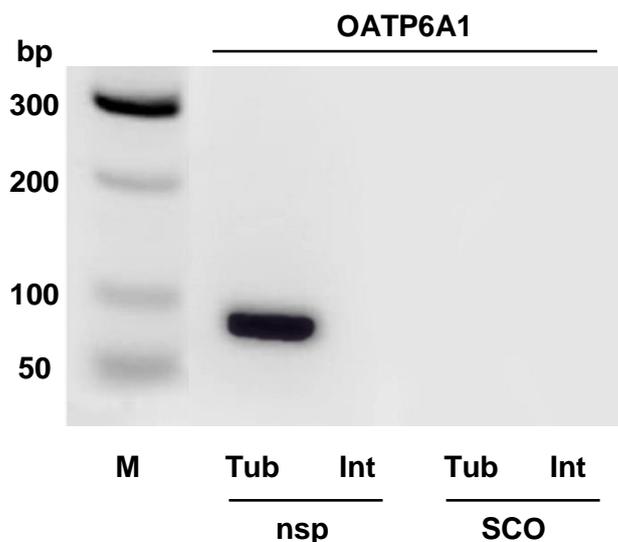


Abbildung 5.3: Quantitative Expressionsanalyse der OATP6A1 mRNA in Hodenbiopsien mit normaler und gestörter Spermatogenese nach LACP.

Mittels LACP wurden die Samenkanälchen (*Tubuli seminiferi*, Tub) vom Interstitium (Int) getrennt und die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben. Diese wurde in der quantitativen Expressionsanalyse mit OATP6A1-spezifischen Primern eingesetzt. Es zeigte sich, dass die mRNA des OATP6A1 nur in den Tubuli seminiferi mit normaler Spermatogenese (nsp), nicht aber mit SCO nachweisbar war. Im Interstitium beider Biopsien wurde keine mRNA des OATP6A1 detektiert. Dies deutet auf eine Expression des OATP6A1 in den Keimzellen hin (Fietz et al. 2013). M: Marker.

Mittels LACP wurden Hodenbiopsien, die von Individuen stammten, die entweder eine normale Spermatogenese aufwiesen, oder ein *Sertoli cell only syndrom* hatten, gewonnen und in der RT-PCR auf die Expression des OATP6A1 hin überprüft. Es zeigte sich, dass der OATP6A1

in den Keimzellen, aber nicht in den Sertoli- und/oder Leydigzellen exprimiert wird, was im Gegensatz zu den Rattenvarianten steht, die mittels *in situ* Hybridisierung sowohl in Sertolizellen, als auch in Leydigzellen nachgewiesen werden konnten (Suzuki et al. 2003b). Daher ist es durchaus möglich, dass das humane OATP6A1-Protein eine andere Funktion im Hoden wahrnimmt als die beiden Proteine der Ratte.

5.1.2.3 Der OATP1C1 – mehr als ein Schilddrüsenhormontransporter?

Der humane OATP1C1 wurde 2002 von Pizzagalli und seinen Kollegen aus einer cDNA-Bibliothek des humanen Gehirns kloniert und erstmals charakterisiert. Der OATP1C1 besteht aus 2136 bp, die ein Protein mit 712 Aminosäuren kodieren. In Gene Bank wird die Sequenz unter der Accession No.: NM_00114594.1 geführt. Das OATP1C1-Protein wurde aufgrund seiner Substrate T_4 und rT_3 als spezifischer Schilddrüsenhormontransporter deklariert (Pizzagalli et al. 2002), da er aber auch einen Transport für sulfatierte Steroide aufwies, wurde er als potentieller Kandidat für diese Studie ausgewählt. Das Expressionsprofil des humanen OATP1C1 wurde von Pizzagalli mittels Northern Blot ermittelt. Die quantitative Realtime-PCR in der vorliegenden Arbeit bestätigte die von Pizzagalli erhobenen Daten insofern, dass der OATP1C1 eine sehr hohe Expression im Gehirn zeigte und eine deutlich niedrigere, aber im Vergleich zu anderen Organen immer noch hohe Expression im Hoden. Pizzagalli hatte ebenfalls Gehirn und Hoden als Hauptexpressionsorgane ermittelt (Pizzagalli et al. 2002). Um nun die Funktion des OATP1C1 im Hoden definieren zu können, war der erste Schritt die Klonierung des Transporters. Dies gestaltete sich als schwierig. In der *GeneBank* Sequenzdatenbank sind die Sequenzen von vier Isoformen hinterlegt. Der von Pizzagalli untersuchte OATP1C1 entsprach der Isoform 2. Die Isoform 2 weist die höchste Übereinstimmung mit der Isoform 3 auf. Beide unterscheiden sich allerdings zum einen in der 5'-UTR-Region und zum anderen fehlt der Isoform 3 ein Sequenzstück von 147 bp. Die detaillierte Sequenzanalyse zeigt, dass bei der Variante 3 das Exon 6 der Isoform 2 fehlt, diese aber weiterhin *in frame* für das 49 aa kürzere OATP1C1 Protein codiert. Die Isoform 1 (Accession No.: NM_001145946.1) stimmt ebenfalls in weiten Teilen ihrer Sequenz mit der Sequenz der Isoform 2 überein. Allerdings ist die Sequenz der Isoform 1 länger (*orf* insgesamt: 2193 bp) und unterscheidet sich ab der Base 1917 von den Isoformen 2 und 3. Die in *Gene Bank* als Isoform 4 geführte Variante (Accession No.: NM_001145944.1) unterscheidet sich deutlich von den anderen drei Isoformen im Anfangsbereich der Sequenz, indem die ersten 354 Basen von den Sequenzen der anderen Varianten abweichen. Allerdings stimmt die Isoform 4 im weiteren Sequenzverlauf mit der Isoform 1 überein und unterscheidet sich dadurch aber auch deutlich von den Isoformen 2 und 3. Durch die hohen Übereinstimmungen der Sequenzen der einzelnen Isoformen vor allem im Bereich der Start- und Stoppcodons war

es nicht möglich, Primer auszusuchen, die nur eine Isoform als Template erkannten. Daher wurden die in der PCR generierten Sequenzen kloniert und dann sequenziert, um die Isoform 2 als Ausgangsmaterial für die funktionelle Charakterisierung zu generieren. Die Isoform 2 sollte in dieser Arbeit untersucht werden, da sie von Pizzagalli bereits im Hoden detektiert und mittels IHC in den Leydigzellen lokalisiert wurde (Pizzagalli et al. 2002). Trotz intensiven Bemühens gelang es nicht, die gewünschte Isoform 2 in der PCR zu amplifizieren. Da die Funktion des OATP1C1-Proteins im Hoden untersucht werden sollte, wurde als Matrize für die PCR Hoden-cDNA verwendet. Da hier kein Amplifikat mit einer entsprechenden Sequenz generiert werden konnte, wurde auf Gehirn-cDNA zurückgegriffen. Da Pizzagalli seinen OATP1C1-Klon aus einer Gehirn cDNA Bibliothek kloniert hatte, wurde erwartet, dass die Amplifizierung aus Gehirn-cDNA auch möglich sei. Es war aber nur möglich, die Isoform 3 aus dem vorhandenen Material zu gewinnen, so dass mit dieser verkürzten Form der Variante 2 weitergearbeitet wurde. Nicht nur die PCR, sondern auch die Klonierung gestaltete sich schwierig. Der korrekte Isoform 3-Klon des OATP1C1 ließ sich nicht ohne massive Sequenzabweichungen in verschiedene Vektoren (pcDNA5/FRT/TO-TOPO Vektor, pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO Vektor, pcDNA6.2/C-EmGFP-TOPO Vektor) subklonieren. Abgesehen von einem minimalen Koloniewachstum, waren nach Minipräparation der DNA in der Sequenzanalyse Abweichungen vom Ausgangsplasmid festzustellen. Da in dieser Arbeit auch der OATP6A1, der OSCP1, der SOAT und die SOAT-Mutanten subkloniert wurden und hierbei keinerlei Schwierigkeiten auftraten, sind methodische Fehler auszuschließen. Es stellt sich allerdings die Frage, ob die Sequenz der Isoform 3 des OATP1C1 Sequenzmotive beinhaltet, welche die zur Klonierung verwendeten Bakterien veranlassen, Modifikationen an dem cDNA-Konstrukt vorzunehmen. Aufgrund dieser Schwierigkeiten wurde lediglich der mit einem V5His-Tag ausgestattete OATP1C1 in der vorliegenden Arbeit eingehender untersucht. Die funktionelle Bewertung des dazugehörigen OATP1C1-V5His-Proteins wurde zunächst im Zellkulturmodell durchgeführt. Ähnlich wie die OATP6A1-Proteine zeigte auch das OATP1C1-V5His-Protein keine Transportaktivität für sulfatierte Steroide wie DHEAS oder E₁S. Der humane OATP1C1 wird in der Literatur aufgrund seiner präferierten Substrate T₄ und rT₃, deren K_m-Werte 90 ± 28 nM (T₄) und 128 ± 38 nM (rT₃) betragen (Pizzagalli et al. 2002), als spezifischer Schilddrüsenhormontransporter bezeichnet. Neben Pizzagalli et al. analysierten auch andere Arbeitsgruppen die Transporteigenschaften des OATP1C1-Proteins (van der Deure et al. 2008; Leuthold et al. 2009). Für die Studie von Leuthold et al. wurde der Klon eingesetzt, der auch schon von Pizzagalli et al. verwendet wurde. Der OATP1C1 zeigte in diesen Transportmessungen einen pH-unabhängigen Transport von T₄. Eine Transportaktivität für TC und E₁S, die in der Literatur als typische Substrate der OATP-Familie angesehen werden, war allerdings in den dargestellten Oozytenexperimenten nicht zu

erkennen (Leuthold et al. 2009). Dies deckt sich mit den Daten, die im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit erhoben wurden. In der Studie von van der Deure et al. wurden COS1-Zellen mit einem *OATP1C1 IMAGE clon* transfiziert. Die Transportmessungen zeigten erneut die Präferenz des Transporters für die Aufnahme von T₄. Interessanterweise wurden sulfatiertes T₄ und T₃ nicht in die Zellen transportiert (van der Deure et al. 2008). Dies führt zu der Überlegung, ob sulfatierte Moleküle generell nicht vom OATP1C1-Protein erkannt werden, oder ob dies nur bei den sulfatierten Schilddrüsenhormonen auftritt. In der vorliegenden Arbeit wurden neben dem *Xenopus laevis* Oozyten-Expressionsmodell auch stabil und transient transfizierte Zellen zur Funktionsanalyse verwendet, aber beide Expressionsmodelle führten, wie bereits zuvor erwähnt, zu keinem sichtbaren Transport der getesteten Steroidsulfate. Da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Untersuchung von Transportproteinen lag, die im Hoden die Aufnahme von sulfatierten Steroiden vermitteln, wurden in den Transportmessungen hauptsächlich Substanzen wie DHEAS oder E₁S verwendet. Hinzu kam TC als Substratprototyp der OATP-Familie. Es wurden weder für den OATP1C1, noch für den OATP6A1 Transportstudien mit Schilddrüsenhormonen durchgeführt. Dies ist darin begründet, dass die Schilddrüsenhormone nicht im Fokus dieser Arbeit standen und Messungen mit Radio-Jod markierten Verbindungen nicht umsetzbar waren. Neben dem humanen OATP1C1-Protein wurden in der Literatur auch die Orthologe der Maus und der Ratte beschrieben. Das *Oatp1c1*-Protein der Ratte wurde in HEK293 Zellen funktionell charakterisiert und wies eine deutliche Substratpräferenz für T₄, rT₃ und 17β-Estradiol-D-17β-glukuronid auf (Sugiyama et al. 2003; Westholm et al. 2009). Der Transport von TC, DHEAS und E₁S durch den Ratten-*Oatp1c1* wurde als signifikant deklariert, die Aufnahmeratios im Vergleich zu den mit Leervektor transfizierten Zellen lagen allerdings nur bei 1,3 bis 1,7 für die drei Substanzen (Sugiyama et al. 2003). Daher ist fraglich, ob TC, DHEAS und E₁S wirklich präferierte Substrate des *Oatp1c1*-Proteins der Ratte darstellen. E₁S wurde in der Studie von Sugiyama als potenter Inhibitor der T₄-Aufnahme (K_i-Wert: 6,63 ± 1,62 μM) identifiziert (Sugiyama et al. 2003). Allerdings wurde nicht näher definiert, wie die Hemmung verläuft. Neben einer allosterischen Hemmung, könnte auch eine orthosterische Hemmung vorliegen. Letzteres würde bedeuten, dass E₁S an die gleiche Bindungsstelle des T₄ bindet, wohingegen bei einer Bindung an die allosterische Bindungsstelle nicht die gleiche Bindungsstelle wie vom T₄ verwendet würde. Das *Oatp1c1*-Protein der Maus transportiert ebenfalls T₄ und rT₃ in HEK293 Zellen (Tohyama et al. 2004). Ferner zeigte es auch eine Aufnahme von 17β-Estradiol-D-17β-glukuronid (Tohyama et al. 2004). Im Gegensatz dazu war die Aufnahme von E₁S nur geringgradig höher in den mit *Oatp1c1* transfizierten Zellen als in den mit Leervektor transfizierten Zellen. Diese Daten ähneln den Transportdaten des Rattenorthologs, so dass auch bei der Maus T₄ das präferierte Substrat zu sein scheint. Das murine *Oatp1c1*-Protein

ließ sich ebenfalls durch E_1S (K_i -Wert: $53,1 \pm 7,4 \mu M$) und TC (K_i -Wert: $109 \pm 32 \mu M$) hemmen, allerdings nur moderat (Tohyama et al. 2004). Neben den Transporteigenschaften wurden auch die Expressionsorte des OATP1C1 in der jeweiligen Spezies untersucht und die organspezifische Lokalisation determiniert. Sowohl bei Ratte, wie auch bei Maus wurde der *Oatp1c1* nur im Gehirn mittels Northern Blot detektiert (Sugiyama et al. 2003; Tohyama et al. 2004), beim Menschen hingegen konnte auch ein Signal im Hoden ermittelt werden (Pizzagalli et al. 2002). Während im Gehirn die humane OATP1C1 mRNA in fast allen Regionen außer der Pons und dem Kleinhirn gefunden wurden, zeigte die immunhistochemische Untersuchung des Hodens eine Lokalisation des Proteins nur in der Leydigzellpopulation (Pizzagalli et al. 2002). In der Literatur wird über die Expression des humanen OATP1C1 im Gehirn teilweise kontrovers diskutiert. So gibt es Studien, die herausgefunden haben, dass im Gegensatz zum Nager, bei dem der *Oatp1c1* massiv in den Kapillaren des Gehirns exprimiert wird (Sugiyama et al. 2003; Tohyama et al. 2004), beim Menschen keine deutliche Lokalisation in den Blutgefäßen zu finden sei und somit eine Funktion im Bereich der Blut-Hirn-Schranke zwar bei Maus und Ratte anzunehmen ist, beim Menschen aber fraglich erscheint (Roberts et al. 2008). In anderen Studien hingegen wurde der humane OATP1C1 in den Gliazellen des Hypothalamus, in Neuronen und Kapillarwänden im Bereich der *Nuclei paraventricularis*, *infundibularis* und *supraopticus*, sowie in zahlreichen Gefäßen und dem *Plexus choroideus* detektiert, so dass ihm diese Literatur durchaus eine Funktion in der Blut-Hirn-Schranke und in der Regulation der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse zuschreibt (Heuer und Visser 2009; Alkemade et al. 2011). In 2012 wurde die Generierung einer *Oatp1c1*-Knockout-Maus veröffentlicht. Diese Maus basiert auf dem Cre-LoxP-System und weist einen Knockout im Gesamtorganismus auf (Mayerl et al. 2012). Es wurde auch hier wieder vordergründig das Gehirn untersucht, allerdings wurde darauf hingewiesen, dass sowohl die männlichen wie auch die weiblichen homozygoten Knockout-Tiere fertil seien und sich wie die vergleichbaren Wildtyp-Mäuse vermehren (Mayerl et al. 2012). Unter Berücksichtigung der bisherigen Kenntnisse scheint dies nicht verwunderlich, da das *Oatp1c1*-Protein beim Nager im Hoden nicht exprimiert zu sein scheint (Sugiyama et al. 2003; Tohyama et al. 2004).

Um zu überprüfen, ob die stabil transfizierte OATP1C1-V5His-HEK293 Zelllinie das humane OATP1C1-Protein überhaupt exprimiert und um gegebenenfalls mit einer mangelnden Expression die fehlende Transportleistung erklären zu können, wurden Proteinnachweise mittels Western Blot Analyse und Immunfluoreszenz durchgeführt. Im Western Blot wurde eine Bande von ~ 75 kDa erwartet, es wurde aber lediglich eine Bande bei 45 kDa detektiert. In der Literatur ist beschrieben, dass das OATP1C1/*Oatp1c1*-Protein keine eindeutigen Ergebnisse im Western Blot liefert. So scheint das OATP1C1/*Oatp1c1*-Protein eine große Variation in Bezug auf seine elektrophoretischen Eigenschaften bei der Auftrennung in einem SDS-PAGE

zu besitzen (Alkemade et al. 2011). Dies wurde bereits von Gao beschrieben, der mit demselben Antikörper das OATP1C1-Protein aus transfizierten Insektenzellen und humanem Retinagewebe nachweisen konnte, allerdings in komplett unterschiedlichen Molekulargewichts-Bereichen (Gao et al. 2005). In anderen Arbeiten war es gar nicht erst möglich, das aus transfizierten Zellen extrahierte humane OATP1C1-Protein im Western Blot zu detektieren (Alkemade et al. 2011). Auch bei Roberts entsprach das Molekulargewicht des in der Western Blot Analyse nachgewiesenen humanen OATP1C1-Proteins nicht dem vorausberechneten Molekulargewicht (Roberts et al. 2008). Hier waren ebenfalls HEK293 Zellen transfiziert worden. Bei der Ratte trat auch ein abweichendes Molekulargewicht in der Western Blot Analyse auf (Sugiyama et al. 2003). In allen Studien wurden erfolgreiche Peptidblockierungen durchgeführt, um die Spezifität des Antikörpers zu überprüfen und zum Teil ergänzende Lokalisationsstudien mit Gewebeschnitten erstellt, die ebenfalls das OATP1C1/Oatp1c1-Protein detektierten. Der Grund für das variable Verhalten im Western Blot konnte aber bislang nicht identifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde ein kommerziell erhältlicher Anti-V5-Antikörper eingesetzt, der sowohl das OATP6A1-V5His-Protein, als auch das OSCP1-V5His-Protein im Western Blot im Bereich des vorausberechneten Molekulargewichtes detektierte und somit seine Spezifität bewies. Es ist daher zu überlegen, ob die deutlich niedrigere Bande auf eine Proteolyse während der Proteinextraktion zurückzuführen ist. Dies ist aufgrund der Verwendung von Protease-Inhibitoren unwahrscheinlich. Ferner können posttranslationale Modifikationen zu einem verkürzten Protein führen, beispielsweise durch potentielle Enzymschnittstellen oder durch Veränderungen des isoelektrischen Punkts (Ananthanarayanan et al. 1994). Letztendlich lässt sich das niedrige Molekulargewicht des OATP1C1/Oatp1c1-Proteins nicht eindeutig erklären, allerdings ist in der Literatur beschrieben, dass durch die Kompaktheit der TMD bei den Membranproteinen häufig ein niedrigeres Molekulargewicht als vorausberechnet gefunden wird (Godoy et al. 2007). In der Immunfluoreszenzuntersuchung der stabil transfizierten OATP1C1-V5His-HEK293 Zelllinie konnte das Protein ebenfalls detektiert werden. Allerdings zeigte es, ähnlich wie das OATP6A1-Protein eine Akkumulation im ER. Eine eindeutige Lokalisation in der Zellmembran war nicht sichtbar. Auch hier stellt sich die Frage, ob eine fehlende Sortierung in die Zellmembran vorliegt, beispielsweise durch das V5His-Tag oder ob die Variante 3 des OATP1C1 generell nicht in die Zellmembran sortiert wird. Da es hierzu in der Literatur noch keine Daten gibt, die explizit die Isoform 3 beschreiben, ist dies durchaus möglich. In den Lokalisationsstudien von Roberts wurde das Protein in der Membran detektiert und die Überprüfung der jeweiligen Epitopsequenzen ergab eine Spezifität für die Zielproteine (Roberts et al. 2008). Es ist zwar nicht ersichtlich, welche Isoform untersucht wurde, da aber der C-Terminus bei den Isoformen 2 und 3 gleich ist, und der Antikörper gegen das C-terminale

Ende gerichtet war, hätten beide Varianten detektiert werden können, aber eine Unterscheidung zwischen ihnen war nicht möglich. Natürlich könnten auch die Isoform 1 bzw. die Isoform 4 detektiert worden sein, da diese ebenfalls im Bereich des C-Terminus übereinstimmende Sequenzabschnitte aufweisen. Dies ist aber aus den zur Verfügung stehenden publizierten Informationen nicht ersichtlich, so dass sich nicht eindeutig klären lässt, welche Isoform hier wirklich detektiert wurde (Roberts et al. 2008). Somit ist nicht klar, ob in der Literatur bereits Daten zur Isoform 3 vorhanden sind. Somit ist es möglich, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit die ersten Daten explizit zur Isoform 3 generiert wurden. Eine abschließende Betrachtung der Literaturdaten des OATP1C1 allgemein und der Vergleich der Spezies Mensch, Maus und Ratte miteinander, sowie die Berücksichtigung der im Rahmen dieser Arbeit generierten Ergebnisse, lässt vermuten, dass die OATP1C1/Oatp1c1-Proteine von Mensch, Maus und Ratte zwar jeweils wichtig für die Aufnahme von T₄ sind, aber keine besondere Bedeutung für den Transport sulfatierter Steroide haben. Ferner ist fraglich, ob die Expression des humanen OATP1C1 im Hoden ein physiologischer Befund ist. Der von Pizzagalli untersuchte Hodenschnitt stammte von einem Individuum mit Leydigzellhyperplasie, was nicht den normalen physiologischen Gegebenheiten im Hoden entspricht (Pizzagalli et al. 2002). Zwar wurde in der quantitativen Realtime-PCR eine sehr hohe Expression des OATP1C1 im Hoden festgestellt, die zelluläre Lokalisation mittels LACP hingegen misslang (Fietz, Geyer, unpublizierte Daten). Auch bei der Analyse von Hodenbiopsien mit gestörter Spermatogenese konnte der OATP1C1 nicht detektiert werden. Da in diesen Proben aber histologisch unauffälliges Leydigzellmaterial vorhanden war, hätte der OATP1C1 dort detektiert werden müssen, sofern er physiologisch in den Leydigzellen exprimiert wird. Es kann somit nicht geklärt werden, ob der OATP1C1 eine Funktion im humanen Hoden wahrnimmt. Es ist aber wahrscheinlich, dass OATP1C1 im Hoden keine spezifische Bedeutung für den *Sulfatase Pathway* innehat. Daher wurden keine weiteren Untersuchungen des humanen OATP1C1 in dieser Arbeit durchgeführt.

5.2 SOAT

Der Carrier SOAT wurde erstmals durch Prof. Geyer am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Veterinärmedizin entdeckt und kloniert. Er war bereits Gegenstand einiger Dissertationsschriften (Döring 2009; Karakus 2009; Funk 2009; Grosser 2013). Neben einer generellen Charakterisierung (Geyer et al. 2007; Döring 2009; Grosser 2013), wurden seine Bedeutung für die Brustdrüse und die Plazenta detaillierter untersucht (Funk 2009; Karakus 2009). Ferner wurde eine vergleichende Analyse der Substratprofile des SOAT und der weiteren SLC10-Familienmitglieder ASBT und NTCP durchgeführt, mit dem Ziel ein

Pharmakophorenmodell für SOAT zu generieren (Grosser 2013). Für die vorliegende Arbeit wurden folgende Ziele in Bezug auf SOAT definiert:

- Etablierung der Messung intakter sulfatierter Steroide aus Zelllysaten mittels LC-MS/MS
- Erweiterung des Substratspektrums des SOAT
- Evaluierung der SOAT-vermittelten Aufnahme von Steroidgemischen in HEK293 Zellen
- Analyse natürlich vorkommender Einzelnukleotidpolymorphismen im SLC10A6-Gen
- Abklärung einer möglichen Funktion des SOAT im *Sulfatase Pathway*

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollten dazu beitragen, die physiologische Bedeutung des SOAT-Proteins im Organismus besser verstehen zu können. Unterstützend wurde dazu im Institut für Veterinäranatomie, -histologie und -embryologie der Justus-Liebig-Universität Gießen in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. M. Bergmann eine weitere Dissertationsschrift angefertigt, in der die zelluläre und subzelluläre Lokalisation des SOAT im Hoden untersucht wurde. Es wurde damit das Ziel verfolgt, eine Aussage über SOAT und seine Funktion im *Sulfatase Pathway* zu formulieren und somit die Bedeutung von SOAT im Reproduktionsgeschehen zu klären.

5.2.1 Die LC-MS/MS als neues Hilfsmittel zur Evaluierung der Transporteigenschaften des SOAT-Proteins

Zunächst wurde in Zusammenarbeit mit dem Labor von Herrn Prof. Wudy, Abteilung für pädiatrische Endokrinologie und Diabetologie, Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen eine Methode entwickelt und etabliert, bei der die Aufnahme des intakten sulfatierten Steroidmoleküls in die, mit dem GOI stabil transfizierten Zellen, mittels LC-MS/MS (s. Kapitel 3.9) gemessen werden kann (Galuska et al. 2013; Fietz et al. 2013). Die LC-MS/MS repräsentiert momentan die Methode der Wahl für die Detektion sulfatierter Steroide. Die implementierte Massenspektrometrie erlaubt höchste Spezifität in der Analyse der Steroide und die Methode der *Soft Ionization* ermöglicht den Nachweis des intakten Steroidsulfats. Die Vorteile dieser Methode bestehen darin, dass zum einen Substanzen, die nicht in radioaktiv-markierter Form verfügbar sind, als Messsubstanz verwendet werden können und somit die aufwändige Synthese der radioaktiv-gekoppelten Substanz vermieden wird. Zum anderen wird mit der LC-MS/MS die Aufnahme des intakten Steroidmoleküls nachgewiesen, wohingegen bei der Verwendung radioaktiv-markierter Substanzen nur die

Radioaktivität im Flüssigszintillationscounter detektiert wird, nicht aber das Molekül selbst. Somit kann keine eindeutige Aussage bezüglich des Moleküls, das tatsächlich aufgenommen wurde, gemacht werden. Es ist durchaus möglich, dass während der Transportmessung eine Hydrolyse der Steroidsulfate stattfindet und die freien Steroide durch Diffusion in die Zellen gelangen. Solange sie aber mit dem Isotop gekoppelt sind, werden sie über Flüssigszintillationsmessung (*liquid scintillation counting*, LSC) detektiert, unabhängig davon, ob sie noch sulfatiert sind oder nicht. Diese Ungenauigkeit in Bezug auf die tatsächlich aufgenommene Substanz wird durch Verwendung der LC-MS/MS vermieden. Auch wird mit Hilfe der LC-MS/MS die Menge der aufgenommenen Substanz exakt bestimmt, wohingegen die transportierte Substanzmenge beim LSC durch Berücksichtigung der verwendeten Standards und substanzspezifischer Umrechnungsfaktoren lediglich extrapoliert werden kann. In der Literatur ist die LSC eine weitverbreitete und häufig angewandte Methode zur Bestimmung der Transportcharakteristika von Transportproteinen. Daher wurden bislang auch die Transportstudien des SOAT-Proteins mit radioaktiv-markierten Substanzen durchgeführt. Da aber nicht alle Steroidsulfate radioaktiv-markiert vorlagen, war die geplante Erweiterung des Substratsspektrums des SOAT-Proteins limitiert. Daher war es umso wichtiger, die LC-MS/MS-Methode an Zelllysaten zu etablieren, um unabhängig von der Radioaktiv-Markierung Substanzen als potentielle Substrate des SOAT testen zu können. Für die Etablierung der LC-MS/MS-Methode unter Verwendung von Zelllysaten wurden zunächst die bereits bekannten Substrate des SOAT, E₁S und DHEAS, gemessen. Als Kontrolle dienten sowohl SOAT-HEK293 Zellen, bei denen die Proteinexpression nicht durch die Zugabe von Tetrazyklin induziert worden war und Flp-In-HEK293 Zellen ohne GOI. Ferner wurden auch die stabil transfizierten ASBT-HEK293 Zellen und die NTCP-HEK293 Zellen untersucht. Die Transportmessungen selbst wurden mit dem Protokoll für die Messung mit radioaktiv-markierten Substanzen durchgeführt, wobei allerdings anstelle des normalerweise verwendeten Lysepuffers (NaOH mit 1 % SDS) ddH₂O zur Zelllyse verwendet wurde und die Lyse über drei Frier-Tau-Zyklen stattfand. Studien von Döring zeigten, dass NaOH-SDS als Lysepuffer für die LC-MS/MS ungeeignet waren, so dass ddH₂O für die Zelllyse etabliert wurde (Döring, unveröffentlichte Daten). Durch die Verwendung der LC-MS/MS konnte dargestellt werden, dass sowohl SOAT, wie auch der NTCP die sulfatierten Steroide E₁S und DHEAS in die Zelle aufnehmen. Hierbei fiel auf, dass die beiden Messmethoden nicht nur generell die gleiche Aussage machten (SOAT und NTCP transportieren, ASBT und Flp-In nicht), sondern dass auch die absoluten Werte der Aufnahme ähnliche Werte aufwiesen. Mit der LC-MS/MS war es somit erstmals möglich, die Aufnahme der intakten Steroidsulfate in die Zelle durch SOAT und NTCP darzustellen und zu belegen. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Verwendung des LSC nicht nur generelle Aussagen zu den Transporteigenschaften zulässt,

sondern auch ermöglicht eine realistische Aussage zur transportierten Menge zu machen. Sie ist zwar im Großen und Ganzen ungenauer als die LC-MS/MS, aber bietet trotzdem die Möglichkeit, eine Aussage über das Transportverhalten eines Membrantransporters zu erhalten. Der ASBT transportiert keine sulfatierten Steroide. Diese, in der Literatur zahlreich belegte Aussage (Craddock et al. 1998; Ho et al. 2006; Lionarons et al. 2012), konnte in der vorliegenden Arbeit mit der LC-MS/MS bestätigt werden. Zwar war eine minimale Aufnahme von E₁S und DHEAS bei den ASBT-HEK293 Zellen zu beobachten, sie entsprach aber der Aufnahme in die Flp-In-HEK293 Zellen und war somit nicht durch ASBT bedingt. Die ASBT-HEK293 Zellen stellten daher gemeinsam mit den nicht induzierten Zellen und den Flp-In-HEK293 Zellen die Negativkontrolle dar. Die Aufnahme der Steroidsulfate durch die FlpIn-HEK293 Zellen ist darin begründet, dass sie eine geringe Menge SOAT exprimieren, was mittels quantitativer Realtime-PCR gezeigt werden konnte (Grosser 2013). Ähnliches gilt für die ASBT-HEK293 Zellen, bei denen ebenfalls geringe Mengen SOAT detektiert werden konnten (Grosser 2013). Die quantitative Realtime-PCR der Niere zeigte eine deutliche SOAT-mRNA Expression in diesem Organ (siehe Abbildung 4.2, A). Daher ist es nachvollziehbar, dass SOAT in den HEK293 Zellen, die humane embryonale Nierenzellen (*human embryonic kidney cells*) darstellen, im Rahmen der quantitativen Realtime-PCR nachweisbar ist.

5.2.2 Erweiterung des Substratspektrums des SOAT-Proteins

Nach Etablierung der LC-MS/MS-Methode für Zelllysate und Kontrolle der bekannten Substrate, wurde das Substratspektrum des SOAT-Proteins erweitert (Fietz et al. 2013). Hierzu wurden verschiedene Steroidsulfate ausgewählt. Da für jedes Steroidsulfat zunächst die LC-MS/MS-Methode angepasst und validiert werden musste, waren den eigentlichen Messungen einige Vorversuche vorgeschaltet, was einen durchaus zeitaufwendigen Prozess darstellte. Für den SOAT konnten zwei neue Substrate identifiziert werden: E₂S und Androstendiol-3-sulfat (Fietz et al. 2013). Beide Substrate sind an Position 3 sulfatiert. In vorangegangenen Arbeiten war ebenfalls auffällig, dass nur Steroide, die an Position 3 sulfatiert sind, von SOAT transportiert werden (Geyer et al. 2007). Somit scheint die Sulfatgruppe an dieser Position des Steroids für die Substraterkennung durch SOAT von Bedeutung zu sein, was in dieser Arbeit durch die Entdeckung der beiden neuen Substrate bestätigt wird. Ein Austausch dieser funktionellen Gruppe an Position 3 durch eine Hydroxygruppe oder eine Glukuronidkonjugation führen zu einer Aufhebung der Transportaktivität (Grosser 2013). Ein geringer, aber signifikanter Na⁺-abhängiger Transport konnte auch für die sulfatierte Gallensäure Sulfotauroolithocholat (TLCS) gezeigt werden (Geyer et al. 2007). Allerdings ließ sich dieser Transport aufgrund der geringen Transportrate nicht in allen Experimenten darstellen (Grosser 2013). Interessant ist auch, dass die

Gallensäure Taurolithocholat (TLC), als einzige Substanz aus dieser Gruppe, ein Substrat von SOAT repräsentiert. (Grosser 2013). Hierbei scheint die 3'-Sulfatgruppe der Steroidsulfate durch die Taurin-Sulfongruppe des TLC bei der Substraterkennung austauschbar zu sein (Grosser 2013).

E₂S und Androstendiol-3-sulfat sind zwei weitere Substrate des SOAT, die an Position 3 sulfatiert sind. Sie wurden als potentielle Substrate ausgewählt, da sie im Rahmen der Steroidbiosynthese eine zentrale Rolle spielen. Androstendiol kann aus DHEA durch enzymatische Umwandlung mittels 17β-HSD gebildet werden und im Anschluss durch die 3β-HSD in Testosteron überführt werden. Testosteron kann anschließend zum einen selber aktiv am AR werden, zum anderen kann es weiter zu DHT konvertiert werden, was ebenfalls am AR wirkt. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die P450arom Testosteron in E₂ umzuwandeln. Androstendiol stellt somit eine wichtige Vorstufe der aktiven Steroidhormone Testosteron, DHT und E₂ (siehe Kapitel 1.3.1.2) dar. Das sulfatierte Androstendiol hingegen ist eine am Hormonrezeptor inaktive Form des freien Androstendiols. Es ist durch seine Sulfatgruppe hydrophil und kann daher die Zellmembran nicht selbständig mittels Diffusion passieren. Durch SOAT kann Androstendiol-3-sulfat aber in die Zielzelle aufgenommen werden. Mittels StS kann eine Reaktivierung stattfinden, so dass Androstendiol dem Testosteron-Metabolismus zugeführt werden kann. E₂S kann ebenfalls mittels SOAT in entsprechende Zielzellen gelangen und dort in die aktive Form E₂ überführt werden, was dann sowohl über den ER, wie auch über den AR hormonelle Wirkungen modulieren könnte. Beide Neusubstrate des SOAT stellen somit wichtige Stufen im Steroidmetabolismus dar und können durch die StS in aktive Formen überführt werden. Es ist daher auch für diese beiden Substrate des SOATs wahrscheinlich, dass sie im Rahmen des *Sulfatase Pathway* eine zentrale Rolle für die lokale Versorgung des Zielgewebes mit Steroidhormonen spielen. Da beide Substrate nicht als radioaktiv-markierte Substanzen kommerziell erhältlich waren, konnten sie in vorhergehenden Studien nicht untersucht werden. Umso bedeutender ist die Entwicklung der LC-MS/MS-Methode für die Messung der Steroidsulfate aus Zelllysaten. Ohne die Etablierung dieser Methode wäre eine Erweiterung des Substratspektrums des SOATs vorerst nicht möglich gewesen.

5.2.3 Cholesterinsulfat – ein neues potentielles Substrat des SOAT-Proteins

Ein weiteres potentielles Substrat des SOATs stellt Cholesterin-3-sulfat (CS) dar. Hier gestaltete sich die Transportmessung allerdings als schwierig. CS ist eine sehr lipophile Substanz, die nur schwer in Lösung zu bekommen und zu halten ist. Eine Vorlösung des Substrats in DMSO funktionierte sehr gut, aber bei der Überführung der vorgelösten Substanz in Natrium-freien Transportpuffer fielen sofort sichtbare Kristalle aus. Die in der Lösung

nachgewiesene Menge an CS wich daher auch deutlich von der eigentlich abgewogenen Menge ab. Somit wurde entschieden, die Messung nur mit Natrium-haltigem Transportpuffer durchzuführen. Aber auch hier traten große Abweichungen zwischen abgewogener und tatsächlich gelöster Substanzmenge auf. Da die Abweichungen bei anderen Substanzen (DHEAS, E₁S, E₂S, Androstendiol-3-sulfat) gering waren, schien das Problem substanzspezifisch zu sein. Es wurden daher verschiedene Laborgefäße zum Ansetzen der Messlösung ausprobiert, aber unabhängig von Glas oder diversen Plastikgefäßen blieben die Ergebnisse unbefriedigend. Zielführend erwies sich die Verwendung einer Cyclodextrinlösung. Dieser Stoff scheint CS in wässriger Lösung zu stabilisieren. CS wurde in einer 45 %-igen 2-Hydroxypropyl-β-Cyclodextrinlösung vorgelöst und dann in Natrium-haltigen Transportpuffer überführt (finaler prozentualer Gehalt des Cyclodextrins in der Messlösung: 0,09 %). Es zeigte sich keine makros- oder mikroskopisch sichtbare Kristallbildung. Cyclodextrine sind zyklische Oligosaccharide. Das Cyclodextrinmolekül weist eine konusförmige Struktur auf mit einem hydrophoben Hohlraum im Molekülinnern und einem hydrophilen Außenbereich, der für die gute Wasserlöslichkeit der Cyclodextrine verantwortlich ist (Dodziuk 2006). β-Cyclodextrine bilden an den C2- und C3-Atomen benachbarter Glukosemoleküle über ihre Hydroxylgruppen Wasserstoffbrücken, daher ist β-Cyclodextrin zwar sehr stabil, aber auch schlechter wasserlöslich. Um dies zu kompensieren, wird β-Cyclodextrin chemisch modifiziert, so dass 2-Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin entsteht, was nicht nur die Wasserlöslichkeit erhöht, sondern auch zu einer verbesserten Lösungsvermittlung hydrophober Reagenzien, wie z. B. CS, führt (Dodziuk 2006).

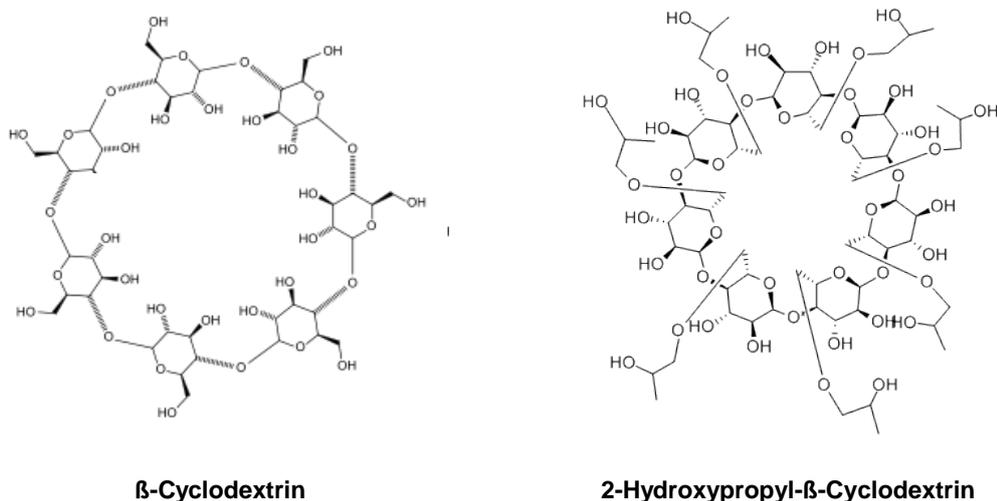


Abbildung 5.4 Chemische Struktur der Cyclodextrine.

(Quellen: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Cyclodextrin.svg>,
http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB6204503.htm).

Daher wurde diese Substanz für die Transportmessungen mit CS eingesetzt. In der LC-MS/MS wurden nur geringe Abweichungen zwischen der abgewogenen und tatsächlich in Lösung befindlichen Substanz gemessen. Die tatsächliche Menge der Substanz wird aus der Messlösung (Standard) bestimmt und mit den Ergebnissen der Zelllysate als prozentualer Anteil der eigentlich abgewogenen Substanz verrechnet. Somit ist eine geringe Abweichung zu vernachlässigen, da sie ins Endergebnis miteinbezogen wird. Wenn allerdings bereits massive Abweichungen zwischen den einzelnen Messungen des Standards (in der Regel wird eine Dreifachbestimmung durchgeführt) bestehen, ist fraglich, welche Menge Substanz überhaupt während der Messung mit den Zellen in Kontakt kommt. Somit ist es von großer Wichtigkeit, die Abweichungen zwischen abgewogener und gelöster Substanz möglich gering zu halten und gleichmäßige Werte bei der Bestimmung der Standards zu ermitteln. Nachdem das Lösungsproblem des CS behoben war, musste auch die Zelllyse optimiert werden. Hierzu wurde dem ddH₂O ebenfalls Cyclodextrin hinzugefügt, um das CS in Lösung zu halten. Ansätze mit anderen Substanzen wie EDTA, Triton X-100 und Tris, die ebenfalls zur Stabilisierung des CS in wässriger Lösung beitragen sollten, mussten leider verworfen werden, da diese Substanzen mit der Proteinbestimmung, die mit dem BCA-Assay durchgeführt wurde, interferierten (Kessler und Fanestil 1986). Final konnten erste Transportstudien mit CS durchgeführt werden. Hierfür wurden SOAT-HEK293 Zellen und FlpIn-HEK293 Zellen mit CS in Natrium-haltigem Transportpuffer inkubiert.

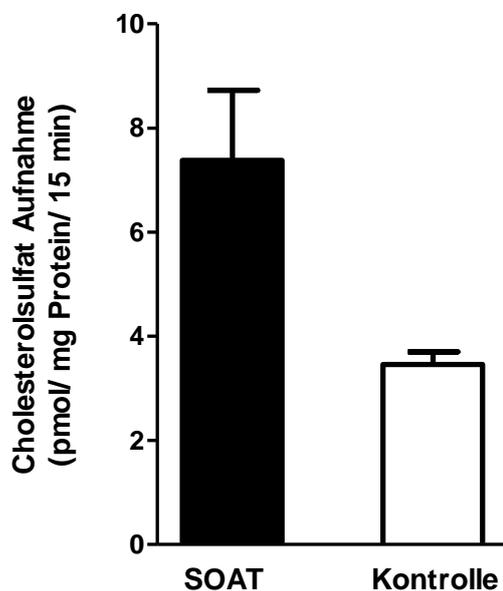


Abbildung 5.5: Aufnahme von Cholesterolsulfat (CS) in die SOAT-HEK293 Zellen

SOAT-HEK293 Zellen (schwarzer Balken) und FlpIn-HEK293 Zellen (Kontrolle, weißer Balken) wurden mit 10 μ M CS in Natrium-haltigem Transportpuffer für 15 min inkubiert, bevor die Messlösung entfernt wurde. Anschließend wurden die Zellen 3 x mit eiskaltem PBS gewaschen und im Anschluss mit ddH₂O (versetzt mit Cyclodextrin) lysiert. Die aufgenommene Menge CS wurde mittels LC-MS/MS aus den Zelllysaten bestimmt und zum Proteingehalt ins Verhältnis gesetzt. Dargestellt sind die MW \pm SD zweier repräsentativer Experimente mit Dreifachbestimmung (n=6).

Es zeigte sich ein Transport des CS durch SOAT in die SOAT-HEK293 Zellen mit einer Ratio von 2,1 gegenüber den Flp-In-HEK293 Zellen. Somit scheint CS ein weiteres Substrat des SOAT-Proteins darzustellen. Allerdings sind dies vorläufige Daten, die noch im Detail validiert werden müssen. Hierzu werden zunächst nicht Tetrazyklin-induzierte SOAT-HEK293 Zellen in die Studie implementiert und es wird versucht, einen Natrium-freien Versuchsaufbau zu generieren, bei dem CS in Lösung bleibt. Geyer et al. konnten 2007 zeigen, dass es trotz der Natrium-Abhängigkeit der SOAT-Transportfunktion zum einen Ersatzionen für Natrium gibt, die den Transport des SOAT abschwächen, aber aufrechterhalten (Lithium und Kalium), und zum anderen auch Transportpufferkompositionen im Zellkulturmodell verwendet werden können, die den Transport des SOAT komplett aufheben. Hierzu zählen Cholin (-chlorid) und N-Methyl-D-Glukamin (Geyer et al. 2007; Döring 2009). Cholinchlorid ist ein primärer, einwertiger Alkohol mit einer quartären Ammoniumverbindung. N-Methyl-D-Glukamin hingegen ist von der D-Glukose abgeleitet, trägt allerdings im Gegensatz zur Glukose eine Methylaminogruppe anstatt eines Aldehyd-Sauerstoffs. N-Methyl-D-Glukamin ist ein häufig eingesetzter Stoff in der Molekularbiologie, da er sich als Natrium-Ersatz sowohl in der Zellkultur, als auch in Versuchsaufbauten eignet. Für die Evaluierung des potentiellen Neusubstrates CS wird auch N-Methyl-D-Glukamin verwendet werden, um zu überprüfen, ob auch CS Natrium-abhängig in die Zellen transportiert wird. Desweiteren wird eine kinetische Bewertung des neuen potentiellen Substrates CS durchgeführt. Diese weiterführenden Untersuchungen sind wichtig, da CS im Hoden und Nebenhoden, aber auch in der Haut wichtige Funktionen übernimmt und als Neusubstrat des SOAT-Proteins weitere Hinweise auf die physiologische Funktion des SOATs in diesen Organen liefern können.

5.2.4 Transportverhalten des SOAT-Proteins

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die Messung der Aufnahme von Steroidgemischen in SOAT exprimierende Zellen. Im Organismus liegen die Steroide, unabhängig ob frei oder sulfatiert, in der Regel nicht einzeln, sondern als Gemisch vor. Bislang waren Messungen, die das Transportverhalten des SOAT-Proteins bei Vorhandensein mehrere Substrate in einer Messlösung untersuchen, sehr aufwändig gewesen. Dies ist in der verwendeten Detektion (LCS) begründet. Beim LSC wird die allgemeine Radioaktivität aller enthaltenen Komponenten gemessen. Eine Unterscheidung zwischen den einzelnen Substraten ist bei dieser Methode nicht möglich, außer es werden Substrate mit unterschiedlicher Markierung (z. B. [³H] und [³⁵S]) verwendet, was aber auch limitiert ist, da wieder nur eine Substanz pro Isotop verwendet werden kann, um eine Unterscheidung zwischen den Substraten anhand ihres Isotops zu gewährleisten. Mittels LC-MS/MS hingegen können die Substanzen einzeln in einem Gemisch nachgewiesen werden, so dass man innerhalb eines Transportansatzes mehrere Substrate

gleichzeitig verwenden und detektieren kann. Dies bietet den Vorteil, dass der Umfang der Transportmessung deutlich kleiner ist und die exakte Determinierung der aufgenommenen Menge der Substrate einen besseren Einblick in das Transportverhalten des untersuchten Carriers ermöglicht.

5.2.4.1 Einfluss von fötalem Kälberserum auf das Transportverhalten des SOAT-Proteins

In der Zellkultur wird üblicherweise FKS verwendet, um das Wachstum der Zellen zu stimulieren. FKS enthält eine Vielzahl von Proteinen, Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Steroiden (Bryan et al. 2011). Ein Nachteil des FKS besteht darin, dass viele der enthaltenen Stoffe und Moleküle gar nicht bekannt sind. Hinzu kommt, dass in Abhängigkeit vom Spendertier die Zusammensetzung des Serums sehr variabel ist (Ma et al. 2006a; Ma et al. 2006b) und daher durchaus einen Einfluss auf das jeweilige Experiment hat (Lutz und Rossner 2007) und dadurch die Reproduzierbarkeit der Experimente erschwert. Der Vorteil des FKS ist aber gerade diese Vielzahl von Stoffen, da somit die meisten für die Proliferation, das Wachstum und die Zellfunktion wichtigen Substanzen den Zellen im Medium zur Verfügung gestellt werden, wenn FKS diesem zugesetzt wurde (Bryan et al. 2011). Da bei der Untersuchung der Steroidgemische ein besserer Einblick in die physiologische Funktion des SOAT-Transporters erlangt werden sollte, musste vorher abgeklärt werden, ob die im FKS enthaltenen Steroidhormone auf die Kultivierung der Zellen und die Expression bzw. Funktion des SOAT-Proteins Einfluss haben und somit die Ergebnisse beeinflussen können. Ferner sollte generell die Bedeutung des FKS für die HEK293-Zelllinien im Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Fachbereichs Veterinärmedizin untersucht werden. Während der Kultivierung traten keinerlei Unterschiede zwischen den mit FKS supplementierten Zellen und den Zellen, die mit DCC-FKS (Dextran-coated Charcoal-treated Fetal Calf Serum) kultiviert wurden, auf. Durch die Behandlung des FKS mit Dextran-überzogener Aktivkohle werden in erster Linie Steroid-, Peptid- und Schilddrüsenhormone entfernt, allerdings belegen Studien, dass durch diese Modifikation auch Vitamine, Elektrolyte und Metaboliten aus dem FKS entfernt und Enzymaktivitäten reduziert werden (Cao et al. 2009). Es scheinen allerdings noch ausreichend essentielle Stoffe im DCC-FKS vorhanden zu sein, da das Wachstum der HEK293-Zellen nicht beeinträchtigt war. Bei der Transportstudie traten ebenfalls keine Unterschiede zwischen den FKS- und den DCC-FKS-behandelten Zellen auf. Die Tetrazyklin-induzierten SOAT-HEK293 Zellen transportierten unabhängig vom verwendeten FKS DHEAS in vergleichbaren Mengen. Es ist daher davon auszugehen, dass die im FKS enthaltenen Steroidhormone keinen Einfluss auf die Proteinexpression und -funktion haben. Daher wurden

alle folgenden Transportexperimente mit Zellen durchgeführt, die mit Standard-FKS ohne Aktivkohlebehandlung kultiviert worden waren.

5.2.4.2 Einfluss von Steroidgemischen auf das Transportverhalten des SOAT-Proteins

Für die Untersuchung, ob die im Körper physiologisch vorkommenden Steroidgemische einen Einfluss auf die Transporter vermittelte Aufnahme der Steroidsulfate haben, wurden Steroidmische, die die SOAT-Substrate E₁S, PREGS und DHEAS enthielten, eingesetzt. So wird das *organic anion transporting polypeptide 2B1* (OATP2B1, Genbezeichnung: *SLCO2B1*) genauso wie SOAT in hormonsensitiven Organen wie der Mamma und der Plazenta exprimiert (Kullak-Ublick et al. 2001; Pizzagalli et al. 2003) und zeigte in Transportstudien im Zellkulturmodell, dass sein Transport der sulfatierten Steroide DHEAS und E₁S durch die Zugabe von freien Steroiden stimuliert (Progesteron, Pregnenolon, Hydroxyprogesteron) oder inhibiert (Testosteron, E₁, E₂, E₃) werden konnte (Grube et al. 2006). Auch eine Zugabe von PREGS beeinflusste die Aufnahmeleistung des OATP2B1 und führte zu einem verändertem Transport von E₁S und DHEAS (Grube et al. 2006).

Daher war es zunächst interessant festzustellen, ob SOAT während eines Transportexperimentes alle drei Substrate transportiert oder ob er eins präferiert und die anderen nicht in die Zelle hineinbringt. Um auszuschließen, dass die Konzentrationen der Substrate E₁S, PREGS und DHEAS unter der Detektionsgrenze in der LC-MS/MS-Analyse liegen bzw. die aufgenommene Menge sich unter der Nachweisgrenze befindet, wurden alle drei Substanzen in einer Konzentration von 10 µM der Messlösung zugesetzt. Mit dieser Konzentration waren in vorangegangenen Experimenten gute Ergebnisse erzielt worden, so dass man sicher sein konnte, dass bei Verwendung von 10 µM der jeweiligen Substanz der Nachweis des einzeln eingesetzten Substrates möglich ist. Die Überprüfung der Standards ergab nur minimale Abweichungen von der abgewogenen Menge, so dass wirklich ca. 10 µM der jeweiligen Substanz im Transportpuffer gelöst war. Bei der Verwendung equimolarer Konzentrationen (10 µM) der Substrate E₁S, PREGS und DHEAS wurden alle drei Substanzen in die Zelle aufgenommen. Es zeigte sich, dass PREGS das präferierte Substrat des SOAT-Proteins war, da es in großer Menge in die SOAT-HEK293 Zellen aufgenommen wurde. Insgesamt war das Verhältnis der Transportraten PREGS:DHEAS:E₁S ≈ 15:4:1. Es ist allerdings auffällig, dass auch in den Kontrollzellen eine deutlich messbare Menge PREGS detektiert wurde. Im nächsten Schritt erfolgte die Adaptation an physiologische Konzentrationen. Hierzu wurden SOAT-HEK293 Zellen mit einem Steroidmix bestehend aus 10 nM E₁S (Ruder et al. 1972; Remy-Martin et al. 1983; Platia et al. 1984), 1 µM PREGS (de Peretti und Mappus 1983) und 10 µM DHEAS (de Peretti und Forest 1978; Labrie et al. 1997) inkubiert. Es zeigte sich, dass die Aufnahme von PREGS um den Faktor 10 korrelierend mit

der Konzentration sank. Dem gegenüber verdoppelte sich die Aufnahmemenge des DHEAS, wohingegen die E₁S-Aufnahme um den Faktor 400 sank. Auch in diesem Versuchsansatz war in den Kontrollzellen (Flp-In-HEK293) eine verhältnismäßig große Menge PREGS detektierbar, wohingegen die Aufnahme von DHEAS und E₁S in diesen Zellen vernachlässigbar gering war. Ein Grund für die vergleichsweise hohe Aufnahme von PREGS in die Kontrollzellen kann in der geringen verbliebenen Transporterexpression in den nicht-transfizierten HEK293 Zellen sowie in den physiochemischen Eigenschaften des PREGS liegen (siehe Kapitel 5.2.1). So könnte PREGS aufgrund seiner hydrophilen Eigenschaften zu einem geringen Anteil die Zellmembran auch Carrier unvermittelt per Diffusion überwinden. Eine weitere Möglichkeit wäre eine besonders hohe Bindung von PREGS an die HEK293 Zellen. In der Literatur ist bekannt, dass PREGS auch nicht-genomische Signalwege aktivieren kann (Watson und Gametchu 1999; Losel und Wehling 2003; Harteneck 2013). So moduliert PREGS im Gehirn sowohl den GABA_A-Rezeptor (Wang 2011), als auch den NMDA-Rezeptor (Adamusova et al. 2013). Ferner stellt PREGS einen *TRPM channel (members of the melastatin-like transient receptor potential channel)* Liganden dar (Harteneck 2013). Es ist also möglich, dass PREGS an entsprechende Membranrezeptoren der HEK293 Zellen bindet, was die vergleichsweise hohen Gehalte von PREGS in den Zelllysaten ebenfalls erklären könnte. So ist beispielsweise der Kanal TRPM 4 in HEK293 Zellen endogen exprimiert (Amarouch et al. 2013). Allerdings wird diesem Umstand methodisch bereits dadurch Rechnung getragen, dass die Zellen vor der Substanzbestimmung mehrfach gewaschen werden, um die, lediglich an die Zellen gebundenen Substratmoleküle von der Zelle zu lösen.

Insgesamt zeigt der Transportversuch mit equimolaren Konzentrationen der drei Steroidsulfate, dass PREGS das bevorzugte Substrat des SOAT-Proteins darstellt, was vermutlich durch seine hohe Affinität zum SOAT bedingt ist (Geyer et al. 2007; Döring 2009). Hierdurch kommt es beim gleichzeitigen Einsatz aller drei Steroidsulfate zu einer kompetitiven Hemmung des Transportes von E₁S und DHEAS durch PREGS. Neben der hohen Affinität trägt vermutlich auch die hohe Kapazität des SOAT-Proteins für den Transport von PREGS zu den hohen Aufnahmewerten dieses Substrates bei. Der V_{max}-Wert der PREGS-Aufnahme liegt mit 2168 ± 134 pmol/mg Protein/min deutlich über dem von E₁S (585 ± 34 pmol/mg Protein/min) und DHEAS (1899 ± 81 pmol/mg Protein/min) (Geyer et al. 2007; Döring 2009). SOAT stellt somit für PREGS sowohl einen *high capacity*, als auch einen *high affinity transporter* dar, wohingegen er für E₁S einen *high affinity* (K_m-Wert: 12,0 ± 2,3 µM), aber *low capacity* und für DHEAS einen *low affinity* (K_m-Wert: 28,7 ± 3,9 µM) und *high capacity transporter* repräsentiert (Geyer et al. 2007; Döring 2009). Bei der Verwendung physiologischer Konzentrationen nimmt der PREGS-Transport um den Faktor der Konzentrationsabsenkung ab. Da die physiologische Konzentration von DHEAS im Blut 10 µM

beträgt, ändert sich diese beim Einsatz physiologischer Konzentrationen nicht gegenüber dem Versuch mit equimolaren Konzentrationen. Die Aufnahme des DHEAS verdoppelt sich aber verglichen mit dem equimolaren Versuchsansatz und befindet sich in Bereichen anderer Versuche, bei denen nur DHEAS als Einzelsubstrat (siehe Abbildung 4.13) eingesetzt wurde. Wenn die PREGS-Konzentration auf 1 μM gesenkt wird, transportiert SOAT somit mehr DHEAS in die HEK293 Zellen. Dies könnte zum einen mit einer kompetitiven Hemmung der DHEAS-Aufnahme bei hohen PREGS-Konzentrationen erklärt werden. Zum anderen könnte dies auf einen stimulierenden Effekt des PREGS in niedrigen Konzentrationen auf den DHEAS-Transport hindeuten. Dieser stimulierende Effekt in Konzentrationsbereichen bis 1 μM konnte auch in der Dissertation von Grosser gezeigt werden. Er inkubierte die SOAT-HEK293 Zellen zunächst mit PREGS für 5 min vor, bevor er radioaktiv-markiertes DHEAS hinzugab. Bei diesem Versuch zeigte sich bis zu einer Konzentration von 1 μM eine Stimulierung der DHEAS-Aufnahme, die bei einem weiteren Anstieg der PREGS-Konzentration in eine Hemmung überging. Die Experimente der vorliegenden Arbeit bestätigen die Ergebnisse von Grosser und zeigen erstmals das Transportverhalten des SOAT-Proteins bei Verwendung von mehr als zwei Substraten innerhalb eines Versuches. Es zeigte sich, dass die Transporteigenschaften des SOAT-Proteins demnach abhängig von der Konzentration der jeweils vorhandenen Steroidsulfate moduliert und den vorherrschenden Bedingungen angepasst werden. Beim OATP2B1 wurde durch die Zugabe von PREGS auch eine Beeinflussung der Transporteigenschaften festgestellt. Mit steigender Konzentration ließ die Aufnahmeleistung des Transporters für E_1S und DHEAS nach (Grube et al. 2006). Dies zeigt, dass auch andere Transportproteine durch die Anwesenheit verschiedener Steroide bzw. Steroidsulfate in ihren Transportcharakteristika beeinflusst werden. Ferner war es in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal möglich, alle verwendeten Substrate in einem Ansatz durch die LC-MS/MS zu bestimmen, wohingegen in anderen Hemm- und Stimulationsstudien der Inhibitor bzw. Stimulator durch die fehlende Radioaktivmarkierung nicht detektiert werden konnte (Grube et al. 2006; Döring 2009; Grosser 2013). Es ist somit möglich, Eindrücke der physiologischen Verhältnisse im Organismus mit Hilfe des Zellkulturmodells zu erlangen. Dies hat auch den überaus positiven Nebeneffekt, dass ein tieferer Einblick in die Physiologie des SOAT-Transporters ohne den Einsatz von Tiermodellen gewährt wird.

In weiteren Transportstudien wurden steigende Konzentrationen (0 μM , 0,01 μM , 0,1 μM , 1 μM und 100 μM) E_1S verwendet und die Konzentrationen der Substrate PREGS und DHEAS aber konstant bei 1 μM für PREGS und 10 μM für DHEAS gehalten. Es zeigte sich, dass in den Konzentrationen von 0 bis 0,1 μM keine in der LC-MS/MS detektierbare Menge E_1S in die Zellen durch SOAT transportiert wurde. Beim Einsatz von Messlösungen mit 1 μM bzw. 100 μM E_1S hingegen ist die Aufnahme von E_1S nachweisbar und es treten deutliche

Veränderungen des Transports der drei Substrate auf. Während bei niedrigen Konzentrationen E₁S in der Messlösung sowohl die Aufnahmemenge von PREGS, wie auch die von DHEAS ansteigen, stagniert sie bei höheren E₁S-Konzentrationen bzw. nimmt ab. So verminderte sich der Transport von DHEAS in die SOAT-HEK293 Zellen um ca. 94 %, die Aufnahme von PREGS um zwei Drittel auf ca. 38 %. Im Gegensatz dazu wurde der Transport von E₁S mehr als 1000 % gesteigert. Es kann hiermit deutlich gezeigt werden, dass E₁S sowohl eine stimulierende, als auch eine hemmende Wirkung innerhalb eines Steroidgemisches einnehmen kann. E₁S stellt einen guten Inhibitor dar (IC₅₀-Wert: 22,1 µM (Grosser 2013)), der signifikant die Aufnahme von DHEAS in Bereichen von 25 bis 250 µM hemmt (Döring 2009). Mit der hier durchgeführten Studie konnte gezeigt werden, dass E₁S diese wechselnde Funktion der Stimulierung und Hemmung auch in Steroidgemischen mit physiologischen Konzentrationen einnehmen kann. Bei Enzymen, deren Kinetik einen konzentrationsabhängigen Sättigungsverlauf nach Michaelis-Menten aufweisen, wird zwischen verschiedenen Formen der Stimulatoren unterschieden (Schwartz und Holst 2007). Da bei Transporterproteinen die stimulatorischen Mechanismen bislang nicht detailliert verstanden sind, kann man versuchen, die Stimulationsformen der Enzyme auf die Transporter zu übertragen, sofern die Transportproteine eine ähnliche Kinetik nach Michaelis-Menten aufweisen. Schwartz und Holst unterscheiden in folgende Stimulatoren (Schwartz und Holst 2007):

1) Ago-allosterische Modulatoren:

- Stellen Liganden dar, die als Agonist an die orthosterische Bindungsstelle (Hauptbindungsstelle) binden und zusätzlich an einer zweiten, davon abweichenden *cis*- oder *trans*-Bindungsstelle (allosterische Bindungsstelle) den Effekt an der Hauptbindungsstelle, der durch den Liganden selbst oder durch einen anderen Agonisten hervorgerufen wird, modulieren.
- Die Modulation kann inhibitorisch oder stimulierend sein.
- *cis* bedeutet, dass die Bindungsstellen sich auf der gleichen Seite der Zellmembran befinden, *trans* hingegen gibt an, dass die orthosterische und die allosterische Bindungsstelle auf verschiedenen Seiten der Zellmembran liegen.

2) Allosterische Enhancer:

- Liganden, die stimulierend an der allosterischen Bindungsstelle wirken, aber keine Wirkung an der orthosterischen Bindungsstelle haben.

- Können sowohl eine *cis*, wie auch eine *trans*-Bindung mit der allosterischen Bindungsstelle eingehen.

3) Allosterischer Promotor:

- Tritt bei Proteinen auf, die als Dimer vorliegen
- Ein endogener Agonist bindet an die orthosterische *cis*-Bindungsstelle des einen Dimeranteils des Proteins, wohingegen der allosterische Promotor an den anderen Dimeranteil bindet.
- Der allosterische Promotor bindet an eine allosterische Bindungsstelle, wobei diese *cis* oder *trans* lokalisiert sein kann
- Der Effekt des allosterischen Promotors ist positiv.

Die Ergebnisse der Transportstudien mit Steroidgemischen bestehend aus E₁S, PREGS und DHEAS lassen den Schluss zu, dass sowohl E₁S, wie auch PREGS als ago-allosterische Modulatoren klassifiziert werden können. PREGS wird bei equimolaren Konzentrationen bevorzugt in die Zellen aufgenommen. Neben der hohen Affinität und der hohen Kapazität des SOAT-Proteins für dieses Substrat kann PREGS seine Aufnahme selbst stimulieren durch eine *cis*-Bindung und/oder die Aufnahme der anderen beiden Substrate allosterisch hemmen. Bei Absenkung der PREGS-Konzentration auf 1 µM hingegen ist eine allosterische *cis*-Stimulation der DHEAS-Aufnahme wahrscheinlich, da bereits gezeigt werden konnte, dass PREGS bis zu einer Konzentration von 1 µM den DHEAS-Transport stimuliert (Grosser 2013). Natürlich kann auch DHEAS seine eigene Aufnahme bei der Verwendung physiologischer Konzentrationen stimulieren, da im Gegensatz zu den equimolaren Konzentrationen eine Erhöhung des DHEAS-Transports detektiert werden konnte. Allerdings hat DHEAS eine geringere Affinität zum SOAT-Protein und eine schlechtere inhibitorische Wirkung auf die eigene Aufnahme als PREGS und E₁S (Döring 2009), so dass es wahrscheinlicher ist, dass PREGS die DHEAS-Aufnahme allosterisch stimuliert. Diese Stimulierung kann dadurch hervorgerufen werden, dass sich als Reaktion auf die allosterische Bindung des PREGS die Konformation des SOAT-Proteins ändert, so dass vermehrt DHEAS in die Zelle hineintransportiert werden kann. Um abzuklären, ob diese Situation vorliegt, müssten Kinetikstudien durchgeführt werden. Mit Hilfe dieser könnte überprüft werden, ob sich die Aufnahmegeschwindigkeit, ausgedrückt durch den V_{max} -Wert, erhöht. Bei einer allosterischen Modulation der DHEAS-Aufnahme sollte sich nur der V_{max} -Wert ändern, der K_m -Wert als Zeichen der Affinität müsste unverändert bleiben. Der Versuchsaufbau hierfür sähe so aus, dass eine Kinetik über fünf bis sechs Messpunkte (Messpunkte entsprechen den steigenden Konzentrationen DHEAS) durchgeführt würde. Während der Kinetikstudie müsste gleichzeitig

eine definierte Konzentration PREGS den Messlösungen hinzugesetzt werden, so dass eine Kinetikstudie einer Konzentration PREGS zugeordnet werden kann. Eine Erhöhung der PREGS-Konzentration müsste bei einer allosterischen Stimulation der DHEAS-Aufnahme zu einer Erhöhung der maximalen Aufnahmegeschwindigkeit bei gleichbleibender Affinität führen. Eine Veränderung der Affinität würde bewirken, dass DHEAS in geringeren Konzentrationen verstärkt in die Zelle hineintransportiert wird und sich die kompetitive Hemmung der Substrate PREGS, E₁S und DHEAS zugunsten des DHEAS verschieben würde. Hierzu wäre eine Modifikation der Bindungsstelle nötig. Da nach bisheriger Vorstellung bei den Steroidsulfaten vor allem die Sulfatgruppe an Position 3 von Bedeutung für die Substraterkennung ist, bleibt bisher unklar, ob sich die Affinität zum DHEAS durch eine allosterische Stimulation ändert, da auch PREGS und E₁S an Position 3 sulfatiert sind und im Falle einer allosterisch bedingten Veränderung der Substratbindungsstelle diese sich sehr selektiv an die Struktur des DHEAS-Moleküls anpassen müsste. Eine Stimulierung an der orthosterischen Bindungsstelle ist auszuschließen, da bei Bindung der stimulierten Substanz eine kompetitive Hemmung der Effektorsubstanz stattfinden würde, und dies den K_m-Wert der Effektorsubstanz in Kinetikstudien erhöhen würde. Dies konnte bisher nicht gezeigt werden. Ferner ist mit den bisherigen Ergebnissen nicht eindeutig zu erklären, ob die Stimulation des SOAT-Proteins eine *trans*- oder *cis*-Stimulation darstellt. Da sowohl E₁S wie auch PREGS in der Messlösung vorliegen, könnte man davon ausgehen, dass eine allosterische *cis*-Stimulation stattfindet. Es kann aber auch sein, dass zunächst PREGS und E₁S aufgrund ihrer höheren Affinität zum SOAT gegenüber DHEAS in die Zelle aufgenommen werden und dann die DHEAS-Aufnahme auf zytosolischer Seite *trans* stimulieren. Um dies zu überprüfen, werden absehbar Transportmessungen durchgeführt, bei denen der zeitliche Verlauf der DHEAS-Aufnahme in Abhängigkeit von der Anwesenheit von PREGS und E₁S untersucht wird. Zusätzlich wird der Gehalt der Substanzen im Überstand und im Zelllysat analysiert, um über die detektierten Mengen im zeitlichen Verlauf Rückschlüsse auf die Stimulationsseite zu bekommen.

5.2.4.3 Einfluss freier Steroide auf das Transportverhalten des SOAT-Proteins

Neben dem Einfluss der drei Steroidsulfate E₁S, PREGS und DHEAS aufeinander wurde auch eine mögliche Modulation freier Steroide auf die Aufnahme der genannten sulfatierten Steroide untersucht. Freies Estron ist im Gefäßsystem in Konzentrationen von 0,09 bis 0,34 nM vorhanden (Baird und Guevara 1969; Ruder et al. 1972; Longcope et al. 1972; Leinonen 1980). Da solch geringe Mengen unter der Nachweisgrenze in der LC-MS/MS liegen, wurde aus technischen Gründen mit einer Konzentration von 0,5 nM gearbeitet. Diese ist bei einer Aufkonzentrierung der Probe gerade noch messbar. Es fiel auf, dass die Zugabe dieser kleinen

Menge E_1 (0,5 nM) zu einer Steigerung der Aufnahme von E_1S führte. Eine Erhöhung der E_1 -Konzentration auf bis zu 100 nM hatte keinen stimulierenden Effekt. Für DHEAS wies E_1 einen IC_{50} -Wert von $>1000 \mu M$ auf (Grosser 2013), was bedeutet, dass E_1 keinen inhibitorischen Effekt auf die DHEAS-Aufnahme besitzt. Die Stimulation bzw. Inhibition der Aufnahme von E_1S hingegen wurde bisher nicht untersucht. Es scheint somit für verschiedene Substrate jeweils verschiedene Stimulatoren zu geben. Eine weitere Untersuchung der E_1S -Aufnahme als Einzelsubstrat unter Zugabe steigender Konzentrationen E_1 kann zeigen, ob die Stimulierung des E_1S -Transportes nur in niedrigen Konzentrationen stattfindet und ob es bei steigenden Konzentrationen zu einer Inhibierung des Transportes kommt. Hier sollte allerdings mit supraphysiologischen Konzentrationen gearbeitet werden, da 10 nM E_1S in der LC-MS/MS im Bereich der unteren Nachweisgrenze liegen und nicht immer durch Aufkonzentration der Messlösung detektierbar sind. Somit kann eine Stimulierung durch zu niedrige E_1S -Werte im Zelllysate maskiert werden und falsch-negative Ergebnisse liefern. Dafür spricht auch der Versuch, bei dem zu 10 nM E_1S steigende Konzentrationen E_1 hinzugegeben wurden und kein in der LC-MS/MS detektierbarer Anstieg der E_1S -Aufnahme gezeigt werden konnte. Die Ergebnisse liefern auf jeden Fall einen interessanten Hinweis darauf, dass die SOAT-Aufnahme der einzelnen Substrate wahrscheinlich substratspezifisch moduliert wird.

Neben E_1 wurde auch Testosteron dem Steroidmix zugesetzt. Hier wurden ebenfalls eine niedrige und eine hohe Konzentration überprüft. Die niedrige Konzentration entspricht dem Wert des scheinbar freien Testosterons im Blut erwachsener Männer im Alter von 20 bis 90 Jahren (Vermeulen et al. 1972). Bei der Zugabe von 0,5 nM Testosteron trat keine Stimulation der Aufnahme von E_1S , PREGS oder DHEAS auf. In der Literatur ist bekannt, dass der Testosterongehalt interindividuell (Longcope et al. 1972; Giusti et al. 1975), zirkadian (Rose et al. 1972; de Lacerda et al. 1973) und Jahreszeiten-abhängig im Plasma schwankt (Mock et al. 1975; Reinberg et al. 1975; Dai et al. 1981) und zwischen 10 nM und 3 μM beträgt (Kirschner et al. 1965; Longcope et al. 1972; Vermeulen et al. 1972; Weinstein et al. 1974; Giusti et al. 1975; Vermeulen 1976; Labrie et al. 1997). Leider wird häufig nicht angegeben, ob der Gesamttestosterongehalt gemessen wurde oder ob nur der Anteil des freien Testosterons bestimmt wurde. Im Blut ist Testosteron zum größten Teil (~ 98 %) an Transportproteine wie dem *sex hormone binding globulin* (SHBG, auch als ABP bekannt) oder Albumin gebunden. Lediglich 2-3 % des Testosterons sind frei in der Zirkulation vorhanden (Vermeulen et al. 1972). Für die Experimente mit den Steroidmischen wurde die Konzentration des freien Testosterons (~ 0,5 nM) gewählt, da dieses in der Lage ist, als potentieller allosterischer Enhancer die Aufnahme der SOAT-Substrate zu modulieren. Es kann an die allosterische Bindungsstelle des SOAT-Proteins binden, wohingegen das an ein Bindungsprotein-gebundene Testosteron nicht direkt mit SOAT interagieren kann. Nach derzeitiger Vorstellung

bringen die Bindungsproteine das Testosteron zur Zielzelle und verändern dann als Folge einer Interaktion mit der endothelialen Glykokalix ihre Konformation, so dass das Testosteron freigesetzt wird und direkt in die Zelle diffundieren kann. Alternativ hierzu gibt es noch die Möglichkeit des Megalinweges (Hammes et al. 2005), was als *cell importer protein* die Aufnahme des Testosterons vermittelt. Es ist anzunehmen, dass das gebundene Testosteron direkt in die Zielzelle verbracht wird und nicht im Gefäßsystem freigesetzt wird, um dann mit SOAT interagieren zu können. Das freie Testosteron hingegen kann an SOAT binden und seine Funktion modulieren. Daher wurde für die Experimente mit Steroidmischen die Konzentration des freien Testosterons verwendet. Da Grosser experimentell für die Aufnahme von DHEAS eine stimulierende Wirkung des Testosterons bei höheren Konzentrationen ausmachen konnte (Grosser 2013), wurden in einem weiteren Experiment 100 μM eingesetzt. Allerdings konnte bei der Verwendung von 100 μM Testosteron auch kein stimulierender Effekt hervorgerufen werden. Es wurde eher eine statistisch nicht signifikante Abnahme der Aufnahme von DHEAS und PREGS beobachtet. Bei Grosser trat eine Steigerung des DHEAS-Transportes ab 10 μM Testosteron auf, die bis zu der höchsten Konzentration von 1000 μM anhielt. Ein Unterschied zwischen den Messungen besteht darin, dass Grosser nur DHEAS zusetzte, wohingegen in der vorliegenden Arbeit auch E_1S und PREGS in der Messlösung enthalten waren. Die Aufnahme dieser beiden Substrate konnte durch die Zugabe des Testosterons nicht gesteigert werden. Testosteron weist einen IC_{50} -Wert von $> 1000 \mu\text{M}$ auf (Grosser 2013), was auf eine geringe inhibitorische Wirkung der Substanz hindeutet. Das heißt, Testosteron wird keine kompetitive Hemmung der Bindungsstelle des Substrates hervorrufen. Testosteron könnte allerdings die Transportaktivität des SOAT allosterisch modulieren. Wenn nun aber E_1S und PREGS in niedrigeren Konzentrationen zusätzlich zum DHEAS und Testosteron in der Messlösung enthalten sind und aller Wahrscheinlichkeit nach eine allosterische Stimulation der DHEAS-Aufnahme hervorrufen, kann eine potentielle stimulierende Wirkung des Testosterons hierdurch verhindert werden. Denn es ist durchaus möglich, dass auch zur allosterischen Bindungsstelle eine unterschiedliche Affinität der Substanzen vorliegt und somit PREGS und E_1S kompetitiv die Bindung von Testosteron an die allosterische Bindungsstelle verhindern. Dies würde die fehlende Stimulation der DHEAS-Aufnahme erklären. Dass ein leichter Rückgang in der Aufnahme der Substrate zu verzeichnen ist, kann ebenfalls durch den Zusatz von Testosteron begründet werden. Sollten Testosteron und PREGS bzw. E_1S um die allosterische Bindungsstelle konkurrieren, könnte dies dazu führen, dass bei der hohen Testosteronkonzentration auch Testosteron an diese Bindungsstelle bindet, aber einen geringeren Effekt auf die Aufnahme der Substanzen ausübt als PREGS oder E_1S und somit die Aufnahme etwas abnimmt. Ein stimulierender Effekt des Testosterons wäre damit nicht vollständig ausgeschlossen, aber es würde bedeuten, dass die

allosterische Effektstärke des Testosterons unter der des PREGS bzw. E₁S liegt. Da Testosteron kein Substrat des SOATs darstellt, wäre diese Substanz in Anlehnung an Schwartz und Holst demnach als allosterischer *Enhancer* anzusehen (Schwartz und Holst 2007). In der Promotorregion des *SLC10A6*-Gens konnten *in silico* AR- und GR (Glukokortikoid)-Bindungsstellen identifiziert werden. Dies lässt vermuten, dass Testosteron zu einer Transkriptionsfaktor-abhängigen SOAT-Expression führt. Allerdings war bei den durchgeführten Transportmessungen keine Kultivierung der Zellen in Testosteron supplementiertem Medium vorgeschaltet, was die Initiierung der verstärkten Proteinexpression durch Testosteron unwahrscheinlich macht. Ferner ist die SOAT-Expression in den SOAT-HEK293 Zellen unter Kontrolle des TetR, so dass die starke Proteinexpression durch die Zugabe des Tetrazyklin induziert und eine Androgen-abhängige Expression maskiert werden würde.

Final wurde die Wirkung verschiedener freier Steroide (0,5 nM E₁, 0,5 nM T, 17 nM DHEAS) in physiologischen Serumkonzentrationen (Kirschner et al. 1965; Boizel et al. 1986; Labrie et al. 1997; Straub et al. 1998; Tagawa et al. 2001) auf die Transporteigenschaften des SOAT-Proteins untersucht. Hierbei zeigte sich keine Veränderung der Aufnahmeverhältnisse von E₁S, PREGS und DHEAS. Ähnlich wie beim Testosteron konnte auch beim DHEA eine stimulierende Wirkung bei Verwendung von DHEAS als Einzelsubstrat gezeigt werden (Grosser 2013), die sich im Steroidgemisch aber nicht bestätigte. Hier kann wie beim Testosteron von einer Konkurrenz um die allosterische Bindungsstelle ausgegangen werden, die dann von PREGS und E₁S in diesem Versuchsansatz besetzt wird. Interessant wäre hier, auch mit höheren Konzentrationen DHEA die Messung zu wiederholen, um zu sehen, ob dann die SOAT-Aufnahme verändert wird. Insgesamt geben die Experimente unter Verwendung von Steroidmischen einen besseren Einblick in die Transporteigenschaften des SOAT-Proteins. Es sind allerdings noch weitere Versuche nötig, um final die modulierenden Eigenschaften der verwendeten Substanzen zu klären. Dies wird aber im Rahmen der zweiten Förderperiode des Projektes 2 der Forschergruppe „Sulfated Steroids in Reproduction“ (FOR1369) von der Verfasserin dieser Dissertationsschrift näher untersucht werden.

5.2.4.4 Konsequenzen für die physiologische Bedeutung des SOAT-Proteins

Bisher konnte zwar das Expressionsprofil, die zelluläre Lokalisation des SOAT-Proteins in einem der Hauptexpressionsorgane und das Substratspektrum dieses Transporters definiert werden (Geyer et al. 2007; Döring 2009; Fietz et al. 2013; Grosser 2013), seine physiologische Bedeutung ist aber nach wie vor unklar. Die Untersuchungen des Transportverhaltens bei Verwendung von Steroidmischen zeigten, dass SOAT beim Vorhandensein verschiedener Substrate mehrere Substanzen parallel transportieren kann. Er tut dies in einer

substratspezifischen Weise, die durch die Affinität des jeweiligen Substrats zum Transporter und die Transportkapazität des SOAT-Proteins für das jeweilige Substrat beeinflusst wird. Es konnte somit dargestellt werden, dass die experimentell erhobenen Daten im Zellkulturmodell unter Bedingungen, die mehr der tatsächlichen physiologischen Situation ähneln, durchaus reproduzierbar sind und hiermit ein Einblick in das physiologische Transportverhalten des SOAT-Proteins gegeben ist. Durch die Verwendung der LC-MS/MS für die Analyse der Steroidsulfate und die Möglichkeit über diese Methode auch die freien Steroide nachzuweisen (Galuska et al. 2013), kann man die in der Messlösung befindlichen Mengen und die real aufgenommenen Mengen und Substanzen genauer nachweisen. Somit konnte bestätigt werden, dass SOAT tatsächlich intakte sulfatierte Steroide transportiert. Ferner scheint SOAT eine Bedeutung im *Sulfatase Pathway* zu übernehmen, da er sowohl verschiedene Steroidsulfate transportiert, als auch in den Organen, die diesen alternativen Hormonweg beinhalten (Hoden, Haut) exprimiert wird. Interessant ist, dass SOAT sein Transportverhalten an die vorhandenen Gegebenheiten anpasst. Durch die Verwendung der Steroidgemische konnte gezeigt werden, wie SOAT auf geänderte Bedingungen reagiert und seine Transporteigenschaften umgestellt werden. Somit ist davon auszugehen, dass SOAT auch im Organismus in der Lage ist, auf sich ändernde Umstände zu reagieren. Mit den Steroidmischen sollten die physiologischen Bedingungen experimentell nachgestellt werden. Es zeigten sich Ähnlichkeiten, aber auch Unterschiede zu den Daten bisheriger Arbeiten, die aber erklärbar sind. Es ist daher unter Berücksichtigung der generierten Daten anzunehmen, dass SOAT in bestimmten Organen des menschlichen Körpers zur lokalen Versorgung des Organs mit Steroidhormonen im Rahmen des *Sulfatase Pathway* beiträgt.

5.2.5 Der Nachweis des SOAT-Proteins in SOAT-HEK293 Zellen

Für den Nachweis des SOAT-Proteins sind zahlreiche, kommerziell erhältliche Antikörper verfügbar. Leider erwiesen sich die meisten als unbrauchbar im Western Blot, der IHC und der Immunfluoreszenz. Daher wurde am Institut für Pharmakologie und Toxikologie, maßgeblich durch Herrn Dr. Alber in Zusammenarbeit mit der Firma Eurogentec, ein anti-SOAT-Antikörper generiert, der gegen den gesamten C-Terminus des SOAT-Proteins gerichtet ist (siehe Kapitel 3.10.1). Der affinitätsgereinigte Antikörper wurde zum Nachweis des SOAT-Proteins eingesetzt und als anti-SOAT₃₁₁₋₃₇₇ bezeichnet. Sowohl in der Immunfluoreszenz, als auch im Western Blot konnte das SOAT-Protein mit diesem Antikörper reproduzierbar detektiert werden. Bislang war die Detektion des SOAT-Proteins nur über angehängte Tags (V5-His Tag oder FLAG-Tag) möglich. Der Nachteil des Tag-basierten Proteinnachweises besteht darin, dass durch den Tag sowohl das Proteinsorting, wie auch die Proteinfunktion beeinträchtigt sein kann und daher gegebenenfalls nicht die physiologischen Gegebenheiten

wiedergespiegelt werden. Es ist somit umso wichtiger gewesen, das SOAT-Protein in seiner nativen Form detektieren zu können. Geyer und Kollegen gelang es 2007 bereits das native SOAT-Protein mit einem Antikörper gegen den N-Terminus nachzuweisen. Hierzu wurde ebenfalls ein von Eurogentec generiertes Antiserum verwendet, was als Epitop die Aminosäuren 2-17 des SOAT-Proteins erkennt (Geyer et al. 2007). Das SOAT₂₋₁₇-Antiserum erwies sich aber als ungeeignet, um im Western Blot oder der IHC SOAT nachzuweisen (Döring 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde der anti-SOAT₃₁₁₋₃₇₇-Antikörper für den Western Blot und die Immunfluoreszenz validiert.

5.2.5.1 Nachweis des SOAT-Proteins im Zellkulturmodell mittels Western Blot

Analyse

Im Western Blot detektierte der Antikörper das SOAT-Protein in den Bereichen von 40 kDa, 49 kDa und 55 kDa. Das vorausberechnete Molekulargewicht des SOATs beträgt 41,2 kDa. Dies wird vermutlich durch die Bande bei 40 kDa repräsentiert. Die beiden Banden bei 49 kDa und 55 kDa deuten auf eine Glykosylierung des SOAT-Proteins an den drei potentiellen Glykosylierungsstellen (N⁴, N¹⁴, N¹⁵⁷) hin. Die N-Glykosylierung des SOAT-Proteins wurde bereits 2007 nachgewiesen. Hierfür wurde das SOAT-FLAG-Protein im Western Blot über einen anti-FLAG-Antikörper detektiert und zeigte ein Molekulargewicht von 46 kDa. Dieses reduzierte sich nach PNGase F-Behandlung auf 42 kDa, was dem Molekulargewicht des unglykosylierten SOAT-Proteins von 41,2 kDa plus 1 kDa des FLAG-Tags entspricht (Geyer et al. 2007). In der hier vorliegenden Arbeit wurde die mögliche Glykosylierung des SOAT-Proteins durch die Behandlung der SOAT-HEK293 Zellen mit Tunicamycin überprüft. Tunicamycin verhindert die Glykosylierung durch Blockade der *GlcNAc Phosphotransferase* (GPT), so dass die N-Glykosylierung von Proteinen vermindert wird. Tatsächlich führte die Tunicamycinbehandlung zu einem veränderten Bandenmuster des SOAT-Proteins im Western Blot. So sank die Bande von 55 kDa auf 50 kDa und die Bande im Bereich von 49 kDa verschwand. Es traten weitere Banden bei 40 kDa und 35 kDa auf. Dies zeigt, dass das SOAT-Protein im Zellkulturmodell glykosyliert vorliegt, aber es lässt sich nicht erkennen, an wie vielen Stellen eine posttranslationale Modifikation stattgefunden hat. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die niedrige Bande bei 35 kDa durch Proteolyse entstanden sein könnte. Ferner ist anzumerken, dass Membranproteine im Western Blot häufiger ein niedrigeres Molekulargewicht anzeigen als rechnerisch ermittelt, was auf die kompakte Struktur von Membranproteinen durch ihre vielen transmembranären Helices zurückgeführt werden kann (Godoy et al. 2007). Aus diesem Grund wird im Western Blot von Membranproteinen in der Regel auch von dem „scheinbaren Molekulargewicht“ gesprochen. Darüber kommt es immer wieder zu Unterschieden in der Bestimmung des scheinbaren

Molekulargewichtes aufgrund der Verwendung unterschiedlicher Marker im Western Blot. Neben SOAT, liegen auch die anderen Mitglieder der SLC10-Transporterfamilie als Glykoproteine vor. Dies wurde insbesondere für ASBT und NTCP gezeigt (Hagenbuch et al. 1991; Hagenbuch und Meier 1994; Stieger et al. 1994; Shneider et al. 1997; Sun et al. 1998; Hallen et al. 1999; Sun et al. 2001; Ho et al. 2004; Zhang et al. 2004; Banerjee et al. 2005; Mareninova et al. 2005; Saeki et al. 2007; Hussainzada et al. 2008; Khantwal und Swaan 2008). SOAT-Mutanten, bei denen die Glykosylierungsstellen entfernt wurden, zeigten in Transportstudien teilweise einen marginal niedrigeren Transport als der SOAT-Wildtyp (Döring 2009). Da bislang aber kein adäquater Antikörper für die Detektion des ungetaggten Proteins im Western Blot verfügbar war, wurde noch keine Western Blot Analyse dieser SOAT-Mutanten durchgeführt. Nach erfolgreicher Validierung des anti-SOAT₃₁₁₋₃₇₇ Antikörpers wird dies aber nun nachgeholt werden.

5.2.5.2 Membranlokalisierung des SOAT-Proteins im Zellkulturmodell

Die Lokalisation des SOAT-Proteins in stabil transfizierten SOAT-HEK293 Zellen wurde ebenfalls mit dem anti-SOAT₃₁₁₋₃₇₇ Antikörper über die Immunfluoreszenz mit einem Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper bestimmt. Das SOAT-Protein war eindeutig in der Zellmembran lokalisiert (Fietz et al. 2013). Dies deckt sich mit den von Geyer und Döring erhobenen Daten, die allerdings das SOAT₂₋₁₇-Antiserum für die Lokalisation in den SOAT-HEK293 Zellen verwendeten (Geyer et al. 2007; Döring 2009). Zur Evaluierung der zellulären Lokalisation des SOAT-Proteins im humanen Hoden mittels IHC war der Antikörper anti-SOAT₃₁₁₋₃₇₇ aber, vermutlich aufgrund abweichender Antigenpräsentierung gegenüber dem Western Blot, ungeeignet. Daher wurde für die IHC der anti-mSoat₃₂₉₋₃₄₄ Antikörper verwendet. Dieser wurde, wie der anti-SOAT₃₁₁₋₃₇₇ Antikörper per Auftrag durch die Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) generiert (Grosser et al. 2013; Grosser 2013). Mit diesem gegen das SOAT-Protein der Maus gerichteten Antikörper konnte das humane SOAT-Protein im Hoden lokalisiert werden. SOAT wird dort sowohl in primären zygoten, also auch in primären pachytänen und in sekundären Spermatozyten exprimiert. Ein weiteres Signal konnte in runden Spermatisden der Stufe 1 und 2 detektiert werden. Die IHC wurde an Hodenbiopsien, die eine normale Spermatogenese (nsp) zeigten, durchgeführt. SOAT akkumuliert in den Keimzellen im Golgi-Apparat, was durch Co-Lokalisationsstudien mit dem Golgi-Marker Golgin A2 verifiziert werden konnte (Fietz et al. 2013). Die unterschiedliche Lokalisation des Proteins in Zellkultur (Plasmamembran) und Hodengewebe (vorwiegend im Golgi-Apparat) kann dadurch begründet sein, dass in den Hodenbiopsien nicht die endgültige Zielstruktur des SOAT-Proteins detektiert wurde, sondern eine intermediäre Lokalisation. Im Golgi-Apparat können Proteine vielfältig modifiziert werden bevor sie in ihr Zielkompartiment sortiert werden.

Zudem kann bei einer hoher Expressionsrate, wie sie in den Tetrazyklinrepressor-kontrollierten SOAT-HEK293 Zellen vorliegt, die Proteindichte im Golgi-Apparat höher sein als in der Plasmamembran. Da die beiden nächsten Verwandten des SOAT, NTCP und ASBT, physiologischerweise in der Plasmamembran exprimiert werden und dort ihre Transportfunktion ausüben, ist es wahrscheinlich, dass auch für SOAT die Plasmamembran das entsprechende Zielkompartiment für die Proteinsortierung darstellt. Allerdings könnte SOAT durchaus auch in der Membran eines subzellulären Kompartiments, wie dem Golgi-Apparat seine Transportfunktion ausüben. Diese wäre jedoch durch die unterschiedliche Lokalisation (N-Terminus im Lumen des ER und Golgi-Apparates) anders zu beurteilen als in der Plasmamembran. Um die subzelluläre Lokalisation im Hoden im Verlauf der Spermienreifung näher zu untersuchen sind elektronenmikroskopische Untersuchungen von Hodenbiopsien geplant.

Durch die Validierung des anti-SOAT₃₁₁₋₃₇₇ Antikörper für die Immunfluoreszenz und den Western Blot ist es nun möglich, SOAT und etwaige Mutanten, die zur weiteren Charakterisierung dieses Proteins nötig sind, im Zellkulturmodell nachzuweisen und zu untersuchen. Es können nun auch natürliche Abänderungen der Gen-Sequenz (Einzelnukleotidpolymorphismen, SNPs, siehe Kapitel 4.7) und daraus resultierende Veränderungen des Proteins mit zwei verschiedenen Methoden nachgewiesen werden. Dies ist bei der Untersuchung der natürlich vorkommenden SNPs im *SLC10A6*-Gen von großer Bedeutung.

5.2.6 Polymorphismen im *SLC10A6*-Gen

Die biologische Information ist in Form von Genen im Genom verankert und notwendig für die Entstehung und das Bestehen eines lebenden Organismus. Beim menschlichen Genom unterscheidet man zwischen dem Kerngenom und dem mitochondrialen Genom. Das Kerngenom besteht aus einer Vielzahl von DNA-Nukleotiden, die im Zellkern in Form von Chromosomen kompakt zusammengefasst sind. Die Anzahl der Chromosomen ist speziesspezifisch und beträgt beim Menschen 46. Man unterscheidet zwei Chromosomenarten: die 22 Autosomen und die beiden Geschlechtschromosomen X und Y. Die Zahl 46 setzt sich aus der in Kopie vorliegenden Anzahl Autosomen (22 x 2) und den 2 Geschlechtschromosomen (XX oder XY) zusammen. Bei den meisten Zellen des menschlichen Organismus liegt dieser diploide Chromosomensatz vor. Bei den Keimzellen hingegen ist der Chromosomensatz haploid und weist daher nur 23 Chromosomen auf. Das mitochondriale Genom des Menschen ist mit nur 37 Genen sehr klein und liegt in ca. 10-facher Kopie in jedem Mitochondrium des Organismus vor. Die genetische Information wird übersetzt, indem die Gene bei Bedarf zunächst transkribiert werden, wobei die *messenger RNA* (mRNA)

gebildet wird, die nach dem Prozess des *Splicens* an den Ribosomen in eine Polypeptidkette translatiert wird. Somit entsteht das Genprodukt in Form eines Proteins. Jede Aminosäure im Protein wird durch eine bestimmte Kombination dreier DNA-Basen, auch Codon genannt, codiert. Der genetische Code stellt dabei ein redundantes System dar, was heißt, dass eine Aminosäure durch mehrere Basentriplets codiert werden kann. Das Genom ist, unabhängig von der Spezies, ein dynamisches Gebilde, was im Laufe der Zeit Veränderungen, sogenannten Mutationen, unterliegt. Eine Mutation stellt also eine Abänderung der ursprünglichen DNA-Sequenz dar, was durchaus Konsequenzen für das resultierende Protein haben kann, sofern sich die Mutation im codierenden Bereich des Gens befindet. Bei den Mutationen wird zwischen Substitution, Deletion und Insertion unterschieden. Bei der Substitution werden einzelne oder mehrere Basen durch andere ersetzt. Je nachdem, ob eine Purinbase gegen eine andere Purinbase oder gegen eine Pyrimidinbase ausgetauscht wird, spricht man von Transition (Purinbase gegen Purinbase) oder Transversion (Purinbase gegen Pyrimidinbase). Die Bezeichnungen gelten natürlich auch für den umgekehrten Fall. Da sich durch die Substitution die Basenzahl aber nicht verändert, wird der ursprüngliche Leserahmen beibehalten. Diese Mutationsform führt unter anderem zu den Einzelnukleotidpolymorphismen, wenn die Substitution als Punktmutation auftritt. Bei der Deletion kommt es zu einem Verlust einer oder mehrerer Basen, wohingegen bei der Insertion eine oder mehrere Basen in die Sequenz eingefügt werden. Dies führt häufig zu einer Verschiebung des Leserahmens und somit zu einer *missense* oder *nonsense* Mutation. Bei einer *missense*-Mutation (Sinn-verändernde, nicht synonyme Mutation) ändert sich die Aminosäuresequenz des Proteins, was häufig Auswirkungen auf die Funktion oder die Sortierung des Proteins hat. Der *missense* eines Proteins kann nicht nur durch Deletion oder Insertion von Basen in der DNA-Sequenz auftreten, sondern auch bei Substitutionen (siehe SNPs). Bei einer *nonsense*-Mutation (Sinn-aufhebende Mutation) wird ein nicht funktionelles Protein gebildet, da mutationsbedingt ein vorzeitiges Stoppcodon in der Sequenz auftritt. Bei der Substitution ist auch eine *silent mutation* möglich. Hierbei kommt es zwar zu einer Veränderung der Basensequenz, aber durch die Redundanz des genetischen Codes wird trotzdem die ursprüngliche Aminosäure synthetisiert. Mutationen können zu erheblichen Beeinträchtigungen des Organismus führen. Sie können die Struktur des Proteins verändern, was wiederum die Einsortierung des Proteins oder die Funktion des Proteins stören kann.

5.2.6.1 Bioinformatische Bewertung der untersuchten

Einzelnukleotidpolymorphismen im SLC10A6-Gen

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die systematische Untersuchung der SNPs im SLC10A6-Gen, um phänotypische Veränderungen in der Funktion des SOAT-Proteins aufzudecken. Bis

vor kurzem waren nur sechs SNPs des SLC10A6-Gens bekannt, mittlerweile sind in der *Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Datenbank* (SNP-Datenbank, www.ncbi.nlm.nih.gov/snp) eine Vielzahl von Einzelnukleotidpolymorphismen des SLC10A6-Gens aufgeführt, die vor allem im Rahmen des *1000 Genomes Project* (www.1000genomes.org/) identifiziert wurden. Im Anhang findet sich eine Tabelle der bis zur Abgabe der Dissertationsschrift bekannten SNPs. Der Schwerpunkt in dieser Arbeit lag auf der Untersuchung der sechs schon länger bekannten Polymorphismen des SLC10A6-Gens (siehe Tabelle 5.1).

Tabelle 5.1: Übersicht über die in dieser Arbeit untersuchten SNPs des humanen SLC10A6-Gens.

Für jeden der sechs SNPs sind die Position der Substitution in der Aminosäuresequenz und die jeweils ausgetauschten Aminosäuren angegeben. Außerdem ist die Bewertung nach Änderung der R-Gruppen-Zugehörigkeit und nach der Berechnung mit dem Programm *PolyPhen* dargestellt. Der Score gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der ein SNP die Proteinfunktion schädigt und kann Werte von 0 bis 1 annehmen, wobei 0 für benigne und 1 für schädigend (*damaging*) steht.

Position	Aminosäure-austausch	Änderung nach Klasse der R-Gruppe*	PolyPhen Berechnung
6	S → F	Polar, ungeladen → aromatisch	Benigne Score: 0,307
114	I → V	Nicht polar, aliphatisch → nicht polar, aliphatisch	Benigne Score: 0,119
185	R → T	Nicht polar, aliphatisch → polar, ungeladen	möglicherweise schädigend Score: 0,775
196	I → T	Nicht polar, aliphatisch → polar, ungeladen	möglicherweise schädigend Score: 0,863
199	V → I	Nicht polar, aliphatisch → nicht polar, aliphatisch	Benigne Score: 0,008
204	L → F	Nicht polar, aliphatisch → aromatisch	wahrscheinlich schädigend Score: 0,996

*nach Lehninger Biochemie, 4. Auflage

Für die bioinformatische Beurteilung wurde das Programm *PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping)*, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/> genutzt. *PolyPhen* ist ein öffentlich zugängliches Programm, in dem nach Eingabe der Proteinsequenz, der Position des interessierenden SNPs und der ausgetauschten Aminosäuren überprüft wird, ob der Aminosäureaustausch an einer Stelle auftritt, die in den Proteindatenbanken SwissProt und TrEMBL (www.uniprot.org/) als Disulfid-, Thiolester-, Thiolether-, Fett- oder Metallionenbindungsstelle gekennzeichnet sind. Ferner wird evaluiert, ob der Aminosäureaustausch an einer potentiellen Glykosylierungs- oder Phosphorylierungsstelle stattfindet oder im Bereich einer TMD oder einer Signalstelle lokalisiert ist (Ramensky et al. 2002). Außerdem verwendet das *PolyPhen* Programm Algorithmen zur Vorhersage von

Transmembrandomänen, von Signalpeptid-Sequenzen und von Regionen mit Superhelix-Bildung (Ramensky et al. 2002). Mit Hilfe des *PHAT transmembrane-specific matrix score* (Ng et al. 2000) werden zusätzlich die möglichen funktionellen Auswirkungen einer Aminosäuresubstitution innerhalb einer TMD beurteilt. Die bioinformatische Evaluierung zeigte, dass für drei der sechs untersuchten SNPs im *SLC10A6*-Gen kein Effekt (= benigne) der Mutation auf das Protein vorausberechnet wurde. Bei zwei SNPs hingegen ist eine Funktionsbeeinträchtigung des Proteins als möglich eingestuft worden. Interessanterweise gibt PolyPhen für den L204F-Polymorphismus nicht nur eine mögliche, sondern eine wahrscheinliche Schädigung der Proteinfunktion an. Durch die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten, konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuresubstitution des L204F-Polymorphismus einen Einfluss auf die Sortierung des SOAT-Proteins in die Plasmamembran hatte, was mit der bioinformatischen Vorausberechnung des PolyPhen Programms übereinstimmt.

5.2.6.2 Funktionelle Bewertung der Einzelnukleotidpolymorphismen im *SLC10A6*-Gen

Neben der bioinformatischen Beurteilung der SNPs wurden entsprechende Mutanten generiert, die zunächst auf funktionelle Auffälligkeiten in Transportstudien überprüft wurden (siehe Kapitel Abbildung 4.26). Es zeigte sich, dass das polymorphe Protein der SOAT-L204F-Variante die bekannten SOAT-Substrate E₁S und DHEAS in geringeren Mengen transportierte, als der SOAT-Wildtyp beziehungsweise als die anderen SOAT-SNP-Mutanten (siehe Abbildung 4.26). Bei der kinetischen Bewertung des L204F-Polymorphismus fiel auf, dass die maximale Aufnahmegeschwindigkeit des SOAT-L204F-Proteins für den DHEAS-Transport signifikant niedriger (V_{\max} -Wert: 302,2 pmol/μg Protein/min) war, als beim SOAT-Wildtyp (V_{\max} -Wert: 866,5 pmol/μg Protein/min) oder der ebenfalls untersuchten SOAT-I114V-Variante (V_{\max} -Wert: 1257,0 pmol/μg Protein/min) (vergleiche auch Abbildung 4.28 und Abbildung 4.29). Die SOAT-I114V-Mutante war im ersten Screening unauffällig und wurde daher als Kontrolle für eine mutierte Sequenz mitgeführt. Dieser SNP wurde außerdem aus den funktionell unauffälligen Polymorphismen ausgesucht, da zu ihm in der SNP-Datenbank zahlreiche Informationen in Bezug auf die Allelhäufigkeit und die Verteilung des Genotyps in verschiedenen Populationen vorhanden sind und er in den gleichen Studien wie der L204F-Polymorphismus untersucht wurde. Die Daten können somit untereinander verglichen und beurteilt werden.

Für die veränderten Transporteigenschaften des L204F-Polymorphismus kommen verschiedene Gründe in Betracht. Da der K_m -Wert des L204F-SNPs nicht signifikant von den K_m -Werten des SOAT-Wildtyp- und des SOAT-I114V-Proteins abweicht, ist eine Änderung der Affinität des Substrates DHEAS zum SOAT-L204F-Protein auszuschließen. Der

Polymorphismus hat allerdings einen signifikanten Einfluss auf die Kapazität des Transports. Die maximale Aufnahmegeschwindigkeit sinkt beim SOAT-L204F-Protein im Vergleich zum SOAT-Wildtyp und der SOAT-I114V-Variante. Dies könnte verschiedene Ursachen haben. Zum einen könnte durch die Mutation die mRNA eine geringere Stabilität aufweisen oder insgesamt weniger Protein translatiert werden. Es wurden daher Western Blot Analysen durchgeführt, um eine Aussage über den Gesamtproteingehalt machen zu können. Es zeigte sich, dass zwar geringe Schwankungen in der Expression der einzelnen SOAT-Varianten auftraten, aber die densitometrische Beurteilung mehrerer unabhängig voneinander durchgeführter Western Blots ergab keinen signifikanten Unterschied im Gesamtproteingehalt der SOAT-L204F-HEK293 Zellen (siehe Abbildung 4.33 B) gegenüber den Proteingehalten der anderen SOAT-HEK293 Zelllinien. Da in den SOAT-L204F-HEK293 also die gleichen SOAT-Proteinmengen exprimiert werden wie in den Wildtyp SOAT-HEK293 Zellen, kann dieser Effekt als Erklärung für die geringere Transportrate des SOAT-L204F ausgeschlossen werden. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit liegt in einer Störungen im Proteinsorting in die Plasmamembran. In den SOAT-HEK293-Zellen, die den SOAT-Wildtyp exprimieren, ist das SOAT-Protein mit zwei verschiedenen Antikörpern, die unterschiedliche Epitope (Bereiche im N-Terminus beziehungsweise den kompletten C-Terminus) erkennen, eindeutig in der Zellmembran lokalisiert worden (siehe auch Abbildung 4.25) (Geyer et al. 2007; Fietz et al. 2013). Es ist nun möglich, dass das SOAT-L204F-Protein nicht oder nur teilweise in die Zellmembran einsortiert wird. Neben einer Störung des Sorting-Signals könnte auch ein schnellerer Proteinabbau für den verminderten Einbau in die Zellmembran verantwortlich sein. Allerdings ist es unwahrscheinlich, dass das Sortierungssignal des L204F-Polymorphismus verändert ist. Die von der Mutation betroffene Base sitzt an Position 204 der Aminosäuresequenz. Im 7-TMD-Modell befindet sich diese somit in der TMD 6, so dass sie wahrscheinlich nicht zum Sortierungssignal beiträgt, da Sortierungssignale häufig im zytosolischen Teil des Proteins liegen (Do et al. 1996; Traub und Kornfeld 1997; Marks et al. 1997). Im 9-TMD-Modell befindet sich die Base ebenfalls in einer TMD, weswegen es auch in diesem Modell unwahrscheinlich ist, dass die Base an Position 204 an der Signal-Sequenz für die Einsortierung in die Zellmembran beteiligt ist. Allerdings gibt es auch Proteine, deren Sortierungssignal im Bereich von TMD sitzt (Weisz und Rodriguez-Boulan 2009), so dass die Beeinträchtigung eines Sortierungssignals durch den L204F-Polymorphismus nicht ganz ausgeschlossen werden kann. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz wurde in den stabil transfizierten SOAT-HEK293 Zelllinien des Wildtyps und der Mutanten überprüft, ob die jeweils exprimierte SOAT-Variante in der Zellmembran lokalisiert ist. Es zeigte sich, dass in der SOAT-L204F-HEK293 Zelllinie deutlich weniger SOAT-Protein in der Zellmembran detektierbar war, als bei der SOAT-Wildtyp-HEK293 Zelllinie beziehungsweise der SOAT-I114V-HEK293

Zelllinie (siehe Abbildung 4.31). Neben der mikroskopischen Analyse wurde auch die Intensität des Fluoreszenzsignals photometrisch bestimmt (siehe Abbildung 4.33A), was die sichtbaren Unterschiede der mikroskopischen Analyse bestätigte. Es ist somit im Vergleich zu den anderen SOAT-Varianten weniger SOAT-L204F-Protein in der Zellmembran vorhanden. Auf Grundlage aller Daten wird das verminderte Sorting des L204F-SOAT in die Plasmamembran als ursächlich für die geringere Transportrate der SOAT-L204F-HEK293 Zellen angesehen. Das heißt, weniger Transportprotein in der Plasmamembran kann weniger Substrat in die Zelle transportieren. Im Gegensatz dazu deutet der im Vergleich zum Wildtyp unveränderte K_m -Wert darauf hin, dass die Transportfunktion des SOATP-L204F-Proteins generell nicht beeinträchtigt ist.

Neben dem L204F-Polymorphismus wurde auch der I114V-Polymorphismus untersucht. Für diesen konnte in den SOAT-I114V-HEK293 Zellen ein höherer Gesamtproteingehalt festgestellt, aber dies ist im Einklang mit den kinetischen Parametern, die zeigen, dass die SOAT-I114V-Variante einen höheren V_{max} -Wert (V_{max} -Wert: 1257,0 pmol/μg Protein/min) als der SOAT-Wildtyp (V_{max} -Wert: 866,5 pmol/μg Protein/min) aufweist. Es ist daher wahrscheinlich, dass die Transportkapazität durch den höheren Proteingehalt hervorgerufen wird, da auch hier die Affinität des Substrates nicht von der des SOAT-Wildtyps abweicht (siehe Abbildung 4.29). Die mikroskopische Analyse (siehe Abbildung 4.31) bekräftigt das ebenfalls, da das SOAT-I114V-Protein eine hohe Lokalisationsrate in der Membran aufweist und dies zu den erhobenen Transport- und Western Blot-Daten passt. Die Western Blot Analyse der drei SOAT-Varianten zeigte außerdem, dass alle drei SOAT-Proteinformen mit einem gleichen Bandenmuster detektiert werden. Wie bereits beim SOAT-Wildtyp-Protein diskutiert (vergleiche 5.2.5.1), weisen auch die Mutanten drei Banden zwischen 45 und 55 kDa auf. Sie scheinen daher ebenfalls in der glykosylierten Form im Zellkulturmodell vorzuliegen. In der Literatur ist beschrieben, dass N-gebundene Polysaccharide ein Signal für die Sortierung in die Zellmembran darstellen können (Scheiffele et al. 1995; Gut et al. 1998; Urquhart et al. 2005). Da aber bei den verschiedenen SOAT-Mutanten das Bandenmuster in der Western Blot Analyse auf einen gleichen Glykosylierungsstatus hinweist, haben die Polymorphismen demnach keinen Einfluss auf diese Art der sekundären Modifikation des SOAT-Proteins. Trotzdem stellt sich die Frage, warum weniger SOAT-Protein beim Auftreten des L204F-Polymorphismus in die Zellmembran transloziert wird. Die Immunfluoreszenz mit dem anti-SOAT₃₁₁₋₃₇₇ Antikörper an permeabilisierten Zellen zeigte, dass die SOAT-L204F-HEK293 Zellen zwar SOAT-Protein bilden, aber es vermehrt im Bereich des Zellkerns detektiert wurde. Im Gegensatz dazu war sowohl das Wildtyp SOAT-Protein sowie die I114V-Variante eindeutig in der Plasmamembran zu finden und nur zu einem geringen Anteil innerhalb der Zelle detektierbar.

Die Ursache für die verminderte Sortierung der L204F-Variante des SOAT in die Plasmamembran bleibt zum jetzigen Zeitpunkt noch unklar. Die verstärkte Detektion des SOAT-L204F-Proteins um den Zellkern herum deutet aber auf eine Retention des Proteins im ER oder dem Golgi-Apparat hin. Interessanterweise konnten frühere Untersuchungen zumindest für den NTCP zeigen, dass eine Dimerisierung des Proteins im ER und Golgi-Apparat eine wichtige Voraussetzung für die Sortierung in die Plasmamembran darstellt. So verbleibt eine trunkierte NTCP-Variante NTCP-Y307X im ER und verhindert sogar bei Cotransfektion die Plasmamembransortierung des Wildtyp-NTCP durch Dimerisierung im Bereich des ER (Bijmans et al. 2012). Es ist daher möglich, dass der L204F-Polymorphismus eine Strukturänderung im SOAT Protein induziert, welche per se oder über eine Hemmung der Dimerisierung die Sortierung von SOAT in die Plasmamembran vermindert.

Ein möglicher Ansatz dies weiter zu untersuchen wäre, an Position der Aminosäure 204 weitere Modifikationen, z.B. L204A, mittels Mutagenese in das Konstrukt einzubauen und dann wiederum das Sorting zu untersuchen. Alanin-Mutanten werden häufig verwendet, um den Einfluss einzelner Aminosäure auf das Proteinverhalten zu untersuchen (Banerjee et al. 2005). Alanin ist eine unpolare und daher hydrophobe Aminosäure, die als R-Gruppe nur eine Methylgruppe aufweist. Methylgruppen sind sehr reaktionsträge. Daher wird Alanin häufig zum Vergleich herangezogen, da es aufgrund seiner Reaktionsträgheit die Funktion des Proteins kaum selbst beeinflusst, wohingegen die R-Gruppen anderer Aminosäuren durchaus reaktionsfreudiger sind.

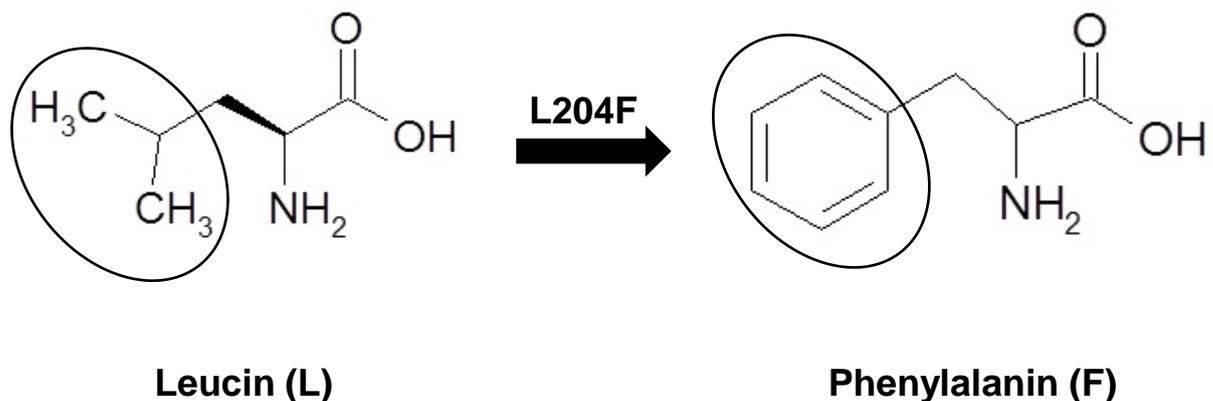


Abbildung 5.6: Vergleich der Strukturformel des SNPs L204F.

Die ursprünglich codierte Aminosäure Leucin (L) weist zwei Methylgruppen anstelle eines aromatischen Rings im Phenylalanin auf.

Im Falle des L204F-Polymorphismus wird Leucin durch Phenylalanin ersetzt. Leucin ist eine unpolare, hydrophobe Aminosäure mit einer aliphatischen R-Gruppe. Phenylalanin hingegen gehört zu den amphiphilen Aminosäuren mit aromatischer R-Gruppe. Sie hat eine hydrophobe Seitenkette und ist eher reaktionsträge. Die Seitenkette des Phenylalanins ist aber durch die

Phenylgruppe wesentlich größer und sperriger als die Seitenkette des Leucins. Da sich die Aminosäure an der Position 204 in einer TMD befindet, könnte durch die Phenylalanin Substitution die Struktur des SOAT-Proteins verändert sein, was wiederum einen Einfluss auf das Sorting haben könnte.

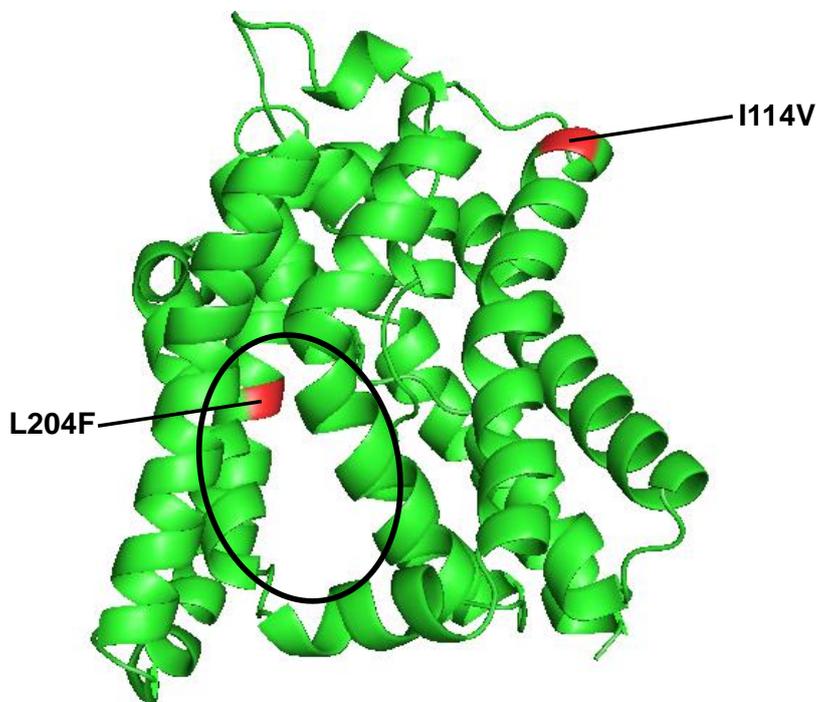


Abbildung 5.7: Illustration eines 3D-Modells des SOATs ohne N- und C-Terminus mit den SNPs I114V und L204F

Ein 3D-Modell des SOAT wurde in Anlehnung an die Kristallstruktur des ASBT_{NM} generiert (Hu et al. 2011). Die beiden näher untersuchten SNPs I114V und L204F sind mit rot markiert. Der schwarze Kreis stellt die potentielle Bindungstasche des SOATs dar. Es ist zu erkennen, dass der L204F-SNP in einer Transmembrandomäne lokalisiert ist.

Beim nahen Verwandten des SOATs, dem ASBT, wurden ebenfalls eine Mutante (C144Y) identifiziert, die eine signifikante Reduktion der Transportrate mit deutlich reduziertem V_{\max} -Wert aufwies und trotz eines höheren Gesamtproteingehaltes gegenüber den ASBT-Wildtyp-Zellen eine geringere Oberflächenexpressionsrate zeigte (~1,4 Gesamtprotein, ~0,75 Zelloberflächenprotein, jeweils im Vergleich zum Wildtyp-Protein) (Ho et al. 2011). Die C144Y-Mutante befindet sich beim ASBT in der TMD 3 (Hussainzada et al. 2009). Dies deutet darauf hin, dass Polymorphismen im Bereich von Transmembrandomänen durchaus das Proteinsorting zur Plasmamembran beeinträchtigen können. Insgesamt zeigen die präsentierten Daten, dass es wichtig ist, funktionell relevante Polymorphismen näher zu charakterisieren, da diese unter Umständen sogar mit Krankheitsbildern assoziiert sein können (Oelkers et al. 1997; Wang et al. 2001; Renner et al. 2009a; Renner et al. 2009b). Da SOAT eine sehr spezifische Organexpression und ein ziemlich klar definiertes

Substratspektrum aufweist, ist es wahrscheinlich, dass er eine wichtige physiologische Funktion im Organismus übernimmt. Da der humane ASBT, der innerhalb der SLC10-Familie den nächsten Verwandten des SOATs darstellt, einige Mutationen aufweist, die zu einem Funktionsverlust führen (Wong et al. 1995; Oelkers et al. 1997; Love et al. 2001; Ho et al. 2011; Pan et al. 2011) und in Krankheitsgeschehen, wie der primären Gallensäurenmalabsorption involviert sind (Oelkers et al. 1997), kann vermutet werden, dass beim SOAT ähnliche Assoziationen auftreten. Allerdings ist die physiologische Bedeutung des SOAT-Proteins noch nicht abschließend geklärt, so dass derzeit noch keine Aussage zu einem möglichen Krankheitswert des L204F-Polymorphismus getroffen werden kann.

5.2.6.3 Ethnischer Vergleich der funktionell relevanten

Einzelnukleotidpolymorphismen des *SLC10A6*-Gens

In der SNP Datenbank finden sich bereits einige Daten zu den beiden näher charakterisierten Polymorphismen I114V und L204F. Der I114V-SNP wurde durch mehrere unabhängige Einträge in das *refSNP cluster* validiert. Jeder SNP, der in die SNP-Datenbank eingetragen wird, erhält eine *submitted* SNP ID Nummer (ss#). Diese Inventarnummer gehört zur jeweiligen Eingabe (*submission*) und ist unveränderlich. Jedem eingetragenen SNP wird zusätzlich eine Referenz SNP-ID Nummer (rs#; *refSNP cluster*) zugewiesen, unter der alle Basisinformationen der individuell eingetragenen SNP-Daten zusammengefasst werden. Desweiteren werden alle Informationen, die sich aus den Einzeleinträgen ergeben, kombiniert und dort aufgeführt. Hierzu gehören beispielsweise die Frequenz der Genotypen, die Allelhäufigkeit oder auch Angaben zur klinischen Varianz der Genotypen. Die SNP-Datenbank ermöglicht somit dem Forscher, seine Daten in den Kontext mit den Daten anderer Arbeitsgruppen zu stellen und liefert zahlreiche Informationen zu dem jeweils interessierenden Polymorphismus. Die beiden Einträge des I114V-SNPs in das *refSNP cluster* zeigen, dass es mehrere unabhängige Einträge (ss#) zu diesem SNP gibt, die zum Validierungsstatus des SNPs beitragen. Bei der Identifizierung von SNPs kann es zu falsch-positiven Ergebnissen kommen. So kann z. B. durch einen Lesefehler der Polymerase bei der Sequenzierung der humanen Probe ein vermeintlicher SNP detektiert werden, der eigentlich gar nicht vorhanden ist. Wenn allerdings ein SNP in mehreren unabhängigen Studien identifiziert wird, ist es wahrscheinlicher, dass er auch in der Realität vorkommt und somit „echt“ ist. Daher ist es wichtig, den Validierungsstatus des SNPs anzugeben. Der I114V-SNP wurde mehrfach in der SNP-Datenbank unter verschiedenen ss-Nummern angegeben. Er konnte außerdem in mindestens zwei Chromosomen der in den jeweiligen Projekten untersuchten Genome als *minor allele* ausgemacht werden. Das bedeutet, dass der SNP auf mindestens zwei oder mehr individuellen Chromosomen detektiert wurde und somit die Häufigkeit des SNPs angegeben

und zwischen dem ursprünglichen Allel und dem SNP-Allel unterschieden werden kann. Es sind damit verschiedene Genotypen (z.B. I/I, I/V, V/V) definierbar. Der I114V-SNP im SLC10A6-Gen wurde sowohl im *HapMap Project*, als auch im *1000 Genomes Project* untersucht. Ziel des *HapMap Projects* war das Anlegen einer Haplotypen-Karte des menschlichen Genoms. Hier wurde der SNP im Rahmen von Genotypisierungsstudien identifiziert und validiert. Im *1000 Genomes Project* hingegen wurden die Genome von Individuen aus aller Welt sequenziert. Hierbei trat der I114V-SNP bei 233 Personen der getesteten Population (1087 Individuen) auf. Dies führt zu einer *minor allele frequency* (MAF) von 10,2 %. Die MAF gibt den Wert des am zweithäufigsten vorkommenden Allels der möglichen Allele an. Der MAF-Wert dient dazu, seltene SNPs von den häufig vorkommenden SNPs zu unterscheiden. Ein MAF von 10,2 %, wie er im Falle des SOAT-I114V-SNP vorliegt, deutet auf ein regelmäßig vorkommendes SNP-Allel hin, wobei allerdings keine Aussage über die Genotypverteilung anhand des MAF-Wertes gemacht werden kann. Im Gegensatz dazu wurde der L204F-SNP im *SLC10A6*-Gen nur bei 26 Individuen des *1000 Genomes Project* detektiert. Daher weist dieser Polymorphismus auch nur einen MAF-Wert von 0,12 (1,2 %) auf. In der SNP-Datenbank ist auch die Diversität der untersuchten Population angegeben. In der Tabelle 5.2 wird aufgeführt, welche Datenangaben zur Population gemacht werden.

Tabelle 5.2: Zusammenfassung der hinterlegten SNP ID Nr. ss44480182 (I114V-SNP im SLC10A6-Gen)

In der dargestellten Tabelle, die der in der SNP-Datenbank hinterlegten angenähert wurde, werden Informationen zu der untersuchten Population dargestellt. Zum einen ist die Population benannt (HapMap-YRI), zum anderen sind Informationen über die Ethnie der untersuchten Individuen (YRI: Volk der Yoruba, beheimatet in Westafrika), die Anzahl der analysierten Chromosomen (n=226) und der Spender, die Verteilung der Genotypen und die Allelhäufigkeit angegeben.

Population ID -Class	Total Sample (2N)	Founder (2N)	Major Allele Freq.	Minor Allele Freq.	Genotype Freq.
HapMap-YRI	226	226	T=0.841	C=0.159	T/T=0.690 C/T=0.301 C/C=0.009

Für die I114V-Variante des *SLC10A6*-Gens liegen Daten verschiedener Populationen in der Datenbank vor. Bei der Analyse der Daten fällt auf, dass bei den asiatischen Populationen, die entweder der ethnischen Gruppe der Han-Chinesen angehören oder zu den Japanern zählen, ausschließlich der Genotyp I/I auftritt, was zu einer Genotyp-Häufigkeit von 1.00 (entspricht 100 %) des Wildtyp-Allels führt. Im Vergleich dazu treten bei Europäern, Afro-Amerikanern und Afrikanern, die unterhalb der Sahara angesiedelt sind (*Sub-Saharan African*) alle drei möglichen Genotypen auf. Der heterozygote Genotyp war hierbei je nach Population bei 10 bis 30 % der Individuen zu detektieren. Der homozygote Genotyp für den I114V-SNP

(V/V) trat nur bei 1 bis 7 % der Personen auf. Der oben bereits angesprochene MAF-Wert mit 10,2 % ist relativ hoch. Dies lässt sich dadurch erklären, dass das Allel für den SNP bei bis zu 30 % der untersuchten Individuen auftritt, allerdings bezogen auf den Genotyp hauptsächlich in der heterozygoten Variante. Homozygot ist der SNP mit 1-7 % je nach Population seltener vertreten. Es ist daher wichtig, alle verfügbaren Daten für die Beurteilung des SNPs heranzuziehen, da ein hoher MAF-Wert nicht automatisch auf die Verteilung der Genotypen schließen lässt. Wenn nun die Daten des L204F-Polymorphismus im *SLC10A6*-Gen vergleichend betrachtet werden, muss man feststellen, dass deutlich weniger Informationen für diesen SNP vorliegen. So kann hier nur auf drei Studien zurückgegriffen werden, in denen eine Aussage über die Diversität der Population gemacht wird. Allerdings ist in allen drei zur Verfügung stehenden Studien auch der I114V-SNP untersucht worden, so dass die Daten miteinander verglichen werden können. Insgesamt sind 4.736 Chromosomen (4.718 Chromosomen beim I114V-SNP) auf den L204F-Polymorphismus gescreent worden. Hierbei wurde eine Allelhäufigkeit von 0,02 (2 %) für das F-Allel und 0,98 (98 %) für das Wildtyp-L-Allel detektiert. Es wurde kein Individuum gefunden, was einen homozygoten Genotyp für das mutierte Allel aufwies. In einer der Studien wurde bei 97,6 % der untersuchten Personen der homozygote Wildtyp detektiert, in einer weiteren waren es 97 %, die homozygot für das Wildtyp-Allel waren. Im Vergleich dazu trat der heterozygote Genotyp nur bei 2,4 % beziehungsweise 3 % der Individuen auf. Der L204F-Polymorphismus ist somit deutlich seltener als der I114V-SNP in der Bevölkerung vorhanden. Ferner liegen keine Daten für die Angehörigen asiatischer Ethnien vor. Beim I114V-Polymorphismus hingegen ist bei asiatischen Individuen bislang nur der homozygote Wildtyp nachgewiesen worden, wohingegen bei Afrikanern, Afro-Amerikanern, Europäern und Individuen aus Nordamerika alle drei Genotypen auftreten. Es zeigen sich somit ethnische und geographische Unterschiede beim Auftreten dieses Polymorphismus. Verglichen mit anderen Mitgliedern der SLC10-Familie, sind auch für den NTCP SNPs bekannt, die in Abhängigkeit der Ethnie auftreten. So konnte Ho den Einzelnuklotidpolymorphismus NTCP-I223T nur bei Afro-Amerikanern nachweisen, wohingegen der SNP NTCP-S267F nur bei Amerikanern chinesischen Ursprungs auftrat (Ho et al. 2004). Die S267F-Variante zeigte außerdem eine deutlich reduzierte Aufnahme des Substrates TC, so dass dieser SNP zu einer Veränderung der Transporteigenschaften führt (Ho et al. 2004). Interessanterweise weist diese NTCP-Variante aber einen erhöhten Transport von Rosuvastatin auf (Pan et al. 2011). SNPs müssen daher nicht immer zu einem Transportverlust führen, sie können ihn auch verändern. Für den L204F-SNP sind solche Informationen bislang nicht bekannt. Durch die Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. M. Bergmann, Institut für Veterinäranatomie, -histologie und -embryologie, Gießen, können wir auf humane Hodenbiopsien zurückgreifen. In Zukunft wird

mit Hilfe eines Genotyping-Assays versucht, in der vorliegenden Hodenbiopsie-Datenbank den L204F-Polymorphismus zu detektieren. Der Genotyping-Assay wurde bereits designet. Ziel dieser Genotypisierungsstudie ist es, Hodenbiopsien, die eine Hypospermatogenese oder Arreste auf dem Level der Spermatozyten beziehungsweise Spermatozyten aufweisen, auf das Vorliegen dieses Polymorphismus zu überprüfen und festzustellen, ob es eine Korrelation zwischen der veränderten Spermatogenese und dem Auftreten des L204F-Polymorphismus gibt. Da die physiologische Bedeutung des SOAT-Proteins noch nicht eindeutig geklärt ist, wird diese Studie neue Informationen über die Bedeutung des SOAT im Hoden liefern. Sollte der SNP bei Patienten mit gestörter Spermatogenese vermehrt auftreten, könnte dieser im Zusammenhang mit den pathologischen Befunden stehen. Die Ätiologie der gestörten Spermatogenese ist noch nicht komplett verstanden. Es wird aber von einem multikausalen Geschehen ausgegangen, bei dem sowohl die Sertolizellen (Hai et al. 2014), endokrinologische Faktoren (Page 2011; Hotaling und Patel 2014), die testikulären Zwischenzellkontakte (Weider et al. 2011), genetische Faktoren (Paoloni-Giacobino 2007; Stouffs et al. 2009), Spurenelemente (Boitani und Puglisi 2008), Krebserkrankungen (Agarwal und Allamaneni 2005), Infektionen beziehungsweise Entzündungen (Pellati et al. 2008; Schuppe et al. 2010) und idiopathische Ursachen (Gianotten et al. 2004) involviert sein können. Wir konnten bereits zeigen, dass SOAT in verschiedenen Arrestformen der gestörten Spermatogenese deutlich niedrigere Expressionsraten aufweist wie beim Vorliegen des Normalzustandes (siehe Abbildung 5.8) (Fietz et al. 2013).

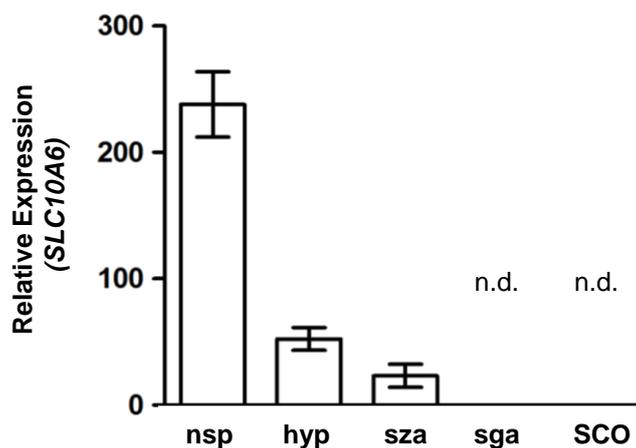


Abbildung 5.8: Relative mRNA Expression von SOAT in Hodenbiopsien mit normaler Spermatogenese und mit verschiedenen Spermatogenesedefekten.

Die relative mRNA Expression von SOAT wurde mittels quantitativer Real-Time PCR Analyse ermittelt. Hierzu wurde der TaqMan *Gene Expression Assay* für SOAT (Hs01399354_m1) verwendet und cDNA von verschiedenen Biopsien mit normaler Spermatogenese (nsp, n=12), Hypospermatogenese (hyp, n=5), Spermatozytenarrest (sza, n=13), Spermatozytenarrest (sga, n=5) oder SCO (n=9) als Template eingesetzt. Die Berechnung der relativen Expression erfolgte mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode. Auf der y-Achse ist die relative Expression des SOATs als n-fache Expression der Probe mit der niedrigsten Gesamtexpression (Kalibrator) dargestellt (Fietz et al. 2013).

Da SOAT in Teilen der Keimzellpopulation exprimiert wird und selektiv sulfatierte Steroide transportiert, die in der freien, aktiven Form für die Entwicklung der Keimzellen und der Aufrechterhaltung des Mikroenvironments im Tubulus von Bedeutung sind, ist davon auszugehen, dass SOAT für die Keimzellen eine wichtige Funktion innehat. Auch die deutlich niedrigere Expressionsrate bei einer gestörten Spermatogenese deutet auf eine physiologische Bedeutung des SOAT-Proteins für die Keimzellentwicklung hin. Mit dem L204F-SNP wurde ein Polymorphismus identifiziert, der im Gegensatz zu den anderen bisher untersuchten Einzelnukleotidpolymorphismen eine Abweichung der Transportleistung vom SOAT-Wildtyp-Protein aufweist. Es ist nun möglich, dass durch die veränderten Transportcharakteristika und die scheinbar gestörte Sortierung des SOAT-L204F-Proteins in die Zellmembran die normale, physiologische Funktion des SOATs unvollständig oder sogar gar nicht gegeben ist. Dies könnte im Folgenden zu Problemen in der Keimzellentwicklung führen, was sich im Bild der gestörten Spermatogenese äußert. Um hier einen Zusammenhang darzustellen, werden zunächst mittels Genotypisierung Hodenbiopsien identifiziert, die den L204F-Polymorphismus aufweisen. Anschließend werden die Biopsien in der IHC und in der Elektronenmikroskopie inklusive Immunelektronenmikroskopie analysiert und mit Hodenbiopsien, die eine normale Spermatogenese aufweisen verglichen. Hierbei werden vor allem Lokalisation und Sorting des polymorphen Proteins untersucht. Diese Daten werden zur Evaluierung der Bedeutung der L204F-Mutation beitragen. Zusätzlich werden mehr Informationen über die physiologische Funktion des SOAT-Proteins gewonnen. Es ist daher von großer Wichtigkeit, die SNPs im *SLC10A6*-Gen zu untersuchen und etwaige Veränderungen der Proteineigenschaften im Zellkulturmodell zu identifizieren, um dann gezielt die vorhandenen Hodenbiopsien auf die interessierenden Polymorphismen screenen zu können. Die Weiterführung der Studie mit einer zusätzlich ausführlichen Analyse der in der SNP-Datenbank aufgeführten Polymorphismen wird im Rahmen der zweiten Förderperiode des Projektes 2 der Forschergruppe „Sulfated Steroids in Reproduction“ (FOR1369) von der Verfasserin dieser Dissertationsschrift in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Martin Bergmann untersucht. Die SNPs des *SLC10A6*-Gens wurden bereits im Institut für Pharmakologie und Toxikologie unter Anleitung der Autorin im Rahmen einer Bachelorarbeit generiert und die Korrektheit der mutierten Sequenzen überprüft.

5.2.7 Mögliche physiologische Bedeutung des SOATs in verschiedenen Organen

Der humane SOAT wird vor allem in hormonresponsiven Organen wie Hoden, Haut, Plazenta und Brustdrüse exprimiert. Sein Substratspektrum umfasst in erster Linie sulfatierte Steroide. Eine Ausnahme stellen die Substanzen STLC, 2-SMP, 4-SMP und TLC dar, die ebenfalls von dem SOAT-Protein transportiert werden (Geyer et al. 2007; Döring 2009; Grosser 2013). Aufgrund seines Expressionspattern und seiner Substratspezifität ist anzunehmen, dass SOAT in den genannten Organen zur Versorgung mit Steroidhormonen beiträgt. Wie bereits in Kapitel 1.2.2 beschrieben, werden die Androgene und Östrogene hauptsächlich im Hoden, dem Ovar, der Plazenta, der Brustdrüse und der Haut gebildet (Vermeulen 1976; Hall et al. 1977; Labrie 1991; Labrie et al. 2000a; Burger 2002; Simpson 2003), wobei die Synthese meist nicht aus Cholesterol erfolgt, sondern aus sulfatierten, inaktiven Steroiden wie dem DHEAS, E₁S oder PREGS (Ruokonen et al. 1972; Payne und Jaffe 1975; Santner et al. 1984; Milewich et al. 1988; Mouhadjer et al. 1989; Labrie et al. 2000a; Labrie et al. 2001; Simpson 2003; Mutembei et al. 2009). Hierzu ist das Enzym StS erforderlich (siehe Kapitel 1.5.1), was durch Hydrolyse sowohl bei den Aryl-, wie auch bei den Alkylsulfaten die Sulfatgruppe abspaltet (Dibbelt und Kuss 1983; Noel et al. 1983; Selcer et al. 2002) und damit die Steroidsulfate in die unkonjugierte Form überführt. Diese wiederum können im Folgenden in hormonell aktive Steroide umgesetzt werden (Santner et al. 1984; Pasqualini et al. 1989; Nakata et al. 2003; Pasqualini und Chetrite 2005; Foster 2008). In der Literatur wird dieser intrakrinologische Weg der Bildung von Steroidhormonen auch als *Sulfatase Pathway* bezeichnet. Dieser wurde viele Jahre als eine Möglichkeit der lokalen Versorgung der Organe mit Steroidhormonen angesehen, allerdings blieb die Frage offen, wie die hydrophilen Steroidsulfate die lipophile Zellmembran durchdringen sollten, um zur StS zu gelangen. Erst mit der Entdeckung einiger Membrantransporter, die in der Lage waren, sulfatierte Steroide in Zellen hineinzutransportieren, erlebte der *Sulfatase Pathway* eine neue Welle der Beachtung (siehe Kapitel 1.6.1). Zu diesen Membrantransportern gehörte neben diversen OATPs (Hagenbuch und Meier 2003; Hagenbuch und Meier 2004; Geyer et al. 2004a; Geyer et al. 2004b), auch der SOAT (Geyer et al. 2007). Im Folgenden wird nun die physiologische Bedeutung dieses Membrantransporters und seine potentielle Funktion im *Sulfatase Pathway* diskutiert.

5.2.7.1 Hoden

Der humane SOAT weist im Hoden eine prädominante Expression auf. Dies, zusammen mit seiner Eigenschaft, selektiv Steroidsulfate zu transportieren, führte zur Annahme, dass er eine wichtige physiologische Funktion in diesem hormonresponsiven Organ übernimmt. Verstärkt wird dies durch Studien, die zeigen konnten, dass der Hoden Hormonvorläufer wie PREGS,

DHEAS und Androstendiol-3-sulfat, alle Substrate des SOAT-Proteins, zu Testosteron metabolisieren kann (Payne et al. 1971; Payne et al. 1973; Payne und Jaffe 1975; Ruokonen 1978). Im Hoden stellen die Leydigzellen den Hauptsyntheseort der Androgene und Östrogene dar. Daher wurde zunächst angenommen, dass SOAT in den Leydigzellen die Aufnahme der Steroidsulfate vermittelt. Mouhadjer und Kollegen konnten *in vitro* zeigen, dass Leydigzellen DHEAS in Testosteron umwandeln können (Mouhadjer et al. 1989). Die hierfür benötigte StS ist, zumindest beim Eber, in den Leydigzellen exprimiert (Mutembei et al. 2009). Dies führte zu der Vermutung, dass die Leydigzellen den Ort des *Sulfatase Pathway* im Hoden darstellen und SOAT die Steroidsulfate DHEAS, E₁S und PREGS durch die Plasmamembran in die Leydigzellen hineintransportiert und so auch zur lokalen Versorgung des Hodens mit Steroidhormonen beiträgt. Eine zweite Hypothese zur Funktion des SOATs im Hoden basierte auf der Tatsache, dass der Hoden nicht nur Steroidsulfate in die freie Form überführen kann, sondern dass er auch sulfatierte Steroide wie DHEAS, PREGS und Testosteronsulfat herstellen und sezernieren kann (Laatikainen et al. 1971; Ruokonen et al. 1972; Vihko und Ruokonen 1975). Somit wäre eine Produktion der sulfatierten Steroide in den Leydigzellen möglich, die im Folgenden ins Blut abgegeben werden, um bei Bedarf wieder rekrutiert und z.B. über die Sertolizellen zu den Keimzellen gebracht zu werden. Eine intakte Keimzellentwicklung ist auf Steroidhormone, insbesondere auch auf Östrogene (Hess et al. 2001; Carreau und Hess 2010; Carreau et al. 2012a; Carreau et al. 2012b) angewiesen, was durch die Expression der ER α und β in den Keimzellen verdeutlicht wird (Lekhkota et al. 2006; Lekhkota und Bergmann 2007). Allerdings können die Steroidhormone nur über die Sertolizellen und die von ihnen gebildete Blut-Hoden-Schranke zu den Keimzellen gelangen. Dieser Vorgang würde aber Transportsysteme benötigen, welche die sulfatierten Steroidhormone beziehungsweise Steroidhormonvorstufen in die Sertolizellen transportieren können. Payne zeigte, dass die enzymatische Spaltung von PREGS durch die StS hauptsächlich in den *Tubuli seminiferi* und weniger im Interstitium stattfindet, so dass Testosteron direkt in der Umgebung der Keimzellen gebildet werden kann (Payne et al. 1973). Da die humanen Sertolizellen neben der StS zusätzlich die P450arom exprimieren, können diese neben Testosteron auch Östrogene produzieren, die beide für die Keimzellentwicklung benötigt werden (O'Donnell et al. 2001; Carreau et al. 2003; Carreau et al. 2008; Carreau und Hess 2010; Carreau et al. 2012a; Carreau et al. 2012b). Es erscheint daher nachvollziehbar, in den Sertolizellen des Menschen ebenfalls einen funktionalen *Sulfatase Pathway* zu vermuten. Um diese beiden Hypothesen bezüglich der Lokalisation und Funktion des SOAT-Proteins im Hoden zu überprüfen, wurde in Kooperation mit dem Institut für Veterinär Anatomie die zelluläre Lokalisation des SOAT-Proteins mit Hilfe von LACP und sich anschließender RT-PCR sowie mit IHC und *in situ* Hybridisierung bestimmt (Fietz et al. 2013). Die RT-PCR der

Hodenschnitte zeigte dabei, dass der humane SOAT in den Keimzellen exprimiert wird (Fietz et al. 2013). Mit Hilfe des anti-Soat₃₂₉₋₃₄₄ Antikörpers, der gegen 16 Aminosäuren des C-Terminus des murinen Soat-Proteins gerichtet ist, konnte das humane SOAT-Protein in verschiedenen Keimzellstadien nachgewiesen werden. Hierzu gehörten zygotene, primäre Spermatozyten des Stadiums V, pachytäne Spermatozyten aller Stadien (I-V), sekundäre Spermatozyten des Stadiums IV und runde Spermatiden (Step 1 und Step 2) der Stadien I und II, wohingegen runde Spermatiden des Stadiums III, sowie Spermatogonien und Spermatiden SOAT nicht exprimierten (Fietz et al. 2013). Das stärkste Signal wurde in primären Spermatozyten in Form eines eiförmigen Schattens, der sich in unmittelbarer Nähe des Zellkerns befand, detektiert. Mit Hilfe eines anti-Golgin A-Antikörpers konnte in Co-Lokalisationsstudien eine Akkumulation des SOAT-Proteins im Bereich des Golgi-Apparat gezeigt werden (Fietz et al. 2013). Interessanterweise war SOAT nicht in der Zellmembran der Keimzellen detektierbar, wohingegen er in HEK293-Zellen ein eindeutig membranständiges Expressionspattern aufweist (siehe Kapitel 4.6.4). Der eingesetzte Antikörper ist gegen Teile des murinen C-Terminus gerichtet und wurde auch in der IHC des Maushodens verwendet (Grosser et al. 2013). Bei der Maus ist das Soat-Protein ebenfalls im Bereich des Golgi-Apparates der pachytänen, primären Spermatozyten akkumuliert und zeigte genau wie das hSOAT-Protein keine eindeutige Membranexpression (Grosser et al. 2013). Mit dem anti-SOAT₃₁₁₋₃₇₇ Antikörper, der gegen den gesamten C-Terminus des humanen SOAT-Proteins generiert wurde, war eine Detektion des nativen hSOAT-Proteins in der IHC nicht möglich, wohingegen er aber in der Western Blot Analyse und der Immunfluoreszenz das in der Zellkultur überexprimierte SOAT-Protein eindeutig nachweisen konnte. Dies kann durch eine unterschiedliche Antigen-Präsentation in den Zellen, Zellysaten und Gewebeschnitten begründet sein. Die *in situ* Hybridisierung untermauerte die Ergebnisse der IHC, da mit Hilfe dieser Technik die SOAT-mRNA ebenfalls in pachytänen Spermatozyten nachgewiesen wurde (Fietz et al. 2013). Die Ergebnisse waren überraschend, da bisher die Hypothesen bezüglich der subzellulären Expression des SOAT-Proteins eine Lokalisation in den Leydig- oder den Sertolizellen favorisierte. Bisherige Studien hatten eine membranständige Lokalisation des SOAT-Proteins sowohl im HEK293-Zellexpressionsmodell, wie auch in *Xenopus laevis* Oozyten gezeigt (Geyer et al. 2004a; Geyer et al. 2007; Döring 2009; Grosser 2013). Zusammen mit den Transportdaten vorangegangener Arbeiten und der vorliegenden Dissertationsschrift, ist anzunehmen, dass die detektierte Lokalisation des SOATs in Strukturen des Golgi-Apparats eine intermediäre Sortierungsstufe darstellt und die finale Translokation des Proteins in die Zellmembran zu diesem Zeitpunkt noch nicht vollzogen wurde. Dies kann durchaus erst in späteren Stadien der Keimzellentwicklung vonstatten gehen, was zu einer weitläufigen Verteilung des SOAT-Proteins in den Zellen führen könnte,

so dass eine Detektion unter den bisher angewandten Konditionen nicht mehr möglich ist. Allerdings ist natürlich auch eine dauerhafte Expression des SOATs im Golgi-Apparat denkbar. Dies kann zum jetzigen Zeitpunkt zumindest nicht ausgeschlossen werden. Das *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) stellt eine Art „Sortierungsstation“ dar, von welcher aus alle neu synthetisierten Membranproteine und Lipide zu ihren Zielkompartimenten geschickt werden. Im TGN sind verschiedene Proteine stationär vorhanden, die in den Sortierungsprozess beziehungsweise in den Transport der Proteine durch die Bereiche des Golgi-Apparates und zu den subzellulären Lokalisationen involviert sind (Traub und Kornfeld 1997). Eventuell übernimmt SOAT auch in diesem Bereich eine Aufgabe. Im Golgi-Apparat werden auch Lipide prozessiert, so dass ein SOAT-vermittelter Transport von CS im TGN ebenfalls denkbar ist. Es gibt verschiedene Techniken, das Geschehen im Bereich des TGNs zu studieren (Traub und Kornfeld 1997), so dass die Bedeutung des SOATs in diesem Kompartiment weiter untersucht werden kann. Primär müsste aber geklärt werden, ob es sich nur um eine intermediäre Lokalisation des SOAT-Proteins im TGN handelt oder ob das TGN das physiologische Zielkompartiment für SOAT darstellt. Wenn man allerdings annimmt, dass das SOAT-Protein nicht dauerhaft im TGN lokalisiert ist, müssen Überlegungen angestellt werden, welche Aufgabe er in den Keimzellen übernehmen könnte. Die Entwicklung der Keimzellen in den *Tubuli seminiferi* wird maßgeblich durch Östrogene beeinflusst (Hess et al. 2001; Carreau und Hess 2010; Carreau et al. 2012a; Carreau et al. 2012b). Nach der Freisetzung der Spermien, werden diese durch den Nebenhoden transportiert. Im Nebenhoden findet die Maturation der Spermien statt, mit dem Ziel, sowohl ihre Fähigkeit zur Fertilisation, als auch zur Vorwärtsbewegung zu erlangen. Hierfür ist ein Cocktail aus einer Vielzahl von Proteinen notwendig (Dacheux et al. 2005), der vom Nebenhoden in Abhängigkeit vom jeweiligen Kompartiment (Nebenhodenkopf, -körper, -schwanz) durch Sekretion bereitgestellt wird, wobei diese durch androgene und östrogene Wirkungen, aber auch durch die Keimzellen selbst moduliert wird (Vazquez et al. 1986; Vazquez et al. 1989; Reyes-Moreno et al. 2008). Während der Nebenhodenpassage finden morphologische und strukturelle Veränderungen an den Spermien in der Region des Akrosoms statt (Schlegel et al. 1986; Jones 1998; Cooper 1998; Yoshinaga und Toshimori 2003). Es kommt zu einer massiven Akkumulation ($15 \pm 3 \mu\text{g CS}/10^9$ Spermatozoen) von CS in den akrosomalen Bereichen der Spermien, wie von Lalumiere gezeigt werden konnte (Lalumiere et al. 1976). Da in dieser Studie stringentes Waschen der Spermatozoen das CS nicht aus diesen entfernte, postulierte Lalumiere eine feste Bindung des CS an die Spermien (Lalumiere et al. 1976). Es stellen sich daher zwei Fragen: Woher kommt die große Menge CS in den Spermien und welche Funktion hat die CS-Anhäufung? CS kann zum einen aus der Zellmembran rekrutiert werden und zum anderen aus dem extrazellulären Raum durch Transportsysteme in die Keimzelle gelangen. CS wurde in

ersten Transportversuchen als potentielles Substrat des SOAT-Proteins identifiziert (siehe Kapitel 5.2.3). Da SOAT in den Keimzellen innerhalb der Samenkanälchen kein membranständiges Expressionsmuster zeigte, sondern im Golgi-Apparat akkumulierte, kann man folgende Hypothese aufstellen: In den Keimzellen im Tubulus könnte SOAT in einem intermediären Zustand der Proteinsortierung detektiert worden sein. Nach Abgabe der Spermien an das Lumen der Samenkanälchen könnte SOAT dann weiter in die Zellmembran der Spermien transloziert werden und könnte dort während der Nebenhodenpassage die Aufnahme und Akkumulation des CS im Bereich des Akrosoms vermitteln. Verschiedene Experimente zeigten, dass Spermien *in vitro* mehr CS akkumulierten, wenn sie in einer NaCl-Ringer-Lösung inkubiert wurden, als bei Verwendung von Seminalplasma (Lalumiere et al. 1976). SOAT stellt ein natriumabhängiges Transportsystem dar, so dass eine NaCl-Ringer-Lösung seine Transportaktivität positiv unterstützen würde. Ob CS allerdings vollständig in die Keimzelle aufgenommen oder während des Transportprozesses in die Keimzellmembran integriert wird, ist noch ungeklärt. In Erythrozyten wurden ebenfalls hohe Konzentrationen an CS nachgewiesen, die vor hypotoner Hämolyse schützen sollen (Bleau et al. 1974). CS liegt in seinem physiologischen Mikroenvironment meist ionisiert vor, wobei der ungeladene Teil des Moleküls einerseits durch das Sterolgerüst relativ starr ist und andererseits durch die Seitenkette eine gewisse Flexibilität aufweist. CS stellt daher eine ideale Substanz für die Interaktion zwischen Zellmembrankomponenten dar. Hinzu kommt die Sulfatgruppe, die ebenfalls zur stabilisierenden Wirkung des CS beiträgt (Bleau et al. 1974). Durch seine Sulfatgruppe kann CS mit dem Wasserstoff des wässrigen, extrazellulären Milieus interagieren und gleichzeitig mit dem lipophilen Molekülteil in der Zellmembran verankert sein, so dass das CS mit der Sulfatgruppe aus der Zellmembran heraus nach außen ragt. Für diese intramembranäre Verankerung spricht auch, dass in Studien erst eine Behandlung mit dem Detergens Triton X-100 CS aus der Zellmembran lösen konnte, wobei allerdings auch das Akrosom und Teile der Zellmembran zerstört wurden (Langlais et al. 1981). Langlais und Kollegen führten elektronenmikroskopische Autoradiographien durch, die bewiesen, dass angebotenes CS in den Spermatozoen innerhalb der Zellmembran akkumulierte. Da in der Studie von Langlais Waschschriffe mit Alkohol und Propylenoxid erneut zu keiner Schädigung der Zellmembran führten (siehe oben) und das CS trotz dieser Manipulationen in der Zellmembran verblieb, wurde somit wie in den Erythrozyten auch in Spermatozoen eine stabilisierende Wirkung des CS postuliert (Langlais et al. 1981). Sollten nun weiterführende Transportstudien CS als Substrat des SOATs eindeutig bestätigen, könnte das bedeuten, dass SOAT maßgeblich an der Erhöhung des CS-Gehaltes in den Spermien beteiligt wäre und somit für die Keimzellentwicklung eine wichtige Funktion inne hätte. CS hat für das Spermium neben der Aufrechterhaltung der Membranstabilität aber auch eine zweite wichtige Funktion,

da es als Inhibitor der im Akrosom befindlichen Proteasen angesehen wird (Bleau et al. 1974; Bleau et al. 1975). Werden Spermatozoen mit radioaktiv-markiertem CS *in vitro* inkubiert, zeigt die lichtmikroskopische Radioautographie, dass alle Spermatozoen CS akkumulieren (Lalumiere et al. 1976). Dies belegt die Wichtigkeit dieses Stoffes für die Spermienzellen. CS übernimmt in den Spermien die Aufgabe die Aktivierung der Proteasen im Akrosom zu verhindern (Roberts 1987). Im Akrosom befindet sich eine Vielzahl von Proteasen, unter anderem Akrosin, welche dazu dienen, die *Zona pellucida* der Eizelle zu penetrieren, um anschließend das Ei befruchten zu können. Durch die Akkumulation des CS im akrosomalen Bereich der Spermien wird die Kapazitation im Nebenhoden verhindert, so dass diese erst im weiblichen Genitale nach der Ejakulation stattfindet (Burck und Zimmerman 1980; Langlais et al. 1981). Beim Hamster wird im Gegensatz zum Menschen Desmosterolsulfat akkumuliert (Bleau und Vandenheuvel 1974; Legault et al. 1979a; Legault et al. 1979b). Studien zeigten, dass dies zu einer völligen Hemmung der Kapazitation *in vitro* führte (Bleau et al. 1975). Ähnliches konnte auch in Spermien des Kaninchens demonstriert werden, wobei hier CS der potenteste Inhibitor des Kapazitationsprozesses war (Fayrer-Hosken et al. 1987). Im weiblichen Genitale ist die Steroidsulfatase (siehe Kapitel 5.1.1) exprimiert. Dadurch wird das CS beziehungsweise Desmosterolsulfat gespalten und die inhibierende Wirkung aufgehoben (Lalumiere et al. 1976). In Erythrozyten wurde eine membranstabilisierende Wirkung des CS nachgewiesen, die vor allem als Schutz vor hypotoner Hämolyse dienen soll (Bleau et al. 1974). Bei Abspaltung des Sulfats im weiblichen Genitale wird daher wahrscheinlich eine Instabilität der Spermienmembran induziert, die die Kapazitation hervorruft und zur Akrosomenreaktion führt. In der Literatur wird diskutiert, ob durch die Membranstabilität der Influx von Ca^{2+} -Ionen zunimmt und dies die Akrosomenreaktion initiiert (Langlais et al. 1981). Zusammenfassend ist anzunehmen, dass SOAT in den Keimzellen eine wichtige Funktion in Bezug auf die Akkumulation des CS in der Spermatozoenmembran übernehmen könnte. Weiterführende Studien mit CS sowie die Etablierung eines *Slc10a6*-Knockout-Maus-Modells werden dazu beitragen, die physiologische Funktion des SOAT-Proteins in diesem Organ weiter aufzuklären. Neben der prädominanten Expression des SOATs im Hoden, führt auch die Veränderung der Expression dieses Proteins in verschiedenen Formen der gestörten Spermatogenese zu der Vermutung, dass SOAT im Hoden wichtige Funktionen erfüllt. So konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die SOAT-Expression in Hodenbiopsien, mit gestörter Spermatogenese gegenüber Biopsien mit normaler Spermatogenese verändert ist (Fietz et al. 2013). Beim Vorliegen der Hypospermatogenese, einer quantitativ reduzierten, aber qualitativ intakten Spermatogenese, war die SOAT-Expression signifikant erniedrigt (Fietz et al. 2013). Auch in weiteren Formen der Spermatogenesestörung, bei denen noch die Keimzellen vorliegen, in denen SOAT bei normaler Spermatogenese exprimiert ist, war der

Gehalt an SOAT mRNA deutlich reduziert oder gar nicht mehr nachweisbar (Fietz et al. 2013). Die Ergebnisse bekräftigen eine potentielle Funktion des SOAT-Proteins für die Aufrechterhaltung einer intakten Spermatogenese. Wie bereits mehrfach erwähnt, werden im Hoden DHEAS und PREGS in großen Mengen produziert (Laatikainen et al. 1971; Ruukonen und Vihko 1983). Diese können außerdem intratestikulär in Testosteron umgewandelt werden, was für die Aufrechterhaltung einer intakten Spermatogenese von Bedeutung ist (Ruukonen 1978). Allerdings exprimieren die Keimzellen keinen AR, so dass Testosteron bei ihnen nur in nicht-genomischen Wegen (*non genomic pathways*) wirken kann (Kuiper et al. 1997; Walker 2010). Im Gegensatz zum AR werden die ER aber von den Keimzellen exprimiert (Makinen et al. 2001; Lekhkota und Bergmann 2007; Cavaco et al. 2009), so dass eine Aufnahme der sulfatierten Östrogene E₁S und E₂S durch SOAT für die Keimzellen durchaus relevant sein könnte. So konnte bereits die Expression der StS in Spermatozyten nachgewiesen werden (unveröffentlichte Ergebnisse). Für die wichtige Rolle einer Supplementierung der Keimzellen mit Steroiden und Steroidsulfaten spricht auch, dass bei der gestörten Spermatogenese die SOAT-Expression reduziert ist. Allerdings ist es nicht möglich zu unterscheiden, ob zuerst die Expression des SOATs sinkt, was eine Spermatogenesestörung zur Folge haben könnte oder ob aufgrund der Spermatogenesestörung die SOAT-Expression abnimmt. Eine direkte Korrelation zwischen gestörter Spermatogenese und der Funktion des SOAT-Proteins lässt sich mit den bisher erhobenen Daten daher nicht darstellen. Trotz alledem ist es interessant, dass beim Vorliegen einer Hypospermatogenese die SOAT-Expression signifikant reduziert ist. Dies könnte zu einer eingeschränkten Versorgung der Keimzellen mit Androgenen und Östrogenen durch die fehlende Aufnahme sulfatierter Steroide führen und somit eine quantitativ reduzierte Spermatogenese hervorrufen. Um diese Zusammenhänge besser verstehen zu können, ist die Etablierung einer *Slc10a6*-Knockout-Mauslinie initiiert worden (siehe Kapitel 3.12). Bei der *Slc10a6*-Knockout-Maus ist das *Slc10a6*-Gen konstitutiv ausgeschaltet. Somit kann die Funktion des Soat-Proteins im gesamten Organismus untersucht werden. Für die Rolle des Soats im Hoden werden durch eine reproduktive Phänotypisierung der Mauslinie (Borg et al. 2010) die Zusammenhänge zwischen fehlender Soat-Expression und gestörter Spermatogenese überprüft.

Ebenfalls in dieser Arbeit wurden Einzelnukleotidpolymorphismen des *SLC10A6*-Gens analysiert und funktionell bewertet. Die SOAT-L204F-Mutante zeigte hierbei eine signifikant reduzierte Aufnahmekapazität des Substrates DHEAS und eine geringere Translokationsrate in die Zellmembran im Vergleich zum SOAT-Wildtyp. Die veränderten Transporteigenschaften dieses Polymorphismus könnten auch im Zusammenhang mit einer gestörten Spermatogenese stehen. Zum SOAT-L204F-SNP sind in der SNP Datenbank bislang nur wenige Daten vorhanden. Daher ist eine systematische Genotypisierung der Hodenbiopsien

von Patienten mit normaler und Hypospermatogenese sowie von Patienten mit anderen Spermatogenesedefekten geplant, um mögliche Zusammenhänge zwischen dem SOAT-L204F-SNP und der gestörten Spermatogenese zu determinieren. Inwiefern SOAT in einen Keimzell-assoziierten *Sulfatase Pathway* integriert ist, konnte mit dieser Studie nicht geklärt werden. Man kann allerdings feststellen, dass die beiden Ausgangshypothesen, die eine Expression in Leydig- oder Sertolizellen vermuteten, widerlegt werden konnten und der ursprünglich angedachte *Sulfatase Pathway* in diesen Zelltypen zumindest ohne Beteiligung des SOAT-Proteins im Hoden stattfindet.

5.2.7.2 Haut

Die quantitative Realtime-PCR zeigte, dass der humane SOAT in einer nicht unerheblichen Menge in der Haut exprimiert wird. Bei der Maus ist *Soat* ebenfalls in der Haut detektierbar. Mit Hilfe der IHC wurde das murine *Soat*-Protein in der Epidermis nachgewiesen (Grosser 2013). Die Haut ist ein intrakrinologisch aktives Organ, das Steroidhormone sowohl bildet, wie auch benötigt (Zouboulis 2000; Labrie et al. 2000a; Zouboulis 2004). Somit kann die Haut als hormonell autonomes Organ betrachtet werden. Die gebildeten Steroidhormone stimulieren die Zellproliferation und den Haarwuchs, erhöhen den Kollagengehalt und die Hautdicke und fördern die Gefäßneubildung (Thornton 2002; Randall 2007; Randall 2008). Neben der Neusynthese der Steroidhormone werden auch die im Blutstrom vorhandenen Vorstufen in der Haut durch die StS reaktiviert, wobei dieser Vorgang hauptsächlich in der Hautpapille stattfindet (Milewich et al. 1988; Hoffmann et al. 2001; Hoffmann 2001). Die StS hat somit eine bedeutende Funktion in der Hautphysiologie. Bei der RXLI (rezessiven X-linked Ichthyosis) liegt eine StS-Defizienz vor, welche zu einer massiven Akkumulation von CS im *Stratum corneum* führt (siehe Kapitel 1.5.1) (Williams und Elias 1981) und eine starke Schuppung der Haut mit grau-bräunlicher Verfärbung der betroffenen Stellen hervorruft. Das SOAT-Protein könnte in der Haut die Aufgabe übernehmen sulfatierte Steroide in die Hautzellen zu transportieren, damit aus ihnen aktive Steroidhormone gebildet werden. Dies würde bedeuten, dass SOAT im Falle der RXLI zu der Akkumulation des CS durch den Transport des Stoffes beiträgt. Somit würde SOAT ein potentiell *Drug Target* für die Behandlung der RXLI-Symptomatik darstellen, da durch eine Inhibition des SOAT-Proteins unter dieser Annahme die Aufnahme des CS in die Zellen unterbunden werden könnte. Für SOAT gibt es bereits einige sehr gute Inhibitoren. Zusammen mit dem jüngst erstellten Pharmakophorenmodell, bietet das eine gute Grundlage für weitere Untersuchungen. Natürlich ist hierfür eine genaue Analyse der Lokalisation des SOAT-Proteins in der Haut erforderlich, um den potentiellen Zusammenhang zwischen der RXLI und SOAT zu verifizieren. SOAT kann aber auch unter physiologisch intakten Bedingungen die Steroidsulfate CS und DHEAS in die Hautzellen

transportieren, wo CS in die Differenzierung von Keratinozyten involviert ist und Gene induziert, die an der Ausbildung der Hautbarriere beteiligt sind (Williams und Elias 1981). CS kann außerdem aufgrund seiner amphiphatischen Struktur zur Verlinkung der Keratinozyten in der Epidermis beitragen, indem es teilweise in die Membran integriert wird und über sein hydrophiles Sulfatende mit anderen Membrankomponenten in Kontakt tritt (Lampe et al. 1983). Somit hat CS eine wichtige physiologische Bedeutung in der Haut, speziell in der Epidermis. Das murine Soat-Protein konnte in der Epidermis detektiert werden, so dass es interessant sein wird herauszufinden, was passiert, wenn die *Slc10a6*-Knockout-Maus kein funktionierendes Soat-Protein mehr bilden kann. Generell sind die Haarfollikel der Maus weniger responsiv gegenüber Androgenen, trotzdem ist die Maus ein weit verbreitetes Tiermodell für das Studium der Haut und der Haare (Randall et al. 2003). Die Haut weist eine Vielzahl von AR und ER auf, so dass die mangelnde Aufnahme der Steroidsulfate zu Störungen der Steroidhomöostase in diesem Organ führen könnte. Das SOAT-Protein vermittelt auch die Aufnahme von Androstendiol-3-sulfat, E₂S und E₁S. In vielen Studien wurde E₂ als Testsubstanz für die östrogenen Effekte verwendet, so dass bereits vielfach die modulatorische Wirkung dieses Östrogens in der Haut gezeigt werden konnte (Stumpf et al. 1974; Hosokawa et al. 1981; Varila et al. 1995; Maeda et al. 1996). Demzufolge kann ein Östrogenmangel deutliche Auswirkungen auf die Haut haben und mit dünneren, schlechter durchbluteten Hautarealen einhergehen, die eine reduzierte Elastizität aufweisen (Thornton 2002). Auch die Wundheilung wird durch niedrige Östrogenspiegel verzögert (Ashcroft et al. 1997). Ein Mangel an Androgenen kann dagegen zur Reduktion der Haut- und Haarproliferation führen (Randall 2008). Inwiefern dies bei der *Slc10a6*-Knockout-Maus auftritt, wird sich in weiterführenden Studien zeigen und zur Klärung der physiologischen Funktion des SOAT-/Soat-Proteins in der Haut beitragen. In den ersten Anpaarungsversuchen der *Slc10a6*-Knockout-Maus wurde bei einigen der KO-Tiere Haarverlust beobachtet (siehe Kapitel 4.8.2), der allerdings noch histologisch abgeklärt werden muss. Ferner sind Beobachtungen der Tiere mittels Videokamera nötig, um ein *Barbering*-Verhalten der Tiere auszuschließen. Diese Studien werden im Rahmen der zweiten Förderperiode des Projektes 2 der DFG-Forschergruppe „Sulfated Steroids in Reproduction“ (FOR1369) durchgeführt. Es ist anzunehmen, dass das SOAT-Protein in der Haut in den *Sulfatase Pathway* integriert ist und somit zur Aufrechterhaltung der intrakrinen Funktion der Haut beiträgt. Es wird interessant sein, ob der Knockout des *Slc10a6*-Gens in der Haut zu einem Phänotyp führt, und ob das humane SOAT-Protein sich als potentielles *Drug Target* für die Therapie der RXLI herausstellt.

5.2.7.3 Brustdrüse

In der Brustdrüse tragen Östrogene maßgeblich zur Promotion hormonabhängiger Mammakarzinome bei. In gesundem Brustgewebe ist die Aktivität der SULT höher als die der StS (Falany et al. 1994; Suzuki et al. 2003a). Im Gegensatz dazu wurde in hormonabhängigen Mammakarzinomen eine bis zu 150-fach höhere Aktivität der StS gegenüber der P450arom gefunden (Pasqualini et al. 1997), die dazu führt, dass 10 x mehr E₁ durch den *Sulfatase Pathway* gebildet wird, als durch die *de novo* Synthese von Östrogenen mit Hilfe der P450arom (Santner et al. 1984). Auch die Gewebekonzentrationen von E₁ und E₂ sind in diesen Tumoren deutlich höher als die Plasmakonzentrationen der beiden Steroide (van Landeghem et al. 1985; Pasqualini et al. 1997), so dass dem *Sulfatase Pathway* eine bedeutende Rolle in der Entstehung hormonabhängiger Mammakarzinomen zugesprochen wird (Santner et al. 1984; Nakata et al. 2003). Durch diese Erkenntnisse wird auch deutlich, dass in hormonabhängigen Mammakarzinomen der *Sulfatase Pathway* gegenüber dem *Aromatase Pathway* eine gewichtigere Bedeutung innehat, was für die Therapie dieser Tumorform von erheblicher Wichtigkeit ist. So sind im Falle der hormonabhängigen Mammakarzinome nicht nur Aromatasehemmer sowie ER-Blocker als Therapeutikum in Betracht zu ziehen, sondern auch Inhibitoren der StS (den Hollander et al. 2013).

Zu den Vorstufen der Steroidhormone werden in der Brustdrüse in erster Linie E₁S und DHEAS gezählt (Pasqualini et al. 1989; Labrie et al. 2001; Nakata et al. 2003). Aus DHEAS kann neben DHEA auch Androstendiol gebildet werden, was wiederum in Östrogene umwandelbar ist. Androstendiol ist in der Lage, an den ER zu binden, wenn auch mit einer geringeren Affinität wie E₂. In postmenopausalen Frauen ist allerdings die Konzentration von Androstendiol im Plasma mindestens 100-fach höher als die Konzentration von E₂, so dass vermutet wird, dass Androstendiol am ER ähnlich potent wie E₂ bei diesen Frauen wirkt (Bonney et al. 1984). SOAT transportiert nun sowohl E₁S, wie auch DHEAS und Androstendiol-3-sulfat und ist in der Brustdrüse exprimiert. Es ist daher möglich, dass er in der Mamma für die Aufnahme der Steroidhormonvorstufen verantwortlich ist. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass eine mit hSOAT transfizierte, hormonsensitive Brustkrebszelllinie (T47D) im Proliferationsassay eine 10-fach höhere Sensitivität für E₁S gegenüber den mit Leervektor transfizierten Kontrollzellen zeigte (Karakus 2009). Dieser Effekt ließ sich durch die potenten SOAT-Inhibitoren 2- und 4-SMP (Geyer et al. 2007; Döring 2009) aufheben. Das bedeutet: SOAT ist an der Aufnahme des E₁S in die Brustkrebszelllinie beteiligt. In gesundem Brustdrüsengewebe wird neben SOAT auch die StS exprimiert. Karakus konnte zeigen, dass durch Inhibition der StS mittels STX64 die höhere Sensitivität der Zelllinie ebenfalls revidiert werden konnte (Karakus 2009). Diese Daten deuten daraufhin, dass SOAT und die StS sowohl in der gesunden, wie auch in der tumorös veränderten Brustdrüse zusammenwirken könnten:

Die sulfatierten Steroide werden durch SOAT in die Brustdrüsenzellen aufgenommen, bevor die Hydrolyse durch die StS erfolgt. Im Anschluss können die freien Steroide entweder erst in aktive Steroide (DHEAS \rightarrow DHEA \rightarrow Androstendion \rightarrow E₁/E₂) umgewandelt werden oder, falls sie schon in der aktiven Form vorliegen, können sie direkt über die Hormonrezeptoren eine zelluläre Antwort modulieren (Suzuki et al. 2005; Funk 2009). In hormonabhängigen Mammakarzinomen ist dies von großer Bedeutung. In einer früheren Doktorarbeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie wurde in jeweils zehn ER-positiven und ER-negativen Mammakarzinomen für SOAT und die StS ein vergleichbar hohes Expressionsniveau nachgewiesen, was die pathophysiologische Bedeutung des SOATs für die Proliferation hormonabhängiger Mammakarzinome bekräftigt (Meerkamp et al. 2008; Funk 2009). SOAT kann somit als neues mögliches *Drug Target* für die Therapie hormonabhängiger Mammakarzinome angesehen werden.

5.2.7.4 Plazenta

In vorangegangenen Studien konnte auch in der Plazenta eine moderate Expression des SOATs gezeigt werden (Geyer et al. 2007; Funk 2009). Im Rahmen der Schwangerschaft steigt die Östrogenproduktion des Organismus stark an und wird ab der neunten Schwangerschaftswoche hauptsächlich von der Plazenta getragen (Pepe und Albrecht 2008). Allerdings ist die Plazenta auf die Zuführung von C₁₉-Steroiden angewiesen, da sie das P450c₁₇ (Cyp₁₇) nicht exprimiert und somit weder die 17 α -Hydroxylase-, noch die C-17,20-Lyase-Aktivität besitzt (Albrecht und Pepe 1990; Strauss, III et al. 1996). Die Plazenta produziert die Östrogene hauptsächlich in den Synzytiotrophoblastzellen aus den Vorstufen DHEAS, DHEA und 16 α -Hydroxy-DHEAS (Siiteri und MacDonald 1963; Laatikainen et al. 1980; Dibbelt und Kuss 1983; Kuss 1994; Pepe und Albrecht 2008). Abgesehen vom DHEA können DHEAS und 16 α -Hydroxy-DHEAS nicht durch Diffusion in den Synzytiotrophoblasten eindringen, so dass Transportsysteme erforderlich sind, die die Aufnahme der Steroidsulfate in die Zielzelle vermitteln. Die Arbeitsgruppen um Ugele und St-Pierre identifizierten mit dem OATP2B1 und dem OAT4 zwei Steroidsulfattransporter in den Zytotrophoblasten und an der basolateralen Membran der Synzytiotrophoblasten (St-Pierre et al. 2002; Ugele et al. 2003). Beide transportieren zwar DHEAS und E₁S, die Affinität des OATP2B1 ist allerdings mit einem K_m-Wert von > 200 μ M sehr gering (Kullak-Ublick et al. 2001; Pizzagalli et al. 2003; Ugele et al. 2008). Zusätzlich zum OATP2B1 und dem OAT4 wurde auch der OSCP1 als Membrantransporter an der fetalen Seite des Synzytiotrophoblasten postuliert (Kobayashi et al. 2005). Allerdings sind die membranständige Lokalisation und die Transporteigenschaften dieses Proteins in der Literatur kontrovers diskutiert (Kobayashi et al. 2005; Hiratsuka et al. 2008; Hiratsuka et al. 2011; Fietz et al. 2013), so dass eine mögliche Funktion des OSCP1-

Proteins in der Plazenta in weiteren Untersuchungen abgeklärt werden muss, bevor eine finale Aussage getätigt werden kann. Bislang war allerdings nicht bekannt, ob 16 α -Hydroxy-DHEAS durch OATP2B1 und/oder OAT4 in die Synzytiotrophoblastzellen aufgenommen wird. Die Bildung des 16 α -Hydroxy-DHEAS erfolgt aus DHEAS durch 16 α -Hydroxylierung in der fetalen Leber. Im Anschluss wird es in den Synzytiotrophoblasten transportiert, wo es dann zu E₃ umgesetzt werden kann (Siiteri und MacDonald 1966; Sato 1969; Pepe und Albrecht 2008). Da SOAT in der Plazenta exprimiert wird und ebenfalls sulfatierte Steroide transportiert, stellte sich die Frage, ob SOAT auch an der Aufnahme des 16 α -Hydroxy-DHEAS und weiterer Steroidsulfate in die Synzytiotrophoblastzellen beteiligt ist. Um nun herauszufinden, ob die potentiellen Kandidaten OATP2B1, OAT4 und SOAT die Aufnahme von 16 α -Hydroxy-DHEAS vermitteln und somit an der Aufnahme der Steroidsulfate in die Plazenta beteiligt sind, wurde am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Veterinärmedizin eine Studie durchgeführt, bei der sowohl die drei genannten Transportproteine, als auch die SLC10-Familienmitglieder ASBT und NTCP in stabil transfizierten HEK293-Zellen untersucht wurden (Schweigmann et al. 2014). SOAT, OAT4 und NTCP transportierten im Gegensatz zu ASBT und OATP2B1 in dem HEK293-Expressionmodell Natrium-abhängig 16 α -Hydroxy-DHEAS mit unterschiedlichen Aufnahmeraten, die 49- bis 283-fach höher waren als die der Kontrollzellen (Schweigmann et al. 2014). Während NTCP und SOAT keinen Transport unter Natrium-freien Bedingungen aufwiesen, war für den OAT4 auch ohne Natrium-Zusatz eine Aufnahme sichtbar. Allerdings war diese um circa 50 % niedriger als bei den Natrium-haltigen Konditionen. Während der NTCP in der Plazenta keine funktionelle Rolle zu übernehmen scheint, da er in bisherigen Studien nur in geringen Mengen oder gar nicht nachgewiesen werden konnte (Ugele et al. 2003; Patel et al. 2003), erfolgte der Nachweis von OAT4 und SOAT im Synzytiotrophoblast mittels Immunhistochemie, was im Fall des SOATs zusätzlich durch *in situ* Hybridisierung bestätigt wurde (Ugele et al. 2003; Schweigmann et al. 2014). Somit scheinen sowohl OAT4 wie auch SOAT für die Aufnahme von 16 α -Hydroxy-DHEAS in die Synzytiotrophoblastzellen verantwortlich zu sein. Das SOAT-Protein weist zwar im Vergleich zu PREGS, E₁S und DHEAS für 16 α -Hydroxy-DHEAS die niedrigste Affinität (K_m -Wert: 51,4 \pm 9,9 μ M) auf, besitzt aber aufgrund seines hohen V_{max} -Wertes (1465.8 \pm 118.8 pmol/mg Protein/min) eine entsprechend große Transportkapazität für dieses Substrat. Da SOAT auch im Endothel der plazentären Blutgefäße nachgewiesen wurde (Schweigmann et al. 2014) und die Konzentration von 16 α -Hydroxy-DHEAS mit bis zu 10 μ M im Umbilikalblut außerordentlich hoch ist (Laatikainen et al. 1980), wird angenommen, dass SOAT für den Transport des Hormonvorläufers 16 α -Hydroxy-DHEAS aus dem fetalen Blutkreislauf verantwortlich ist und durch seine Expression in den apikalen Bereichen der Synzytiotrophoblastzellen zur Versorgung der plazentären *Villi* mit Steroidsulfaten beiträgt.

SOAT übernimmt somit in der Plazenta eine wichtige Funktion und ist auch in diesem Kompartiment des Körpers in den *Sulfatase Pathway* integriert.

5.3 Ausblick

SOAT ist in mehreren hormonresponsiven Organen exprimiert und transportiert verschiedene sulfatierte Steroide. Im Hoden und in der Plazenta konnte seine subzelluläre Lokalisation bereits determiniert werden (Fietz et al. 2013; Schweigmann et al. 2014). Seine Funktion hingegen konnte bislang nicht abschließend geklärt werden. Neben dem *Sulfatase Pathway* könnte SOAT auch andere Aufgaben im Hoden übernehmen. Hierzu gehört beispielsweise die Akkumulation von CS in den Spermatozyten, Spermatischen und Spermien zur Stabilisierung ihrer Zellmembran. Daher sind weiterführende Transportstudien geplant, um CS als Substrat des SOATs eindeutig identifizieren zu können.

Der murine Soat transportiert ebenfalls sulfatierte Steroide und ist im Hoden wie der humane SOAT in den Keimzellen lokalisiert (Grosser et al. 2013). Dies lässt die Vermutung zu, dass SOAT eine ähnliche Funktion in den beiden Spezies Mensch und Maus innehat. Daher wurde für weitergehende Untersuchungen des SOATs/Soats ein *Slc10a6*-Knockout-Maus-Modell etabliert. Das Mausmodell dient dazu, die Auswirkungen des Verlusts der SOAT/Soat-Funktion zu untersuchen und somit die physiologische Aufgabe dieses Proteins bestimmen zu können. Hierbei werden nicht nur die Konsequenzen des Gen-Knockouts für den Hoden, sondern auch für die Haut und die Plazenta untersucht. Umfangreiche Phänotypisierungsstudien, bei denen die *Slc10a6*-Knockout-Maus mit der entsprechenden Wildtyp-Linie verglichen wird, werden dazu beitragen, die physiologischen Aufgaben des SOAT-/Soat-Proteins zu ermitteln. Neben der systematischen histopathologischen Untersuchung der Expressionsorgane des Soats wird auch der Einfluss des *Slc10a6*-Knockouts auf die Fortpflanzung der Maus untersucht. Hierbei wird ergänzend das Verhalten der Knockout-Maus miteinbezogen, um zu verhindern, dass abweichende, von Steroidhormonen beeinflusste Verhaltensweisen übersehen werden. Zusätzlich soll das Steroidmetabolom der Wildtyp- und Knockout-Mäuse definiert werden. Hierzu werden sowohl Blut- wie auch Urin-, Galle- und Gewebeprobe in der LC-MS/MS analysiert und die Ergebnisse zwischen Wildtyp und Knockout-Maus verglichen. Ziel ist es, das Steroidmetabolom der Maus zu ermitteln, was für weitere Mausmodelle, bei denen die Steroidsynthese, der Steroidmetabolismus oder der Steroidtransport beeinflusst ist, von enormer Wichtigkeit ist. Dies ist sehr wichtig, da vorläufige Studien zeigten, dass es erhebliche Unterschiede zwischen dem Steroidmetabolismus der Maus und des Menschen gibt. So produziert die Maus in der Nebenniere Corticosteron anstelle von Cortisol, welches das Produkt der humanen Nebenniere ist. Mäuse metabolisieren außerdem das Corticosteron bevorzugt zu stark polaren Metaboliten, wohingegen der Mensch weniger polare Metaboliten

im Urin aufweist. Interessant ist außerdem, dass sulfatierte Steroide bisher bei der Maus nicht im Fokus des Interesses standen und somit ein vollkommen neues Gebiet der Steroidanalyse bei der Maus betreten werden wird. Eine Microarray-Analyse der *Slc10a6*-Knockout-Maus wird den Einfluss des *Slc10a6*-Gens auf die Hoch- bzw. Herunterregulierung anderer Gene und somit kompensatorische Mechanismen des *Slc10a6*-Gen-Knockouts aufzeigen. Dies wird weitere interessante Einblicke in den Steroidmetabolismus der Maus liefern. Die *Slc10a6*-Knockout-Maus stellt daher ein wichtiges Werkzeug nicht nur für die Untersuchung der physiologischen und pathologischen Funktion des SOATs/Soats dar, sondern auch für den Steroidmetabolismus der Maus im Allgemeinen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene natürlich vorkommende SNPs des *SLC10A6*-Gens untersucht und einer ermittelt, der den Sortierungsprozess des Proteins im Zellkulturmodell stört und Auswirkungen auf die Transportfunktion des Proteins hat. Um weitere Daten für eine mögliche klinische Relevanz dieses SNPs L204F zu bekommen, werden Hodenbiopsien auf diesen SNP hin genotypisiert. Hierbei werden einerseits generelle Daten zum Auftreten dieser Mutante in einer natürlichen Population generiert, andererseits aber auch eine potentielle Korrelation des SNPs mit Bildern der gestörten Spermatogenese oder der Hypospermatogenese ermittelt. Da für das *SLC10A6*-Gen mittlerweile eine große Anzahl an natürlich vorkommenden SNPs bekannt ist, werden diese zukünftig systematisch auf Abnormalitäten in Bezug auf Expression, Lokalisation und Transportfunktion überprüft und gegebenenfalls das Patientengut wie beim L204F-SNP auf diese Polymorphismen hin gescreent.

Ein weiteres Zukunftsziel ist das bessere Verständnis des Transportvorgangs des SOAT-Proteins. Hierfür sollen weitere potentielle Substrate des SOATs in der LC-MS/MS getestet werden, um ein besseres Verständnis der Struktur-Funktion-Beziehung des SOAT-Proteins und seiner Substrate zu erlangen. Zu den möglichen Substraten gehören neben CS auch Testosteronsulfat, 17-Hydroxypregnenolonsulfat, Androsteronsulfat und Epiandrosteronsulfat. All diese zukünftig erhobenen Daten werden maßgeblich zu einem besseren Verständnis der Funktion des SOAT-/Soat-Proteins im Organismus beitragen. Zusätzlich kann mit Hilfe dieser Studien die potentielle Rolle von SOAT als *Drug Target* besser definiert werden. Ziel ist es, in Zukunft nicht nur die physiologische, sondern auch die pathologische Rolle des SOATs/Soats im Organismus zu verstehen und diese gezielt beeinflussen zu können.

6 Zusammenfassung

Sulfatierte Steroide sind aufgrund ihrer hydrophilen Eigenschaften im Gegensatz zu den unkonjugierten Steroiden nicht in der Lage, eigenständig die Zellmembran mittels Diffusion zu durchdringen. Sie sind daher auf Transportsysteme angewiesen, die sie in die Zielzelle hineinbringen. Innerhalb der Zelle können sie von der StS in freie, hormonell aktive Form überführt werden, über den spezifische Rezeptoren mit der DNA interagieren und eine hormonelle Zellantwort initiieren und modulieren. Dieser sogenannte *Sulfatase Pathway* wird in der Literatur als alternativer Weg der Steroidhormonversorgung in intrakrinologisch aktiven Organen wie dem Hoden oder der Haut diskutiert und in den Zusammenhang mit pathologischen Befunden wie dem hormonabhängigen Mammakarzinom in Verbindung gebracht. In dieser Arbeit wurden der *Sulfatase Pathway* im Hoden untersucht. Hierzu wurden vier potentielle Kandidatentransporter (OATP6A1, OATP1C1, OSCP1 und SOAT) ausgewählt und in Expressionsanalysen und Transportstudien näher charakterisiert. Es zeigte sich, dass alle vier ausgewählten Transportproteine eine prädominante, oder im Fall des OATP1C1, dominante Expression im Hoden aufwiesen. Im Rahmen der funktionellen Charakterisierung stellte sich heraus, dass SOAT der vielversprechendste Kandidat für die Einbindung in den *Sulfatase Pathway* darstellte. Sowohl die beiden OATP-Proteine wie auch das OSCP1-Protein zeigten in den durchgeführten Transportstudien weder in stabil transfizierten HEK293-Zellen, noch im *Xenopus laevis* Oozyten-Expressionsmodell eine Transportaktivität für die sulfatierten Steroide DHEAS und E₁S, so dass von einer weiteren Untersuchung dieser Proteine abgesehen wurde. SOAT hingegen transportiert eine Vielzahl sulfatierter Steroide. Um sein Substratspektrum zu erweitern, wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. S. Wudy, Gießen, die LC-MS/MS für die Analyse sulfatierter Steroide aus Zelllysaten etabliert. Mit Hilfe dieser neuen analytischen Möglichkeit wurde erstmals gezeigt, dass SOAT intakte Steroidsulfate in HEK293-Zellen hineintransportiert. Ferner konnten mit E₂S und Androstendiol-3-sulfat zwei neue Substrate des SOAT-Proteins identifiziert werden. Beim Einsatz von Steroidmischen, die E₁S, PREGS und DHEAS in wechselnden Konzentrationen enthielten zeigte sich eine, von der Konzentration der Substanz in der Messlösung abhängige Aufnahme der Substrate. Die Aufnahme von E₁S kann außerdem durch freies E₁ gesteigert werden, wohingegen Testosteron keinen Einfluss auf die Aufnahmemenge der einzelnen Steroidsulfate zur Folge hatte. Diese Daten zeigen, dass sowohl E₁S wie auch PREGS und DHEAS ago-allosterische Modulatoren des SOAT-Proteins darstellen. Die LC-MS/MS ermöglichte somit weitere Einblicke in das Transportverhalten des SOAT-Proteins unter physiologischen Bedingungen und stellt ein neues Analyse-Tool für die Identifizierung weiterer Substrate des SOATs dar.

Neben der Untersuchung des SOAT-Wildtyp-Proteins erfolgte auch die Evaluierung verschiedener natürlich vorkommender SNPs im *SLC10A6*-Gen. Hierbei wurde beim SOAT-L204F-Polymorphismus eine signifikant erniedrigte maximale Aufnahmegeschwindigkeit im Vergleich zum SOAT-Wildtyp festgestellt, die vermutlich durch eine unzureichende Sortierung des polymorphen Proteins in die Zellmembran der untersuchten HEK293-Zellen hervorgerufen wird. Die Lokalisation der SOAT-Proteine erfolgte mit dem anti-SOAT₃₁₁₋₃₇₇ Antikörper, der im Rahmen dieser Arbeit sowohl für den Western Blot als auch für die Immunfluoreszenz validiert wurde. Das membranständige SOAT-Protein wurde mit dem SOAT₂₋₁₇ Antiserum detektiert und ermöglichte die Kontrolle des Sortierungsprozesses der SOAT-Varianten.

Mit dieser Arbeit wurde gezeigt, dass SOAT ein breites Spektrum an intakten Steroidsulfaten Natrium-abhängig in die Zellen transportiert und auf Konzentrationsänderungen in Steroidgemischen mit einer Anpassung seines Transportverhaltens reagiert. Die Aufnahme der Steroidsulfate kann außerdem durch freie Steroide moduliert werden. In vorläufigen Experimenten konnte CS als weiteres potentiell Substrat identifiziert werden.

Aufgrund der exklusiven Expression des SOATs im Hoden, die ausschließlich in den Keimzellen stattfindet, und seinem sehr selektives Substratspektrum ist von einer wichtigen physiologischen Funktion dieses Proteins im Hoden auszugehen. Hierfür spricht auch seine reduzierte Expression in verschiedenen Formen der gestörten Spermatogenese und das Auftreten funktionell veränderter SNPs. Seine deutliche Expression in der Haut deutet auch in diesem, intrakrinologisch aktivem Organ auf eine bedeutende Funktion im Rahmen der lokalen Steroidhormonversorgung hin.

Um nun die physiologische und pathologische Bedeutung des SOATs final zu klären, wurde ein *Slc10a6*-Knockout-Maus-Modell generiert, was in weiterführenden Studien vor allem in Hinblick auf den Hoden, die Haut und den Steroidmetabolismus charakterisiert werden soll. SOAT hat das Potential zum *Drug Target*, was durch diese Arbeit bekräftigt werden konnte. Das *Slc10a6*-Knockout-Maus-Modell wird hierzu weitere Erkenntnisse liefern, die es ermöglichen SOAT als *Drug Target* zu nutzen.

7 Summary

Free unbound steroids can penetrate the cell membrane by diffusion, bind to the nuclear receptor and initiate a cellular response. In contrast to that, sulfated steroid hormones rely on membrane uptake carriers, which import the sulfoconjugated steroids into the cell, where they can be (re)activated by the catalytic activity of the steroid sulfatase (StS). In the literature, the so called sulfatase pathway is discussed as an alternative way for the local supply of certain organs (testis and skin) with steroid hormones and to play a role in several diseases such as breast cancer or X-linked ichthyosis. The aim of the current study was to determine the role of the sulfatase pathway in the testis. OATP6A1, OATP1C1, OSCP1 and SOAT were selected as potential candidate carriers for steroid sulfate uptake and investigated by expression analyses and transport studies. OATP6A1, OSCP1 and SOAT were predominantly expressed in the human testis, whereas OATP1C1 showed highest expression in brain and a moderate expression in testis. Functional analyses revealed, that SOAT might be the most important steroid sulfate carrier in this study due to the fact that neither the OATPs nor the OSCP1 protein showed transport activity for sulfated steroids in the transport studies although two different expression systems (HEK293 cells and *Xenopus laevis* oocytes) were used for functional characterisation. In contrast to that, SOAT transported several sulfated steroids, thus further investigations concentrated on SOAT. To expand the substrate pattern of SOAT a novel LC-MS/MS procedure was established in cooperation with Prof. Dr. S. Wudy, Giessen, which is able to detect the cellular uptake of intact sulfoconjugated steroid molecules. With this new technique, E₂S and androstenediol-3-sulfate were identified as novel substrates of SOAT. Furthermore steroid mixtures containing various concentrations of sulfated and free steroids were investigated using LC-MS/MS, showing that the uptake of SOAT substrates occurs in a substrate- and concentration-dependent manner. The studies ruled out that E₁S, PREGS and DHEAS are all ago-allosteric modulators of SOAT. Additionally, the impact of free steroids on the uptake properties of SOAT was analysed. It was demonstrated that E₁ is able to stimulate the E₁S uptake whereas testosterone does not influence the transport activity of SOAT. These results confirmed that on one hand the LC-MS/MS technique is a useful tool to analyse simulated physiological conditions in the testis using various free and sulfated steroid hormones and on the other hand it enables the identification of novel substrates of SOAT without using radiolabelled compounds.

In addition to the SOAT wild-type, several naturally occurring single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the *SLC10A6* gene were investigated. This part of the study showed, that the SOAT L204F mutant exhibited aberrant transport kinetics with a significantly reduced maximum velocity of the DHEAS uptake in contrast to SOAT wild-type and SOAT I114V mutant.

Abnormal transport kinetics of the SOAT L204F mutant seem to be caused by a disturbed sorting process of the mutated protein. For localisation studies of wild-type and mutant proteins a newly validated antibody was used. The validation of the anti-SOAT_{3 11-377} antibody was done by western blot analyses, peptid matching studies and immunocytochemistry using immunofluorescent microscopy of the stably transfected SOAT-HEK293 cell lines containing the wild-type or mutant genes.

Due to the exclusive expression of SOAT in germ cells of the human testis and its highly selective substrate pattern it can be considered that SOAT plays an important role in the physiology of the human testis. This suggestion is reinforced by the reduced expression of SOAT in different pictures of impaired spermatogenesis and the appearance of functional abnormal SNPs in the *SLC10A6* gene. In addition to the testis, SOAT might have physiological significance in the skin, where it is also highly expressed. Considering earlier studies of SOAT function and localisation, SOAT seems to be a potential drug target which was confirmed by this study.

In order to clarify the physiological and pathological role of SOAT in the human organism a *Slc10a6*-knockout mouse model was generated and will be further investigated with special focus on intracrine active organs like testis and skin and on the steroid metabolism of the knockout mice. The *Slc10a6*-knockout mouse model will help to determine the physiological role of SOAT in certain organs and will elucidate the suitability of SOAT as a drug target.

8 Danksagungen

Es ist geschafft: Das Werk ist vollendet! Auch wenn das Schreiben letztendlich die Fleißarbeit des Doktoranden ist, zum Gelingen dieser Arbeit haben doch einige beigetragen, bei denen ich mich an dieser Stelle bedanken möchte.

Den Anfang macht „der Chef“, Prof. Dr. Joachim M. Geyer. Du hast mir bereits zu Beginn der Promotion das nötige Vertrauen entgegen gebracht, dieses besondere Projekt erfolgreich zu bearbeiten. Neben den zahlreichen Diskussionen haben auch deine Ideen und kritischen Anmerkungen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Lieber Achim, du hast mir die Präsentation meiner Daten auf verschiedensten Kongressen ermöglicht (auch wenn so manches Poster mich an den Rand der Verzweiflung gebracht hat...ich sage nur zwei Projektleiter, die gegensätzlicher nicht sein könnten) und meine eigene Fort- und Weiterbildung immer unterstützt. Hierfür möchte ich dir an dieser Stelle herzlich danken!

Herrn Prof. Dr. Ernst Petzinger, Ihnen, dem ehemaligen geschäftsführenden Direktor des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie möchte ich auch meinen besonderen Dank aussprechen. Mit Ihren kritischen und oft unerwarteten Fragen haben Sie mich nicht nur zum Nachdenken angeregt, sondern auch mein wissenschaftliche Argumentieren und Schlussfolgern gefördert. Ihr Humor und der Stolz auf „Ihre Truppe“ trug maßgeblich zur guten Stimmung im Institut bei und führte zu vielen gemeinsamen Lachern, die gerade in frustrierenden Phasen das Leben wieder schön machten. Ich danke Ihnen für Ihr Vertrauen, was Sie mir trotz meines Piercings entgegengebracht haben:-).

Ein ganz großes Dankeschön geht natürlich an die Veterinäranatomie, -histologie und –embryologie, insbesondere an Herrn Prof. Dr. Martin Bergmann, Frau Dr. Daniela Fietz und Frau Britta Wapelhorst für die schöne Zusammenarbeit! Auch wenn es nicht immer leicht war/ist, es zwei Chefs Recht zu machen, freue ich mich, dass wir auch weiterhin zusammen am SOAT forschen werden. Denn wie heißt es immer so schön: Geht doch!

Der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Stefan Wudy (Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie des UKGM) möchte ich ebenfalls danken. Sein Team, insbesondere Frau Dr. Christina Galuska und Herr Alberto Sánchez Guijo führten die zahlreichen LC-MS/MS Messungen durch, die eine Großteil dieser Arbeit ausmachen und mir Einblicke in die physiologischen Gegebenheiten im Körper ermöglichten. Muchas gracias!

Frau Dorothee von Schnakenburg, danke für die Unterstützung im Rahmen von Vertragsabschlüssen, Folgeverträgen, Reisekostenabrechnungen, Schnaki, du hast die universitäre Bürokratie für mich durchaus leichter gemacht.

Herrn Christoph Zimmermann, Ihnen danke ich für Ihre schnelle Hilfe bei jeglichen Computerfragen und die Erstellung meiner „Wunschwärmeplatte“.

Ich möchte mich bei dir, Herrn Dr. Daniel Zahner bedanken, dass du mir alle Fragen bezüglich der Haltung und Unterbringung der SOAT-KO-Maus geduldig und ausführlich beantwortet hast. Ein besonderer Dank gilt auch Frau Manuela Binz, du hattest immer ein wachsames Auge auf meine Mäuschen und hast mir so einiges bei unseren wöchentlichen Begutachtungen der Mäuse beigebracht. Danke Ela!

Meiner Kollegin Frau Jasmin Kranz gebührt der Dank für die Hilfe bei meinen ersten Laborschritten im Rahmen von PCR und quantitativer Realtime-PCR. Frau Stephanie Schmidt danke ich für die Einführung und die Tipps zum Hantieren mit Froscheiern.

Herrn Dr. Jörg Alber, dir möchte ich für die vielen guten Gespräche danken und den Einsatz, mit dem du Dich für die Behebung der Probleme anderer einsetzt. Ohne dich wäre ich so manches Mal an den Tücken des Labors gescheitert. Danke Jörg!

Ein ganz großes Dankeschön geht an die guten Seelen des Instituts: Anita Neubauer, Regina Leidolf und Klaus Schuh, ohne Euch sähe das Tagesgeschäft ganz schön alt aus. Vielen Dank für Eure Unterstützung, Hilfe und aufmunternden Worte! Und dir Regina auch ein besonderer Dank für die kulturellen Unternehmungen außerhalb der Doktorarbeit! Immer wieder gern!

Vielen Dank an unsere Putzfrau Birgit Kauß, du bist immer zur Stelle, wenn man dich braucht und erledigst die vielen Kleinigkeiten, die man leider zu oft für selbstverständlich ansieht. Dir sei an dieser Stelle herzlichst gedankt!

Als nächstes möchte ich mich bei meinem ersten Zimmer bedanken: Dr. Gary Grosser und Luise-Charlotte Straehle. Ich habe mich im „Keller“ immer sehr wohl gefühlt, was zum einen am ständigen Bananen-Apfeltee-Karamell-Cappuccino-Geruch, zum anderen aber natürlich auch an euch beiden, überaus netten, lustigen und fachlich immer mit Rat und Tat zur Seite stehenden Mitbewohnern lag. Vielen Dank Euch zweien!

Bei meiner Kollegin Helene Schweigmann möchte ich mich für die gute Kooperation im Rahmen der Forschergruppe bedanken. Die vielen Kongressbesuche und GGL-Veranstaltungen wären ohne Dich nicht so schön gewesen!

Auch meinem zweiten Zimmer, stellvertretend hier Frau Jana Bartholomeyzik, danke ich für die schöne, unvergessliche Zeit!

Man sagt immer, das Beste kommt zum Schluss und so möchte ich es auch bei diesen Danksagungen halten. Mein größter Dank geht an die vier Menschen, die meine Doktorarbeit immer unterstützt haben, in guten wie in schlechten Zeiten zur Tür rein kamen, und entweder durch Unmengen an aufmunternden Karten und Schokolade die Stimmung wieder aufzuhellen vermochten, oder sich einfach mit mir über DFG-Bescheide, accepted Paper, Posterpreise oder auch nur eine funktionierende Genotypisierungs-PCR freuen konnten. Ich möchte den Personen danken, die mir nicht nur die Molekularbiologie, die Proteinbiochemie, die Zellkultur, die höhere Mathematik und die Welt der Labormäuse nahegebracht haben, sondern die sich auch als Freunde im wahren Leben auszeichnen: Dr. Barbara Döring, Julia Aretz und Sabrina Elmshäuser. Danke!

Wer ist nun die vierte Person wird sich der ein oder andere fragen: Nun, als wirklich letztes möchte ich meinem Freund und baldigem Ehemann Christian Bäcker Danke sagen, der bereits während des Studiums und auch jetzt während der Promotion immer versucht hat, mir den Rücken frei zu halten und vollstes Vertrauen in mich hatte, dass ich das schaffe. Hab Dich lieb, Kika!

9 Anhang

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in der kodierenden Region des humanen SOAT

In der Tabelle sind die SNPs in der kodierenden Region des SLC10A6-Gens aufgeführt, die zu einem Aminosäureaustausch führen. Die SNPs sind mit „rs“ und einer Nummer benannt. Ferner sind die Position in der mRNA, die ausgetauschte Base und die veränderte Aminosäure (im Einbuchstabencode) angegeben. Außerdem ist bei einigen SNPs die Allelverteilung bekannt. Bisher ist keiner der SNPs funktionell bewertet worden. n.d. = no data available.

* Mittelwerte aller in der SNP-Datenbank vorhandenen Daten zu diesem Polymorphismus.

SNP	mRNA-Position	Basen-austausch	AS-Austausch	Genotyp*	Allel*
rs17694522	165	TCC → TTC	S6F	A/A: 0,006 A/G: 0,039 G/G: 0,960	A: 0,021 G: 0,979
rs139477399	182		P12S	n.d.	n.d.
rs202237551	218	CTG → GTG	L24V	n.d.	n.d.
rs200863577	229	CAT → CAG	H27Q	A/A: 0,998 A/C: 0,002 C/C: -	A: 0,999 C: 0,001
rs200542431	245	GTT → ATT	V33I	C/C: 0,998 C/T: 0,002 T/T: -	C: 0,999 T: 0,001
rs150585610	260	TCC → GCC	S38A	A/A: 0,998 A/C: 0,002 C/C: -	A: 0,999 C: 0,001
rs376640232	300	TGT → TAT	C51Y	n.d.	n.d.
rs373465762	327	TCG → TGG	S60W	n.d.	n.d.
rs374782349	383	ATG → GTG	M79V	n.d.	n.d.
rs200164392	386	CCT → GCT	P80A	n.d.	n.d.
rs144287611	393	ACA → ATA	T82I	A/A: - A/G: 0,000 G/G: 1,000	A: 0,000 G: 1,000
rs140433007	396	GCT → GTT	A83V	A/A: - A/G: 0,000 G/G: 1,000	A: 0,000 G: 1,000
rs141756668	457		M103I	n.d.	n.d.
rs148050314	468	CCG → CTG	P107L	A/A: - A/G: 0,000 G/G: 1,000	A: 0,000 G: 1,000

rs144612845	473	GGC → AGC	G109S	C/C: 0,999 C/T: 0,001 T/T: -	C: 0,999 T: 0,001
rs369966485	487	AAC → AAG	N113K	n.d.	n.d.
rs13106574	488	ATT → GTT	I114V	C/C: 0,009 C/T: 0,378 T/T: 0,610	C: 0,192 T: 0,776
rs368944610	516	ATG → ACG	M123T	n.d.	n.d.
rs200680340	527	ATC → GTC	I127V	n.d.	n.d.
rs145019888	597	TGG → TTG	W150L	A/A: - A/C: 0,000 C/C: 1,000	A: 0,000 C: 1,000
rs374917571	629	CCT → TCT	P161S	n.d.	n.d.
rs368767682	647	ATT → GTT	I167V	n.d.	n.d.
rs142848271	650	ACC → GCC	T168A	n.d.	n.d.
rs199832707	680	TTT → GTT	F178V	n.d.	n.d.
rs200815451	683	GGT → AGT	G179S	n.d.	n.d.
rs72874286	702	AGA → ACA	R185T	C/C: 0,330 C/G: 0,670 G/G: 0	C: 0,665 G: 0,335
rs140551884	719	AAA → CAA	K191Q	G/G: - G/T: 0,000 T/T: 1,000	G: 0,000 T: 1,000
rs112025158	735	ATT → ACT	I196T	A/G: 1,000	A: 0,500 G: 0,500
rs57559561	743	GTT → ATT	V199I	C/C: 0,972 C/T: 0,028 T/T: 0,000	C: 0,968 T: 0,036
rs61734716	758	CTC → TTC	L204F	A/A: 0,027 G/G: 0,973	A: 0,020 G: 0,980
rs201421765	773	GCA → ACA	A209T	n.d.	n.d.
rs373402918	795	GCG → GTG	A216V	n.d.	n.d.
rs369294275	819	ATC → ACC	I224T	n.d.	n.d.
rs376017123	870	GGT → GAT	G241D	n.d.	n.d.
rs145639709	891	ACC → ATC	T248I	n.d.	n.d.
rs200494131	961	ATC → ATG	I271M	n.d.	n.d.
rs37679000	967	ATG → ATC	M273I	n.d.	n.d.
rs144273089	1028	GGA → AGA	G294R	C/C: 0,997 C/T: 0,003 T/T: -	C: 0,999 T: 0,001

rs148636363	1043	ATA → GTA	I299V	C/C: - C/T: 0,000 T/T: 1,000	C: 0,000 T: 1,000
rs373961468	1070	TAT → AAT	T308A	n.d.	n.d.
rs370848977	1099	AAC → AAG	N317K	n.d.	n.d.
rs200983064	1154	ACT → GCT	T336A	n.d.	n.d.
rs200406516	1229	ATG → GTG	M361V	C/T: 0,002 T/T: 0,098	C: 0,001 T: 0,999
rs139158966	1240	CAC → CAG	H364Q	C/C: - C/G: 0,001 G/G: 0,999	C: 0,001 G: 0,999
rs146262257	1247	CTC → TTC	L367F	A/A: - A/G: 0,000 G/G: 1,000	A: 0,000 G: 1,000

10 Literaturverzeichnis

- Abbaszade IG, Arensburg J, Park CH, Kasa-Vubu JZ, Orly J, Payne AH (1997) Isolation of a new mouse 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase isoform, 3beta-HSD VI, expressed during early pregnancy. *Endocrinology*. 138:1392-1399.
- Abe T, Kakyo M, Tokui T, Nakagomi R, Nishio T, Nakai D, Nomura H, Unno M, Suzuki M, Naitoh T, Matsuno S, Yawo H (1999) Identification of a novel gene family encoding human liver-specific organic anion transporter LST-1. *J.Biol.Chem.* 274:17159-17163.
- Adamski J, Normand T, Leenders F, Monte D, Begue A, Stehelin D, Jungblut PW, de LY (1995) Molecular cloning of a novel widely expressed human 80 kDa 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase IV. *Biochem.J.* 311:437-443.
- Adamusova E, Cais O, Vyklicky V, Kudova E, Chodounska H, Horak M, Vyklicky L, Jr. (2013) Pregnenolone sulfate activates NMDA receptor channels. *Physiol.Res.* 20;62:731-736.
- Aerts-Kaya FS, Visser TP, Arshad S, Frincke J, Stickney DR, Reading CL, Wagemaker G (2012) 5-Androstene-3beta,17beta-diol promotes recovery of immature hematopoietic cells following myelosuppressive radiation and synergizes with thrombopoietin. *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.* 84:e401-e407.
- Agarwal A und Allamaneni SS (2005) Disruption of spermatogenesis by the cancer disease process. *J.Natl.Cancer Inst.Monogr.* 9-12.
- Akamatsu H, Zouboulis CC, Orfanos CE (1992) Control of human sebocyte proliferation in vitro by testosterone and 5-alpha-dihydrotestosterone is dependent on the localization of the sebaceous glands. *J.Invest.Dermatol.* 99:509-511.
- Alber J, Jiang L, Geyer J (2013) CaRch1p does not functionally interact with the high-affinity Ca(2+) influx system (HACS) of *Candida albicans*. *Yeast.* 30:449-457.
- Albrecht ED und Pepe GJ (1990) Placental steroid hormone biosynthesis in primate pregnancy. *Endocr.Rev.* 11:124-150.
- Alkemade A, Friesema EC, Kalsbeek A, Swaab DF, Visser TJ, Fliers E (2011) Expression of thyroid hormone transporters in the human hypothalamus. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 96:E967-E971.

- Amarouch MY, Syam N, Abriel H (2013) Biochemical, single-channel, whole-cell patch clamp, and pharmacological analyses of endogenous TRPM4 channels in HEK293 cells. *Neurosci.Lett.* 541:105-10.:105-110.
- Ananthanarayanan M, Ng OC, Boyer JL, Suchy FJ (1994) Characterization of cloned rat liver Na(+)-bile acid cotransporter using peptide and fusion protein antibodies. *Am.J.Physiol.* 267:G637-G643.
- Andersson S und Russell DW (1990) Structural and biochemical properties of cloned and expressed human and rat steroid 5 alpha-reductases. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 87:3640-3644.
- Ando Y, Yamaguchi Y, Hamada K, Yoshikawa K, Itami S (1999) Expression of mRNA for androgen receptor, 5alpha-reductase and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase in human dermal papilla cells. *Br.J.Dermatol.* 141:840-845.
- Arensburg J, Payne AH, Orly J (1999) Expression of steroidogenic genes in maternal and extraembryonic cells during early pregnancy in mice. *Endocrinology.* 140:5220-5232.
- Ashcroft GS, Dodsworth J, van BE, Tarnuzzer RW, Horan MA, Schultz GS, Ferguson MW (1997) Estrogen accelerates cutaneous wound healing associated with an increase in TGF-beta1 levels. *Nat.Med.* 3:1209-1215.
- Auchus RJ, Lee TC, Miller WL (1998) Cytochrome b5 augments the 17,20-lyase activity of human P450c17 without direct electron transfer. *J.Biol.Chem.* 273:3158-3165.
- Bain PA, Yoo M, Clarke T, Hammond SH, Payne AH (1991) Multiple forms of mouse 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase and differential expression in gonads, adrenal glands, liver, and kidneys of both sexes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88:8870-8874.
- Baird DT und Guevara A (1969) Concentration of unconjugated estrone and estradiol in peripheral plasma in nonpregnant women throughout the menstrual cycle, castrate and postmenopausal women and in men. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 29:149-156.
- Banerjee A, Ray A, Chang C, Swaan PW (2005) Site-directed mutagenesis and use of bile acid-MTS conjugates to probe the role of cysteines in the human apical sodium-dependent bile acid transporter (SLC10A2). *Biochemistry.* 44:8908-8917.

- Banerjee S, Chambliss KL, Mineo C, Shaul PW (2014) Recent insights into non-nuclear actions of estrogen receptor alpha. *Steroids*. 81:64-9.
- Barracough CA und Haller EW (1970) Positive and negative feedback effects of estrogen on pituitary LH synthesis and release in normal and androgen-sterilized rats. *Endocrinology*. 86:542-551.
- Baulieu EE, Alberga A, Jung I, Lebeau MC, Mercier-Bodard C, Milgrom E, Raynaud JP, Raynaud-Jammet C, Rochefort H, Truong H, Robel P (1971) Metabolism and protein binding of sex steroids in target organs: an approach to the mechanism of hormone action. *Recent Prog.Horm.Res.* 27:351-419.
- Beato M (1989) Gene regulation by steroid hormones. *Cell*. 56:335-344.
- Beato M und Klug J (2000) Steroid hormone receptors: an update. *Hum.Reprod.Update*. 6:225-236.
- Bergmann M und Kliesch S (2010) Testicular Biopsy and Histology. In: *Andrology. Male Reproductive Health and Dysfunction*, 3rd, S.155-167, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, ISBN 978-3-540-78354-1.
- Bergmann M, Nashan D, Nieschlag E (1989) Pattern of compartmentation in human seminiferous tubules showing dislocation of spermatogonia. *Cell Tissue Res*. 256:183-190.
- Bergmann M (2005) Spermatogenese-Physiologie und Pathophysiologie. *Urologe A*. 44:1131-1138.
- Bijsmans IT, Bouwmeester RA, Geyer J, Faber KN, van de Graaf SF (2012) Homo- and heterodimeric architecture of the human liver Na(+)-dependent taurocholate co-transporting protein. *Biochem.J*. 441:1007-1015.
- Bird I und Conley A (2002) *Genetics of steroid biosynthesis and function*, Taylor & Francis, London, ISBN 0-415-27878-3
- Blakeman PJ, Hilton P, Bulmer JN (2000) Oestrogen and progesterone receptor expression in the female lower urinary tract, with reference to oestrogen status. *BJU.Int.* 86:32-38.
- Bleau G und Vandenheuvel WJ (1974) Desmosteryl sulfate and desmosterol in hamster epididymal spermatozoa. *Steroids*. 24:549-556.

- Bleau G, Bodley FH, Longpre J, Chapdelaine A, Roberts KD (1974) Cholesterol sulfate. I. Occurrence and possible biological function as an amphipathic lipid in the membrane of the human erythrocyte. *Biochim.Biophys.Acta* 352:1-9.
- Bleau G, Vandenheuvel WJ, Andersen OF, Gwatkin RB (1975) Desmosteryl sulphate of hamster spermatozoa, a potent inhibitor of capacitation in vitro. *J.Reprod.Fertil.* 43:175-178.
- Boitani C und Puglisi R (2008) Selenium, a key element in spermatogenesis and male fertility. *Adv.Exp.Med.Biol.* 636:65-73.
- Boizel R, de PE, Cathiard AM, Halimi S, Bost M, Berthezene F, Saez JM (1986) Pattern of plasma levels of cortisol, dehydroepiandrosterone and pregnenolone sulphate in normal subjects and in patients with homozygous familial hypercholesterolaemia during ACTH infusion. *Clin.Endocrinol.(Oxf).* 25:363-371.
- Bonney RC, Scanlon MJ, Reed MJ, Jones DL, Beranek PA, James VH (1984) Adrenal androgen concentrations in breast tumours and in normal breast tissue. The relationship to oestradiol metabolism. *J.Steroid Biochem.* 20:501-504.
- Bonser J, Walker J, Purohit A, Reed MJ, Potter BV, Willis DS, Franks S, Mason HD (2000) Human granulosa cells are a site of sulphatase activity and are able to utilize dehydroepiandrosterone sulphate as a precursor for oestradiol production. *J.Endocrinol.* 167:465-471.
- Borg CL, Wolski KM, Gibbs GM, O'Bryan MK (2010) Phenotyping male infertility in the mouse: how to get the most out of a 'non-performer'. *Hum.Reprod.Update.* 16:205-224.
- Bose HS, Lingappa VR, Miller WL (2002) The steroidogenic acute regulatory protein, StAR, works only at the outer mitochondrial membrane. *Endocr.Res.* 28:295-308.
- Brock BJ und Waterman MR (1999) Biochemical differences between rat and human cytochrome P450c17 support the different steroidogenic needs of these two species. *Biochemistry.* 38:1598-1606.
- Brodie A, Inkster S, Yue W (2001) Aromatase expression in the human male. *Mol.Cell.Endocrinol.* 178:23-28.

- Bryan N, Andrews KD, Loughran MJ, Rhodes NP, Hunt JA (2011) Elucidating the contribution of the elemental composition of fetal calf serum to antigenic expression of primary human umbilical-vein endothelial cells in vitro. *Biosci.Rep.* 31:199-210.
- Burck PJ und Zimmerman RE (1980) The inhibition of acrosin by sterol sulphates. *J.Reprod.Fertil.* 58:121-125.
- Burckhardt BC und Burckhardt G (2003) Transport of organic anions across the basolateral membrane of proximal tubule cells. *Rev.Physiol Biochem.Pharmacol.* 146:95-158.
- Burger HG (2002) Androgen production in women. *Fertil.Steril.* 77 Suppl 4:S3-S5.
- Burger S, Döring B, Hardt M, Beuerlein K, Gerstberger R, Geyer J (2011) Co-expression studies of the orphan carrier protein Slc10a4 and the vesicular carriers VACHT and VMAT2 in the rat central and peripheral nervous system. *Neuroscience.* 193:109-21.
- Burstein S und Gut M (1976) Intermediates in the conversion of cholesterol to pregnenolone: kinetics and mechanism. *Steroids.* 28:115-131.
- Cao Z, West C, Norton-Wenzel CS, Rej R, Davis FB, Davis PJ, Rej R (2009) Effects of resin or charcoal treatment on fetal bovine serum and bovine calf serum. *Endocr.Res.* 34:101-108.
- Carreau S, Lambard S, Delalande C, Denis-Galeraud I, Bilinska B, Bourguiba S (2003) Aromatase expression and role of estrogens in male gonad : a review. *Reprod.Biol.Endocrinol.* 1:35.
- Carreau S, de VC, Galeraud-Denis I (2008) Aromatase and estrogens in man reproduction: a review and latest advances. *Adv.Med.Sci.* 53:139-144.
- Carreau S und Hess RA (2010) Oestrogens and spermatogenesis. *Philos.Trans.R.Soc.Lond.B Biol.Sci.* 365:1517-1535.
- Carreau S, Bouraima-Lelong H, Delalande C (2012a) Estrogen, a female hormone involved in spermatogenesis. *Adv.Med.Sci.* 57:31-36.
- Carreau S, Bouraima-Lelong H, Delalande C (2012b) Role of estrogens in spermatogenesis. *Front Biosci.(Elite.Ed)* 4:1-11.
- Castagna M (1983) Transmembrane signalling systems. *Biomed.Pharmacother.* 37:380-386.

- Cavaco JE, Laurentino SS, Barros A, Sousa M, Socorro S (2009) Estrogen receptors alpha and beta in human testis: both isoforms are expressed. *Syst.Biol.Reprod.Med.* 55:137-144.
- Chang C, Chen YT, Yeh SD, Xu Q, Wang RS, Guillou F, Lardy H, Yeh S (2004) Infertility with defective spermatogenesis and hypotestosteronemia in male mice lacking the androgen receptor in Sertoli cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 101:6876-6881.
- Chaudhri RA, Hadadi A, Lobachev KS, Schwartz Z, Boyan BD (2014a) Estrogen Receptor-alpha 36 Mediates the Anti-apoptotic Effect of Estradiol in Triple Negative Breast Cancer Cells via a Membrane-Associated Mechanism. *Biochim.Biophys.Acta.* 1843:2796-806.
- Chaudhri RA, Schwartz N, Elbaradie K, Schwartz Z, Boyan BD (2014b) Role of ERalpha36 in membrane-associated signaling by estrogen. *Steroids.* 81:74-80.
- Chen W, Thiboutot D, Zouboulis CC (2002) Cutaneous androgen metabolism: basic research and clinical perspectives. *J.Invest Dermatol.* 119:992-1007.
- Cheng CK und Leung PC (2005) Molecular biology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and their receptors in humans. *Endocr.Rev.* 26:283-306.
- Christie DM, Dawson PA, Thevananther S, Shneider BL (1996) Comparative analysis of the ontogeny of a sodium-dependent bile acid transporter in rat kidney and ileum. *Am.J.Physiol.* 271:G377-G385.
- Chung BC, Matteson KJ, Voutilainen R, Mohandas TK, Miller WL (1986) Human cholesterol side-chain cleavage enzyme, P450scc: cDNA cloning, assignment of the gene to chromosome 15, and expression in the placenta. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 83:8962-8966.
- Clarke IJ und Cummins JT (1985) GnRH pulse frequency determines LH pulse amplitude by altering the amount of releasable LH in the pituitary glands of ewes. *J.Reprod.Fertil.* 73:425-431.
- Clermont Y und Perey B (1957) Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. *Am.J.Anat.* 100:241-267.
- Clermont Y (1963) The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am.J.Anat.* 112:35-51.

- Compagnone NA, Bulfone A, Rubenstein JL, Mellon SH (1995) Expression of the steroidogenic enzyme P450_{scc} in the central and peripheral nervous systems during rodent embryogenesis. *Endocrinology*. 136:2689-2696.
- Conde A, Diallinas G, Chaumont F, Chaves M, Geros H (2010) Transporters, channels, or simple diffusion? Dogmas, atypical roles and complexity in transport systems. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 42:857-868.
- Conn PM, Staley D, Harris C, Andrews WV, Gorospe WC, McArdle CA, Huckle WR, Hansen J (1986) Mechanism of action of gonadotropin releasing hormone. *Annu.Rev.Physiol.* 48:495-513.
- Cooper TG (1998) Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. *J.Reprod.Fertil.Suppl.* 53:119-36..
- Courchay G, Boyera N, Bernard BA, Mahe Y (1996) Messenger RNA expression of steroidogenesis enzyme subtypes in the human pilosebaceous unit. *Skin Pharmacol.* 9:169-176.
- Craddock AL, Love MW, Daniel RW, Kirby LC, Walters HC, Wong MH, Dawson PA (1998) Expression and transport properties of the human ileal and renal sodium-dependent bile acid transporter. *Am.J.Physiol.* 274:G157-G169.
- Dacheux JL, Castella S, Gatti JL, Dacheux F (2005) Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology*. 63:319-341.
- Dai WS, Kuller LH, LaPorte RE, Gutai JP, Falvo-Gerard L, Caggiula A (1981) The epidemiology of plasma testosterone levels in middle-aged men. *Am.J.Epidemiol.* 114:804-816.
- Dawson PA, Lan T, Rao A (2009) Bile acid transporters. *J.Lipid Res.* 50:2340-2357.
- de Lacerda L, Kowarski A, Johanson AJ, Athanasiou R, Migeon CJ (1973) Integrated concentration and circadian variation of plasma testosterone in normal men. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 37:366-371.
- De Oliveira DH, Figuera TM, Bianchet LC, Kulak CA, Kulak J (2012) Androgens and bone. *Minerva Endocrinol.* 37:305-314.

- de Peretti E und Forest MG (1978) Pattern of plasma dehydroepiandrosterone sulfate levels in humans from birth to adulthood: evidence for testicular production. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 47:572-577.
- de Peretti E und Mappus E (1983) Pattern of plasma pregnenolone sulfate levels in humans from birth to adulthood. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 57:550-556.
- de Rooij DG (1998) Stem cells in the testis. *Int.J.Exp.Pathol.* 79:67-80.
- de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E (2003) Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 100:10972-10976.
- Deitcher D (2002) Exocytosis, endocytosis, and development. *Semin.Cell Dev.Biol.* 13:71-76.
- den Hollander P, Savage MI, Brown PH (2013) Targeted Therapy for Breast Cancer Prevention. *Front Oncol.* 3:250.
- Denning MF, Kazanietz MG, Blumberg PM, Yuspa SH (1995) Cholesterol sulfate activates multiple protein kinase C isoenzymes and induces granular cell differentiation in cultured murine keratinocytes. *Cell Growth Differ.* 6:1619-1626.
- Dibbelt L und Kuss E (1983) Human placental steroid-sulfatase. Kinetics of the in-vitro hydrolysis of dehydroepiandrosterone 3-sulfate and of 16 alpha-hydroxydehydroepiandrosterone 3-sulfate. *Hoppe Seylers.Z.Physiol Chem.* 364:187-191.
- Dillon JS (2005) Dehydroepiandrosterone, dehydroepiandrosterone sulfate and related steroids: their role in inflammatory, allergic and immunological disorders. *Curr.Drug Targets.Inflamm.Allergy.* 4:377-385.
- Do H, Falcone D, Lin J, Andrews DW, Johnson AE (1996) The cotranslational integration of membrane proteins into the phospholipid bilayer is a multistep process. *Cell.* 85:369-378.
- Dodziuk H (2006) Molecules with Holes - Cyclodextrins. In: *Cyclodextrins and Their Complexes, Chemistry, Analytical Methods, Applications*, S.1-30, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, ISBN 3-527-31280-3.
- Dohle GR, Colpi GM, Hargreave TB, Papp GK, Jungwirth A, Weidner W (2005) EAU guidelines on male infertility. *Eur.Urol.* 48:703-711.

- Döring, B (2009) Molekulare und funktionelle Charakterisierung des humanen Natrium-dependent organic anion transporter (SOAT). Dissertationsschrift am Institut für Biochemie der Ernährung, Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und Umweltmanagement der Justus-Liebig-Universität Gießen, VVB Laifersweiler Verlag, Gießen, ISBN 978-3-8359-5592-9.
- Dumont M, Luu-The V, de LY, Labrie F (1992a) Expression of human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in mammalian cells. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 41:605-608.
- Dumont M, Luu-The V, Dupont E, Pelletier G, Labrie F (1992b) Characterization, expression, and immunohistochemical localization of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase in human skin. *J.Invest.Dermatol.* 99:415-421.
- Durkee TJ, McLean MP, Hales DB, Payne AH, Waterman MR, Khan I, Gibori G (1992) P450(17 alpha) and P450SCC gene expression and regulation in the rat placenta. *Endocrinology.* 130:1309-1317.
- Dym M und Fawcett DW (1970) The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol.Reprod.* 3:308-326.
- Ehmcke J, Wistuba J, Schlatt S (2006) Spermatogonial stem cells: questions, models and perspectives. *Hum.Reprod.Update.* 12:275-282.
- Elias PM, Williams ML, Maloney ME, Bonifas JA, Brown BE, Grayson S, Epstein EH, Jr. (1984) Stratum corneum lipids in disorders of cornification. Steroid sulfatase and cholesterol sulfate in normal desquamation and the pathogenesis of recessive X-linked ichthyosis. *J.Clin.Invest.* 74:1414-1421.
- Engdahl C, Lagerquist MK, Stubelius A, Andersson A, Studer E, Ohlsson C, Westberg L, Carlsten H, Forsblad-d'Elia H (2014) Role of androgen and estrogen receptors for the action of dehydroepiandrosterone (DHEA). *Endocrinology.* 155:889-896.
- Evans JJ (1999) Modulation of gonadotropin levels by peptides acting at the anterior pituitary gland. *Endocr.Rev.* 20:46-67.
- Falany CN, Wheeler J, Oh TS, Falany JL (1994) Steroid sulfation by expressed human cytosolic sulfotransferases. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 48:369-375.
- Fayrer-Hosken RA, Brackett BG, Brown J (1987) Reversible inhibition of rabbit sperm-fertilizing ability by cholesterol sulfate. *Biol.Reprod.* 36:878-883.

- Fernandes CF, Godoy JR, Döring B, Cavalcanti MC, Bergmann M, Petzinger E, Geyer J (2007) The novel putative bile acid transporter SLC10A5 is highly expressed in liver and kidney. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 361:26-32.
- Fietz D, Bakhaus K, Wapelhorst B, Grosser G, Günther S, Alber J, Döring B, Kliesch S, Weidner W, Galuska CE, Hartmann MF, Wudy SA, Bergmann M, Geyer J (2013) Membrane transporters for sulfated steroids in the human testis--cellular localization, expression pattern and functional analysis. *PLoS.One.* 8:5.
- Finn PD, Cunningham MJ, Pau KY, Spies HG, Clifton DK, Steiner RA (1998) The stimulatory effect of leptin on the neuroendocrine reproductive axis of the monkey. *Endocrinology.* 139:4652-4662.
- Foster PA (2008) Steroid metabolism in breast cancer. *Minerva Endocrinol.* 33:27-37.
- Fredholm L, Holmén J, Gullbing B, und Röhl A
http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2007/popular-medicineprize2007.pdf (Abrufdatum: 22.3.2013)
- Friesema EC, Jansen J, Milici C, Visser TJ (2005) Thyroid hormone transporters. *Vitam.Horm.* 70:137-67.
- Fritsch M, Orfanos CE, Zouboulis CC (2001) Sebocytes are the key regulators of androgen homeostasis in human skin. *J.Invest.Dermatol.* 116:793-800.
- Fuda H, Lee YC, Shimizu C, Javitt NB, Strott CA (2002) Mutational analysis of human hydroxysteroid sulfotransferase SULT2B1 isoforms reveals that exon 1B of the SULT2B1 gene produces cholesterol sulfotransferase, whereas exon 1A yields pregnenolone sulfotransferase. *J.Biol.Chem.* 277:36161-36166.
- Funes S, Hedrick JA, Vassileva G, Markowitz L, Abbondanzo S, Golovko A, Yang S, Monsma FJ, Gustafson EL (2003) The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 312:1357-1363.
- Funk, K (2009) Die Bedeutung des Natrium-dependent Organic Anion Transporter (SOAT) für den Steroidsulfattransport in der Plazenta und die Pathogenese hormonabhängiger Mammakarzinome. Dissertationsschrift am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, VVB Laufersweiler Verlag, Gießen, ISBN 3-8359-5414-8.

- Gallegos AM, Schoer JK, Starodub O, Kier AB, Billheimer JT, Schroeder F (2000) A potential role for sterol carrier protein-2 in cholesterol transfer to mitochondria. *Chem.Phys.Lipids.* 105:9-29.
- Galuska CE, Hartmann MF, Sanchez-Guijo A, Bakhaus K, Geyer J, Schuler G, Zimmer KP, Wudy SA (2013) Profiling intact steroid sulfates and unconjugated steroids in biological fluids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). *Analyst.* 138:3792-3801.
- Gao B, Huber RD, Wenzel A, Vavricka SR, Ismail MG, Reme C, Meier PJ (2005) Localization of organic anion transporting polypeptides in the rat and human ciliary body epithelium. *Exp.Eye Res.* 80:61-72.
- Geese WJ und Raftogianis RB (2001) Biochemical characterization and tissue distribution of human SULT2B1. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 19:288-299..
- Geissler WM, Davis DL, Wu L, Bradshaw KD, Patel S, Mendonca BB, Elliston KO, Wilson JD, Russell DW, Andersson S (1994) Male pseudohermaphroditism caused by mutations of testicular 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3. *Nat.Genet.* 7:34-39.
- Geyer, J (2005) Ouabaintransporter in Leber und Nebenniere von Ratte und Rind: Klonierung, Charakterisierung und funktionelle Bedeutung. Dissertationsschrift am Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotoxologie und Umweltmanagement der Justus-Liebig-Universität Gießen, VVB Laufersweiler Verlag, Gießen, ISBN 3-89687-456-X.
- Geyer J, Godoy JR, Petzinger E (2004a) Identification of a sodium-dependent organic anion transporter from rat adrenal gland. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 316:300-306.
- Geyer J, Döring B, Failing K, Petzinger E (2004b) Molecular cloning and functional characterization of the bovine (*Bos taurus*) organic anion transporting polypeptide Oatp1a2 (*Slco1a2*). *Comp Biochem.Physiol.B Biochem.Mol.Biol.* 137:317-329.
- Geyer J, Wilke T, Petzinger E (2006a) The solute carrier family SLC10: more than a family of bile acid transporters regarding function and phylogenetic relationships. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 372:413-431.
- Geyer J, Wilke T, Petzinger E (2006b) The solute carrier family SLC10: more than a family of bile acid transporters regarding function and phylogenetic relationships. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 372:413-431.

- Geyer J, Döring B, Meerkamp K, Ugele B, Bakhiya N, Fernandes CF, Godoy JR, Glatt H, Petzinger E (2007) Cloning and functional characterization of human sodium-dependent organic anion transporter (SLC10A6). *J.Biol.Chem.* 282:19728-19741.
- Geyer J, Fernandes CF, Döring B, Burger S, Godoy JR, Rafalzik S, Hubschle T, Gerstberger R, Petzinger E (2008) Cloning and molecular characterization of the orphan carrier protein Slc10a4: expression in cholinergic neurons of the rat central nervous system. *Neuroscience.* 152:990-1005.
- Gianotten J, Lombardi MP, Zwinderman AH, Lilford RJ, van d, V (2004) Idiopathic impaired spermatogenesis: genetic epidemiology is unlikely to provide a short-cut to better understanding. *Hum.Reprod.Update.* 10:533-539.
- Gilliver SC, Ruckshanthi JP, Hardman MJ, Zeef LA, Ashcroft GS (2009) 5alpha-dihydrotestosterone (DHT) retards wound closure by inhibiting re-epithelialization. *J.Pathol.* 217:73-82.
- Giusti G, Gonnelli P, Borrelli D, Fiorelli G, Forti G, Pazzagli M, Serio M (1975) Age-related secretion of androstenedione, testosterone and dihydrotestosterone by the human testis. *Exp.Gerontol.* 10:241-245.
- Godoy JR, Fernandes C, Döring B, Beuerlein K, Petzinger E, Geyer J (2007) Molecular and phylogenetic characterization of a novel putative membrane transporter (SLC10A7), conserved in vertebrates and bacteria. *Eur.J.Cell Biol.* 86:445-460.
- Gorelick FS (1987) Second messenger systems and adaptation. *Gut.* 28 Suppl:79-84.
- Grosser, G (2013) Der Sodium-dependent Organic Anion Transporter SOAT: Gewebeexpression, vergleichende funktionelle Charakterisierung und Generierung einer 3D-QSAR Pharmakophore. Dissertationsschrift am Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, VVB Laufersweiler Verlag, Gießen, ISBN 978-3-8359-5990-3.
- Grosser G, Fietz D, Gunther S, Bakhaus K, Schweigmann H, Ugele B, Brehm R, Petzinger E, Bergmann M, Geyer J (2013) Cloning and functional characterization of the mouse sodium-dependent organic anion transporter Soat (Slc10a6). *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 138:90-9.

- Grube M, Kock K, Karner S, Reuther S, Ritter CA, Jedlitschky G, Kroemer HK (2006) Modification of OATP2B1-mediated transport by steroid hormones. *Mol.Pharmacol.* 70:1735-1741.
- Gut A, Kappeler F, Hyka N, Balda MS, Hauri HP, Matter K (1998) Carbohydrate-mediated Golgi to cell surface transport and apical targeting of membrane proteins. *EMBO J.* 17:1919-1929.
- Habert R, Lejeune H, Saez JM (2001) Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells. *Mol.Cell Endocrinol.* 179:47-74.
- Hagenbuch B, Stieger B, Foguet M, Lubbert H, Meier PJ (1991) Functional expression cloning and characterization of the hepatocyte Na⁺/bile acid cotransport system. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88:10629-10633.
- Hagenbuch B und Meier PJ (1994) Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na⁺/bile acid cotransporter. *J.Clin.Invest.* 93:1326-1331.
- Hagenbuch B und Meier PJ (2003) The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochim.Biophys.Acta.* 1609:1-18.
- Hagenbuch B und Meier PJ (2004) Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch.* 447:653-665.
- Hagenbuch B und Dawson P (2004) The sodium bile salt cotransport family SLC10. *Pflugers Arch.* 447:566-570.
- Hagenbuch B und Stieger B (2013) The SLCO (former SLC21) superfamily of transporters. *Mol.Aspects Med.* 34:396-412.
- Hai Y, Hou J, Liu Y, Liu Y, Yang H, Li Z, He Z (2014) The roles and regulation of Sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells and spermatogenesis. *Semin.Cell Dev.Biol.* 29:66-75.
- Hall CS, James TE, Goodyer C, Branchaud C, Guyda H, Giroud CJ (1977) Short term culture of human midterm and term placenta: parameters of hormonogenesis. *Steroids.* 30:569-580.

- Hallen S, Branden M, Dawson PA, Sachs G (1999) Membrane insertion scanning of the human ileal sodium/bile acid co-transporter. *Biochemistry*. 38:11379-11388.
- Hammes A, Andreassen TK, Spoelgen R, Raila J, Hubner N, Schulz H, Metzger J, Schweigert FJ, Lippa PB, Nykjaer A, Willnow TE (2005) Role of endocytosis in cellular uptake of sex steroids. *Cell*. 122:751-762.
- Handa RJ und Weiser MJ (2013) Gonadal steroid hormones and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Front Neuroendocrinol*. 35(2):197-220.
- Haning RV, Jr., Hackett RJ, Boothroid RI, Canick JA (1990) Steroid sulphatase activity in the human ovarian corpus luteum, stroma, and follicle: comparison to activity in other tissues and the placenta. *J.Steroid Biochem*. 36:175-179.
- Haning RV, Jr., Hackett RJ, Canick JA (1992) Steroid sulfatase in the human ovary and placenta: enzyme kinetics and phosphate inhibition. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol*. 41:161-165.
- Harteneck C (2013) Pregnenolone sulfate: from steroid metabolite to TRP channel ligand. *Molecules*. 18:12012-12028.
- Harvey CB und Williams GR (2002) Mechanism of thyroid hormone action. *Thyroid*. 12:441-446.
- Hay JB und Hodgins MB (1973) Metabolism of androgens in vitro by human facial and axillary skin. *J.Endocrinol*. 59:475-486.
- Hayes FJ und Crowley WF, Jr. (1998) Gonadotropin pulsations across development. *Horm.Res*. 49:163-168.
- Hediger MA, Romero MF, Peng JB, Rolfs A, Takanaga H, Bruford EA (2004) The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteinsIntroduction. *Pflugers Arch*. 447:465-468.
- Helsen C, Kerkhofs S, Clinckemalie L, Spans L, Laurent M, Boonen S, Vanderschueren D, Claessens F (2012) Structural basis for nuclear hormone receptor DNA binding. *Mol.Cell Endocrinol*. 348:411-417.

- Her C, Wood TC, Eichler EE, Mohrenweiser HW, Ramagli LS, Siciliano MJ, Weinshilboum RM (1998) Human hydroxysteroid sulfotransferase SULT2B1: two enzymes encoded by a single chromosome 19 gene. *Genomics*. 53:284-295.
- Hess RA, Bunick D, Bahr J (2001) Oestrogen, its receptors and function in the male reproductive tract - a review. *Mol.Cell.Endocrinol.* 178:29-38.
- Heuer H und Visser TJ (2009) Minireview: Pathophysiological importance of thyroid hormone transporters. *Endocrinology*. 150:1078-1083.
- Hiratsuka K, Yin SA, Ohtomo T, Fujita M, Ohtsuki K, Isaka H, Suga T, Kurosawa T, Yamada J (2008) Intratesticular localization of the organic solute carrier protein, OSCP1, in spermatogenic cells in mice. *Mol.Reprod.Dev.* 75:1495-1504.
- Hiratsuka K, Momose A, Takagi N, Sasaki H, Yin SA, Fujita M, Ohtomo T, Tanonaka K, Toyoda H, Suzuki H, Kurosawa T, Yamada J (2011) Neuronal expression, cytosolic localization, and developmental regulation of the organic solute carrier partner 1 in the mouse brain. *Histochem.Cell Biol.* 135:229-238.
- Ho RH, Leake BF, Roberts RL, Lee W, Kim RB (2004) Ethnicity-dependent polymorphism in Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide (SLC10A1) reveals a domain critical for bile acid substrate recognition. *J.Biol.Chem.* 279:7213-7222.
- Ho RH, Tirona RG, Leake BF, Glaeser H, Lee W, Lemke CJ, Wang Y, Kim RB (2006) Drug and bile acid transporters in rosuvastatin hepatic uptake: function, expression, and pharmacogenetics. *Gastroenterology*. 130:1793-1806.
- Ho RH, Leake BF, Urquhart BL, Gregor JC, Dawson PA, Kim RB (2011) Functional characterization of genetic variants in the apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT; SLC10A2). *J.Gastroenterol.Hepatol.* 26:1740-1748.
- Hoffmann R (2001) Enzymology of the hair follicle. *Eur.J.Dermatol.* 11:296-300.
- Hoffmann R, Rot A, Niiyama S, Billich A (2001) Steroid sulfatase in the human hair follicle concentrates in the dermal papilla. *J.Invest.Dermatol.* 117:1342-1348.
- Honma N, Saji S, Hirose M, Horiguchi S, Kuroi K, Hayashi S, Utsumi T, Harada N (2011) Sex steroid hormones in pairs of tumor and serum from breast cancer patients and pathobiological role of androstene-3beta, 17beta-diol. *Cancer Sci.* 102:1848-1854.

- Hosokawa M, Ishii M, Inoue K, Yao CS, Takeda T (1981) Estrogen induces different responses in dermal and lung fibroblasts: special reference to collagen. *Connect.Tissue Res.* 9:115-120.
- Hotaling JM und Patel Z (2014) Male endocrine dysfunction. *Urol.Clin.North Am.* 41:39-53.
- Hrabovszky E, Kallo I, Szlavik N, Keller E, Merchenthaler I, Liposits Z (2007) Gonadotropin-releasing hormone neurons express estrogen receptor-beta. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 92:2827-2830.
- Hsiang B, Zhu Y, Wang Z, Wu Y, Sasseville V, Yang WP, Kirchgessner TG (1999) A novel human hepatic organic anion transporting polypeptide (OATP2). Identification of a liver-specific human organic anion transporting polypeptide and identification of rat and human hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitor transporters. *J.Biol.Chem.* 274:37161-37168.
- Hu NJ, Iwata S, Cameron AD, Drew D (2011) Crystal structure of a bacterial homologue of the bile acid sodium symporter ASBT. *Nature.* 478:408-411.
- Hum DW, Belanger A, Levesque E, Barbier O, Beaulieu M, Albert C, Vallee M, Guillemette C, Tchernof A, Turgeon D, Dubois S (1999) Characterization of UDP-glucuronosyltransferases active on steroid hormones. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 69:413-423.
- Hussainzada N, Da Silva TC, Zhang EY, Swaan PW (2008) Conserved aspartic acid residues lining the extracellular loop 1 of sodium-coupled bile acid transporter ASBT Interact with Na⁺ and 7alpha-OH moieties on the ligand cholestane skeleton. *J.Biol.Chem.* 283:20653-20663.
- Hussainzada N, Claro da ST, Swaan PW (2009) The cytosolic half of helix III forms the substrate exit route during permeation events of the sodium/bile acid cotransporter ASBT. *Biochemistry.* 48:8528-8539.
- Huxtable RJ (1986) *Biochemistry of sulfur*, Plenum Press, New York, ISBN 0-306-42348-0
- Ishimura K und Fujita H (1997) Light and electron microscopic immunohistochemistry of the localization of adrenal steroidogenic enzymes. *Microsc.Res.Tech.* 36:445-453.
- Itami S und Takayasu S (1981) Activity of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in various tissues of human skin. *Br.J.Dermatol.* 105:693-699.

- Izuno H, Kobayashi Y, Sanada Y, Nihei D, Suzuki M, Kohyama N, Ohbayashi M, Yamamoto T (2007) Rat organic solute carrier protein 1 (rOscp1) mediated the transport of organic solutes in *Xenopus laevis* oocytes: isolation and pharmacological characterization of rOscp1. *Life Sci.* 81:1183-1192.
- Jacquemin E, Hagenbuch B, Stieger B, Wolkoff AW, Meier PJ (1994) Expression cloning of a rat liver Na(+)-independent organic anion transporter. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 91:133-137.
- Javitt NB, Lee YC, Shimizu C, Fuda H, Strott CA (2001) Cholesterol and hydroxycholesterol sulfotransferases: identification, distinction from dehydroepiandrosterone sulfotransferase, and differential tissue expression. *Endocrinology.* 142:2978-2984.
- Jetten AM, George MA, Nervi C, Boone LR, Rearick JI (1989) Increased cholesterol sulfate and cholesterol sulfotransferase activity in relation to the multi-step process of differentiation in human epidermal keratinocytes. *J.Invest.Dermatol.* 92:203-209.
- Jiang L, Alber J, Wang J, Du W, Yang X, Li X, Sanglard D, Geyer J (2012) The *Candida albicans* plasma membrane protein Rch1p, a member of the vertebrate SLC10 carrier family, is a novel regulator of cytosolic Ca²⁺ homeostasis. *Biochem.J.* 444:497-502.
- Johnsen SG (1970) Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones.* 1:2-25.
- Jones R (1998) Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. *J.Reprod.Fertil.Suppl.* 53:73-84.
- Kao JS, Garg A, Mao-Qiang M, Crumrine D, Ghadially R, Feingold KR, Elias PM (2001) Testosterone perturbs epidermal permeability barrier homeostasis. *J.Invest.Dermatol.* 116:443-451.
- Karakus, E (2009) Die Bedeutung des Transporters SOAT (SLC10A6) für die Entwicklung von Estrogen-abhängigen Mammakarzinomen. Dissertationsschrift am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, VVB Laufersweiler Verlag, Gießen, ISBN 3-8359-5429-6.
- Kayes-Wandover KM und White PC (2000) Steroidogenic enzyme gene expression in the human heart. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 85:2519-2525.

- Kessler RJ und Fanestil DD (1986) Interference by lipids in the determination of protein using bicinchoninic acid. *Anal.Biochem.* 159:138-142.
- Kester MH, Kaptein E, Van Dijk CH, Roest TJ, Tibboel D, Coughtrie MW, Visser TJ (2002) Characterization of iodothyronine sulfatase activities in human and rat liver and placenta. *Endocrinology.* 143:814-819.
- Khantwal CM und Swaan PW (2008) Cytosolic half of transmembrane domain IV of the human bile acid transporter hASBT (SLC10A2) forms part of the substrate translocation pathway. *Biochemistry.* 47:3606-3614.
- Kirschner M, Lipsett M, Collins D (1965) Plasma ketosteroids and testosterone in man: A study of the pituitary-testicular axis. *J.Clin.Invest.* 44:657-65..
- Kishimoto M, Fujiki R, Takezawa S, Sasaki Y, Nakamura T, Yamaoka K, Kitagawa H, Kato S (2006) Nuclear receptor mediated gene regulation through chromatin remodeling and histone modifications. *Endocr.J.* 53:157-172.
- Kobayashi D, Nozawa T, Imai K, Nezu J, Tsuji A, Tamai I (2003) Involvement of human organic anion transporting polypeptide OATP-B (SLC21A9) in pH-dependent transport across intestinal apical membrane. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 306:703-708.
- Kobayashi Y, Shibusawa A, Saito H, Ohshiro N, Ohbayashi M, Kohyama N, Yamamoto T (2005) Isolation and functional characterization of a novel organic solute carrier protein, hOSCP1. *J.Biol.Chem.* 280:32332-32339.
- Kobayashi Y, Tsuchiya A, Hayashi T, Kohyama N, Ohbayashi M, Yamamoto T (2007) Isolation and characterization of polyspecific mouse organic solute carrier protein 1 (mOscp1). *Drug.Metab.Dispos.* 35:1239-1245.
- Konig J, Cui Y, Nies AT, Keppler D (2000) Localization and genomic organization of a new hepatocellular organic anion transporting polypeptide. *J.Biol.Chem.* 275:23161-23168.
- Korzekwa KR, Trager WF, Mancewicz J, Osawa Y (1993) Studies on the mechanism of aromatase and other cytochrome P450 mediated deoxygenation reactions. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 44:367-373.
- Kroboth PD, Salek FS, Pittenger AL, Fabian TJ, Frye RF (1999) DHEA and DHEA-S: a review. *J.Clin.Pharmacol.* 39:327-348.

- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*. 138:863-870.
- Kullak-Ublick GA, Hagenbuch B, Stieger B, Scheingart CD, Hofmann AF, Wolkoff AW, Meier PJ (1995) Molecular and functional characterization of an organic anion transporting polypeptide cloned from human liver. *Gastroenterology*. 109:1274-1282.
- Kullak-Ublick GA, Ismail MG, Stieger B, Landmann L, Huber R, Pizzagalli F, Fattinger K, Meier PJ, Hagenbuch B (2001) Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology*. 120:525-533.
- Kullak-Ublick GA, Stieger B, Meier PJ (2004) Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology*. 126:322-342.
- Kumar R und Thompson EB (1999) The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids*. 64:310-319.
- Kuss E (1994) The fetoplacental unit of primates. *Exp.Clin.Endocrinol*. 102:135-165.
- Laatikainen T, Laitinen EA, Vihko R (1971) Secretion of free and sulfate-conjugated neutral steroids by the human testis. Effect of administration of human chorionic gonadotropin. *J.Clin.Endocrinol.Metab*. 32:59-64.
- Laatikainen T, Pelkonen J, Apter D, Ranta T (1980) Fetal and maternal serum levels of steroid sulfates, unconjugated steroids, and prolactin at term pregnancy and in early spontaneous labor. *J.Clin.Endocrinol.Metab*. 50:489-494.
- Labrie F (1991) Intracrinology. *Mol.Cell.Endocrinol*. 78:C113-C118.
- Labrie F, Belanger A, Cusan L, Gomez JL, Candas B (1997) Marked decline in serum concentrations of adrenal C19 sex steroid precursors and conjugated androgen metabolites during aging. *J.Clin.Endocrinol.Metab*. 82:2396-2402.
- Labrie F, Luu-The V, Labrie C, Pelletier G, El-Alfy M (2000a) Intracrinology and the skin. *Horm.Res*. 54:218-229.

- Labrie F, Luu-The V, Lin SX, Simard J, Labrie C, El-Alfy M, Pelletier G, Belanger A (2000b) Intracrinology: role of the family of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human physiology and disease. *J.Mol.Endocrinol.* 25:1-16.
- Labrie F, Luu-The V, Labrie C, Simard J (2001) DHEA and its transformation into androgens and estrogens in peripheral target tissues: intracrinology. *Front.Neuroendocrinol.* 22:185-212.
- Lala DS, Rice DA, Parker KL (1992) Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor I. *Mol.Endocrinol.* 6:1249-1258.
- Lalumiere G, Bleau G, Chapdelaine A, Roberts KD (1976) Cholesteryl sulfate and sterol sulfatase in the human reproductive tract. *Steroids.* 27:247-260.
- Lambrot R, Coffigny H, Pairault C, Donnadiou AC, Frydman R, Habert R, Rouiller-Fabre V (2006) Use of organ culture to study the human fetal testis development: effect of retinoic acid. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 91:2696-2703.
- Lampe MA, Williams ML, Elias PM (1983) Human epidermal lipids: characterization and modulations during differentiation. *J.Lipid Res.* 24:131-140.
- Langlais J, Zollinger M, Plante L, Chapdelaine A, Bleau G, Roberts KD (1981) Localization of cholesteryl sulfate in human spermatozoa in support of a hypothesis for the mechanism of capacitation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 78:7266-7270.
- Laplante Y, Rancourt C, Poirier D (2009) Relative involvement of three 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases (types 1, 7 and 12) in the formation of estradiol in various breast cancer cell lines using selective inhibitors. *Mol.Cell Endocrinol.* 301:146-153.
- Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, Cheng R, Liu Y, Howard AD, Coulombe N, Tan CP, Tang-Nguyen AT, George SR, O'Dowd BF (1999) Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett.* 446:103-107.
- Lee WJ, Jung HD, Chi SG, Kim BS, Lee SJ, Kim dW, Kim MK, Kim JC (2010) Effect of dihydrotestosterone on the upregulation of inflammatory cytokines in cultured sebocytes. *Arch.Dermatol.Res.* 302:429-433.
- Legault Y, Bleau G, Chapdelaine A, Roberts KD (1979a) The binding of sterol sulfates to hamster spermatozoa. *Steroids.* 34:89-99.

- Legault Y, Bouthillier M, Bleau G, Chapdelaine A, Roberts KD (1979b) The sterol and sterol sulfate content of the male hamster reproductive tract. *Biol.Reprod.* 20:1213-1219.
- Leinonen P (1980) Estrone and estradiol concentrations in the testis and spermatic and peripheral venous blood of elderly men: the influence of estrogen treatment. *J.Steroid Biochem.* 13:737-742.
- Lejeune H, Habert R, Saez JM (1998) Origin, proliferation and differentiation of Leydig cells. *J.Mol.Endocrinol.* 20:1-25.
- Lekhkota, O and Bergmann, M (2007) Expression and cellular localization of estrogen receptor alpha in the testis of different mammals. *AnatGes2007 (Poster Abstract Booklet):* 67.
- Lekhkota O, Brehm R, Claus R, Wagner A, Bohle RM, Bergmann M (2006) Cellular localization of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and -beta (ERbeta) mRNA in the boar testis. *Histochem.Cell Biol.* 125:259-264.
- Leuthold S, Hagenbuch B, Mohebbi N, Wagner CA, Meier PJ, Stieger B (2009) Mechanisms of pH-gradient driven transport mediated by organic anion polypeptide transporters. *Am.J.Physiol.Cell Physiol.* 296:C570-C582.
- Li L, Lee TK, Meier PJ, Ballatori N (1998) Identification of glutathione as a driving force and leukotriene C4 as a substrate for oatp1, the hepatic sinusoidal organic solute transporter. *J.Biol.Chem.* 273:16184-16191.
- Li L, Meier PJ, Ballatori N (2000) Oatp2 mediates bidirectional organic solute transport: a role for intracellular glutathione. *Mol.Pharmacol.* 58:335-340.
- Liebich H (2004) Allgemeine Körperdecke (Integumentum Commune). In: Funktionelle Histologie der Haussäugetiere, 4. Auflage, S.311-330, Schattauer Verlag, Stuttgart, ISBN 3-7945-2311-3.
- Lionarons DA, Boyer JL, Cai SY (2012) Evolution of substrate specificity for the bile salt transporter ASBT (SLC10A2). *J.Lipid Res.* 53:1535-1542.
- Longcope C, Widrich W, Sawin CT (1972) The secretion of estrone and estradiol-17 by human testis. *Steroids.* 20:439-448.
- Lopez FJ, Merchenthaler IJ, Moretto M, Negro-Vilar A (1998) Modulating mechanisms of neuroendocrine cell activity: the LHRH pulse generator. *Cell.Mol.Neurobiol.* 18:125-146.

- Losel R und Wehling M (2003) Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 4:46-56.
- Love MW, Craddock AL, Angelin B, Brunzell JD, Duane WC, Dawson PA (2001) Analysis of the ileal bile acid transporter gene, SLC10A2, in subjects with familial hypertriglyceridemia. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 21:2039-2045.
- Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 193:265-275.
- Lutz MB und Rossner S (2007) Factors influencing the generation of murine dendritic cells from bone marrow: the special role of fetal calf serum. *Immunobiology.* 212:855-862.
- Luu T, V, Lachance Y, Labrie C, Leblanc G, Thomas JL, Strickler RC, Labrie F (1989) Full length cDNA structure and deduced amino acid sequence of human 3 beta-hydroxy-5-ene steroid dehydrogenase. *Mol.Endocrinol.* 3:1310-1312.
- Lykkesfeldt G, Hoyer H, Ibsen HH, Brandrup F (1985a) Steroid sulphatase deficiency disease. *Clin.Genet.* 28:231-237.
- Lykkesfeldt G, Bennett P, Lykkesfeldt AE, Micic S, Moller S, Svenstrup B (1985b) Abnormal androgen and oestrogen metabolism in men with steroid sulphatase deficiency and recessive X-linked ichthyosis. *Clin.Endocrinol.(Oxf).* 23:385-393.
- Lykkesfeldt G, Bennett P, Lykkesfeldt AE, Micic S, Rorth M, Skakkebaek NE, Svenstrup B (1991) Testis cancer. Ichthyosis constitutes a significant risk factor. *Cancer.* 67:730-734.
- Lynch JP, Lala DS, Peluso JJ, Luo W, Parker KL, White BA (1993) Steroidogenic factor 1, an orphan nuclear receptor, regulates the expression of the rat aromatase gene in gonadal tissues. *Mol.Endocrinol.* 7:776-786.
- Ma Y, Li Y, Chiriboga DE, Olendzki BC, Hebert JR, Li W, Leung K, Hafner AR, Ockene IS (2006a) Association between carbohydrate intake and serum lipids. *J.Am.Coll.Nutr.* 25:155-163.
- Ma Y, Griffith JA, Chasan-Taber L, Olendzki BC, Jackson E, Stanek EJ, III, Li W, Pagoto SL, Hafner AR, Ockene IS (2006b) Association between dietary fiber and serum C-reactive protein. *Am.J.Clin.Nutr.* 83:760-766.

- Maeda K, Naganuma M, Fukuda M, Matsunaga J, Tomita Y (1996) Effect of pituitary and ovarian hormones on human melanocytes in vitro. *Pigment Cell Res.* 9:204-212.
- Makinen S, Makela S, Weihua Z, Warner M, Rosenlund B, Salmi S, Hovatta O, Gustafsson JA (2001) Localization of oestrogen receptors alpha and beta in human testis. *Mol.Hum.Reprod.* 7:497-503.
- Maran RR (2003) Thyroid hormones: their role in testicular steroidogenesis. *Arch.Androl.* 49:375-388.
- Marchlewska K, Kula K, Walczak-Jedrzejowska R, Oszukowska E, Orkisz S, Slowikowska-Hilczek J (2011) Triiodothyronine modulates initiation of spermatogenesis in rats depending on treatment timing and blood level of the hormone. *Mol.Cell.Endocrinol.* 341:25-34.
- Mareninova O, Shin JM, Vagin O, Turdikulova S, Hallen S, Sachs G (2005) Topography of the membrane domain of the liver Na⁺-dependent bile acid transporter. *Biochemistry.* 44:13702-13712.
- Markel P, Shu P, Ebeling C, Carlson GA, Nagle DL, Smutko JS, Moore KJ (1997) Theoretical and empirical issues for marker-assisted breeding of congenic mouse strains. *Nat.Genet.* 17:280-284.
- Marks MS, Ohno H, Kirchnausen T, Bonracino JS (1997) Protein sorting by tyrosine-based signals: adapting to the Ys and wherefores. *Trends Cell Biol.* 7:124-128.
- Mayerhofer A, Vogt H, Zahner R (2005) Männliche Geschlechtsorgane. In: *Histologie*, 6. neu übersetzte, überarbeitete und aktualisierte Auflage, S.369-384, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, ISBN 978-3-540-21965-1.
- Mayerl S, Visser TJ, Darras VM, Horn S, Heuer H (2012) Impact of Oatp1c1 deficiency on thyroid hormone metabolism and action in the mouse brain. *Endocrinology.* 153:1528-1537.
- Mayerl S, Muller J, Bauer R, Richert S, Kassmann CM, Darras VM, Buder K, Boelen A, Visser TJ, Heuer H (2014) Transporters MCT8 and OATP1C1 maintain murine brain thyroid hormone homeostasis. *J.Clin.Invest.* 124:1987-99.

- Meloche CA und Falany CN (2001) Expression and characterization of the human 3 beta-hydroxysteroid sulfotransferases (SULT2B1a and SULT2B1b). *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 77:261-269.
- Mendis-Handagama SM und Ariyaratne HB (2001) Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biol.Reprod.* 65:660-671.
- Mendis-Handagama SM und Siril Ariyaratne HB (2005) Leydig cells, thyroid hormones and steroidogenesis. *Indian J.Exp.Biol.* 43:939-962.
- Mennin SP und Gorski RA (1975) Effects of ovarian steroids on plasma LH in normal and persistent estrous adult female rats. *Endocrinology.* 96:486-491.
- Meyer-Ficca ML, Meyer RG, Kaiser H, Brack AR, Kandolf R, Kupper JH (2004) Comparative analysis of inducible expression systems in transient transfection studies. *Anal.Biochem.* 334:9-19.
- Milewich L, Shaw CB, Sontheimer RD (1988) Steroid metabolism by epidermal keratinocytes. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 548:66-89.
- Miller WL (1988) Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr.Rev.* 9:295-318.
- Miller WL (2007) Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter. *Biochim.Biophys.Acta.* 1771:663-676.
- Mock EJ, Kamel F, Wright WW, Frankel AI (1975) Seasonal rhythm in plasma testosterone and luteinising hormone of the male laboratory rat. *Nature.* 256:61-63.
- Morales C, CLERMONT Y, Nadler NJ (1986) Cyclic endocytic activity and kinetics of lysosomes in Sertoli cells of the rat: a morphometric analysis. *Biol.Reprod.* 34:207-218.
- Morohaku K, Pelton SH, Daugherty DJ, Butler WR, Deng W, Selvaraj V (2014) Translocator protein/peripheral benzodiazepine receptor is not required for steroid hormone biosynthesis. *Endocrinology.* 155:89-97.
- Mouhadjer N, Bedin M, Pointis G (1989) Steroid sulfatase activity in homogenates, microsomes and purified Leydig cells from adult rat testis. *Reprod.Nutr.Dev.* 29:277-282.
- Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA, Michalovich D, Moore DJ, Calamari A, Szekeres PG, Sarau HM, Chambers JK, Murdock P, Steplewski K, Shabon U, Miller JE, Middleton SE,

- Darker JG, Larminie CG, Wilson S, Bergsma DJ, Emson P, Faull R, Philpott KL, Harrison DC (2001) AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J.Biol.Chem.* 276:28969-28975.
- Murphy E und Steenbergen C (2014) Estrogen regulation of protein expression and signaling pathways in the heart. *Biol.Sex Differ.* 5:6-5.
- Mutembei HM, Kowalewski MP, Ugele B, Schuler G, Hoffmann B (2009) Expression and activity of steroid sulphatase in the boar testis. *Reprod.Domest.Anim.* 44:17-23.
- Nakajin S, Shinoda M, Haniu M, Shively JE, Hall PF (1984) C21 steroid side chain cleavage enzyme from porcine adrenal microsomes. Purification and characterization of the 17 alpha-hydroxylase/C17,20-lyase cytochrome P-450. *J.Biol.Chem.* 259:3971-3976.
- Nakata T, Takashima S, Shiotsu Y, Murakata C, Ishida H, Akinaga S, Li PK, Sasano H, Suzuki T, Saeki T (2003) Role of steroid sulfatase in local formation of estrogen in post-menopausal breast cancer patients. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 86:455-460.
- Ng PC, Henikoff JG, Henikoff S (2000) PHAT: a transmembrane-specific substitution matrix. Predicted hydrophobic and transmembrane. *Bioinformatics.* 16:760-766.
- Nickel R, Schummer A, Seiferle E (2004a) Zwischenhirn. In: *Lehrbuch der Anatomie der Haussäugetiere, Band IV, Nervensystem, Sinnesorgane, Endokrine Drüsen, 4. Auflage, S.117-126, Parey Verlag, Stuttgart, ISBN 3-8304-4150-9.*
- Nickel R, Schummer A, Seiferle E (2004b) Hypophyse. In: *Lehrbuch der Anatomie der Haussäugetiere, Band IV, Nervensystem, Sinnesorgane, Endokrine Drüsen, 4. Auflage, S.477-482, Parey Verlag, Stuttgart, ISBN 3-8304-4150-9.*
- Nickel R, Schummer A, Seiferle E (2005) Haut und Hautorgane. In: *Lehrbuch der Anatomie der Haussäugetiere, Band III, Kreislaufsystem, Haut und Hautorgane, 4. Auflage, S.443-571, Parey Verlag, Stuttgart, ISBN 3-8304-4164-9.*
- Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, McIntush EW (2000) Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev.* 80:1-29.
- Noel H, Plante L, Bleau G, Chapdelaine A, Roberts KD (1983) Human placental steroid sulfatase: purification and properties. *J.Steroid Biochem.* 19:1591-1598.

- Nussey S und Whitehead S (2001) *Endocrinology - An Integrated Approach*, BIOS Scientific Publishers, Oxford, ISBN 1-85996-252-1
- Nutu M, Weijdegard B, Thomas P, Thurin-Kjellberg A, Billig H, Larsson DG (2009) Distribution and hormonal regulation of membrane progesterone receptors beta and gamma in ciliated epithelial cells of mouse and human fallopian tubes. *Reprod.Biol.Endocrinol.* 7:89-7.
- O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER (2001) Estrogen and spermatogenesis. *Endocr.Rev.* 22:289-318.
- O'Shaughnessy PJ (2014) Hormonal control of germ cell development and spermatogenesis. *Semin.Cell Dev.Biol.* 29:55-65.
- Oelkers P, Kirby LC, Heubi JE, Dawson PA (1997) Primary bile acid malabsorption caused by mutations in the ileal sodium-dependent bile acid transporter gene (SLC10A2). *J.Clin.Invest.* 99:1880-1887.
- Ohno S, Nishikawa K, Honda Y, Nakajin S (2008) Expression in *E. coli* and tissue distribution of the human homologue of the mouse Ke 6 gene, 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 8. *Mol.Cell.Biochem.* 309:209-215.
- Ojeda SR, Dubay C, Lomniczi A, Kaidar G, Matagne V, Sandau US, Dissen GA (2010) Gene networks and the neuroendocrine regulation of puberty. *Mol.Cell.Endocrinol.* 324:3-11.
- Orth JM, Gunsalus GL, Lamperti AA (1988) Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology.* 122:787-794.
- Page ST (2011) Physiologic role and regulation of intratesticular sex steroids. *Curr.Opin.Endocrinol.Diabetes Obes.* 18:217-223.
- Pan W, Song IS, Shin HJ, Kim MH, Choi YL, Lim SJ, Kim WY, Lee SS, Shin JG (2011) Genetic polymorphisms in Na⁺-taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP) and ileal apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT) and ethnic comparisons of functional variants of NTCP among Asian populations. *Xenobiotica.* 41:501-510.
- Paoloni-Giacobino A (2007) Epigenetics in reproductive medicine. *Pediatr.Res.* 61:51R-57R.
- Papadopoulos V (2014) On the role of the translocator protein (18-kDa) TSPO in steroid hormone biosynthesis. *Endocrinology.* 155:15-20.

- Parker KL und Schimmer BP (1995) Transcriptional regulation of the genes encoding the cytochrome P-450 steroid hydroxylases. *Vitam.Horm.* 51:339-70.
- Pashen RL und Allen WR (1979) The role of the fetal gonads and placenta in steroid production, maintenance of pregnancy and parturition in the mare. *J.Reprod.Fertil.Suppl.* 499-509.
- Pasqualini JR, Gelly C, Nguyen BL, Vella C (1989) Importance of estrogen sulfates in breast cancer. *J.Steroid Biochem.* 34:155-163.
- Pasqualini JR, Cortes-Prieto J, Chetrite G, Talbi M, Ruiz A (1997) Concentrations of estrone, estradiol and their sulfates, and evaluation of sulfatase and aromatase activities in patients with breast fibroadenoma. *Int.J.Cancer.* 70:639-643.
- Pasqualini JR und Chetrite GS (2005) Recent insight on the control of enzymes involved in estrogen formation and transformation in human breast cancer. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 93:221-236.
- Patel P, Weerasekera N, Hitchins M, Boyd CA, Johnston DG, Williamson C (2003) Semi quantitative expression analysis of MDR3, FIC1, BSEP, OATP-A, OATP-C, OATP-D, OATP-E and NTCP gene transcripts in 1st and 3rd trimester human placenta. *Placenta.* 24:39-44.
- Paul SM und Purdy RH (1992) Neuroactive steroids. *FASEB J.* 6:2311-2322.
- Payne AH, Jaffe RB, Abell MR (1971) Gonadal steroid sulfates and sulfatase. 3. Correlation of human testicular sulfatase, 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase, histologic structure and serum testosterone. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 33:582-591.
- Payne AH, Kawano A, Jaffe RB (1973) Formation of dihydrotestosterone and other 5 alpha-reduced metabolites by isolated seminiferous tubules and suspension of interstitial cells in a human testis. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 37:448-453.
- Payne AH und Jaffe RB (1975) Androgen formation from pregnenolone sulfate by fetal, neonatal, prepubertal and adult human testes. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 40:102-107.
- Payne AH und Youngblood GL (1995) Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells. *Biol.Reprod.* 52:217-225.

- Payne AH, Abbaszade IG, Clarke TR, Bain PA, Park CH (1997) The multiple murine 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms: structure, function, and tissue- and developmentally specific expression. *Steroids*. 62:169-175.
- Payne AH und Hales DB (2004) Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr.Rev.* 25:947-970.
- Pellati D, Mylonakis I, Bertoloni G, Fiore C, Andrisani A, Ambrosini G, Armanini D (2008) Genital tract infections and infertility. *Eur.J.Obstet.Gynecol.Reprod.Biol.* 140:3-11.
- Pelletier G, Li S, Luu-The V, Tremblay Y, Belanger A, Labrie F (2001) Immunoelectron microscopic localization of three key steroidogenic enzymes (cytochrome P450(scc), 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and cytochrome P450(c17)) in rat adrenal cortex and gonads. *J.Endocrinol.* 171:373-383.
- Peng L und Payne AH (2002) AP-2 gamma and the homeodomain protein distal-less 3 are required for placental-specific expression of the murine 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase VI gene, Hsd3b6. *J.Biol.Chem.* 277:7945-7954.
- Peng L, Huang Y, Jin F, Jiang SW, Payne AH (2004) Transcription enhancer factor-5 and a GATA-like protein determine placental-specific expression of the Type I human 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene, HSD3B1. *Mol.Endocrinol.* 18:2049-2060.
- Pepe GJ und Albrecht ED (2008) Steroid endocrinology of pregnancy. In: *The Global Library of Women's Medicine*, ISBN 1756-2228.
- Pinilla L, Aguilar E, Dieguez C, Millar RP, Tena-Sempere M (2012) Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol.Rev.* 92:1235-1316.
- Pitts RL (1987) Serum elevation of dehydroepiandrosterone sulfate associated with male pattern baldness in young men. *J.Am.Acad.Dermatol.* 16:571-573.
- Pizzagalli F, Hagenbuch B, Stieger B, Klenk U, Folkers G, Meier PJ (2002) Identification of a novel human organic anion transporting polypeptide as a high affinity thyroxine transporter. *Mol.Endocrinol.* 16:2283-2296.
- Pizzagalli F, Varga Z, Huber RD, Folkers G, Meier PJ, St-Pierre MV (2003) Identification of steroid sulfate transport processes in the human mammary gland. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 88:3902-3912.

- Platia MP, Fencel MD, Elkind-Hirsch KE, Canick JA, Tulchinsky D (1984) Estrone sulfatase activity in the human brain and estrone sulfate levels in the normal menstrual cycle. *J.Steroid Biochem.* 21:237-241.
- Poortman J, Prenen JA, Schwarz F, Thijssen JH (1975) Interaction of delta-5-androstene-3beta, 17beta-diol with estradiol and dihydrotestosterone receptors in human myometrial and mammary cancer tissue. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 40:373-379.
- Prince FP (1984) Ultrastructure of immature Leydig cells in the human prepubertal testis. *Anat.Rec.* 209:165-176.
- Prince FP (2001) The triphasic nature of Leydig cell development in humans, and comments on nomenclature. *J.Endocrinol.* 168:213-216.
- Qian YM, Sun XJ, Tong MH, Li XP, Richa J, Song WC (2001) Targeted disruption of the mouse estrogen sulfotransferase gene reveals a role of estrogen metabolism in intracrine and paracrine estrogen regulation. *Endocrinology.* 142:5342-5350.
- Queiros AM, Eschen C, Fliegner D, Kararigas G, Dworatzek E, Westphal C, Sanchez RH, Regitz-Zagrosek V (2013) Sex- and estrogen-dependent regulation of a miRNA network in the healthy and hypertrophied heart. *Int.J.Cardiol.* 169:331-338.
- Ramensky V, Bork P, Sunyaev S (2002) Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Res.* 30:3894-3900.
- Randall VA, Sundberg JP, Philpott MP (2003) Animal and in vitro models for the study of hair follicles. *J.Investig.Dermatol.Symp.Proc.* 8:39-45.
- Randall VA (2007) Hormonal regulation of hair follicles exhibits a biological paradox. *Semin.Cell Dev.Biol.* 18:274-285.
- Randall VA (2008) Androgens and hair growth. *Dermatol.Ther.* 21:314-328.
- Randall VA, Jenner TJ, Hibberts NA, De Oliveira IO, Vafae T (2008) Stem cell factor/c-Kit signalling in normal and androgenetic alopecia hair follicles. *J.Endocrinol.* 197:11-23.
- Reed MJ, Purohit A, Woo LW, Newman SP, Potter BV (2005) Steroid sulfatase: molecular biology, regulation, and inhibition. *Endocr.Rev.* 26:171-202.

- Reinberg A, Lagoguey M, Chauffournier JM, Cesselin F (1975) Circannual and circadian rhythms in plasma testosterone in five healthy young Parisian males. *Acta Endocrinol.(Copenh)*. 80:732-734.
- Remy-Martin A, Prost O, Nicollier M, Burnod J, Adessi GL (1983) Estrone sulfate concentrations in plasma of normal individuals, postmenopausal women with breast cancer, and men with cirrhosis. *Clin.Chem*. 29:86-89.
- Renner O, Harsch S, Schaeffeler E, Schwab M, Klass DM, Kratzer W, Stange EF (2009a) Mutation screening of apical sodium-dependent bile acid transporter (SLC10A2): novel haplotype block including six newly identified variants linked to reduced expression. *Hum.Genet*. 125:381-391.
- Renner O, Harsch S, Schaeffeler E, Winter S, Schwab M, Krawczyk M, Rosendahl J, Wittenburg H, Lammert F, Stange EF (2009b) A variant of the SLC10A2 gene encoding the apical sodium-dependent bile acid transporter is a risk factor for gallstone disease. *PLoS.One*. 4.
- Reyes-Moreno C, Laflamme J, Frenette G, Sirard MA, Sullivan R (2008) Spermatozoa modulate epididymal cell proliferation and protein secretion in vitro. *Mol.Reprod.Dev*. 75:512-520.
- Rheaume E, Lachance Y, Zhao HF, Breton N, Dumont M, de LY, Trudel C, Luu-The V, Simard J, Labrie F (1991) Structure and expression of a new complementary DNA encoding the almost exclusive 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase in human adrenals and gonads. *Mol.Endocrinol*. 5:1147-1157.
- Roberts KD (1987) Sterol sulfates in the epididymis; synthesis and possible function in the reproductive process. *J.Steroid Biochem*. 27:337-341.
- Roberts LM, Woodford K, Zhou M, Black DS, Haggerty JE, Tate EH, Grindstaff KK, Mengesha W, Raman C, Zerangue N (2008) Expression of the thyroid hormone transporters monocarboxylate transporter-8 (SLC16A2) and organic ion transporter-14 (SLCO1C1) at the blood-brain barrier. *Endocrinology*. 149:6251-6261.
- Rose RM, Kreuz LE, Holaday JW, Sulak KJ, Johnson CE (1972) Diurnal variation of plasma testosterone and cortisol. *J.Endocrinol*. 54:177-178.

- Roth M, Obaidat A, Hagenbuch B (2012) OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. *Br.J.Pharmacol.* 165:1260-1287.
- Ruder HJ, Loriaux L, Lipsett MB (1972) Estrone sulfate: production rate and metabolism in man. *J.Clin.Invest.* 51:1020-1033.
- Ruokonen A, Laatikainen T, Laitinen EA, Vihko R (1972) Free and sulfate-conjugated neutral steroids in human testis tissue. *Biochemistry.* 11:1411-1416.
- Ruokonen A (1978) Steroid metabolism in testis tissue: the metabolism of pregnenolone, pregnenolone sulfate, dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate in human and boar testes in vitro. *J.Steroid Biochem.* 9:939-946.
- Ruokonen A, Oikarinen A, Vihko R (1986) Regulation of serum testosterone in men with steroid sulfatase deficiency: response to human chorionic gonadotropin. *J.Steroid Biochem.* 25:113-119.
- Ruokonen AO und Vihko RK (1983) Quantitative changes of endogenous unconjugated and sulfated steroids in human testis in relation to synthesis of testosterone in vitro. Influence of a precursor steroid, dehydroepiandrosterone. *J.Androl.* 4:104-107.
- Russel L, Ettl R, Sinha Hikim A, Clegg E (1990) *Histological and histopathological evolution of the testis*, 1. Edition, Cache River Press, Clearwater, Florida, USA, ISBN 0-9627422-0-1
- Saeki T, Munetaka Y, Ueda K, Iwami K, Kanamoto R (2007) Effects of Ala substitution for conserved Cys residues in mouse ileal and hepatic Na⁺-dependent bile acid transporters. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 71:1865-1872.
- Saez JM (1994) Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation. *Endocr.Rev.* 15:574-626.
- Saier MH, Jr. (2000) A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 64:354-411.
- Santner SJ, Feil PD, Santen RJ (1984) In situ estrogen production via the estrone sulfatase pathway in breast tumors: relative importance versus the aromatase pathway. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 59:29-33.

- Sasano H, Okamoto M, Mason JI, Simpson ER, Mendelson CR, Sasano N, Silverberg SG (1989) Immunolocalization of aromatase, 17 alpha-hydroxylase and side-chain-cleavage cytochromes P-450 in the human ovary. *J.Reprod.Fertil.* 85:163-169.
- Satlin LM, Amin V, Wolkoff AW (1997) Organic anion transporting polypeptide mediates organic anion/HCO₃⁻ exchange. *J.Biol.Chem.* 272:26340-26345.
- Sato K (1969) The formation of estriol in the fetoplacental unit during pregnancy. *Acta Obstet.Gynaecol.Jpn.* 16:1-11.
- Scheiffele P, Peranen J, Simons K (1995) N-glycans as apical sorting signals in epithelial cells. *Nature.* 378:96-98.
- Schlegel RA, Hammerstedt R, Cofer GP, Kozarsky K, Freidus D, Williamson P (1986) Changes in the organization of the lipid bilayer of the plasma membrane during spermatogenesis and epididymal maturation. *Biol.Reprod.* 34:379-391.
- Schnell C, Shahmoradi A, Wichert SP, Mayerl S, Hagos Y, Heuer H, Rossner MJ, Hulsmann S (2013) The multispecific thyroid hormone transporter OATP1C1 mediates cell-specific sulforhodamine 101-labeling of hippocampal astrocytes. *Brain Struct.Funct.* 220:193-203.
- Schroeder F, Atshaves BP, McIntosh AL, Gallegos AM, Storey SM, Parr RD, Jefferson JR, Ball JM, Kier AB (2007) Sterol carrier protein-2: new roles in regulating lipid rafts and signaling. *Biochim.Biophys.Acta.* 1771:700-718.
- Schuppe HC, Pilatz A, Hossain H, Meinhardt A, Bergmann M, Haidl G, Weidner W (2010) Orchitis und Infertilität. *Urologe A.* 49:629-635.
- Schwartz TW und Holst B (2007) Allosteric enhancers, allosteric agonists and ago-allosteric modulators: where do they bind and how do they act? *Trends Pharmacol.Sci.* 28:366-373.
- Schweigmann H, Sanchez-Guijo A, Ugele B, Hartmann K, Hartmann MF, Bergmann M, Pfarrer C, Doring B, Wudy SA, Petzinger E, Geyer J, Grosser G (2014) Transport of the placental estriol precursor 16alpha-hydroxy-dehydroepiandrosterone sulfate (16alpha-OH-DHEAS) by stably transfected OAT4-, SOAT-, and NTCP-HEK293 cells. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 143:259-65.
- Schweizer U und Kohrle J (2013) Function of thyroid hormone transporters in the central nervous system. *Biochim.Biophys.Acta.* 1830:3965-3973.

- Selcer KW, Kabler H, Sarap J, Xiao Z, Li PK (2002) Inhibition of steryl sulfatase activity in LNCaP human prostate cancer cells. *Steroids*. 67:821-826.
- Seminara SB, Messager S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Jr., Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwinof KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaugenhaupt SA, Gusella JF, O'Rahilly S, Carlton MB, Crowley WF, Jr., Aparicio SA, Colledge WH (2003) The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N.Engl.J.Med.* 349:1614-1627.
- Shaw RW (1975) Estrogen modulation of gonadotrophin release. *Proc.R.Soc.Med.* 68:73-75.
- Shneider BL, Fox VL, Schwarz KB, Watson CL, Ananthanarayanan M, Thevananther S, Christie DM, Hardikar W, Setchell KD, Mieli-Vergani G, Suchy FJ, Mowat AP (1997) Hepatic basolateral sodium-dependent-bile acid transporter expression in two unusual cases of hypercholanemia and in extrahepatic biliary atresia. *Hepatology*. 25:1176-1183.
- Siiteri PK und MacDonald PC (1963) The utilization of circulating dehydroisoandrosterone sulfate for estrogen synthesis during human pregnancy. *Steroids* 2:713-730.
- Siiteri PK und MacDonald PC (1966) Placental estrogen biosynthesis during human pregnancy. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 26:751-761.
- Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Amarneh B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD, . (1994) Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr.Rev.* 15:342-355.
- Simpson ER, Clyne C, Rubin G, Boon WC, Robertson K, Britt K, Speed C, Jones M (2002) Aromatase--a brief overview. *Annu.Rev.Physiol.* 64:93-127.
- Simpson ER (2003) Sources of estrogen and their importance. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 86:225-230.
- Simpton NB, Cunliffe WJ, Hodgins MB (1983) The relationship between the vitro activity of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase delta 4-5-isomerase in human sebaceous glands and their secretory activity in vivo. *J.Invest.Dermatol.* 81:139-144.
- Splinter PL, Lazaridis KN, Dawson PA, LaRusso NF (2006) Cloning and expression of SLC10A4, a putative organic anion transport protein. *World J.Gastroenterol.* 12:6797-6805.

- St-Pierre MV, Hagenbuch B, Ugele B, Meier PJ, Stallmach T (2002) Characterization of an organic anion-transporting polypeptide (OATP-B) in human placenta. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 87:1856-1863.
- Starka L, Duskova M, Hill M (2014) Dehydroepiandrosterone: A neuroactive steroid. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 145:254-60.
- Stieger B, Hagenbuch B, Landmann L, Hochli M, Schroeder A, Meier PJ (1994) In situ localization of the hepatocytic Na⁺/Taurocholate cotransporting polypeptide in rat liver. *Gastroenterology.* 107:1781-1787.
- Stouffs K, Tournaye H, Liebaers I, Lissens W (2009) Male infertility and the involvement of the X chromosome. *Hum.Reprod.Update.* 15:623-637.
- Straub RH, Konecna L, Hrach S, Rothe G, Kreutz M, Scholmerich J, Falk W, Lang B (1998) Serum dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate are negatively correlated with serum interleukin-6 (IL-6), and DHEA inhibits IL-6 secretion from mononuclear cells in man in vitro: possible link between endocrinosenescence and immunosenescence. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 83:2012-2017.
- Strauss JF, III, Martinez F, Kiriakidou M (1996) Placental steroid hormone synthesis: unique features and unanswered questions. *Biol.Reprod.* 54:303-311.
- Strott CA (1996) Steroid sulfotransferases. *Endocr.Rev.* 17:670-697.
- Strott CA (2002) Sulfonation and molecular action. *Endocr.Rev.* 23:703-732.
- Stumpf WE, Sar M, Joshi SG (1974) Estrogen target cells in the skin. *Experientia.* 30:196-198.
- Sugiyama D, Kusuhara H, Taniguchi H, Ishikawa S, Nozaki Y, Aburatani H, Sugiyama Y (2003) Functional characterization of rat brain-specific organic anion transporter (Oatp14) at the blood-brain barrier: high affinity transporter for thyroxine. *J.Biol.Chem.* 278:43489-43495.
- Sun AQ, Ananthanarayanan M, Soroka CJ, Thevananther S, Shneider BL, Suchy FJ (1998) Sorting of rat liver and ileal sodium-dependent bile acid transporters in polarized epithelial cells. *Am.J.Physiol.* 275:G1045-G1055.
- Sun AQ, Swaby I, Xu S, Suchy FJ (2001) Cell-specific basolateral membrane sorting of the human liver Na⁽⁺⁾-dependent bile acid cotransporter. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.* 280:G1305-G1313.

- Suzuki T, Miki Y, Nakata T, Shiotsu Y, Akinaga S, Inoue K, Ishida T, Kimura M, Moriya T, Sasano H (2003a) Steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in normal human tissue and breast carcinoma. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 86:449-454.
- Suzuki T, Onogawa T, Asano N, Mizutamari H, Mikkaichi T, Tanemoto M, Abe M, Satoh F, Unno M, Nunoki K, Suzuki M, Hishinuma T, Goto J, Shimosegawa T, Matsuno S, Ito S, Abe T (2003b) Identification and characterization of novel rat and human gonad-specific organic anion transporters. *Mol.Endocrinol.* 17:1203-1215.
- Suzuki T, Miki Y, Nakamura Y, Moriya T, Ito K, Ohuchi N, Sasano H (2005) Sex steroid-producing enzymes in human breast cancer. *Endocr.Relat Cancer.* 12:701-720.
- Svechnikov K, Landreh L, Weisser J, Izzo G, Colon E, Svechnikova I, Soder O (2010) Origin, development and regulation of human Leydig cells. *Horm.Res.Paediatr.* 73:93-101.
- Tagawa N, Takano T, Fukata S, Kuma K, Tada H, Izumi Y, Kobayashi Y, Amino N (2001) Serum concentration of androstenediol and androstenediol sulfate in patients with hyperthyroidism and hypothyroidism. *Endocr.J.* 48:345-354.
- Takayasu S, Wakimoto H, Itami S, Sano S (1980) Activity of testosterone 5 alpha-reductase in various tissues of human skin. *J.Invest.Dermatol.* 74:187-191.
- Thiboutot D, Jabara S, McAllister JM, Sivarajah A, Gilliland K, Cong Z, Clawson G (2003) Human skin is a steroidogenic tissue: steroidogenic enzymes and cofactors are expressed in epidermis, normal sebocytes, and an immortalized sebocyte cell line (SEB-1). *J.Invest.Dermatol.* 120:905-914.
- Thornton MJ (2002) The biological actions of estrogens on skin. *Exp.Dermatol.* 11:487-502.
- Thornton MJ, Taylor AH, Mulligan K, Al-Azzawi F, Lyon CC, O'Driscoll J, Messenger AG (2003) The distribution of estrogen receptor beta is distinct to that of estrogen receptor alpha and the androgen receptor in human skin and the pilosebaceous unit. *J.Investig.Dermatol.Symp.Proc.* 8:100-103.
- Tohyama K, Kusuhara H, Sugiyama Y (2004) Involvement of multispecific organic anion transporter, Oatp14 (Slc21a14), in the transport of thyroxine across the blood-brain barrier. *Endocrinology.* 145:4384-4391.

- Tong MH, Christenson LK, Song WC (2004) Aberrant cholesterol transport and impaired steroidogenesis in Leydig cells lacking estrogen sulfotransferase. *Endocrinology*. 145:2487-2497.
- Traub LM und Kornfeld S (1997) The trans-Golgi network: a late secretory sorting station. *Curr.Opin.Cell Biol.* 9:527-533.
- Truett GE, Heeger P, Mynatt RL, Truett AA, Walker JA, Warman ML (2000) Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *Biotechniques*. 29:52-54.
- Ugele B, St-Pierre MV, Pihusch M, Bahn A, Hantschmann P (2003) Characterization and identification of steroid sulfate transporters of human placenta. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.* 284:E390-E398.
- Ugele B, Bahn A, Rex-Haffner M (2008) Functional differences in steroid sulfate uptake of organic anion transporter 4 (OAT4) and organic anion transporting polypeptide 2B1 (OATP2B1) in human placenta. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 111:1-6.
- Urquhart P, Pang S, Hooper NM (2005) N-glycans as apical targeting signals in polarized epithelial cells. *Biochem.Soc.Symp.* 39-45.
- Valimaki VV, Alftan H, Ivaska KK, Loyttyniemi E, Pettersson K, Stenman UH, Valimaki MJ (2004) Serum estradiol, testosterone, and sex hormone-binding globulin as regulators of peak bone mass and bone turnover rate in young Finnish men. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 89:3785-3789.
- van der Deure WM, Hansen PS, Peeters RP, Kyvik KO, Friesema EC, Hegedus L, Visser TJ (2008) Thyroid hormone transport and metabolism by organic anion transporter 1C1 and consequences of genetic variation. *Endocrinology*. 149:5307-5314.
- van Landeghem AA, Poortman J, Nabuurs M, Thijssen JH (1985) Endogenous concentration and subcellular distribution of estrogens in normal and malignant human breast tissue. *Cancer Res.* 45:2900-2906.
- Varila E, Rantala I, Oikarinen A, Risteli J, Reunala T, Oksanen H, Punnonen R (1995) The effect of topical oestradiol on skin collagen of postmenopausal women. *Br.J.Obstet.Gynaecol.* 102:985-989.

- Vassilieva EV und Nusrat A (2008) Vesicular trafficking: molecular tools and targets. *Methods Mol.Biol.* 440:3-14.
- Vazquez MH, de Larminat MA, Gulpide E, Scorticati C, Blaquier JA (1986) Androgen metabolism in the human epididymis. Effect of in vivo estrogen administration. *J.Steroid Biochem.* 25:239-244.
- Vazquez MH, de Larminat MA, Scorticati C, Blaquier JA (1989) The effect of in vitro androgen stimulation upon androgen metabolism and trophic parameters in cultured human epididymis. *Andrologia.* 21:9-17.
- Vermeulen A, Rubens R, Verdonck L (1972) Testosterone secretion and metabolism in male senescence. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 34:730-735.
- Vermeulen A (1976) Plasma levels and secretion rate of steroids with anabolic activity in man. *Environ.Qual.Saf.Suppl.* 171-180.
- Vihko R und Ruokonen A (1975) Steroid sulphates in human adult testicular steroid synthesis. *J.Steroid Biochem.* 6:353-356.
- Visser WE, Friesema EC, Jansen J, Visser TJ (2008) Thyroid hormone transport in and out of cells. *Trends Endocrinol.Metab.* 19:50-56.
- Voutilainen R und Miller WL (1986) Developmental expression of genes for the steroidogenic enzymes P450scc (20,22-desmolase), P450c17 (17 alpha-hydroxylase/17,20-lyase), and P450c21 (21-hydroxylase) in the human fetus. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 63:1145-1150.
- Walker WH (2010) Non-classical actions of testosterone and spermatogenesis. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 365:1557-1569.
- Wang M (2011) Neurosteroids and GABA-A Receptor Function. *Front Endocrinol.* 2.
- Wang W, Xue S, Ingles SA, Chen Q, Diep AT, Frankl HD, Stolz A, Haile RW (2001) An association between genetic polymorphisms in the ileal sodium-dependent bile acid transporter gene and the risk of colorectal adenomas. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 10:931-936.
- Waterman MR und Keeney DS (1996) Signal transduction pathways combining peptide hormones and steroidogenesis. *Vitam.Horm.* 52:129-148.

- Watson CS und Gametchu B (1999) Membrane-initiated steroid actions and the proteins that mediate them. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 220:9-19.
- Weider K, Bergmann M, Brehm R (2011) Connexin 43: its regulatory role in testicular junction dynamics and spermatogenesis. *Histol.Histopathol.* 26:1343-1352.
- Weinbauer G, Luetjens C, Simoni M, Nieschlag E (2010) Physiology of Testicular Function. In: *Andrology. Male Reproductive Health and Dysfunction*, S.11-59, Springer-Link, Berlin Heidelberg, ISBN 978-3-540-78354-1.
- Weinstein RL, Kelch RP, Jenner MR, Kaplan SL, Grumbach MM (1974) Secretion of unconjugated androgens and estrogens by the normal and abnormal human testis before and after human chorionic gonadotropin. *J.Clin.Invest.* 53:1-6.
- Weisz OA und Rodriguez-Boulan E (2009) Apical trafficking in epithelial cells: signals, clusters and motors. *J.Cell Sci.* 122:4253-4266.
- Westholm DE, Salo DR, Viken KJ, Rumbley JN, Anderson GW (2009) The blood-brain barrier thyroxine transporter organic anion-transporting polypeptide 1c1 displays atypical transport kinetics. *Endocrinology.* 150:5153-5162.
- Williams ML und Elias PM (1981) Stratum corneum lipids in disorders of cornification: increased cholesterol sulfate content of stratum corneum in recessive x-linked ichthyosis. *J.Clin.Invest.* 68:1404-1410.
- Wong MH, Oelkers P, Craddock AL, Dawson PA (1994) Expression cloning and characterization of the hamster ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J.Biol.Chem.* 269:1340-1347.
- Wong MH, Oelkers P, Dawson PA (1995) Identification of a mutation in the ileal sodium-dependent bile acid transporter gene that abolishes transport activity. *J.Biol.Chem.* 270:27228-27234.
- Wu CH, Flickinger GL, Archer DF, Touchstone JC (1970) Estrogen formation in vitro by fetal liver, fetal adrenal gland, and placenta of early human pregnancy. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 107:313-317.
- Wu L, Einstein M, Geissler WM, Chan HK, Elliston KO, Andersson S (1993) Expression cloning and characterization of human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2, a

- microsomal enzyme possessing 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity. *J.Biol.Chem.* 268:12964-12969.
- Wu MV und Shah NM (2011) Control of masculinization of the brain and behavior. *Curr.Opin.Neurobiol.* 21:116-123.
- Xu Q, Lin HY, Yeh SD, Yu IC, Wang RS, Chen YT, Zhang C, Altuwajri S, Chen LM, Chuang KH, Chiang HS, Yeh S, Chang C (2007) Infertility with defective spermatogenesis and steroidogenesis in male mice lacking androgen receptor in Leydig cells. *Endocrine.* 32:96-106.
- Yamamoto KR (1985) Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Annu.Rev.Genet.* 19:209-52.:209-252.
- Yamamoto T, Kitawaki J, Urabe M, Honjo H, Tamura T, Noguchi T, Okada H, Sasaki H, Tada A, Terashima Y, . (1993) Estrogen productivity of endometrium and endometrial cancer tissue; influence of aromatase on proliferation of endometrial cancer cells. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 44:463-468.
- Yanaihara A, Yanaihara T, Toma Y, Shimizu Y, Saito H, Okai T, Higashiyama T, Osawa Y (2001) Localization and expression of steroid sulfatase in human fallopian tubes. *Steroids.* 66:87-91.
- Ye SJ, Ying L, Ghosh S, de Franca LR, Russell LD (1993) Sertoli cell cycle: a re-examination of the structural changes during the cycle of the seminiferous epithelium of the rat. *Anat.Rec.* 237:187-198.
- Yoshinaga K und Toshimori K (2003) Organization and modifications of sperm acrosomal molecules during spermatogenesis and epididymal maturation. *Microsc.Res.Tech.* 61:39-45.
- Young MJ, Clyne CD, Cole TJ, Funder JW (2001) Cardiac steroidogenesis in the normal and failing heart. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 86:5121-5126.
- Zangmo R, Singh N, Kumar S, Vanamail P, Tiwari A (2014) Role of dehydroepiandrosterone in improving oocyte and embryo quality in IVF cycles. *Reprod.Biomed.Online.* 28:743-7.
- Zhang C, Yeh S, Chen YT, Wu CC, Chuang KH, Lin HY, Wang RS, Chang YJ, Mendis-Handagama C, Hu L, Lardy H, Chang C (2006) Oligozoospermia with normal fertility in

male mice lacking the androgen receptor in testis peritubular myoid cells. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 103:17718-17723.

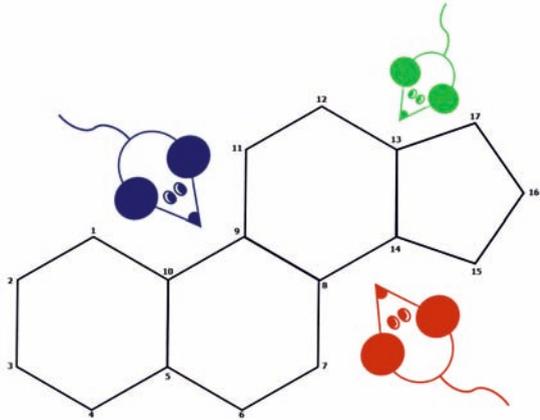
Zhang EY, Phelps MA, Banerjee A, Khantwal CM, Chang C, Helsper F, Swaan PW (2004) Topology scanning and putative three-dimensional structure of the extracellular binding domains of the apical sodium-dependent bile acid transporter (SLC10A2). Biochemistry. 43:11380-11392.

Zhao J, Harada N, Okajima K (2011) Dihydrotestosterone inhibits hair growth in mice by inhibiting insulin-like growth factor-I production in dermal papillae. Growth Horm.IGF.Res. 21:260-267.

Zimmermann E und Critchlow V (1969) Negative feedback and pituitary-adrenal function in female rats. Am.J.Physiol. 216:148-155.

Zouboulis CC (2000) Human skin: an independent peripheral endocrine organ. Horm.Res. 54:230-242.

Zouboulis CC (2004) The human skin as a hormone target and an endocrine gland. Hormones.(Athens.). 3:9-26.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6278-1



9 783835 196278 1