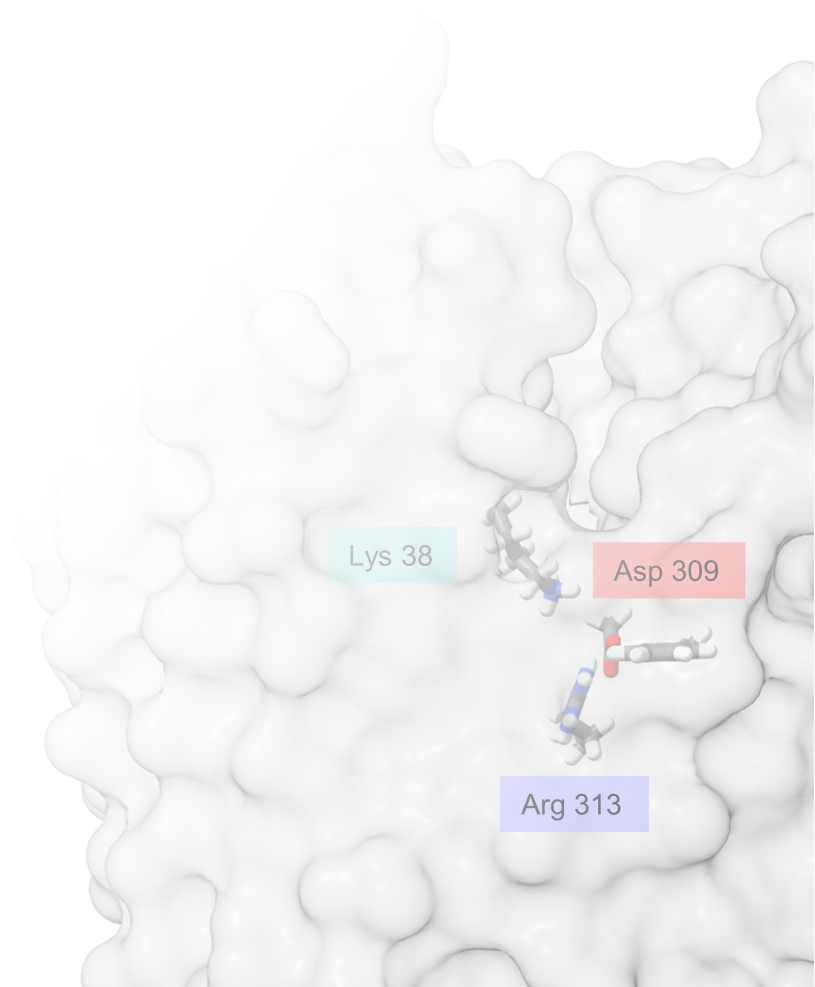


Der Protonentransport über den humanen Monocarboxylattransporter 1 wird durch das anionische Substrat vermittelt

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Katharina Geistlinger
Kiel, 2022



Erster Gutachter:	Prof. Dr. Eric Beitz
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Heiner Schäfer

Tag der mündlichen Prüfung:	01.12.2022
Zum Druck genehmigt:	01.12.2022

Wissenschaftlichkeit heißt nicht, weniger zu streiten,
sondern besser.

Dr. Mai Thi Nguyen-Kim, *Die kleinste gemeinsame Wirklichkeit*

Titelbild: Struktur von MCT1 (PDB ID #6LZ0). Gezeigt sind die Oberfläche des Proteins und die Seitenketten von Position 38, 309, 313 und 367, teilweise mit Beschriftung.

Rückseite: Struktur von MCT1 (PDB ID #6LZ0). Gezeigt ist die Oberfläche des Proteins. Das Bild wurde horizontal gespiegelt.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Zusammenfassung	VII
Abstract	IX
1 Einleitung	1
1.1 Laktat und Laktattransporter in der Physiologie und Pathophysiologie	1
1.1.1 Laktat ist ein zentrales Molekül in der Humanphysiologie	1
1.1.2 Laktat in der Pathophysiologie von Krebs	3
1.1.3 Das Protonierungsgleichgewicht von Laktat und Milchsäure	5
1.1.4 Passage von Laktat und Milchsäure über Zellmembranen	5
1.2 Humane Monocarboxylattransporter (MCT)	8
1.2.1 Die umfangreich charakterisierten Anionen-Protonen-Cotransporter: MCT1, MCT2 und MCT4	9
1.2.2 Der lange Weg zum MCT-Inhibitor	10
1.2.3 Weitere Anionen-Protonen-Cotransporter: MCT3 und MCT6	13
1.2.4 Die Zwitterionen-Uniporter: MCT8, MCT10 und MCT12	13
1.2.5 Eine dritte Gruppe: Die Anionen-und-Zwitterionen-Transporter	15
1.2.6 Gemeinsamkeiten von MCT	15
1.3 Die postulierten Transportmechanismen	16
1.4 Zielsetzung der Arbeit	19
2 Material	21
2.1 Expressionsplasmide, Oligonukleotide und Zellstämme	21
2.2 Antikörper, Enzyme, Kits, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	25
2.3 Nährmedien und Lösungen	29
2.4 Geräte und Software	35
3 Methoden	39
3.1 Präparation von DNA	39
3.1.1 Konzept zur Klonierung von MCT12-Konstrukten	39
3.1.2 Anfügen von Schnittstellen über eine Polymerasekettenreaktion	40
3.1.3 Ortsgerichtete Mutagenese	41

3.1.4	Restriktionsverdau	42
3.1.5	Agarose-Gelelektrophorese	44
3.1.6	Gelextraktion	44
3.1.7	Ligation	45
3.1.8	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>	45
3.1.9	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	45
3.1.10	Schnelltransformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	45
3.1.11	Dauerkulturen von <i>E. coli</i>	46
3.1.12	Isolierung von Plasmid-DNA aus transformierten <i>E. coli</i>	46
3.1.13	Bestimmung von Reinheit und Gehalt der Plasmid-DNA	46
3.1.14	Sequenzierung	46
3.2	Expression in <i>S. cerevisiae</i>	47
3.2.1	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	47
3.2.2	Dauerkulturen von <i>S. cerevisiae</i>	48
3.2.3	Isolierung der mikrosomalen Fraktion aus <i>S. cerevisiae</i>	48
3.2.4	Bestimmung der Gesamt-Proteinkonzentration nach Bradford	49
3.2.5	SDS-PAGE	49
3.2.6	Western Blot	50
3.3	Funktionelle Charakterisierung in <i>S. cerevisiae</i>	51
3.3.1	¹⁴ C-Substrat-Transportassay	51
3.3.2	Lichtstreuungsassay	56
3.4	Bioinformatische Methoden	58
3.4.1	Berechnung des Volumens übertragener Gruppen	58
3.4.2	Alignments	58
3.4.3	Proteinstrukturen und -modelle	58

4 Ergebnisse 59

4.1	Expression von MCT12 in <i>S. cerevisiae</i>	59
4.2	Identifizierung der Laktat-Antenne im humanen Basigin	68
4.3	Inhibition von MCT1 durch Cysteinmodifikatoren	72
4.4	Zeitabhängige Substratpassage über AQP9, MCT1 und MCT1-Mutanten	76
4.4.1	AQP9-vermittelte Glycerol- und Milchsäure-Aufnahme	76
4.4.2	MCT1-vermittelter Laktattransport	79
4.4.3	MCT1 K38X-vermittelter Laktattransport	81
4.4.4	Funktionalität von MCT1 D309N	85
4.5	Aktivierungsenergie von durch MCT1 und MCT1 K38M vermittelten Transport	87
4.6	Substrate, Nicht-Substrate und Transportkinetik von MCT1 und MCT1 K38M	89
4.6.1	Identifizierung von Substraten und Nicht-Substraten	89

4.6.2	Substrataffinität für MCT1 und MCT1 K38M	92
4.7	Protonierungsreaktionen in durch MCT1 vermitteltem Transport	97
4.7.1	pH-Abhängigkeit des Transportes über MCT1 und MCT1 K38M	97
4.7.2	Konzentrationsabhängigkeit der pH-Kurven von MCT1	99
4.7.3	Konzentrationsabhängigkeit der pH-Kurven von MCT1 K38M	101
4.7.4	Schwerwasser-Effekt der Aufnahme über AQP9, MCT1 und MCT1 K38M . .	103
5	Diskussion	111
5.1	Eignung von <i>S. cerevisiae</i> für die Charakterisierung von MCT1 und MCT12	111
5.2	Der Transportmechanismus erfordert Beweglichkeit des Proteins	115
5.3	MCT1 selektiert Substrate auf De-/Protonierbarkeit	117
5.3.1	Direktionalität des Transportes	117
5.3.2	Transport über MCT1 K38M: Säure oder Anion und Proton?	118
5.3.3	Substratspektrum von MCT1 und MCT1 K38M	119
5.4	Das Anion bindet zwischen Lysin 38 und Arginin 313	120
5.4.1	Die Funktion von Arginin 313	120
5.4.2	Die Funktion von Lysin 38	120
5.4.3	Die Bindestelle von Laktat im MCT1	122
5.5	Die Translokation des Protons führt über das Anion	124
5.5.1	Zuordnung der Protonenbindestellen	124
5.5.2	Protonierungsreaktionen im Transportmechanismus	128
5.5.3	Fazit zum Transportmechanismus	131
5.6	Ausblick: Übertragbarkeit des Mechanismus auf andere MCT	132
	Literaturverzeichnis	141
	Eidesstattliche Erklärung	157
	Danksagung	159

Abkürzungsverzeichnis

A

A	Absorption
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AQP	Aquaporin
as	<i>antisense</i>

B

BMTS	Benzylmethanthiosulfonat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin Fraktion V
Bsg	Basigin

C

CAU	Christian-Albrechts-Universität
-----	---------------------------------

D

D ₂ O	Deuteriumoxid, schweres Wasser
dATP	2'-Desoxy-adenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxy-cytosin-5'-triphosphat
dd H ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dGTP	2'-Desoxy-guanosin-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	2'-Desoxy-nucleosid-triphosphate
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxy-Thymin-5'-triphosphat

E

E _A	Aktivierungsenergie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

F

FNT	Formiat-Nitrit-Transporter
fw	<i>forward</i>

H

HA	Hämagglutinin
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus

I

IgC2	Immunglobulin-C2-ähnliche-Domäne
IgI	Immunglobulin-I-ähnliche Domäne

K

kDa	Kilodalton
K _m	Michaelis-Menten-Konstante

L

Lak	L-Laktat
LB	Luria-Bertani

M

MCT	Monocarboxylattransporter
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
MFS	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
MMTS	Methylmethanthiosulfonat
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
MTBST	Magermilchpulver in TBST

Abkürzungsverzeichnis

N

N Anzahl biologischer Replikate

O

OD₆₀₀ optische Dichte bei 600 nm

optMCT12 optimiertes MCT12

P

PAGE Polyacrylamid-
Gelelektrophorese

pCMBS p-Chlormercuribenzolsulfonat

PCR Polymerasekettenreaktion

PDB *protein database*

PEG Polyethylenglykol

Pfam *protein family*

PMTS Propylethanthiosulfonat

PVDF Polyvinylidendifluorid

R

REN Restriktionsendonuklease

RNA Ribonukleinsäure

RPE retinales Pigmentepithel

rv *reverse*

S

s *sense*

S.E.M. Standardfehler des Mittelwertes

SD *synthetic defined*

SDS Natriumlaurylsulfat

SfMCT MCT aus *S. fumaroxidans*

SLC *solute carrier*

SMCT Natriumgekoppelter MCT

ss-DNA DNA-Natriumsalz aus Lachshoden

T

T₃ Triiodthyronin

T₄ Thyroxin

TAE Tris-Acetat-EDTA

TAT1 *t-type amino acid transporter 1*

TBS *TRIS buffered saline*

TBST *TRIS buffered saline*
mit Tween®20

TEMED Tetramethylethylendiamin

TM Transmembrandomäne

TRIS Tris(hydroxymethyl)aminomethan

tRNA Transfer-RNA

V

V_{max} maximale Transportrate

Y

YNB *yeast nitrogen base*

YPD *yeast extract peptone dextrose*

Zusammenfassung

In den letzten Jahren wurde die Funktion von L-Laktat für den Metabolismus von gesunden Zellen und Tumorzellen neu bewertet. Während es lange überwiegend als Abfallstoff galt, ist heute bekannt, dass L-Laktat einen universellen Nährstoff für Zellen darstellt. Mit dieser Neubewertung rückte der Transport des anionischen L-Laktats über Zellmembranen hinweg in den Fokus. Dieser Austausch wird im Menschen zu einem großen Anteil von Vertretern der Monocarboxylattransporter-Familie (MCT-Familie) vermittelt. Aufgrund dieser entscheidenden Rolle stehen MCT im Zentrum des Tumormetabolismus und gelten als valides Arzneistoff-Target. Ein umfassendes Verständnis der mechanistischen Zusammenhänge innerhalb des Transporters könnte die Entwicklung hoch wirksamer Inhibitoren erleichtern und so den Fortschritt in der Behandlung von malignen Erkrankungen beschleunigen.

In dieser Arbeit wurde MCT1 heterolog in *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert und in zwei verschiedenen Funktionsassays untersucht. Im Lichtstreuungsassay wurden Substrate und Nicht-Substrate des Transporters identifiziert. Ein ^{14}C -Aufnahmeassay erlaubte die Bestimmung der Substrataffinität, der pH-Abhängigkeit des Transportes und dessen kinetischer Parameter mit hoher Auflösung. Über die Charakterisierung des Transportes über Punktmutanten von MCT1 wurden einzelnen Positionen im Transporter eine spezifische Funktion zugeordnet. Das gewählte Expressionssystem zeichnet sich durch eine hohe Stabilität gegenüber extrazellulären pH-Werten aus. Ferner ist bekannt, dass MCT1 in *S. cerevisiae* sowohl mit als auch ohne das Begleitprotein Basigin exprimiert werden kann. Dies erlaubte in der vorliegenden Arbeit die Charakterisierung des Einflusses von Basigin auf den Transport und die funktionelle Charakterisierung des Transporters ohne diese Interferenzen.

Die in dieser Arbeit präsentierten Messwerte resultieren in einem Transportmechanismus. Dieser Mechanismus beinhaltet zunächst die Bindung des anionischen Substrates an zwei positive Ladungen innerhalb der Bindetasche: Lysin 38 und Arginin 313. Der Transport des Protons erfolgt ausgehend vom Lysin über das gebundene Substrat hinweg bis zum Aspartat 309. Die Schwächung der ionischen Bindung zwischen Arginin 313 und Aspartat 309 vermittelt dann die Translokation.

Der präsentierte Mechanismus ist mit dem aktuellen Wissensstand zu MCT1 vereinbar. Außerdem ist er wahrscheinlich, in modulierter Form, auf andere Transporter der Familie übertragbar. So könnte er auch für die Zwitterionen-Transporter der Familie gelten, die bisher bei mechanistischen Überlegungen nicht mit einbezogen wurden. Die Messwerte und deren Auswertung in dieser Arbeit schließen wesentliche Lücken in der Literatur, die bisher nur diskutiert wurden. Damit legt diese Arbeit die Grundlage, um die Familie der MCT vollständig zu charakterisieren und zu verstehen.

Abstract

Recently, the function of L-lactate in the metabolism of healthy cells and tumour cells has been reevaluated. For a long time, L-lactate was predominantly considered a waste product. It is known today to serve as universal fuel for cells. With this reassessment, the transport of the L-lactate anion across the plasma membrane moved into focus. In humans, this exchange is mediated to a large extent by members of the monocarboxylate transporter (MCT) family. Hence, they are assigned a pivotal role in tumour metabolism and constitute valid drug targets. An extensive understanding of the mechanistic processes within the transporter would aid the development of potent MCT inhibitors and thus may accelerate progress in the therapy of malignant diseases.

In this work, MCT1 was heterologously expressed in *Saccharomyces cerevisiae* and functionally characterized in two different assays. A light scattering assay identified substrates and non-substrates. A radiolabel uptake assay allowed the determination of substrate affinity, pH dependency of the transport and its kinetic parameters with high resolution. Characterizing transport properties of point mutants of MCT1 enabled assignment of specific functions to individual positions in the transporter. The chosen expression system is highly stable towards a low pH in the extracellular medium. Furthermore, MCT1 can be expressed with or without the ancillary protein basigin,. Therefore, the effect of basigin on the transport process and the functional characterization of transport activity without this interference became measurable.

The data presented in this thesis resulted in the elaboration of a transport mechanism. In the first step, the anionic substrate binds to two positively charged residues within the binding pocket: lysine 38 and arginine 313. The cotransported proton is transferred from lysine onto the bound substrate and further to aspartate 309. This weakens the ionic bond between aspartate 309 and arginine 313 and initiates translocation.

The proposed mechanism is consistent with data presented in the literature. Furthermore, it is probably transferable to other members of the protein family. With adaptations, it could also apply for the zwitterion transporters, which have not been included in mechanistic considerations so far. The data presented here closes major gaps in MCT research that have only been the subject of discussions so far. Therefore, this thesis lays the groundwork for a comprehensive characterization of the MCT family.

1 | Einleitung

1.1 Laktat und Laktattransporter in der Physiologie und Pathophysiologie

1.1.1 Laktat ist ein zentrales Molekül in der Humanphysiologie

L-Laktat ist einer der Metabolite mit der höchsten Konzentration im Blutserum [1]. Diese beträgt im Menschen etwa 1 mM [1]. Dieses L-Laktat ist eng mit dem Glukosestoffwechsel verbunden: D-Glukose wird über die Glykolyse zu L-Laktat umgewandelt, L-Laktat wiederum kann über die Glukoneogenese wieder zu D-Glukose aufgebaut werden. Um herauszufinden, welcher der beiden Nährstoffe den zentralen Energieträger für die Zellen darstellt, wurden unter anderem Differenzmessungen durchgeführt. Dabei wird die Konzentration an Metaboliten im Blut an zwei Stellen im Körper eines Lebewesens gemessen und daraus die Bilanz des dazwischenliegenden Gewebes bestimmt [2, 3]. Für Muskelgewebe und das Abdomen beziehungsweise die Leber ergaben diese Messungen folgendes Bild: Fließt das Blut durch stark arbeitendes Muskelgewebe, nimmt der D-Glukosegehalt ab und der L-Laktatgehalt zu; fließt es durch das Abdomen und die Leber, nimmt der D-Glukosegehalt zu und der L-Laktatgehalt ab [2, 3]. Messwerte wie diese prägten die vorherrschende Interpretation, dass D-Glukose den universellen Energieträger im Metabolismus darstelle. D-Glukose würde in Zellen mit Energiebedarf aufgenommen und oxidativ über den Zitronensäurezyklus und die Atmungskette zu ATP verstoffwechselt. Läuft dieser Prozess nicht vollständig ab, weil zum Beispiel nicht genug Sauerstoff vorhanden ist oder die Kapazität der Zelle für oxidative Decarboxylierung erschöpft ist, würde L-Laktat als Nebenprodukt anfallen [2, 3, 4]. Dieses Nebenprodukt müsse in der Leber wieder über die Glukoneogenese zu D-Glukose aufgebaut werden, um von Zellen genutzt werden zu können [2, 3, 4, 5]. So galt L-Laktat lange Zeit als Abfallprodukt der Glykolyse [6].

Mit der Etablierung von Radiotracer-Untersuchungen kann der Weg einzelner Moleküle D-Glukose und L-Laktat und ihr Schicksal im Metabolismus von Säugetieren gezielt nachvollzogen werden [7]. Die Messungen von Hui *et al.* (2017) zeigten überraschenderweise, dass L-Laktat der Metabolit war, der am stärksten zwischen den Zellen ausgetauscht wurde [7]. Anders als vorher vermutet wurde D-Glukose in allen Organen, ausgenommen vom Gehirn, nicht direkt in den Zitronensäurezyklus eingespeist. Stattdessen wird sie glykolytisch zu zwei Molekülen Pyruvat abgebaut und dann zu L-Laktat reduziert. Die Zellen tauschen dann das gebildete L-Laktat über universell exprimierte L-Laktattransporter, die Monocarboxylattransporter (MCT), untereinander aus [6]. Wird das L-Laktat von einer anderen Zelle aufgenommen, wird es in Form von Pyruvat dem Zitronensäurezyklus

1.1 Laktat und Laktattransporter in der Physiologie und Pathophysiologie

zugeführt (siehe auch Abbildung 1.1). Ein derart hoher Austausch von L-Laktat zwischen Zellen ist im Modell von L-Laktat als Abfallprodukt nicht vorgesehen [7].

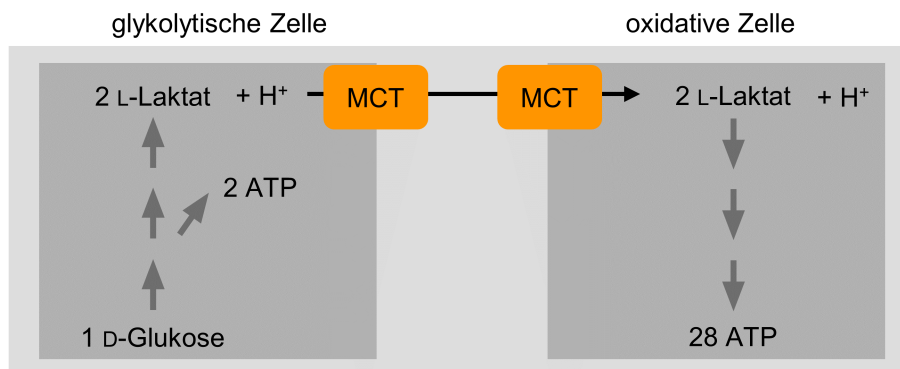


Abbildung 1.1: **Glukose ist ein spezifischer Nährstoff für glykolytische Zellen, Laktat dient als universeller Nährstoff.** In glykolytischen Zellen wird D-Glukose zu L-Laktat abgebaut. L-Laktat wird über Monocarboxylattransporter (MCT) in andere Zellen aufgenommen, die es oxidativ zu ATP umsetzen. Die glykolytische Zelle gewinnt so aus einem Molekül D-Glukose 2 Moleküle ATP, die oxidative Zelle 28 Moleküle ATP [8].

Diese weit verbreitete Entkopplung von der Glykolyse einerseits und der lebenswichtigen Versorgung mit ATP andererseits ermöglicht, dass die Glykolyse nicht in jeder einzelnen Zelle durchlaufen werden muss. Der glykolytische Teil des Stoffwechsels bleibt so den Zellen und Geweben vorbehalten, die auf diesen Stoffwechselweg besonders angewiesen sind [9]. Dort, wo ATP-Gehalt und die Glykolyse eng gekoppelt sein müssen, werden auch keine L-Laktattransporter exprimiert [10]. In den β -Zellen des Pankreas zum Beispiel muss Glukose vollständig oxidativ abgebaut werden. Nur so spiegelt der ATP-Gehalt der Zelle die Glukoseaufnahme wieder und kann eine angemessene Ausschüttung von Insulin vermitteln [6, 10].

In diesem Modell ist D-Glukose ein überwiegend spezifischer Nährstoff für wenige Zelltypen, der auch die Bausteine für die Zellteilung liefert. Im Gegensatz dazu ist L-Laktat ein universeller Nährstoff und ATP-Lieferant, der von allen Zelltypen verwertet wird [6]. Da L-Laktat gleichzeitig in großen Mengen gebildet und auch wieder abgebaut wird, scheint die L-Laktatkonzentration in Differenzmessungen kaum verändert. So wurde die Bedeutung des L-Laktattransportes für die Physiologie lange unterschätzt [6].

L-Laktat stellt außerdem ein Bindeglied zwischen Metabolismus und Immunität dar [11]. Es wird davon ausgegangen, dass ein Großteil der Biomoleküle, die für eine Zellteilung benötigt werden, *de novo* synthetisiert werden [9]. Diese Synthese erfordert große Mengen von Ausgangsstoffen, die unter anderem über die Glykolyse hergestellt werden. Es wird vermutet, dass die Verfügbarkeit dieser Edukte wie zum Beispiel Acetyl-Coenzym A den limitierenden Faktor darstellt und nicht die reine Menge an ATP [9]. Daher betreiben stark proliferierende Zellen wie aktivierte Immunzellen in einem hohen Ausmaß Glykolyse und exportieren folglich große Mengen L-Laktat [11]. Dieser verstärkte Export von L-Laktat führt zu einer Akkumulation im Extrazellulärraum und kann so Auswirkungen

auf den Verlauf chronisch entzündlicher Krankheiten haben [11, 12]. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl L-Laktat als auch L-Milchsäure die Immunantwort verändern und so chronische Entzündungen verstärken können. Nehmen zum Beispiel T-Helferzellen L-Laktat aus dem Extrazellulärraum auf, moduliert dies ihre Zytokinproduktion und den Effektor-Phänotyp [12]. Diese immunmodulierenden Effekte werden auch in Krebszellen beobachtet. Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass L-Laktat/L-Milchsäure in der Tumormikroumgebung eine Unterdrückung der Immunantwort auf den Tumor vermitteln können [13, 14, 15]. Neben diesen immunologisch vermittelten Effekten stellt L-Laktat außerdem auch im Energiestoffwechsel von Tumorzellen einen zentralen Metaboliten dar, wie im Folgenden vorgestellt wird [16].

1.1.2 Laktat in der Pathophysiologie von Krebs

Ein Zusammenhang zwischen der L-Laktat-Produktion und Krebs ist seit fast 100 Jahren bekannt [17]. Die Beobachtung, dass bösartige Tumore oft auch unter ausreichender Sauerstoffzufuhr in einem hohen Ausmaß Glykolyse betreiben und so L-Laktat freisetzen, galt als universelles Merkmal von Krebszellen (Warburg-Effekt). Dass gerade die teilungsaktiven Krebszellen D-Glukose nicht vollständig zu CO₂ oxidieren und so auf einen Großteil der ATP-Ausbeute verzichten, stellte lange einen Widerspruch dar. Man schlussfolgerte, dass die irreversible Schädigung der Atmung in den Mitochondrien die Hauptursache für die Krebsentstehung sei [18].

Viele Untersuchungen der letzten Jahrzehnte deuten jedoch darauf hin, dass Krebszellen genau wie aktivierte Immunzellen die Glykolyse nutzen, um Bausteine für die Zellteilung zu generieren [9, 19]. Durch die bevorzugte Glykolyse fällt L-Laktat an, das aus den Zellen transportiert wird. Diese Hypothese kann also ebenfalls die hohen extrazellulären L-Laktatkonzentration erklären. Die Theorie der defekten Mitochondrien konnte hingegen nicht bestätigt werden. Tatsächlich sind die Mitochondrien in vielen Krebsarten funktionsfähig und betreiben oxidative Phosphorylierung, auch wenn die Glykolyse überwiegt [20, 21, 22]. Außerdem konnten viele Studien zeigen, dass der Metabolismus zwischen verschiedenen Krebsarten, aber auch innerhalb einer Krebsart variabel ist. Krebszellen sind nicht allein auf die Glykolyse angewiesen. Auch Krebszellen nehmen, genau wie gesunde Zellen unter physiologischen Bedingungen, extrazelluläres L-Laktat auf und speisen dieses in den Zitronensäurezyklus ein (siehe Abbildung 1.2 obere Zeile) [7]. Ferner wurden auch Krebsarten charakterisiert, die den universellen Nährstoff L-Laktat gegenüber D-Glukose bevorzugen [16, 23]. Einige dieser oxidativen Krebsarten kapern benachbarte Zellen und zwingen sie zur massiven Glykolyse und damit zum Export von großen Mengen L-Laktat (siehe Abbildung 1.2 untere Zeile, *Reverse Warburg-Effekt*; [24]). Dieses wird dann von den Krebszellen aufgenommen und verwertet. In einigen Tumoren, vor allem während einer Behandlung mit Angiogenesehemmern, wurden glykolytische und oxidative Krebszellen nebeneinander beobachtet, die L-Laktat über Transporter austauschen [16, 25]. Durch diese Arzneistoffe wird die Neubildung von Blutgefäßen im Tumor vermindert. Die Zellen weit entfernt von den Blutgefäßen exprimieren zunehmend Glukosetransporter und einen Transporter zum L-Laktat-Export

1.1 Laktat und Laktattransporter in der Physiologie und Pathophysiologie

[25]. Diese Zellen betreiben wahrscheinlich verstärkt Glykolyse [25]. Die Krebszellen um die Blutgefäße herum werden besser mit Sauerstoff versorgt. Sie exprimieren verstärkt L-Laktattransporter und verstoffwechseln dieses wahrscheinlich anaerob. In dieser metabolischen Symbiose kann im Tumorgewebe trotz schlechterer Versorgung mit Sauerstoff trotzdem der Stoffwechsel aufrecht erhalten werden [25]. Diese Umstrukturierung vermittelt wahrscheinlich eine Resistenz gegenüber Angiogenesehemmern [25]. Letztendlich können Krebszellen sogar ihren Stoffwechsel umstellen, wenn ihr bevorzugtes Substrat nicht in ausreichenden Mengen vorhanden ist [16]. Krebszellen nutzen folglich verschiedene Substrate und Stoffwechselwege und sind in ihrem Metabolismus variabel, anders als lange vermutet. Durch die verstärkte Glykolyse in Tumorzellen oder in gekaperten gesunden Zellen akkumuliert in bösartigen Tumoren L-Laktat im Extrazellulärraum.

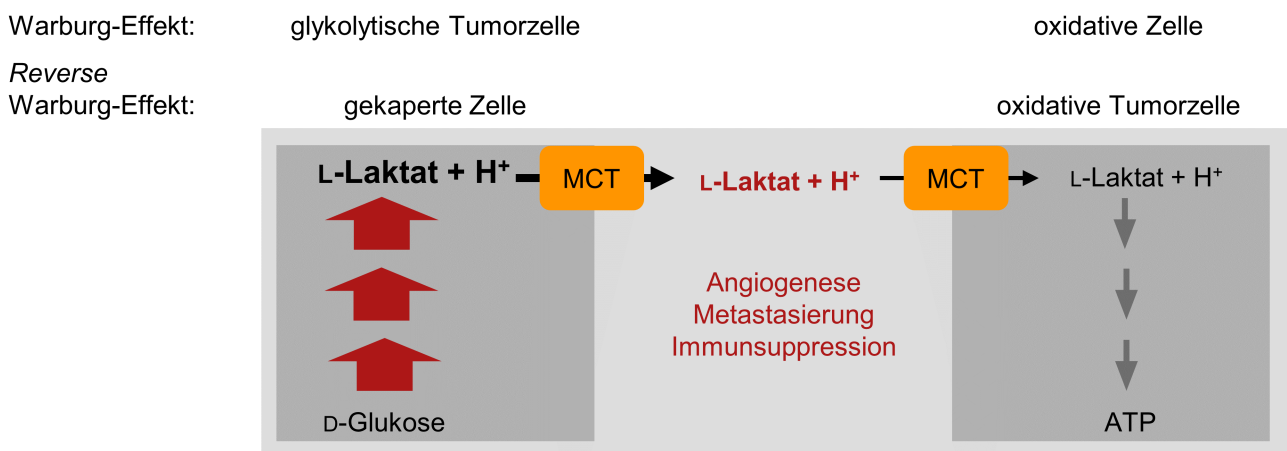


Abbildung 1.2: **Metabolische Symbiose von Tumoren und ihrer Umgebung.** Betreiben Tumorzellen bevorzugt Glykolyse, wird der Warburg-Effekt beobachtet: die Zellen setzen L-Laktat frei. Im Falle des Reverse Warburg-Effektes kapern oxidative Tumorzellen benachbarte Körperzellen und zwingen sie zur Glykolyse und zur Freisetzung von großen Mengen L-Laktat, das dann von den oxidativen Tumorzellen aufgenommen wird. In beiden Fällen werden oft deutlich erhöhte Konzentrationen von L-Laktat im Extrazellulärraum gemessen. Dies kann das Überleben des Tumors auf verschiedenen Wegen fördern.

Die L-Laktatkonzentrationen dort ist stark erhöht und beträgt bis zu 40 mM [26, 27, 28]. Dies entspricht dem 40-fachen der mittleren Serumkonzentration von L-Laktat [1]. Im Gegensatz dazu war die Konzentration von D-Glukose in denselben Tumoren mit bis zu 8 mM ähnlich dessen Serumkonzentration von 5 mM [1]. Eine hohe L-Laktatkonzentration korreliert mit Metastasierung, Rückfällen oder einer geringeren Überlebenszeit der Patienten [27, 28, 29]. Aus diesen Effekten wird geschlussfolgert, dass L-Laktat nicht nur einen Nährstoff für Tumorzellen darstellen kann, sondern auch als Signalmolekül wirkt und das Überleben des Tumors fördert [30]. Hohe Konzentrationen von L-Laktat fördern zum einen die Angiogenese in Tumoren und verbessern so die Versorgung des besonders stoffwechselaktiven Gewebes [30].

Zusammengefasst ist auch für Krebszellen der Austausch von L-Laktat überlebenswichtig: sei es der Efflux von L-Laktat aus vorwiegend glykolytischen Zellen, die Aufnahme von L-Laktat als Nährstoff in oxidative Zellen oder die Akkumulation von L-Laktat als Signalmolekül im Extrazellulärraum.

1.1.3 Das Protonierungsgleichgewicht von Laktat und Milchsäure

Der pH-Wert, also die Protonenkonzentration, bestimmt das Verhältnis von L-Laktat und L-Milchsäure. Der pK_S -Wert gibt den pH-Wert an, an dem beide Moleküle zu gleichen Teilen vorliegen. Liegt der pH-Wert unterhalb des pK_S -Wertes, liegt überwiegend L-Milchsäure vor. Liegt er darüber, ist L-Laktat die überwiegende Form. Die Beziehung zwischen pH-Wert, pK_S -Wert und den Konzentrationen von protonierter $[HA]$ und deprotonierter Form $[A^-]$ einer Säure wird in der Henderson-Hasselbalch-Gleichung ausgedrückt [31]:

$$pH = pK_S - \log \left(\frac{[HA]}{[A^-]} \right) \quad (1.1)$$

Der pK_S -Wert bezieht sich dabei auf die wässrige Umgebung. Andere Umgebungen, wie zum Beispiel organische Lösungsmittel oder die meist hydrophobere Bindetasche innerhalb eines Proteins, können die Säurestärke verändern [32, 33].

Die physikochemischen Eigenschaften von L-Laktat und L-Milchsäure unterscheiden sich deutlich. Das L-Laktat-Anion wird in polaren Umgebungen wie Wasser gut solubilisiert und kann über seine Ladung elektrostatische Wechselwirkungen eingehen. Die neutrale L-Milchsäure hingegen kann diese Interaktionen nur in einem deutlich geringeren Umfang ausbilden und wird in hydrophoben Bereichen besser stabilisiert als das Anion. Aufgrund dieser Unterschiede müssen die beiden Moleküle auf unterschiedlichen Wegen über die Zellmembran geleitet werden [34].

1.1.4 Passage von Laktat und Milchsäure über Zellmembranen

Um biochemische Reaktionen innerhalb einer lebenden Zelle aufrechtzuerhalten, müssen Stoffe über die lipophile Membran hinweg mit der Umgebung ausgetauscht werden. Je nach den chemischen Eigenschaften der Stoffe und den Konzentrationsgradienten nutzt die Zelle verschiedene Wege: Moleküle können entweder direkt durch die Membran hindurch diffundieren oder sie passieren Transmembranproteine wie Kanäle oder Transporter.

Kleine und ungeladene Moleküle können die Membran direkt und ohne weitere Regulierung passieren [35]. Dazu gehören die protonierten und damit ungeladenen Formen schwacher Säuren, wie zum Beispiel Essigsäure, Sorbinsäure und L-Milchsäure [36, 37]. Die Teilchen diffundieren entlang eines Konzentrationsgradienten durch die lipophile Membrenumgebung [38]. Dieser universelle Eintrittsweg in die Zelle ist den geladenen korrespondierenden Basen verwehrt [36, 37].

Kanalproteine können die Diffusion erleichtern, indem sie eine Pore in der Membran bilden. Die L-Milchsäure kann neben der Diffusion über die Membran auch über das humane Aquaporin-9 (AQP9) aufgenommen oder abgegeben werden [39] (siehe auch Abbildung 1.3). Die Kanäle bilden eine Pore aus, die den Transportpfad darstellt. Diesen können dann je nach Aufbau des Transportpfades entweder ungeladene Moleküle oder Ionen passieren [40, 41]. Im Gegensatz zur Diffusion kann der

1.1 Laktat und Laktattransporter in der Physiologie und Pathophysiologie

Teilchenstrom über Kanäle reguliert werden. Dafür kann der Kanal eine Domäne besitzen, die den Transportpfad verschließen kann (*gating*) [42, 43].

Das stark polare L-Laktat-Anion kann die Zellmembran nicht über Diffusion passieren. Im Menschen werden auch Kanäle exprimiert, die L-Laktat leiten können [44]. Diese Kanäle spielen in der Physiologie eine untergeordnete Rolle [45]. Für L-Laktat sind außerdem mehrere Transporter bekannt [45, 46]. Transporter können in mindestens zwei verschiedenen Konformationen vorliegen: zur zytosolischen Seite hin geöffnet (*inward open*) oder zum Extrazellulärraum hin geöffnet (*outward open*). Sie transportieren das Substrat, indem sie es in der einen Konformation binden, in die andere Konformation übergehen und es dann auf der gegenüberliegenden Seite der Membran freisetzen [47]. Dies wird auch als *alternating access* Modell bezeichnet. Da das Substratmolekül in diesem Prozess an den Transporter binden muss, können nur Substrate mit definierten Eigenschaften, zum Beispiel Ladung und Größe, transportiert werden. Uniporter transportieren nur ein einzelnes Teilchen gleichzeitig. Wird in jedem Translokationszyklus nur eine Teilchenart transportiert, bestimmt auch hier der Konzentrationsgradient die vorherrschende Transportrichtung. Werden verschiedene Teilchenarten gleichzeitig in dieselbe (Cotransport, Symport) oder in die entgegengesetzte Richtung (Antiport) transportiert, werden so die jeweiligen Substratgradienten gekoppelt [47]. Das Zusammenwirken aller beteiligten Kräfte entscheidet die Transportrichtung, sodass bei diesem sekundär aktiven Transport auch gegen einen individuellen Konzentrationsgradienten transportiert werden kann.

Die andere Möglichkeit, Substrate entgegen ihres Konzentrationsgradienten zu transportieren, stellen die primär aktiven Transporter dar. Der Transport eines Substrates wird hier mit der Hydrolyse von ATP gekoppelt [47]. Die primär aktiven Transporter werden im Folgenden nicht weiter besprochen, da sie für die direkte Aufnahme und Abgabe von L-Laktat und L-Milchsäure nicht relevant sind.

1.1 Laktat und Laktattransporter in der Physiologie und Pathophysiologie

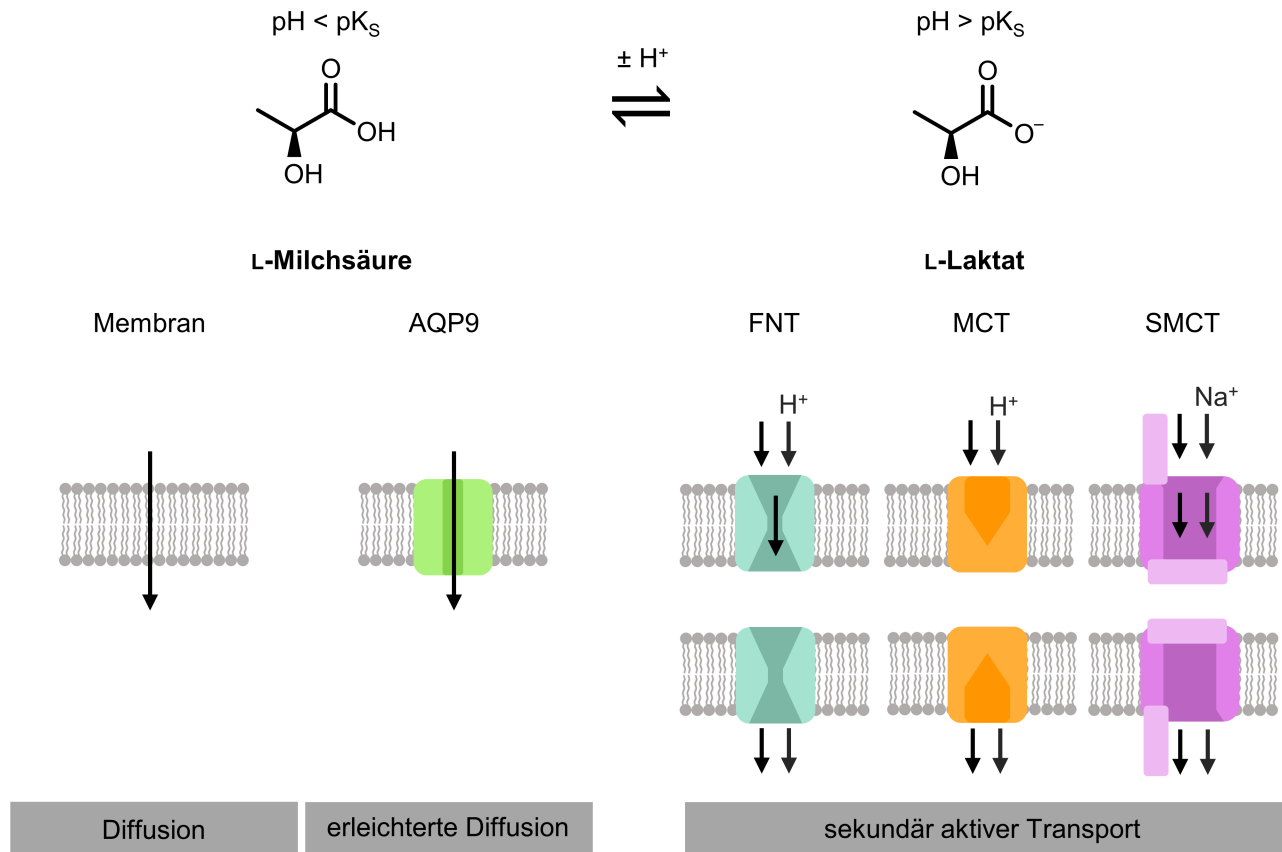


Abbildung 1.3: **Milchsäure und Laktat müssen auf verschiedenen Wegen die Zellmembran passieren.** Abhängig von der Protonenkonzentration liegt das Molekül entweder als protonierte Säure oder als deprotoniertes Anion vor. Die physikochemischen Eigenschaften des Moleküls bestimmen die Wege, auf denen das Molekül die Membran passieren kann. L-Milchsäure kann die Membran direkt durch Diffusion oder durch Kanalproteine wie das Aquaporin-9 (AQP9) passieren. Für L-Laktat sind in verschiedenen Spezies verschiedene Transportproteine, wie die Formiat-Nitrit-Transporter (FNT), Monocarboxylattransporter (MCT) oder Natrium-gekoppelte Monocarboxylattransporter (SMCT), beschrieben worden. Während FNT und MCT das Anion mit einem Proton zusammen transportieren, erfolgt der Transport über SMCT zusammen mit Natriumionen.

Der Cotransport von L-Laktat und Natriumionen kann zum Beispiel durch die Natrium-Monocarboxylat-Cotransporter 1 und 2 (SMCT1 und SMCT2) vermittelt werden [48, 49, 50]. Sie transportieren verschiedene Carboxylat-Anionen, wie zum Beispiel L-Laktat und Butyrat, zusammen mit Natrium im Verhältnis 2 : 1 (SMCT1) oder 1 : 1 (SMCT2) [50, 51]. Die Transporter nutzen dabei den einwärts gerichteten Natrium-Gradienten, um L-Laktat im proximalen Tubulus aus dem Primärharn zurückzugewinnen [52]. Sie teilen sich die SLC5A-Proteinfamilie unter anderem mit den Natrium-gekoppelten Zuckertransportern, SGLT [46]. Für SGLT1 wurde ein Transportmechanismus postuliert, der auch auf andere Mitglieder der Familie und damit auch auf die SMCT übertragen werden könnte [46, 53]. Im SGLT1 binden demnach zwei Natriumionen zuerst an den Transporter, was eine äußere Konstriktion öffnet. So kann der Zucker in die Bindetasche gelangen. Daraufhin öffnet sich eine innere Konstriktion, sodass Natriumionen und Zucker das Protein auf der anderen Seite verlassen können.

1.2 Humane Monocarboxylattransporter (MCT)

Daneben wurden auch in der SLC16A-Proteinfamilie Monocarboxylattransporter identifiziert [45]. Die beiden Proteinfamilien werden heute verschiedenen *Protein Family (Pfam) Clans* zugeordnet, da sie deutliche Unterschiede in den Primärsequenzen aufweisen und daher wahrscheinlich kaum miteinander verwandt sind [54]. Für fünf Vertreter der SLC16A-Familie wurde ein Monocarboxylat-Protonen-Cotransport nachgewiesen oder postuliert: MCT1, MCT2, MCT3, MCT4 und MCT6 [45]. Für diesen Cotransport mit Protonen konnte der Transportmechanismus bisher noch nicht abschließend beschrieben werden.

Formiat-Nitrit-Transporter (FNT), die in einzelligen Lebewesen beschrieben wurden, jedoch nicht in Mehrzellern, vermitteln ebenfalls einen Cotransport von L-Laktat und Protonen [55]. Auch für diese Proteine konnte ein Mechanismus beschrieben werden [56, 57, 58]. Hier werden L-Laktat-Anionen und Protonen am Eingang des Transporters elektrostatisch angezogen und gelangen in den Transportpfad. In der hydrophoben Proteinumgebung wird die Protonierung von L-Laktat erleichtert, entsprechend einer Verschiebung von 2 - 3 log-Einheiten des pK_S -Wertes im Vergleich zu dem in Wasser [56]. Das cotransportierte Ion bindet hier während des Transportes nicht an das Protein, wie bei den SMCT, sondern wird an das Carboxylat gebunden. In ungeladener Form passiert die L-Milchsäure den Transportpfad und wird auf der gegenüberliegenden Seite der Membran wieder als L-Laktat und Proton freigegeben.

Die humanen MCT1, MCT2 und MCT4 spielen eine zentrale Rolle im L-Laktattransport im Menschen [45]. Ob in ihrem Transportmechanismus das Cosubstrat ähnlich der SLC5A-Familie an das Protein bindet oder ob analog zu bei den FNT das Proton auf das Carboxylat-Anion übergeht und intermediär Milchsäure entsteht, ist bisher noch nicht eindeutig geklärt.

1.2 Humane Monocarboxylattransporter (MCT)

Die humanen MCT teilen viele Merkmale der übergeordneten *Major Facilitator Superfamily* (MFS). Alle 14 identifizierten MCT bestehen aus zwölf vergleichsweise lipophilen alpha-helikalen Transmembrandomänen (TM) [59]. Diese werden über hydrophile Segmente miteinander verbunden. Die Termini liegen innerhalb der Zelle. Typisch für die MFS ist, dass die TM 1-6 eine hohe Sequenzähnlichkeit zu den TM 7-12 aufweisen und die Proteine symmetrisch aufgebaut sind [47]. Es wird vermutet, dass eine Gen-Duplikation eines Vorgängerproteins stattgefunden hat, sodass es zunächst aus zwei gleichartigen Hälften bestand, die sich im Laufe der Evolution verändert haben. Transporter der MFS weisen ein breites Substratspektrum auf, wobei für die Substratspezifität eines Transporters jeweils nur wenige Aminosäuren im Protein verantwortlich zu sein scheinen [47]. Besonders auffällig für die MCT ist der große intrazelluläre *loop* zwischen den Transmembrandomänen 6 und 7 [59]. Dieser ist wenig konserviert und zwischen 29 (MCT4) und 105 Aminosäuren (MCT5) lang [10].

Humane MCT weisen ein spezifisches Expressionsmuster auf. Die Expression von MCT-Isoformen

wird wahrscheinlich auf den Ebenen der Epigenetik und der Transkription sowie post-transkriptionell reguliert [45]. Die Aktivität der Proteine wird außerdem über die Interaktion mit anderen Proteinen reguliert. In vielen Expressionssystemen wurde beobachtet, dass die Interaktion von einigen Vertretern der MCT mit *chaperones* wie Basigin oder Embigin für das *trafficking* an die Membran notwendig ist [45]. Außerdem wurde auch ein direkter Einfluss von anderen Proteinen auf den Transport gezeigt: als Protonenantenne können Basigin und Carboanhydrasen lokal die Protonenkonzentration erhöhen und damit den Transport verändern [45, 60, 61]. Eine Ansammlung von Ladungen auf der Oberfläche des Basigins befindet sich in der Nähe der Membran und, in Assoziation mit MCT1, direkt über dem Eingang des Transportpfades [62]. Basigin kann so über die elektrostatische Anziehung von L-Laktat und Protonen direkt die Aufnahme von L-Laktat in die Zellen hinein erhöhen, unabhängig vom *trafficking* [60].

Die MCT werden oft anhand ihres Substratspektrums in zwei Untergruppen unterteilt, die Anionen-Protonen-Cotransporter und die Zwitterionentransporter. Für MCT5, MCT11, MCT13 und MCT14 konnte bisher noch kein Substrat identifiziert werden [45].

1.2.1 Die umfangreich charakterisierten Anionen-Protonen-Cotransporter: MCT1, MCT2 und MCT4

MCT1, MCT2 und MCT4 transportieren Monocarboxylat-Anionen wie L-Laktat, Acetat und Pyruvat jeweils zusammen mit einem Proton und daher pH-abhängig [45, 63]. Das Substratspektrum von MCT1 ist breit und umfasst neben den oben genannten Verbindungen außerdem Arzneistoffe und Aminosäure-Derivate wie *N*-Acetyl-L-Leucin und 5-Oxoprolin [63, 64, 65]. Mehrfach geladene Di- und Tricarboxylate und Zwitterionen werden nicht toleriert [63, 66, 67].

Die Substratelektivität und die pH-Abhängigkeit des Transportes von MCT2 ähneln stark den Eigenschaften von MCT1 [68]. Die Affinität der Substrate für den Transporter ist hier jedoch ungefähr sechsmal höher [68]. Für MCT2 und MCT8 wurden Hinweise auf Homodimerisierung gefunden [69, 70]. MCT2 ist jedoch der einzige Vertreter, für den es Anzeichen eines kooperativen Transportes gibt [69].

Vom Transport über MCT4 sind einige MCT1-Substrate, zum Beispiel das 5-Oxoprolin, ausgeschlossen. Für MCT4 wird diskutiert, ob es sich im Vergleich zu MCT1 und MCT2 um einen hoch- oder niedrigaffinen L-Laktattransporter handelt [59, 71, 72, 73]. Dimmer *et al.* (2000) zeigten, dass die L-Laktataffinität von MCT4 einen hoch- und einen niedrig-affinen Anteil hat, was für die verschiedenen Beobachtungen verantwortlich sein könnte [72]. Im Gegensatz dazu wird das Expressionsmuster, die Funktion von MCT4 und die Präferenz des Transporters für L-Laktat über Pyruvat in der Literatur einheitlich angegeben [71, 72, 73].

Die MCT-Isoformen 1, 2 und 4 unterscheiden sich, neben der Substrataffinität, hauptsächlich in ihrem Expressionsmuster. MCT1 wird im Menschen ubiquitär exprimiert, mit Ausnahme des Pankreas

1.2 Humane Monocarboxylattransporter (MCT)

[10, 45]. Daher wird MCT1 situativ die Aufnahme oder die Abgabe von L-Laktat zugesprochen [59]. MCT2 wird stark in Zellen exprimiert, die Glukoneogenese und oxidative Atmung betreiben. Daher gilt MCT2 als wesentlicher Transporter für die L-Laktat-Aufnahme [10]. Im Gegensatz dazu ist MCT4 vor allem in glykolytischen Geweben anzutreffen und ihm wird eine zentrale Rolle im L-Laktat-Efflux zugeschrieben [10, 73].

MCT1, MCT2 und MCT4 sind wesentlich für die Verteilung von L-Laktat im Körper verantwortlich und so auch an dessen Physiologie und an pathophysiologischen Prozessen beteiligt. Für viele Krebsarten wurde eine gesteigerte Expression von MCT1 und MCT4 detektiert, die oft mit einer schlechten Prognose einhergeht [30]. Über die Inhibition von MCT1 und 4 wurde *in vitro* und im Mausmodell *in vivo* eine Hemmung des Tumorwachstums erzielt [74, 75]. Inhibitoren von MCT1 und MCT2 könnten die Aufnahme von L-Laktat in oxidative Tumorzellen hemmen und so die ATP-Versorgung der Zellen unterbrechen. Die Inhibition von MCT4, oder je nach Stoffwechsellaage auch MCT1, könnte den Ausstrom von L-Laktat damit auch Protonen aus glykolytischen Tumorzellen verhindern. Dies könnte den pH-Wert innerhalb der Zellen absenken und eine Endprodukthemmung der Glykolyse bewirken und so die Krebszellen schädigen. Folglich stellen diese MCT vielversprechende Wirkstoff-Targets dar.

1.2.2 Der lange Weg zum MCT-Inhibitor

Die T-Zell-Aktivierung ist an der Entstehung von Autoimmunerkrankungen und auch bei der Transplantatabstoßung beteiligt [76]. In einem zellbasierten Screening zur Inhibition der T-Zell-Aktivierung wurde ein *hit* identifiziert und auf eine höhere Wirksamkeit im Assay hin optimiert [76]. Das Target dieser Verbindung, MCT1, wurde 10 Jahre nach dieser ersten Veröffentlichung identifiziert und die Substanz weiter optimiert [77]. Dass MCT1-Inhibitoren das Wachstum von bösartigen Tumoren verhindern können, eröffnete eine weitere Indikation für diese Verbindungen [16]. Nach weiteren Optimierungsschritten [78] wurde mit AZD3965 ein Molekül vorgestellt, das sich *in vitro* und im Xenograft in der Maus *in vivo* gegen verschiedene Tumore als wirksam erwiesen hat (siehe Abbildung 1.4 oben) [79, 80]. 2013 begann eine klinische Phase-I-Studie zur Anwendung von AZD3965 bei fortgeschrittenem Krebs im Menschen, für die seit April 2022 Daten vorliegen [81]. BAY-8002 ist ein zweiter, unabhängig von AZD3965 entwickelter selektiver MCT1-Inhibitor (siehe Abbildung 1.4 unten) [74]. Dieser wurde in einem zellbasierten Screening von 3 Millionen Substanzen identifiziert. Im Rahmen der Strukturaufklärung von MCT1 wurden beide Inhibitoren in der Bindetasche in der *outward-open*-Konformation aufgelöst [62].

1.2 Humane Monocarboxylattransporter (MCT)

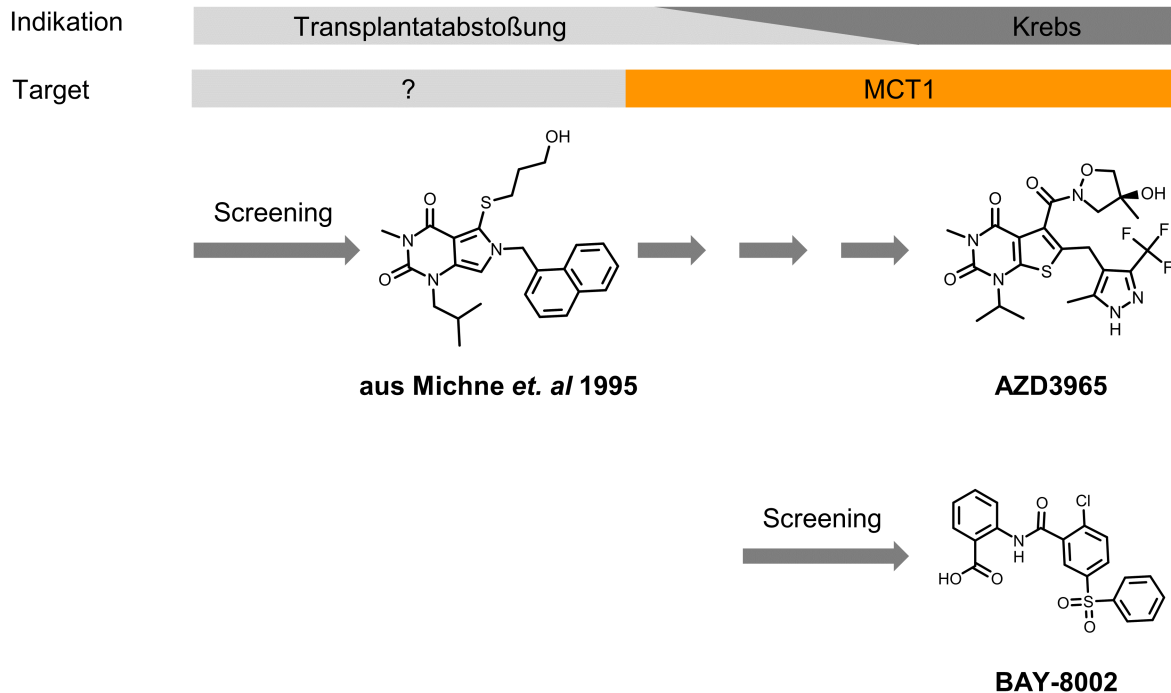


Abbildung 1.4: **Schematische Darstellung der Entwicklung der beiden MCT1-Inhibitoren.** AZD3965 wurde über die wiederholte Optimierung und Testung entwickelt. Dabei wurde das Target erst später entdeckt. Auch die Indikation des Wirkstoffes wurde geändert. Die Wirksamkeit von BAY-8002 wurde in einem umfangreichen Hochdurchsatzscreening entdeckt.

Beide Inhibitoren haben außerdem gemeinsam, dass Resistenzentwicklungen durch eine Überexpression von MCT4 beschrieben wurden [74, 82]. Daher befinden sich auch MCT4-selektive Inhibitoren, wie zum Beispiel VB124 (siehe Abbildung 1.5 links), in der präklinischen Entwicklung [83]. Ein weiterer Ansatz zur Umgehung dieser Resistenz sind duale MCT1-MCT4-Inhibitoren, die aktuell entwickelt und getestet werden [84]. Mit diesem Ziel der dualen MCT-Inhibition startete auch die Entwicklung von 7ACC2, einem Cumarin-Derivat (siehe Abbildung 1.5 rechts) [85]. Die beobachteten Effekte dieser Verbindungsklasse auf Krebszelllinien ließen sich in einem heterologen Expressionssystem jedoch nicht auf die Hemmung von MCT zurückführen. Stattdessen wird hier der mitochondriale Pyruvattransporter (MPC) gehemmt [86, 87]. Interessanterweise wurde der MPC-Inhibitor 7ACC2 trotzdem in der Bindetasche der MCT1-Struktur in der *inward-open*-Konformation aufgelöst [62].

1.2 Humane Monocarboxylattransporter (MCT)

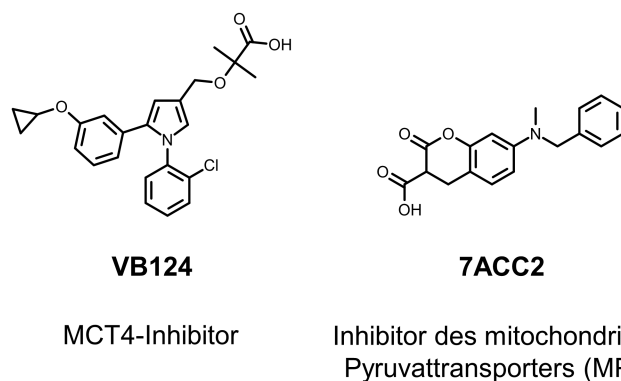


Abbildung 1.5: **Strukturformeln von VB124 und 7ACC2.** VB124 ist ein selektiver MCT4-Inhibitor. Die Wirksamkeit von 7ACC2 lässt sich nicht, wie zunächst angenommen, auf die Inhibition von MCT zurückführen, sondern auf die Wirkung am mitochondrialen Pyruvattransporter.

Die bisherigen Strategien zur Entwicklung eines MCT-Inhibitors waren stets langwierig: Von der ersten Struktur bis zum Start der klinischen Testung von AZD3965 vergingen 18 Jahre, für die Entdeckung von BAY-8002 wurden Millionen von Substanzen untersucht und die Wirksamkeit der Cumarin-Derivate beruht auf einem anderen Target [74, 76, 81, 87]. Die hier angewendeten Strategien zur Wirkstoffentwicklung, wie zum Beispiel die Identifizierung eines *hits* in einem Screening von vielen Substanzen, beruhen auf der sorgfältigen Beobachtung von zufälligen Ereignissen. Dieses Vorgehen hat viele Erkenntnisse der Naturwissenschaften und viele Arzneistoffe und ihre Wirkungen ans Licht gebracht, ist aber stets abhängig vom Zufall [88].

Darüber hinaus können Arzneistoffe heute auch basierend auf den dreidimensionalen Strukturen ihrer Targets oder anderer Liganden entwickelt werden. Diese meist computergestützte rationale Wirkstoffentwicklung hat in den letzten Jahrzehnten die Entwicklung neuer Arzneistoffklassen ermöglicht [88]. Das Verfahren wurde zunächst auf Enzyme angewendet. So entstand zum Beispiel die Wirkstoffklasse der Neuraminidase-Inhibitoren [88]. Arzneistoffe, die Übergangszustände einer enzymatisch katalysierten Reaktion imitieren, zeichnen sich durch außerordentlich hohe Affinität und Spezifität aus [89, 90]. Ein Beispiel für eine derartige Arzneistoffklasse sind die HIV-1-Protease-Inhibitoren um Saquinavir [91, 92].

Das Konzept eines Enzyms als Katalysator einer chemischen Reaktion kann, leicht verändert, auch auf Kanäle und Transporter übertragen werden: Sie katalysieren den Durchtritt von Molekülen durch die Zellmembran, indem sie eine veränderte Umgebung innerhalb der Membran schaffen und so die Aktivierungsenergie der Molekülbewegung senken. Genauso können viele der Begriffe und Definitionen zur Charakterisierung eines Enzyms, wie die Michaelis-Menten-Konstante (K_m), die maximale Geschwindigkeit (v_{max}) und die Aktivierungsenergie (E_A), direkt auf Transporter übertragen werden. Über die Aufklärung des Transportmechanismus könnten so auch bei Transportern Übergangszustände identifiziert werden. Diese zu imitieren könnte dementsprechend die Affinität dieser Inhibitoren deutlich erhöhen.

Rationale Arzneistoffentwicklung, insbesondere die Entwicklung von Inhibitoren der Übergangs-

zustände, erfordert detailliertes Wissen über Funktion, Struktur und den genauen Mechanismus einer katalysierten Reaktion [90, 93]. Viele der oben genannten Kenngrößen wurden bisher vor allem anhand von MCT1 bestimmt. Auch die Struktur von humanem MCT1, humanem MCT2 und von einem bakteriellen Homolog der MCT konnten in den letzten Jahren aufgelöst werden [69, 62, 94]. Für den Transportmechanismus von humanem MCT wurden bisher verschiedene Modelle vorgestellt [62, 95, 96]. Von denen konnte bisher keins durch umfangreiche und zusammenhängende experimentelle Daten bestätigt werden.

Ein Transportmechanismus, der sich auf alle charakterisierten Mitglieder innerhalb der Proteinfamilie übertragen lässt, könnte die rationale Entwicklung von neuen MCT-Inhibitoren deutlich beschleunigen. Somit könnten zum Beispiel deutlich höher affine, selektive MCT1- und MCT4-Inhibitoren entwickelt werden. Auch ein dualer Inhibitor beider Isoformen könnte so effizienter entwickelt werden, wenn die Funktion und die räumliche Ausrichtung jeder Aminosäure innerhalb der Bindetasche bekannt ist. Darüber hinaus könnten auch einige der bisher weniger charakterisierten MCT therapeutisch interessant sein. Sollte sich herausstellen, dass eine Inhibition dieser weiteren Isoformen pharmakologisch nutzbar ist, würde auch hier die Arzneistoffentwicklung profitieren.

1.2.3 Weitere Anionen-Protonen-Cotransporter: MCT3 und MCT6

Die Expression von MCT3 wurde bisher nur in der basolateralen Membran des retinalen Pigmentepithels detektiert [97]. Die Photorezeptoren sind auf Glykolyse angewiesen, daher ist das Zusammenspiel von MCT1 und MCT3 im darunterliegenden Epithel von entscheidender Bedeutung, um den gerichteten Fluss der Metabolite wie L-Laktat sicherzustellen [98, 99]. Für MCT6 wurde der Transport verschiedener Xenobiotika, darunter Nateglinid, und das körpereigene Prostaglandin $F_{2\alpha}$ (siehe auch Abbildung 1.6) gezeigt [100, 101]. Auch hier wird von einem Cotransport der Monocarboxylat-Anionen mit einem Proton ausgegangen [100]. Es wird angenommen, dass MCT6 die Verteilung und die Interaktion von Arzneistoffen in der Niere beeinflusst und für die Lipid- und Energiehomöostase relevant ist [102, 103].

1.2.4 Die Zwitterionen-Uniporter: MCT8, MCT10 und MCT12

MCT8 und MCT10 vermitteln den Transport von Schilddrüsenhormonen wie Triiodthyronin (T_3) und Thyroxin (T_4) (siehe auch Abbildung 1.6) [104, 105]. MCT10 vermittelt außerdem auch die Aufnahme von aromatischen Aminosäuren und trägt daher auch die Bezeichnung *T-type amino acid transporter*, kurz TAT1 [106]. Die Substrate der beiden Transporter liegen im Neutralen als Zwitterionen vor und werden im annähernd neutralen Milieu unabhängig vom pH-Wert transportiert [106, 107]. Für MCT10 wurde außerdem gezeigt, dass der Transport elektroneutral ist [106]. Daher stellen MCT8 und MCT10 wahrscheinlich Zwitterion-Uniporter dar. MCT8 nimmt eine zentrale Rolle bei der Verteilung der Schilddrüsenhormone im Körper ein. Bei homozygoten Defekten im Protein

1.2 Humane Monocarboxylattransporter (MCT)

treten schwere neurologische Entwicklungsstörungen bei leicht veränderten Serumkonzentrationen von T3 und T4 auf (Allan-Herndon-Dudley-Syndrom) [108].

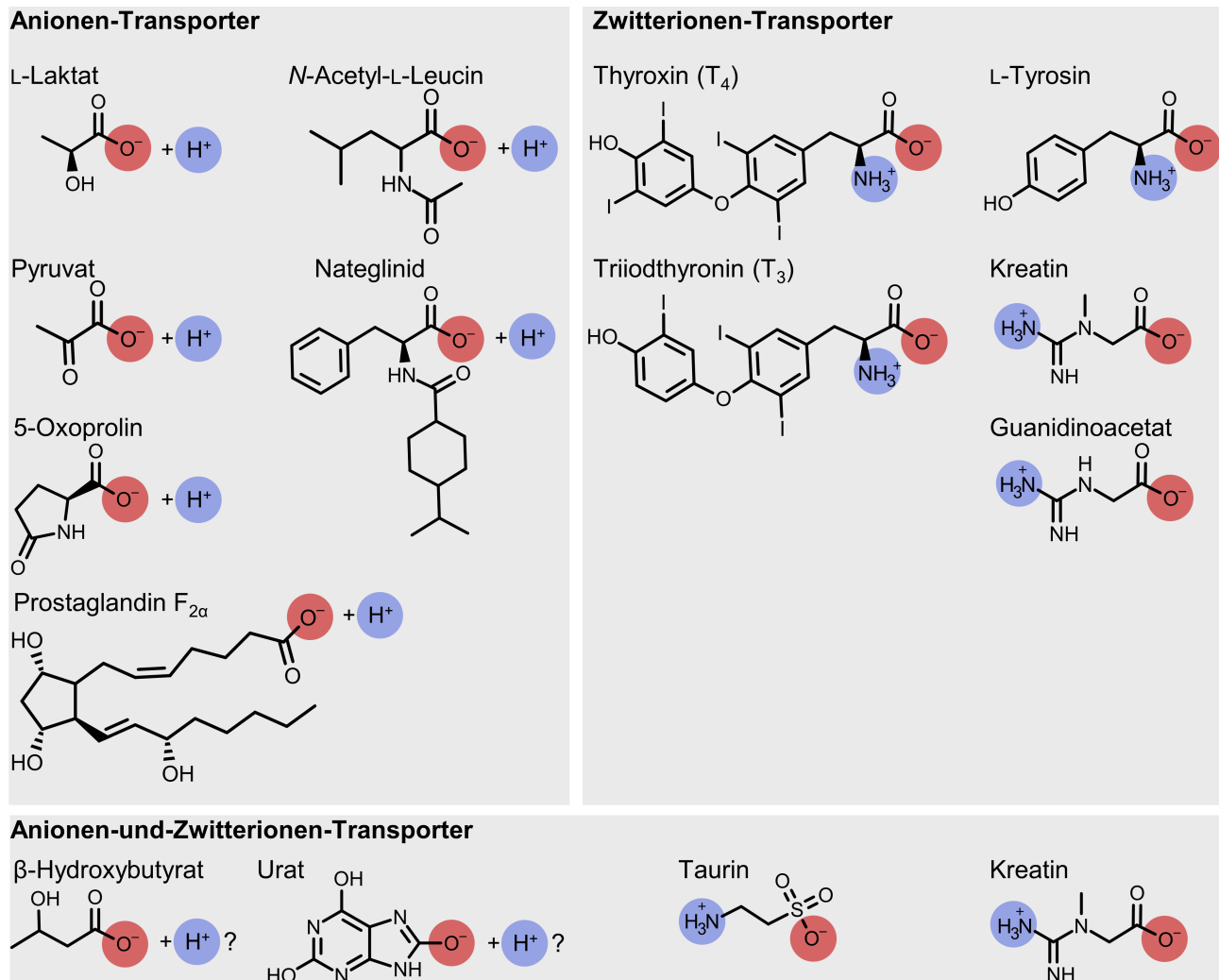


Abbildung 1.6: **Substrate von verschiedenen MCT im Vergleich.** Negative Ladungen sind rot markiert, positive Ladungen sind in blau eingefärbt. Die Substrate der Anionen-Transporter sind stets einfach negativ geladen und werden mit einem einfach positiv geladenen Proton zusammen transportiert. Die Substrate der Zwitterionen-Transporter werden alleine transportiert. Das Substratspektrum der Anionen- und-Zwitterionen-Transporter überschneidet sich mit den beiden Gruppen. Zum Cotransport mit Protonen in dieser Untergruppe lässt sich derzeit aufgrund der Datenlage keine Aussage machen.

MCT12 vermittelt den Influx und Efflux der Zwitterionen Kreatin und Guanidinoacetat und ist wahrscheinlich am Energiehaushalt des kortikalen Linsenepithels und an der Guanidinoacetat-Homöostase beteiligt [109, 110, 111, 112] (die in [112] auch beschriebene Glukosurie konnte nicht bestätigt werden, siehe dazu [113]). Die Angaben zur pH-Abhängigkeit des Transportes sind widersprüchlich: Der Kreatin-Transport über MCT12 nimmt in vielen Studien zu höheren pH-Werten hin zu [109, 111, 114]. Es gibt im Gegensatz dazu auch Angaben, der Transport sei pH-unabhängig [115]. Da der Transport zum Säuren hin jedoch nicht zunimmt, handelt es sich wahrscheinlich nicht von einem Protonen-Cotransport. Insgesamt ist hier davon auszugehen, dass es sich wie auch bei

MCT8 und MCT10 um einen Zwitterionen-Uniport handelt.

1.2.5 Eine dritte Gruppe: Die Anionen-und-Zwitterionen-Transporter

Es gibt Hinweise darauf, dass MCT7 und MCT9 eine dritte, zusätzliche Untergruppe bilden. Diese Vertreter transportieren wahrscheinlich sowohl anionische wie auch zwitterionische Stoffe.

Für MCT7 wurde zunächst ein anionisches Carboxylat, das β -Hydroxybutyrat, als Substrat beschrieben [116]. Für diesen Transporter gibt es mittlerweile auch Hinweise auf einen weitgehend pH-unabhängigen Transport von zwitterionischem Taurin [117]. Dieser lässt sich jedoch nicht durch Zwitterionen kompetitiv inhibieren, sondern nur durch Substanzen, die in Summe eine negative Ladung trugen. Taurin trägt darüber hinaus keine Carboxylat-, sondern eine Sulfonatgruppe.

Für MCT9 wurde mit Urat sowohl ein anionisches Substrat beschrieben als auch das Zwitterion Kreatin [109, 110, 118, 119]. Futagi *et al.* (2020) sammelten außerdem Hinweise darauf, dass sich der Kreatin-Transport zwischen MCT12 und MCT9 unterscheidet [109]. Es handelt sich also in beiden Transportern wahrscheinlich um einen etwas anderen Transportmechanismus.

1.2.6 Gemeinsamkeiten von MCT

Dass es eine dritte Untergruppe innerhalb der MCT gibt, deutet darauf hin, dass sich Anionen- und Zwitterionentransport nicht gegenseitig ausschließen müssen. Betrachtet man alle charakterisierten MCT, so lassen sich, neben der engen Verwandtschaft, einige Gemeinsamkeiten feststellen:

1. **Der Transport ist stets elektroneutral.** Sei es der Cotransport von Anion und Proton oder der Uniport eines Zwitterions, die Summe aller transportierten Ladungen ist gleich null.
2. **Alle MCT-Substrate weisen eine im Neutralen anionische, aber protonierbare Gruppe auf.** Diese Gruppe stellt meist eine Oxosäure dar. Häufig handelt es sich dabei um eine Carbonsäure.
3. **Einzelne Aminosäuren in MCT sind hoch konserviert.** Dazu gehört das Arginin 313 aus dem MCT1. In MCT4, dem Zwitterionentransporter MCT8 und dem bakteriellen SfMCT stellt die korrespondierende Position ebenfalls ein Arginin dar, für das in allen vier Proteinen eine zentrale Bedeutung im Transport vermutet wird [62, 94, 120, 121].

Diese Gemeinsamkeiten lassen vermuten, dass die MCT einen gemeinsamen und universellen Transportmechanismus teilen.

1.3 Die postulierten Transportmechanismen

Der Begriff „*alternating access*“ beschreibt ein Modell, in dem die Substratbindestelle eines Transportes abwechselnd zur einen und zur anderen Seite der Membran hin zugänglich ist [122]. Dieses Modell entstand Mitte der 1950er Jahre. Es konnte die beobachteten Eigenschaften von Transportern erklären und ist bis heute akzeptiert. Heute sind drei verschiedene Gruppen von Translokations-Mechanismen bekannt, die diese alternierende Exposition der Bindestelle ermöglichen. Bei einem *rocker-switch*-Mechanismus kippen sowohl die C- und N-terminale Hälfte in einer schaukelnden Bewegung. Kippt nur eine bewegliche Hälfte des Proteins gegen eine unbewegliche zweite Hälfte, spricht man von einem *rocking-bundle*-Mechanismus. Beim *elevator*-Modell sind beide Proteinhälften weitgehend unbeweglich. Hier wird das Substrat von einer einzigen flexiblen Gruppe durch das ganze Protein hindurch bewegt. Die kryo-Elektronenmikroskopie-Strukturen von MCT1, MCT2 und dem bakteriellen Homolog SfMCT aus *Syntrophobacter fumaroxidans* weisen zusammengefasst darauf hin, dass sich sowohl die N- als auch die C-terminale Hälfte des Proteins während der Translokation bewegen. Basierend auf den Strukturen handelt es sich also wahrscheinlich um einen *rocker-switch*-Mechanismus [69, 62, 94]. Da diese Translokation für die Proteine der MFS typisch und mit experimentellen Daten gut vereinbar ist, wurde er schon vor der Aufklärung der Struktur postuliert [95, 122]. Einen weiteren Hinweis auf diesen Translokationsmechanismus lieferte die Identifizierung der Bindestelle des Inhibitors pCMBS: Dieser Inhibitor überträgt eine große funktionelle Gruppe auf das Cystein 159 im MCT1 [123]. Dieses befindet sich innerhalb des Proteins an einer Engstelle zwischen den beiden Proteinhälften [62]. Damit blockiert die übertragene voluminöse Gruppe wahrscheinlich die Kippbewegung des Translokationsmechanismus [123].

Dass in MCT1, MCT2, MCT3 und MCT4 jeweils genau ein Proton mit einem Monocarboxylat zusammen transportiert wird, wurde bereits häufig in heterologen Expressionssystemen beobachtet. Ob das Anion und das Proton dabei in einer festgelegten Reihenfolge binden, wurde schon untersucht, als die MCT noch nicht beschrieben waren [124]. Die Reihenfolge, in der Substrate binden, kann bestimmt werden, indem man die Affinität und die maximale Geschwindigkeit des Transportes bei jeweils verschiedenen Konzentrationen der Substrate bestimmt [125]. [63, 68, 72, 126]. Der K_m -Wert von L-Laktat für MCT1 wurde im Neutralen zu 2,8 mM bis 5 mM bestimmt [60, 66, 127, 128]. Oberhalb von pH 7 ist der K_m -Wert jedoch stark pH-abhängig [124]. Zusammen mit Kompetitionsexperimenten kamen Bruijne *et al.* (1983 und 1985) zu dem Schluss, dass das Proton zuerst binden müsse und dann das L-Laktat folgte [124, 129]. Basierend auf diesen Daten galt die Reihenfolge der Substratbindung als aufgeklärt [59]. Vinnakota *et al.* (2011) analysierten publizierte Daten zum Transport über MCT und kamen im Gegensatz dazu zu dem Schluss, dass die vorliegenden Messwerte nicht ausreichten, um das allgemein anerkannte Szenario zu bestätigen [130].

Misst man die Aufnahme über einen breiten Bereich an pH-Werten, dann variiert der Protonierungsstatus und damit die physikochemischen Eigenschaften einzelner Positionen im Protein. So kann

auf ihre Funktion im Transportmechanismus zurückgeschlossen werden. Die verfügbaren pH-Kurven beschränken sich meist auf MCT1 bis MCT4, die in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert wurden. Die pH-Abhängigkeit im Bereich von pH 4 bis 8 wurde dabei in vergleichsweise großen Schritten von 0,5 oder 1 pH-Einheiten aufgelöst [66, 127, 96, 126, 131, 132]. Dabei steigt die Transportrate meist sigmoidal zum Säuren hin an bis zu einem pH von 5 und bleibt dann zum Säuren hin ähnlich hoch. Bader *et al.* bestimmten die pH-Abhängigkeit von MCT1-vermitteltem Transport in der Hefe und beschrieben eine sinkende Transportrate bei pH 3,8 [133]. Hier wurden die Messwerte nicht sigmoidal gefittet, sondern mit einer symmetrischen Glockenkurve. Der genaue Verlauf der pH-Abhängigkeit steht folglich zur Diskussion.

Kleine Ionen mit einer hohen Ladungsdichte können das Protein nicht als einzelnes Teilchen durchqueren, sondern müssen an einen Bindungspartner gebunden werden. Zum Beispiel bindet das Proton beim Transport durch die FNT an das L-Laktat [56]. Die Natriumionen, die von der SLC5-Familie cotransportiert werden, binden wiederum an verschiedene Seitenketten im Protein [53]. Die Na²⁺-Bindestelle im SGLT1 zum Beispiel besteht aus den Hydroxylgruppen zweier Serine und drei Carbonylgruppen von Peptidbindungen [53]. Da es sich bei MCT1-4 um Protonen-Cotransporter handelt, muss sich in der Proteinumgebung mindestens eine protonierbare Position befinden: die Protonenbindestelle. Lysin 38 in MCT1 weist in den beiden Konformationen verschiedene pK_S-Werte auf und ist innerhalb der Bindetasche lokalisiert [95, 96]. Daher wird diskutiert, ob es sich hier um die Protonenbindestelle handelt (siehe Abbildung 1.7) [95, 96]. Während Wilson *et al.* (2009) davon ausgingen, dass L-Laktat an das protonierte Lysin 38 bindet und so in der Bindetasche L-Milchsäure entsteht, schrieben Yamaguchi *et al.* (2020) dem Lysin vor allem ein pH-abhängiges *gating* zu. Da die korrespondierende Position in SfMCT keine geladene Position aufweist, verorteten Bosshart *et al.* (2019) die Protonenbindestelle in einem Cluster aus geladenen Aminosäuren auf der extrazellulären Oberfläche des Proteins [94]. Folglich konnte in der Familie der MCT noch keine Protonenbindestelle eindeutig identifiziert werden.

Zhang *et al.* (2020) schrieben basierend auf ihren funktionellen Daten und der kryoelektronenmikroskopischen Struktur von MCT2 dem Aspartat 309 (Nummerierung basierend auf MCT1, siehe Abbildung 1.7) die Funktion als Protonen-Überträger zu, der mit Lysin 38 in einem Wasserstoffbrücken-Netzwerk verbunden ist. Die Erkennung und der Transport des Anions wird vor allem dem Arginin 313 (Nummerierung basierend auf MCT1, siehe Abbildung 1.7) zugeschrieben, das wie oben beschrieben in der MCT-Familie stark konserviert ist und dessen Mutation meist die Funktion der Proteine zerstört [62, 94, 95, 131]. Diese beiden Aminosäuren, Aspartat 309 und Arginin 313, bilden ein Ionenpaar [62, 69, 128]. Die Schwächung dieser ionischen Bindung durch die Protonierung von Aspartat 309 gilt als Auslöser der Translokation [62]. Die voluminöse Seitenkette des Phenylalanins 367 verengt die Bindetasche und definiert so die Substratselektivität [62, 134, 135].

1.4 Die postulierten Transportmechanismen

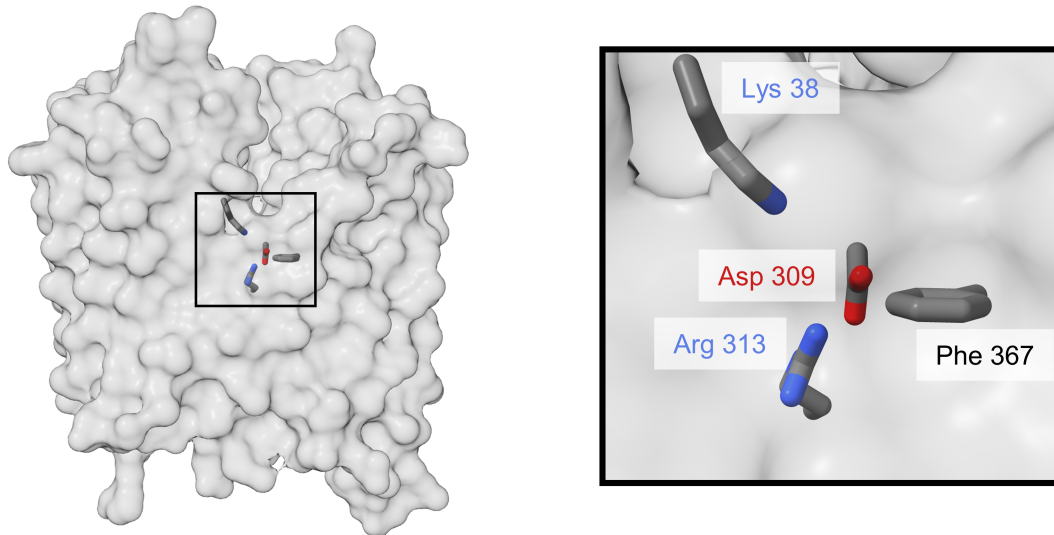


Abbildung 1.7: **Positionen, die für die Funktion von MCT von zentraler Bedeutung sind.** Das Modell basiert auf der kryo-elektronenmikroskopischen Struktur von MCT1 in der *outward-open*-Konformation (PDB ID #6LZ0). Dargestellt sind die Oberfläche des Proteins und die Seitenketten der Positionen 38, 309, 313, 367.

Für Proteine der MFS ist es typisch, dass der Protonierungsstatus von Salzbrücken in der Nähe der Substratbindestelle die Translokation beeinflusst [122]. Diese Salzbrücken und die Substratbindestelle befinden sich bei Proteinen der MFS meist in den TM 1, 4, 7 und 10. Hier folgen die MCT dem Schema der MFS nicht, die Salzbrücken-Partner befinden sich in MCT1 in der 8. TM. Außerdem sind die Positionen der Salzbrücke im Protein nicht streng konserviert. Während in MCT1 an Position 367, dem Substratfilter, nur verzweigte, lipophile Substitutionen toleriert werden, befindet sich hier in MCT8 ein negativ geladenes Aspartat, welches der Ionenbrücken-Partner von Arginin 313 ist [121].

Insgesamt finden sich in der Literatur widersprüchliche Angaben, zum Beispiel zur Reihenfolge der Substratbindung wie auch zur pH-Abhängigkeit des Transportes. Zum Mechanismus des Transportes werden verschiedene Szenarien diskutiert. Diese stützen sich jedoch hauptsächlich auf die Ergebnisse aus Mutagenese-Experimenten, bei denen die Substitution einer Position zum Funktionsverlust führte. Innerhalb der Proteinfamilie sind die einzelnen Vertreter außerdem unterschiedlich gut charakterisiert: Während im MCT1 relevante Aminosäuren für den Transport identifiziert werden konnten, fehlt diese Information bei vielen anderen Isoformen. Dass im MCT8 auch eine relevante Ionenbindung gefunden werden konnte, deutet auf Gemeinsamkeiten im Mechanismus der MCT-Familie hin. Dabei sind die Positionen, an denen sich diese relevanten Aminosäuren befinden, jedoch nicht streng konserviert. Ein Mechanismus, der sich auf eine umfangreiche funktionelle Charakterisierung des Transporters stützt, könnte beleuchten, welche funktionellen Gruppen und welche räumliche Anordnung dieser Gruppen benötigt wird.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Da die Proteinfamilie der MCT an zentralen pathophysiologischen Prozessen beteiligt ist, stellt die Entwicklung von MCT-Inhibitoren eine vielversprechende Strategie zur Arzneistoffentwicklung dar. Diese Entwicklung ist in großen Teilen auf zufallsbasierte Methoden angewiesen, da verlässliches Wissen zum Transportmechanismus und dessen Übergangszuständen fehlt.

Ziel der Arbeit war es, ein umfassendes Bild von den Vorgängen im Transportpfad zu entwickeln. Dafür sollten stellvertretend für die verschiedenen Mitglieder der SLC16A-Familie MCT1 und MCT12 in *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert und charakterisiert werden. Dieses Expressionssystem erlaubt die Durchführung von verschiedenen Experimenten mit einer hohen Auflösung der Messwerte, wie der Bestimmung von Substrataffinität, pH-Abhängigkeit, Aktivierungsenergie und dem Austausch des Lösungsmittels. Über die Einführung von Punktmutationen kann die Funktion einzelner Positionen bestimmt werden. Gleichzeitig können die Eigenschaften der Transporter mit denen anderer Transmembranproteine, wie zum Beispiel Kanäle, verglichen werden. Dies erlaubt insgesamt detaillierte Rückschlüsse auf die Direktionalität des Transportes, Protonierungsreaktionen und die Substratbindestelle.

2 | Material

Falls nicht anders angegeben, wurden Lösungen mit doppelt destilliertem Wasser (dd H₂O) angesetzt.

2.1 Expressionsplasmide, Oligonukleotide und Zellstämme

Expressionsplasmide

Zur Expression in *S. cerevisiae* wurde ein modifizierter pDRT196-Vektor verwendet, der im Folgenden pDRTXa genannt wird [55]. Die in diesem Vektor exprimierten Transportproteine trugen einen N-terminalen Hämagglutinin-tag (HA-tag) und einen C-terminalen tag aus zehn aufeinanderfolgenden Histidinen (His₁₀-tag).

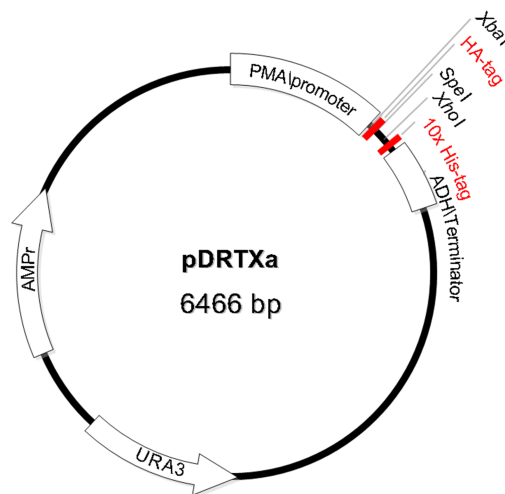


Abbildung 2.1: **Vektorkarte des Plasmids pDRTXa, das zur Expression in *S. cerevisiae* verwendet wurde.** Die tags sind in Rot markiert. Die Selektion von transformierten Hefen erfolgte über das Gen URA-3, das für die Orotidin-5'-phosphat-Decarboxylase kodiert. Zur Vervielfältigung der DNA wurde das Plasmid in *E. coli* eingebracht. Hier wurde über die Resistenz gegenüber Ampicillin selektiert, die durch das Gen AMP^r und das Enzym β -Laktamase vermittelt wird.

2.1 Expressionsplasmide, Oligonukleotide und Zellstämme

Das verwendete Plasmid wurde mit folgenden Inserts zur Verfügung gestellt:

- humanes Aquaporin-9 (AQP9) (NCBI Gen ID 366), veröffentlicht in [39],
- humaner Monocarboxylattransporter 1 (MCT1) (NCBI Gen ID NM_001166496), veröffentlicht in [60],
- MCT1 C159S, veröffentlicht in [123],
- humanes Basigin (Bsg) (NCBI Gen ID NM_001728) verkürzt als Bsg Igl als N-terminales Fusionsprotein mit MCT1, veröffentlicht in [60],
- Basigin K108A K111A K127A R166A R201A R203A (=Bsg allKRtoA) verkürzt als Bsg Igl als N-terminales Fusionsprotein mit MCT1, veröffentlicht in [60].

Oligonukleotide

Humanes MCT12 (Gen ID NM_213606) wurde im pcDNA3.1+/C-(K)-DYK-Vektor von Gen-script (Rijswijk, Niederlande) bezogen. Über die Verwendung von Primern mit nicht-komplementären Enden wurden über eine PCR Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen angefügt. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide werden in folgender Tabelle (siehe Tabelle 2.1) dargestellt.

Tabelle 2.1: **Oligonukleotide zum Anfügen von Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen (REN).** Nicht-komplementäre Basen sind als Kleinbuchstaben angegeben.

Oligonukleotid	REN	Sequenz 5'→3'
MCT12 Spe I Bcl I fw	<i>Spe</i> I, <i>Bcl</i> I	gtactagttgatcaATGCCATCAGGAAGTCACTGG
MCT12 SpeI fw	<i>Spe</i> I	ttactagtATGCCATCAGGAAGTCACTGG
MCT12 XhoI rv	<i>Xho</i> I	aactcgagTGTGAGGCTGTAGCCAGG

2.1 Expressionsplasmide, Oligonukleotide und Zellstämme

In dieser Arbeit wurde außerdem ein Konstrukt von MCT12 verwendet, das eine veränderte Basensequenz für den N-Terminus enthielt. Diese veränderte Sequenz wurde über Schnittstellen in das Plasmid mit MCT12 eingefügt (siehe Abschnitt 3.1.1) und ist in Tabelle 2.2 aufgeführt.

Tabelle 2.2: **Sequenz des optimierten N-Terminus.** Zum Wildtyp-Gen nicht-komplementäre Basen sind als Kleinbuchstaben angegeben.

```
actagttccggatcgatcgaaggtcgactgcagATGCCATCAGGAAGTCACTGGACAGCAAACCTCTTCCAAGA
TCATAACTTGGCTGTTGGAGCAACCTGGAAAgGAgGAgAAgcgcAAgACCATGGCAAAAGTAAAT
AGAGCTCGGTCTACCTCCCCTCCAGATGGAGGCTGGGGCTGGATGATTGTGGCTGGCTGTTT
CCTTGTTACCATCTGCACACGGGCAGTCACAAGATGTATCTCAATTTTTTTTTGTGGAGTTCC
AGACATACTTCACTCAGGATTACGCACAAACGGCATGGATCC
```

Die Identität aller verwendeten Konstrukte wurde über Sequenzierung bestätigt. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in folgender Tabelle (siehe Tabelle 2.3) aufgeführt.

Tabelle 2.3: **Oligonukleotide, die zur Sequenzierung verwendet wurden.** Gegebenenfalls zum Wildtyp-Gen nicht-komplementäre Basen sind als Kleinbuchstaben angegeben. Auch Oligonukleotide mit nicht-komplementären Basen konnten erfolgreich zur Sequenzierung eingesetzt werden.

Oligonukleotid	Sequenz 5'→3'
PMA5 fw	CTCTCTTTTATACACACATTC
ADH3 rv	CATAAATCATAAGAAATTCGC
MCT1 R313N fw	GTTGACATGGTAGCCaatCCATCTATGGGACTT
MCT1 F367N rv	GGCAAATCCAAAGAATCCCGCATAGACACA
MCT12 Seq fw	ACGAGTCTGAAGCATCTCTACC
MCT12 Seq rv	ATCTCTGTGGTCACTACTGG
MCT12 Seq rv 1905	ATAAGTCTAGCAAAGCCAAGC
hBsg d308 fw	ttACTAGTATGTCCGACCAGGCCATCATCACGC
BsgΔ1-220_R98A_R100A_fw	CATCACGCTCgcCGTGgcCAGCCACCTGG

2.1 Expressionsplasmide, Oligonukleotide und Zellstämme

In dieser Arbeit wurden über ortsgerichtete Mutagenese einzelne Nukleotide ausgetauscht, um Punktmutanten der Membranproteine zu erzeugen. Dafür wurden in der Polymerasekettenreaktion Oligonukleotide eingesetzt, die nicht exakt komplementär zur Ausgangs-DNA sind. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in der folgenden Tabelle (siehe Tabelle 2.4) dargestellt.

Tabelle 2.4: **Oligonukleotide, die zur ortsgerichteten Mutagenese eingesetzt wurden.** Zum Wildtyp-Gen nicht-komplementäre Basen sind als Kleinbuchstaben angegeben.

Oligonukleotid	Sequenz 5'→3'
MCT1 K38A fw	TCTTATGCATTTCCCgcgTCAATTACTGTC
MCT1 K38C fw	TCTTATGCATTTCCCtgcTCAATTACTGTC
MCT1 K38E fw	TCTTATGCATTTCCCgAATCAATTACTGTC
MCT1 K38M fw	TCTTATGCATTTCCCAtgTCAATTACTGTC
MCT1 K38R fw	TCTTATGCATTTCCCAgATCAATTACTGTC
MCT1 K38Y fw	TCTTATGCATTTCCCtAcTCAATTACTGTC
MCT1 K38X rv	GGGAAATGCATAAGAGAAGCCGATGG
MCT1 D309N fw	ATTCTGGCTTTTGTTaAtATGGTAGCCCCG
MCT1 D309N rv	AACAAAAGCCAGAATGGAAAGAAGGAAGGC
Bsg Igl K108A K111A fw	GCCCAGAGTGgcGGCTGTGgcGTCGTCAGAAC
Bsg Igl K108A K111A rv	CACTCTGGGCATACTAGTGTCCGCGTAGTCAGG
Bsg Igl allKRtoA A166R fw	CCTCGCAGGGCcgGTCAGAGCTACACATTG
Bsg Igl allKRtoA A166R rv	GCCCTGCGAGGAACTCACGAAGAACCTGC
Bsg Igl R201A R203A fw	CATCACGCTCgcCGTGgcCAGCCACCTGG
Bsg Igl R201A R203A rv	GAGCGTGATGATGGCCTGGTCGGAGCCCTTGG

Zellstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme sind in Tabelle 2.5 aufgeführt. Der Hefestamm W303-1A Δ jen1 Δ ady2 wurde von M. Casal zur Verfügung gestellt [136].

Tabelle 2.5: **Verwendete Zelllinien.**

Organismus	Stamm	Genotyp
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α	<i>F</i> – 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>rK</i> –, <i>mK</i> +) <i>phoA</i> <i>supE44</i> – <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>
<i>S. cerevisiae</i>	W303-1A	<i>MATa leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1</i> <i>ade2-1 his3-11,15</i>
<i>S. cerevisiae</i>	W303-1A Δ jen1 Δ ady2	<i>MATa leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1</i> <i>ade2-1 his3-11,15 jen1::kanMX4 ady2::hphMX4</i>

2.2 Antikörper, Enzyme, Kits, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Antikörper

Produkt	Anbieter
Anti-Hämagglutinin-Antikörper, Maus, monoklonal	Roche, Mannheim
Anti-Penta-His-Antikörper, Maus, monoklonal	Qiagen, Hilden
Anti-Maus-Antikörper, Peroxidase <i>AffiniPure</i> IgG, Ziege	Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, UK

Enzyme

Produkt	Anbieter
OneTaq® DNA-Polymerase und Puffer	New England Biolabs, Frankfurt am Main
PfuTurbo DNA-Polymerase und Puffer	Agilent Technologies, Waldbronn
Restriktionsendonukleasen und Puffer	Fisher Scientific, Schwerte
T4-DNA-Ligase	Fisher Scientific, Schwerte
Zymolyase® 20T	Carl Roth, Karlsruhe

Kits

Produkt	Anbieter
<i>Bio-Rad Protein Assay</i>	Bio-Rad, Feldkirchen
<i>Clarity Western ECLSubstrate</i>	Bio-Rad, Feldkirchen
<i>Hi Yield®Gel/PCR Fragment Extraction Kit</i>	Süd-Laborbedarf, Gauting
<i>Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System</i>	Promega, Walldorf

Chemikalien

Produkt	Anbieter
Acetat, Natriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe
Acetat, Natriumsalz (1- ¹⁴ C)-markiert	Hartmann Analytic, Braunschweig
Acrylamid, Rotiphorese® Gel 40	Carl Roth, Karlsruhe
Adenin Hemisulfat	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Agarose, LE	GENAXXON bioscience, Ulm
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Ammoniumsulfat	Carl Roth, Karlsruhe
Ampicillin	GENAXXON bioscience, Ulm
L-Alanin	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
L-Arginin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
L-Asparagin Monohydrat	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
L-Aspartat Natriumsalz Monohydrat	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Bacto™ Hefeextrakt	Fisher Scientific, Schwerte
Bacto™ Pepton	Fisher Scientific, Schwerte
Benzylmethanthiosulfonat, (BMTS)	Interchim, Montluçon, Frankreich
Bromphenolblau, Natriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe
BSA, Rinderserumalbumin Fraktion V	Carl Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Chloracetat, Natriumsalz	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
cOmplete™ -Proteaseinhibitor-Cocktail (EDTA-frei)	Roche, Mannheim
L-Cystein	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
2'-Desoxy-Adenosin-5'-triphosphat, dATP (100 mM)	Fisher Scientific, Schwerte
2'-Desoxy-Cytosin-5'-triphosphat, dCTP (100 mM)	Fisher Scientific, Schwerte
2'-Desoxy-Guanosin-5'-triphosphat, dGTP (100 mM)	Fisher Scientific, Schwerte
2'-Desoxy-Thymidin-5'-triphosphat, dTTP (100 mM)	Fisher Scientific, Schwerte
Deuteriumoxid, D ₂ O	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen Euriso-Top, Saarbrücken
Difco™ <i>Yeast Nitrogen Base</i> (YNB), ohne Aminosäuren	Becton, Dickinson and Company, Heidelberg
Dimethylsulfoxid, (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
DNA-Natriumsalz aus Lachshoden	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Essigsäure	J. T. Baker, München

2.2 Antikörper, Enzyme, Kits, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Produkt	Anbieter
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethansulfonat, Natriumsalz	TCl, Eschborn
Ethidiumbromid	MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich
Ethylendiamintetraessigsäure, EDTA	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure, EDTA, Dinatriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe
D-(+)-Glukose	Carl Roth, Karlsruhe
L-Glutamat Natriumsalz Monohydrat	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
L-Glutamin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Glycerol, wasserfrei	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerol, (1,3- ¹⁴ C)-markiert	Hartmann Analytic, Braunschweig
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth, Karlsruhe
L-Histidin Hydrochlorid Monohydrat	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
L-Isoleucin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogencitrat	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Kreatin	Alfa Aesar, Heysham UK
Kreatin (4- ¹⁴ C)-markiert	Hartmann Analytic, Braunschweig
(S)-(-)-Laktamid (= L-Laktamid)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
L-Laktat, Natriumsalz	Applichem, Darmstadt
L-Laktat, Natriumsalz, (1- ¹⁴ C)-markiert	Hartmann Analytic, Braunschweig
λ-DNA	Fisher Scientific, Schwerte
LB-Agar (Lennox)	Carl Roth, Karlsruhe
LB-Medium (Lennox)	Carl Roth, Karlsruhe
L-Leucin	Carl Roth, Karlsruhe
Lithiumacetat	Carl Roth, Karlsruhe
L-Lysin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
β-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol	J. T. Baker, München
L-Methionin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Milchpulver, <i>blotting grade</i> , fettarm	Carl Roth, Karlsruhe
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Carl Roth, Karlsruhe
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat	Carl Roth, Karlsruhe

2.2 Antikörper, Enzyme, Kits, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Produkt	Anbieter
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumlaurylsulfat, SDS	Applichem, Darmstadt
Orange G	Carl Roth, Karlsruhe
Oxoid™ Agar	Oxoid, Basingstoke USA
Polyethylenglykol 3500	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
L-Prolin	Carl Roth, Karlsruhe
Propionat, Natriumsalz	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Propionat, Natriumsalz, (1- ¹⁴ C)-markiert	Hartmann Analytic, Braunschweig
Propylmethanthiosulfonat, PMTS	Interchim, Montluçon, Frankreich
Protein Marker III (<i>pre-stained</i>), peqGOLD	VWR Darmstadt
Quicksafe A	Zinsser Analytic, Eschborn
Rotiszint® eco plus	Carl Roth, Karlsruhe
D-(+)-Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
L-Serin	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Tetramethylethyldiamin, TEMED	GENAXXON bioscience, Ulm
L-Threonin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Tris(hydroxymethyl)aminomethan, TRIS	Carl Roth, Karlsruhe
Tween®20	Applichem, Darmstadt
L-Tryptophan	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
L-Tyrosin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
D,L-Valin	Acros Organics, Geel, Belgien
Zitronensäure, wasserfrei	Carl Roth, Karlsruhe

Verbrauchsmaterialien

Produkt	Anbieter
Blotting-Membran, Amersham Hybond®-P, PVDF, (0,45 µm)	VWR Darmstadt
Einmalspritzen NORM-JECT®	Eydam, Kiel
Glasgeräte	Schott Instruments, Mainz
Glaskugeln, säuregewaschen, (Ø 425-600 µm)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Glasmikrofaserfilter, GF/C, (Ø 25 mm)	VWR Darmstadt
Parafilm®M	Bemis, Neenah, USA

Produkt	Anbieter
Partikelfilter Filtropur S (\varnothing 0,45 μm)	Sarstedt, Nümbrecht
Pasteurpipetten	Eydam, Kiel
Petrischalen, rund	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Polystyrolküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Szintillationsgefäße, <i>snaptwist</i> , 6,5 ml	VWR Darmstadt
Sterilfilter Filtropur S (\varnothing 0,2 μm)	Sarstedt, Nümbrecht
Ultrazentrifugengefäß, Polypropylen, 1,5 ml	Beckmann Coulter, Krefeld
Whatman® Chromatographie-Papiere	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Zentrifugenröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht

2.3 Nährmedien und Lösungen

Alle Nährmedien wurden nach ihrer Herstellung entweder autoklaviert oder sterilfiltriert. Zusätze zur Selektion wurden erst nach dem Autoklavieren hinzugefügt, Agar davor. Wurden Kulturen für einen Lichtstreuungsassay angesetzt, wurde sterilfiltriertes Medium verwendet oder autoklaviertes Medium partikelfiltriert.

Nährmedien für *E. coli*

LB-Flüssigmedium

20 g LB-Medium (Lennox)
ad 1 l dd H₂O

LB-Agarplatten

35 g LB-Agar (Lennox)
ad 1 l dd H₂O

Zur Selektion transformierter Klone wurde gegebenenfalls Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ zugegeben.

Nährmedien für *S. cerevisiae*

YPD-Flüssigmedium

20 g Pepton
10 g Hefeextrakt
20 g D-Glukose
ad 1 l dd H₂O

YPD-Agarplatten

20 g Agar
ad 1 l YPD-Flüssigmedium

2.3 Nährmedien und Lösungen

SD-Flüssigmedium

1,7 g	YNB
5 g	Ammoniumsulfat
20 g	D-Glukose
ad 1 l	dd H ₂ O

SD-Agarplatten

20 g	Agar
ad 1 l	SD-Flüssigmedium

Der pH-Wert des SD-Flüssigmediums wurde vor dem autoklavieren auf pH 5,6 eingestellt. Die verwendeten Hefestämme sind nach der Transformation auf den Zusatz von vier Nährstoffen im SD-Medium angewiesen: Adenin (25 mg l⁻¹), L-Histidin (20 mg l⁻¹), L-Leucin (100 mg l⁻¹) und L-Tryptophan (10 mg l⁻¹). Die Zusätze wurden als sterilfiltrierte Lösungen zugegeben und das supplementierte Medium (SD-AHLW) wurde zur Kultivierung der transformierten Hefen verwendet.

Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer

40 mM	TRIS
1 mM	Na ₂ -EDTA
20 mM	Essigsäure
ad 1 l	dd H ₂ O
	einstellen auf pH 8,5

Orange G-Beladepuffer (10X)

0,4 %	Orange G
30 %	Glycerol

Ethidiumbromid-Lösung

1 Tablette	Ethidiumbromid
10 ml	dd H ₂ O

Lösungen für die Isolierung der mikrosomalen Fraktion aus *S. cerevisiae*

Puffer B

25 mM	TRIS
5 mM	Na ₂ -EDTA
	einstellen auf pH 7,5
	autoklavieren

Puffer M

100 mM	Na ₂ HPO ₄
50 mM	NaCl
	einstellen auf pH 8,0
	autoklavieren

Proteaseinhibitor-Lösung

1 Tablette	cOmplete™ Proteaseinhibitor-Cocktail (EDTA-frei)
1 ml	dd H ₂ O

Lösungen für die SDS-PAGE und den Western Blot

Sammelgelpuffer (4X)

0,5 M TRIS
0,4 % SDS
 einstellen auf pH 6,8

Trenngelpuffer (4X)

1,5 M TRIS
0,4 % SDS
 einstellen auf pH 8,8

SDS-Ladepuffer (4X)

250 mM TRIS
40 % Glycerol
0,02 % Bromphenolblau
8 % SDS
400 mM DTT
 einstellen auf pH 6,8

Kathodenpuffer

25 mM TRIS
192 mM Glycin
0,1 % SDS
 einstellen auf pH 8,2-8,6

TBS (10X)

1,35 M NaCl
ad 1 l dd H₂O
 einstellen auf pH 7,6

TBST

1 ml Tween®20
900 ml dd H₂O

MTBST

1,2 g Milchpulver
ad 40 ml TBST

Transferpuffer (5X)

125 mM TRIS
960 mM Glycin
0,2 % SDS
 einstellen auf pH 8,3

Transferpuffer

10 ml Transferpuffer (5X)
10 ml Methanol
ad 50 ml dd H₂O

Lösungen für die funktionelle Charakterisierung im ^{14}C -Substrat-Transportassay

Die Puffersubstanzen der Messpuffer mit dem jeweiligen pH-Wert sind in Tabelle 2.6 aufgeführt.

Tabelle 2.6: **Zusammensetzung der Messpuffer für den ^{14}C -Substrat-Transportassay.**

Puffersubstanzen jeweils 50 mM	pH-Werte
HEPES, TRIS	6,3; 6,8; 7,0; 7,3; 7,5; 7,8; 8,0; 8,3
MES, TRIS	5,8; 6,0; 6,5
Zitronensäure, TRIS	2,3; 2,8; 3,3; 3,8; 4,3; 4,8; 5,3; 5,8

Für den Vergleich des Transportes in leichtem und schwerem Wasser wurden für beide Lösungsmittel Puffer in grober Anlehnung an [137] hergestellt. Die Zusammensetzung für die Ziel-pH beziehungsweise -pD-Werte wurden im Gegensatz zu [137] nicht Tabellen entnommen, sondern wie nachfolgend beschrieben bestimmt.

Zur Einstellung des korrekten pD-Wertes wurde eine pD-Elektrode etabliert. Dabei handelte es sich um eine kommerziell erhältliche pH-Elektrode, die in einer Lösung von 3 M KCl in D_2O über Nacht äquilibriert und in dieser Lösung aufbewahrt wurde. Ein Austausch des protiumhaltigen Elektrolyten und der Salzbrücke war nicht notwendig [138]. Die Standards zur Kalibrierung der Elektrode wurden nach Literaturangaben [138] hergestellt. Dafür wurde auf kommerziell erhältliche, protiumhaltige Substanzen zurückgegriffen, die nicht weiter aufbereitet wurden. Da der Soll-pD-Wert für jeden Standard temperaturabhängig ist, wurden die Literaturangaben linear interpoliert. Die Soll-pD-Werte für 22 °C sind in der nachfolgenden Tabelle 2.7 aufgeführt.

Tabelle 2.7: **Sollwerte der Kalibrierung der pD-Elektrode.**

Puffersubstanz und Konzentration	pD-Wert
0,050 molal KD_2citrat	4,303
0,025 molal KD_2PO_4	7,442
0,025 molal Na_2DPO_4	
0,025 molal NaDCO_3	10,771
0,025 molal Na_2CO_3	

Der McIlvaine-Puffer basiert auf einer 0,1 M Zitronensäure- und einer 0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung, die in unterschiedlichen Verhältnissen miteinander gemischt werden, um einen definierten pH-Wert zu erreichen. Da sich die Säurestärken in den beiden verwendeten Lösungsmitteln jedoch unterscheidet, wurde wie folgt vorgegangen:

Die beiden Stammlösungen wurden sowohl mit leichtem als auch mit schwerem Wasser hergestellt. Ein definiertes Volumen einer der beiden Stammlösungen in schwerem Wasser wurde vorgelegt. Anschließend wurde unter Rühren der pD-Wert mit der frisch kalibrierten Elektrode gemessen. Dann wurde so lange die andere Stammlösung in schwerem Wasser zugegeben, bis der Ziel pD-Wert erreicht war. Die Verhältnisse der beiden Stammlösungen, die für die Einstellung des jeweiligen pD-Wertes verwendet wurden, sind in Tabelle 2.8 aufgeführt.

Tabelle 2.8: **Volumina der Stammlösungen von Na_2DPO_4 und Zitronensäure und das Verhältnis der Stammlösungen zur Herstellung der Messpuffer in schwerem Wasser.**

pD des Puffers	0,2 M Na_2DPO_4 in ml	0,1 M Zitronensäure in ml	Verhältnis der Lösungen
6,8	7,90	4,00	1,98
5,8	3,38	2,92	1,16
4,8	4,50	6,13	0,734
3,8	1,90	5,05	0,376

Die Stammlösungen der beiden Puffersubstanzen in leichtem Wasser wurden im selben Verhältnis gemischt. Der pH-Wert dieser Mischung wurde dann mit 5 M NaOH oder 5 M HCl auf den selben Zahlenwert wie der pD-Wert des Schwerwasserpuffers eingestellt.

Substratlösung (5X)

1,25 - 250 mM	Substrat, unmarkiert
0,002 - 0,01 $\mu\text{Ci } \mu\text{l}^{-1}$	Substrat, ^{14}C -markiert
	dd H_2O oder D_2O

Für Konkurrenzexperimente wurde eine weitere unmarkierte Verbindung im Verhältnis 1 : 1 oder 1 : 10 in Relation zum ersten Substrat hinzugefügt.

Lösungen für die funktionelle Charakterisierung im Lichtstreuungsassay

Puffer I

50 mM	MOPS, pH 7,2
	autoklavieren
0,2 %	β -Mercaptoethanol (frisch)

Puffer II

50 mM	MOPS, pH 7,2
1,8 M	D-Saccharose
	sterilfiltrieren
0,2 %	β -Mercaptoethanol (frisch)

Puffer III

10 mM	MOPS pH 7,2
1,2 M	D-Saccharose
50 mM	NaCl
5 mM	CaCl ₂
	sterilfiltrieren

Puffer Substratpuffer pH 7

20 mM	MOPS, pH 7,2
1,2 M	D-Saccharose
50 mM	NaCl
5 mM	CaCl ₂
600 mM	Solut
	einstellen auf pH 7,2

Substratpuffer pH 5

20 mM	Zitronensäure
1,2 M	D-Saccharose
50 mM	NaCl
5 mM	CaCl ₂
600 mM	Solut
	einstellen auf pH 4,5 \pm 0,3

Der pH-Wert wurde so eingestellt, dass sich in einer 1 : 1-Mischung mit Puffer III der pH-Wert von 7 beziehungsweise 5 ergab.

2.4 Geräte und Software

Geräte

Produkt	Hersteller
Analysenwaage <i>CP225D</i>	Sartorius, Göttingen
Analysenwaage <i>Kern ABS 120-4</i>	Kern & Sohn, Balingen-Frommern
<i>BioPhotometer 6131</i>	Eppendorf, Hamburg
<i>Biometra TRIO Thermocycler</i>	Analytik Jena, Jena
Brutschrank <i>Kelvitron® T</i>	Heraeus, Hanau
Brutschrank <i>Minitron</i>	Infors HAT, Bottmingen, Schweiz
<i>ChemoStar Touch eCL and Fluorescence Imager</i>	Intas Science Imaging, Göttingen
Digitaler Blockheizter <i>HX-2</i>	PeqLab, Erlangen
Digitales pH-Meter <i>Lab 850</i>	RSchott Instruments, Mainz
Digitales pH-Meter <i>ino Lab® Multi 9310 IDS</i>	Xylem Analytics, Weilheim
Dispensette® <i>BRAND® S organic</i> , analog	Merck, Darmstadt
<i>Dualblock Primus advanced HT2X Thermocycler</i>	Clemens, Waldbüttelbronn
Heizblock <i>Techne Dri-block DB-20</i>	Fisher Scientific, Schwerte
<i>IDA Image Documentation Analysis</i>	Raytest, Straubenhardt
Inkubator <i>WTC Binder 9010-0021</i>	Binder, Tuttlingen
Kolben-Orbitalschüttler <i>Certomat® MO II</i>	Sartorius, Göttingen
Kolbenhubpipetten	Gilson, Middleton, USA
	Eppendorf, Hamburg
Kühlschrank <i>MF-6W</i>	Waeeco, Emsdetten
Kühlzentrifuge <i>5424R</i>	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge <i>Multifuge 1S-R</i>	Heraeus, Hanau
Magnetrührer <i>IKAMAG® RET-GS</i>	IKA®-Werke, Staufen
Magnetrührer <i>Variomag mono</i>	Variomag-USA, Daytona Beach, USA
Mikrowelle <i>NN-E245W</i>	Panasonic, Wiesbaden
Netzgerät <i>EPS 300</i>	Pharmacia Biotech, Dübendorf, Schweiz
<i>PerfectSpin 24 Plus</i>	Peqlab, Erlangen
pH Elektrode <i>Blue Line 12 pH</i>	SI-Analytics, Weilheim
Pipettierhilfe <i>accu-jet® pro</i>	Brand, Wertheim
<i>Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell</i>	Bio-Rad, Feldkirchen
Präzisionswaage <i>PB3002-S Delta Ranger</i>	Mettler-Toledo, Gießen
Quarzküvette	Helma, Jena
Rotationsmischer für Reagenzgläser <i>TC-7</i>	New Brunswick Scientific, Edison, USA

2.4 Geräte und Software

Produkt	Hersteller
SDS-PAGE <i>Perfect Blue Doppelgelsystem Twin S</i>	VWR Darmstadt
Spannungsquelle <i>PowerPac 200</i>	Bio-Rad, Feldkirchen
Sterilwerkbank <i>Heraguard</i>	Heraeus, Hanau
<i>Stopped Flow</i> Apparatur:	Jasco, Gross-Umstadt
Spannungsquelle <i>ALX 250</i>	
Verstärker <i>PMS 250</i>	
Mikroprozessor Einheit <i>MPS 70/2</i>	
Fluoreszenzküvette <i>FC-15/7,5</i>	
Mischeinheit <i>SFM 2000</i>	
Monochromator <i>BH-10-61</i>	
UV/Vis-Photometer <i>MOS-200</i>	
Tischzentrifuge <i>wisespin CF-10</i>	PMI Labortechnik, Wettingen
Tischzentrifuge <i>Biofuge™ Pico</i>	Heraeus, Hanau
<i>TRI-CARB 2000 TR Liquid Szintillation Analyzer</i>	Perkin-Elmer, Langenfeld
Ultrazentrifuge <i>Optima™ XL-80K</i> mit Rotor <i>50.2 Ti</i>	Beckman Coulter, Krefeld
UV-Transilluminator <i>UVT-20 S/M</i>	Herolab, Wiesloch
<i>Vortex® Genie 2</i>	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wippschüttler <i>WS 10</i>	Edmund Bühler, Hechingen
Wippschüttler <i>KL2</i>	Edmund Bühler, Bodelshausen
WTW pH-Elektrode <i>SenTix® 981</i>	Xylem Analytics, Weilheim

Software

Produkt	Anbieter
<i>Bio-Kine Version 4.74.2</i>	BioLogic, Claix, Frankreich
<i>Chemicalize.org</i>	Chemaxon, Basel, Schweiz
<i>ChimeraX Version 1.3</i>	UCSF Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics, San Francisco, CA, USA [139]
<i>ImageJ 1.53k</i>	National Institutes of Health, USA [140]
<i>Lasergene 7.2.1</i>	DNASTAR®, Madison, WI, USA
<i>Marvin-Sketch 18.1</i>	Chemaxon, Basel, Schweiz
<i>Microsoft Office 365</i>	Microsoft Corporation, Redmond, USA
<i>NCBI Proteindatenbank</i>	rcsb.org, [141]
<i>Origin 2020 9.7.0.185</i>	OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA
<i>Residue Depth</i>	[142]
<i>SWISS-MODEL</i>	Biozentrum, University of Basel, Basel, Schweiz [143]
<i>TeXshade 1.26</i>	[144]

3 | Methoden

Alle Zentrifugationsschritte wurden in einem Festwinkelrotor durchgeführt.

3.1 Präparation von DNA

3.1.1 Konzept zur Klonierung von MCT12-Konstrukten

Die Erkennungssequenz von *Spe* I, entweder als einzige Schnittstelle oder in Kombination mit *Bcl* I wurde am 3'-Terminus des Gens von MCT12 über eine PCR angefügt. Die *Spe* I-Schnittstelle wurde verwendet, um MCT12 direkt in den pDRTXa-Vektor einzusetzen. Da die Erkennungssequenz von *Bcl* I im verwendeten Leseraster für einen Translationsstop codiert, wurde für die Expression von MCT12 alleine nur die Erkennungssequenz von *Spe* I angefügt. Die Schnittstellen von *Bcl* I und *Bam* H I sind kompatibel, sodass auf diese Weise das Fusionsprodukt mit Basigin IgI erstellt werden konnte. Bei der Ligation der überhängenden Enden wurde das Stopp-Codon zerstört. Am 5'-Terminus des Gens wurde stets *Xho* I angefügt und zur Klonierung verwendet.

Es wurde des Weiteren ein Adenin-reicher Teil des N-Terminus ausgetauscht, da solche Sequenzen die Translation erschweren können [145]. Die kodierte Aminosäure-Sequenz wurde dabei nicht verändert. Die DNA-Sequenz wurde als doppelsträngige DNA im pUC57-Vektor von Genscript (Rijswijk, Niederlande) bezogen. Der N-Terminus wurde über Restriktionsendonukleasen in die Plasmide eingesetzt, in denen schon MCT12 enthalten war. Dafür wurde auf der 3'-Seite des Inserts eine *Bam* HI-Schnittstelle verwendet, die in der Gensequenz enthalten ist. Die 5'-Seite des Inserts wurde über die *Spe* I-Schnittstelle in den pDRTXa-Vektor eingefügt oder über eine *Bsp* EI-Schnittstelle an den C-Terminus von Basigin angefügt, um das Fusionsprotein zu erhalten. Die DNA enthält neben dem N-Terminus außerdem angefügte Schnittstellen für *Spe* I und *Bsp* E I sowie eine Faktor-Xa-Schnittstelle inklusive einer Schnittstelle für *Sal* I.

3.1 Präparation von DNA

3.1.2 Anfügen von Schnittstellen über eine Polymerasekettenreaktion

Um Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen (REN) an ein Gen anzufügen, wurde in dieser Arbeit die Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendet.

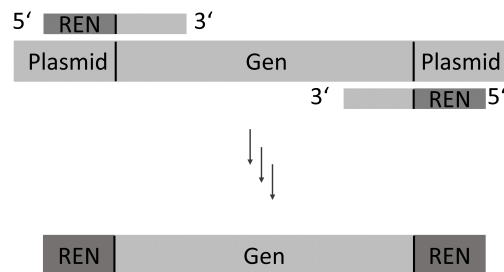


Abbildung 3.1: **Primer-Design für das Anfügen von Erkennungssequenzen von REN.** Diese sind markiert in Dunkelgrau.

In der PCR wurden Primer verwendet, die zu einem großen Teil komplementär zum *template* sind. Die Enden ragten jedoch im ersten Zyklus über das Gen hinaus und trugen die Erkennungssequenz für ausgewählte Endonukleasen (siehe Abbildung 3.1). Die *annealing*-Temperatur wurde für jeden Primer nach folgender Formel berechnet:

$$T_m = 60 + 41 \cdot GC - \text{Gehalt}(\%) - \frac{600}{n} \quad (3.1)$$

T_m : *annealing*-Temperatur in °C

GC-Gehalt(%): Anteil von Guanosin und Cytosin an der Primer-Sequenz in %

n: Anzahl der Basen des Primers

Waren die *annealing*-Temperaturen der zusammen verwendeten Primer nicht identisch, wurde zunächst das arithmetische Mittel der beiden Temperaturen verwendet. Führte ein PCR-Ansatz nicht zum erwarteten Produkt, wurden die *annealing*-Temperaturen verändert. In mehreren Zyklen wurden die Enden des Amplifikats von der DNA-Polymerase aufgefüllt. Durch die Auswahl der Primer besteht das Amplifikat lediglich aus dem Zielgen flankiert von den eingeführten Schnittstellen.

Tabelle 3.1: **Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes**

Reagenz	Volumen
Präparation der Ausgangs-DNA	0,5 µl
Primer (25 µM)	je 1,5 µl
<i>OneTaq Standard Reaction Buffer</i> (5X)	10 µl
dNTPs (2,5 mM)	4 µl
dd H ₂ O	35 µl
<i>OneTaq</i> DNA-Polymerase (5 U µl ⁻¹)	0,5 µl

Tabelle 3.2: **Temperaturprogramm für eine PCR**

Schritt	Temperatur	Dauer
20 Zyklen Denaturieren der <i>template</i> -DNA	94°C	0,5 min
<i>annealing</i> der Primer	T _m	1 min
Elongation	68°C	1,5 min *
Finale Elongation	68°C	5 min

*: 1 min pro 1.000 Basenpaare (bp); 1,5 min für ein ca. 1.500 bp großes MCT

Die Komponenten für einen PCR-Ansatz wurden nach Tabelle 3.1 zusammengegeben und in einem *thermocycler* mit einem Temperaturprogramm wie in Tabelle 3.2 behandelt. Das Amplifikat wurde dann in ein Agarosegel aufgetragen (siehe Abschnitt 3.1.5).

3.1.3 Ortsgerichtete Mutagenese

Mithilfe der ortsgerichteten Mutagenese wurden gezielt einzelne Codons in den DNA-Sequenzen der untersuchten Gene verändert. Die veränderten Gene codierten so für ein Protein, das an einer definierten Position eine definierte andere Aminosäure trug.

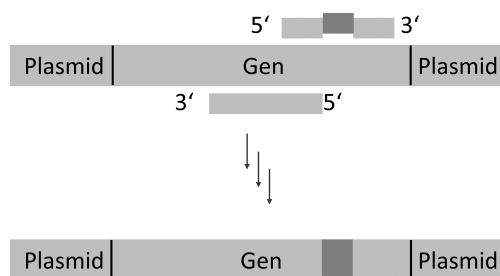


Abbildung 3.2: **Primer-Design für die ortsgerichtete Mutagenese.** Die eingeführte Mutation ist markiert in Dunkelgrau.

3.1 Präparation von DNA

Der *sense*-Primer war nicht vollständig komplementär zum *template*, sondern enthielt das Codon, das in der DNA-Sequenz ersetzt werden sollte (siehe Abbildung 3.2). Der *antisense*-Primer war vollständig komplementär und band direkt neben dem ausgetauschten Codon. Die *PfuTurbo*-DNA-Polymerase amplifizierte so das ganze Plasmid. Waren in den entworfenen *primer*-Sequenzen die Bildung vieler *hairpins* oder Dimere möglich, wurde gegebenenfalls vom hier beschriebenen Design abgewichen. Die *annealing*-Temperaturen wurden bestimmt, wie unter 3.1 beschrieben.

Tabelle 3.3: **Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes für die ortsgerichtete Mutagenese.**

Reagenz	Volumen
Präparation der Ausgangs-DNA	0,2 µl
Primer (25 µM)	je 1,5 µl
<i>PfuTurbo</i> AD-Puffer (10X)	5 µl
dNTPs (2,5 mM)	4 µl
dd H ₂ O	37 µl
<i>PfuTurbo</i> AD DNA-Polymerase (2,5 U µl ⁻¹)	0,8 µl

Tabelle 3.4: **Temperaturprogramm für eine PCR zur ortsgerichteten Mutagenese.**

	Schritt	Temperatur	Dauer
16 Zyklen	Denaturieren der <i>template</i> -DNA	94°C	0,5 min
	<i>annealing</i> der Primer	T _m	1 min
	Elongation	68°C	16 min *
	Finale Elongation	68°C	20 min

*: 2 min pro 1.000 bp; 16 min für ein ca. 8.000 bp großes Plasmid inklusive MCT

Die Komponenten für einen Mutagenese-PCR-Ansatz wurden nach Tabelle 3.3 zusammengegeben und in einem *thermocycler* einem Temperaturprogramm nach Tabelle 3.4 unterzogen. Das Amplifikat wurde mit 1 µl *Dpn* I versetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert, um die unmethylierte *template*-DNA zu verdauen. Mit diesem Ansatz wurden dann kompetente *E. coli* transformiert (siehe Abschnitt 3.1.9).

3.1.4 Restriktionsverdau

Mittels Restriktionsendonukleasen kann doppelsträngige DNA an definierten Positionen, den Erkennungssequenzen, geschnitten werden. In dieser Arbeit wurden Restriktionsendonukleasen verwendet, um DNA zu schneiden und später neu zusammenzusetzen oder aber um die Anwesenheit von Erkennungssequenzen in der vorliegenden DNA zu überprüfen. Wurde ein Restriktionsverdau

durchgeführt, um ein neues Konstrukt zu erstellen, wurden die Mengen nach Tabelle 3.5 zusammengegeben und für mindestens 2 h bei 37 °C inkubiert. Lag für die gewählten Enzyme keine *star*-Aktivität laut Herstellerangaben vor, wurde auch länger inkubiert. Bei der Ausgangs-DNA handelte es sich um DNA aus einer Minipräparation (siehe Abschnitt 3.1.12). Der verwendete Puffer wurde nach den Herstellerangaben ausgewählt. Je nach verwendetem Enzym und Puffer wurde die Inkubationstemperatur an die Herstellerangaben angepasst. Wurden Enzyme mit zwei verschiedenen Temperaturoptima verwendet, wurde zunächst nur eines der beiden Enzyme zugegeben und bei der höheren Temperatur für 2 h inkubiert. Nach Zugabe des zweiten Enzyms wurde dann 2 h lang bei der niedrigeren Temperatur inkubiert. Empfahl der Hersteller eine größere Konzentration an Puffer-Konzentrat, so wurde das Volumen an zugegebenem dd H₂O entsprechend verringert. Nach der Inkubation wurde der Ansatz in ein Agarosegel (siehe Abschnitt 3.1.5) aufgetragen.

Tabelle 3.5: **Zusammensetzung eines Restriktionsverdaus für präparative Zwecke.**

Reagenz	Volumen
Ausgangs-DNA (200-600 nmol µl ⁻¹)	4 µl
Puffer-Konzentrat (10X)	2 µl
Restriktionsendonuklease (10 U µl ⁻¹)	je 0,5 µl
dd H ₂ O	ad 20 µl

Ein Restriktionsverdau, der der Identitäts-Überprüfung der vorliegenden DNA diene, wurde in einem kleineren Maßstab angesetzt (siehe Tabelle 3.6). Hier war eine Inkubation von 20 min bei 37 °C ausreichend. Wiesen die gewählten Enzyme keine *star*-Aktivität auf, konnte auch länger inkubiert werden. Auch hier wurden die Puffer und die Inkubationstemperaturen nach den Herstellerangaben ausgewählt beziehungsweise angepasst. Der gesamte Ansatz wurde nach der Inkubation in ein Agarosegel (siehe Abschnitt 3.1.5) aufgetragen.

Tabelle 3.6: **Zusammensetzung eines Restriktionsverdaus für analytische Zwecke.**

Reagenz	Volumen
Ausgangs-DNA	0,4 µl
Puffer-Stock (10X)	1 µl
Restriktionsendonuklease (10 U µl ⁻¹)	je 0,2 µl
dd H ₂ O	ad 10 µl

3.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

In einem Agarosegel wurden DNA-Fragmente ihrer Größe nach voneinander aufgetrennt und mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Für ein einprozentiges Gel wurden 0,5 g Agarose eingewogen und in 50 ml TAE-Puffer suspendiert. Die Suspension wurde in einer Mikrowelle zum Sieden und zum vollständigen Lösen der Agarose erhitzt. Der Verdunstungsverlust wurde mit dd H₂O ausgeglichen. Dann wurde 1 µl Ethidiumbromid-Lösung hinzugegeben, die Flüssigkeiten durch Schwenken gemischt und in den vorbereiteten Gelgießstand mit Kämmen gegossen.

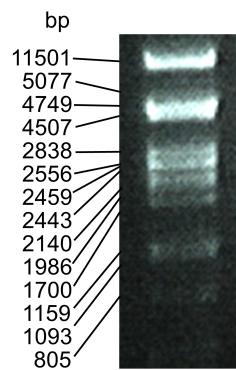


Abbildung 3.3: Mit *Pst* I verdaute λ-DNA als Größenmarker für die Agarose-Gelelektrophorese in einem 1%-igen Agarosegel

Nach dem Auskühlen wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Proben wurden mit einem Orange G-Beladepuffer (10X) gemischt und in die Taschen eingefüllt. Als Marker wurde mit *Pst* I verdaute λ-DNA verwendet (siehe Abbildung 3.3). Die Elektrophorese wurde mit 120 V für 30 bis 60 min durchgeführt. Zur Detektion wurde das Gel auf einen UV-Tisch überführt. Bei einer Anregungswellenlänge von 366 nm fluoresziert das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid und die verschieden großen DNA-Stücke wurden als Banden im Gel sichtbar. Die Fluoreszenz im Gel wurde mit einer Kamera festgehalten. Die Bilder der Kamera wurden mit einem Scanner digitalisiert und der Kontrast der Aufnahme wurde mit ImageJ optimiert.

3.1.6 Gelextraktion

Wurden DNA-Fragmente in einem Agarosegel zur Weiterverwendung aufgetrennt, so wurde die Bande mit dem Fragment unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 366 nm mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Aus diesem Gelstück wurde dann mit dem *HiYield® Gel/PCR Extraction Kit* die DNA nach Herstellerangaben extrahiert. Die Elution erfolgte mit 20 µl dd H₂O nach einer Inkubationszeit von mindestens 5 min.

3.1.7 Ligation

Um zwei DNA-Fragmente mit überhängenden Enden zu ligieren, wurden die Eluate der Gel-extraktion verwendet. Dabei wurden 5 µl einer Präparation der *insert*-DNA, 3 µl der Präparation der Vektor-DNA und der vom Hersteller empfohlene Puffer gemischt und mit 5 U T4-DNA-Ligase versetzt. Der Ligationsansatz wurde für mindestens 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

3.1.8 Herstellung kompetenter *E. coli*

E. coli-Zellen vom Stamm DH5α wurden auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 5 ml LB-Medium mit einem Klon inokuliert und bei 37 °C und 200 U min⁻¹ auf dem Orbitalschüttler kultiviert. Diese Vorkultur wurde am Abend mit 100 ml frischem LB-Medium versetzt und über Nacht bei 20 °C auf dem Orbitalschüttler bei 200 U min⁻¹ inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen bei einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 auf Eis für 10 min abgekühlt und dann durch Zentrifugation geerntet (2.000 g; 4 °C; 10 min). Der Überstand wurde verworfen, die Zellpellets mit 15 ml einer 0,1-M-Calciumchlorid-Lösung versetzt und dann unter Schütteln resuspendiert. Nach einem Abkühlen auf Eis für 10 min wurden die Zellen erneut zentrifugiert (2.000 g; 4 °C; 10 min), der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden unter Schütteln in 10 ml der 0,1-M-Calciumchlorid-Lösung resuspendiert. Die Zellen wurden für 20 min auf Eis inkubiert und dann erneut durch Zentrifugation (2.000 g; 4 °C; 10 min) abgetrennt. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden unter Schütteln in 5 ml einer Lösung resuspendiert, die neben 0,1 M Calciumchlorid auch 20 % Glycerol enthält. Die Zellen wurden so für mindestens 4 h inkubiert, dann zu 100 µl aliquotiert und bei –80 °C bis zu Verwendung gelagert.

3.1.9 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Die chemisch kompetenten *E. coli* wurden auf Eis aufgetaut, mit dem ganzen Ligationsansatz aus Abschnitt 3.1.7 versetzt und für mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 45 s bei 42 °C wurde der Ansatz wieder 2 min lang auf Eis abgekühlt. Zu den Zellen wurden 900 µl LB-Medium gegeben und die Suspension wurde für 45 min bei 37 °C rotierend bei 6 U min⁻¹ inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet (14.000 g; 10 s; Raumtemperatur), 900 µl des Mediums im Überstand verworfen, die Zellen im verbleibenden Medium resuspendiert und dann auf einer LB-Amp-Agarplatte ausgestrichen. Die Platte wurde dann bei 37 °C über Nacht inkubiert.

3.1.10 Schnelltransformation chemisch kompetenter *E. coli*

Zur Transformation von *E. coli* mit DNA aus einer Präparation (siehe Abschnitt 3.1.12) wurde eine Schnelltransformation durchgeführt. Die chemisch kompetenten *E. coli* wurden nach dem Auf-

3.1 Präparation von DNA

tauen auf Eis mit 1 µl der Plasmid-Lösung versetzt und für mindestens 20 min auf Eis inkubiert. Ein Teil dieser Suspension wurde dann auf einer LB-Amp-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.1.11 Dauerkulturen von *E. coli*

Zur längeren Lagerung von Plasmiden wurden Dauerkulturen von transformierten *E. coli* angelegt. Dafür wurden 5 ml LB-Amp-Medium mit einem transformierten Klon inokuliert und über Nacht rotierend bei 37 °C und 6 U min⁻¹ inkubiert. 1 ml dieser Flüssigkultur wurde mit 0,5 ml autoklaviertem Glycerol 80 % versetzt, gründlich gemischt und bei –80 °C gelagert.

3.1.12 Isolierung von Plasmid-DNA aus transformierten *E. coli*

Ein Klon transformierter *E. coli* wurde in 5 ml LB-Amp-Medium über Nacht rotierend bei 37 °C und 6 U min⁻¹ wachsen gelassen. Von dieser Kultur wurden dann je 3 bis 5 ml verwendet und nach Herstellerangaben mit dem *Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification System* aufgeschlossen. Die DNA wurde isoliert und gewaschen. Dabei wurde auf den Zusatz von *Alkaline Protease Solution* verzichtet. Die Elution erfolgte mit 50 µl autoklaviertem dd H₂O, welche im letzten Schritt mittels zweiminütiger Zentrifugation von der Membran getrennt wurde. Reinheit und Gehalt dieser Präparationen wurde nach Abschnitt 3.1.13 bestimmt.

3.1.13 Bestimmung von Reinheit und Gehalt der Plasmid-DNA

Der Gehalt von DNA in Lösung wurde über die Absorption bei 260 nm in einer Quarz-Mikroküvette mit dem *Biophotometer* bestimmt. Dafür wurde folgende Gleichung verwendet:

$$c_{\text{DNA}} = A_{260} \cdot 50 \mu\text{g ml}^{-1} \cdot VF \quad (3.2)$$

c_{DNA} : DNA-Konzentration in µg ml⁻¹

A_{260} : Absorption bei 260 nm

VF: Verdünnungsfaktor

Über das Verhältnis der Absorptionen bei 260 und 280 nm wurde die Reinheit beurteilt. Eine geringe Kontamination mit Proteinen und damit eine gute Reinheit der Präparationen wurde bei einem Verhältnis von 1,7 bis 2,0 angenommen.

3.1.14 Sequenzierung

Die Identität der verwendeten DNA-Sequenzen wurde mithilfe eine Sanger-Sequenzierung verifiziert. Dafür wurde der Sequenzierservice des Instituts für klinische Molekularbiologie der CAU Kiel

beauftragt. Dort wurden die Analysen mit einem *Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer*, einem 96-Kapillarsequenzier, durchgeführt.

3.2 Expression in *S. cerevisiae*

Alle Kulturen wurden so angesetzt, dass das Kolbenvolumen stets dem fünffachen Volumen der Kultur entsprach.

3.2.1 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation von Hefen wurde in Anlehnung an die Lithiumacetat/ss-carrier-DNA/PEG-Methode [146] durchgeführt. Dafür wurden naive Zellen des zu transformierenden *S. cerevisiae*-Stammes aus einem Glycerolstock auf YPD-Agarplatten ausgestrichen und für 3 bis 5 Tage bei 29 °C inkubiert. Ein Klon wurde von einer YPD-Agarplatte in 5 ml YPD-Medium überführt und über Nacht bei 220 U min⁻¹ und 29 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde aus dieser Vorkultur eine Hauptkultur von 40 bis 50 ml mit einer Start-OD₆₀₀ von 0,2 oder 0,3 angesetzt. Diese Kultur wurde bei 220 U min⁻¹ und 29 °C auf einem Orbitalschüttler inkubiert und bei einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8 geerntet (4.000 g; 5 min; 4 °C). Das Zellpellet wurde mit 25 ml eiskaltem autoklaviertem dd H₂O gewaschen (4.000 g; 5 min; 4 °C).

Das gewaschene Zellpellet wurde in 1 ml autoklaviertem dd H₂O resuspendiert. Je 100 µl dieser Suspension wurden für einen Transformationsansatz verwendet. Die Zellen werden erneut pelletiert (18.000 g; 30 s; 4 °C) und das Pellet mit 0,5 µl Plasmid-DNA-Lösung aus einer Präparation und 360 µl Transformationsmix versetzt, (siehe Tabelle 3.7). Die ss-carrier-DNA wurde zuvor bei 100 °C für 5 min aufgeköcht und danach auf Eis gehalten. Die Suspension wurde für 30 bis 60 min bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt. Die Zellen wurden geerntet (18.000 g; 30 s; 4 °C) und in 1 ml autoklaviertem dd H₂O suspendiert. Die Suspension wurde verdünnt (1 : 10 bis zu 1 : 100) und 100 µl der Verdünnung wurden auf einer SD-AHLW-Agarplatte ausplattiert.

Tabelle 3.7: Transformationsmix für die Transformation von *S. cerevisiae*

Reagenz	Volumen
PEG 3500 (50 % (w/v))	240 µl
Lithiumacetat (1 M)	36 µl
aufgekochte ss-carrier-DNA	50 µl
autoklaviertes dd H ₂ O	34 µl
gesamt	360 µl

3.2.2 Dauerkulturen von *S. cerevisiae*

Zur langfristigen Lagerung von naiven und transformierten Hefen wurden Dauerkulturen angelegt. Dafür wurden 5 ml Medium (YPD-Medium für naive Hefen, SD-AHLW-Medium für transformierte Hefen) mit einem Klon inokuliert und über Nacht im Orbitalschüttler bei 29 °C und 220 U min⁻¹ inkubiert. 0,5 ml dieser Flüssigkultur wurden mit 0,5 ml autoklaviertem Glycerol 80 % versetzt, gründlich gemischt und bei –80 °C gelagert.

3.2.3 Isolierung der mikrosomalen Fraktion aus *S. cerevisiae*

Zur Überprüfung der Expression in der Hefe *S. cerevisiae* wurde eine Hefekultur angelegt, geerntet und dann aufgeschlossen. Über differentielle Zentrifugation wurden die Zellbestandteile voneinander getrennt. Von besonderem Interesse war hier die mikrosomale Fraktion, die bei 100.000 g pelletiert wird. Zu Beginn wurde eine Vorkultur angelegt. Dafür wurden 5 ml SD-AHLW-Medium mit einem transformierten Klon inokuliert und für 24 h bei 29 °C und 220 U min⁻¹ auf dem Orbitalschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde aus dieser Vorkultur eine Hauptkultur mit einem Volumen von 40 bis 50 ml angelegt. In dieser Arbeit wurde auch der Einfluss von verschiedenen Kulturbedingungen auf die Expression von Membranproteinen untersucht. Dafür wurden dem Medium einzelne Verbindungen in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt: Glycerol 10 % (V/V), Dimethylsulfoxid (DMSO) 2,5 % (V/V), Histidin 0,04 mg ml⁻¹ oder Kreatin in einer Konzentration von 1 mM oder 50 mM. Außerdem wurde der Einfluss von Aminosäure-Zusätzen zum Medium auf die Proteinexpression untersucht. Dafür wurden zwei Stammlösungen angesetzt. Diese Lösungen enthielten insgesamt alle noch nicht im Medium enthaltenen proteinogenen Aminosäuren. Diese Stammlösungen wurden dem Medium zugesetzt, sodass die Endkonzentration der Aminosäuren im Medium 12,5, 25 oder 50 mg ml⁻¹ betrug. Auch Kombinationen der verschiedenen Zusätze wurden getestet.

Die Kulturen wurden über Nacht bei 29 °C und 220 U min⁻¹ auf dem Orbitalschüttler inkubiert. Auch der Einfluss der Wachstumstemperatur auf die Proteinexpression wurde näher untersucht. Für dieses Experiment wurden Hauptkulturen abweichend von der oben genannten Vorschrift bei 20 °C inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 1 wurden die Zellen über Zentrifugation geerntet (4.000 g; 5 min; 4 °C) und einmal mit 50 ml kaltem dd H₂O sowie einmal mit 10 ml kaltem Puffer B gewaschen (jeweils 4.000 g; 5 min; 4 °C). Das Zellpellet wurde dann für mindestens 30 min bei –80 °C gelagert.

Anschließend wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, in 0,5 ml kaltem Puffer B resuspendiert und mit 0,5 g säuregewaschenen Glaskügelchen (Ø 0,5 mm) versetzt. Die Zellen wurden für 30 s auf dem Vortex-Mischer geschüttelt und anschließend für 1 min auf Eis abgekühlt. Dieser Zyklus wurde insgesamt 12 bis 15 mal wiederholt. Dann wurden die Glaskügelchen und große Zellbestandteile über Zentrifugation (1.000 g; 5 min; 4 °C) abgetrennt und der Überstand auf Eis aufbewahrt. Die Glaskügelchen und das Zellpellet wurden erneut mit 0,5 ml Puffer B versetzt und 12- bis 15-mal abwechselnd 30 s auf dem Vortex-Mischer geschüttelt und 1 min auf Eis abgekühlt. Der Ansatz wurde

erneut zentrifugiert (1.000 *g*; 5 min; 4 °C) und der Überstand mit dem Überstand der vorherigen Zentrifugation vereinigt. Dieser wurde bei 10.000 *g* für 5 min und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet dieser Zentrifugation wurde in 100 µl Puffer M resuspendiert, der Überstand wurde erneut zentrifugiert (100.000 *g*; 40 min; 4 °C), um die mikrosomale Zellfraktion zu erhalten. Dieses Pellet wurde mit 100 µl Puffer M versetzt, mindestens 5 min auf Eis inkubiert und dann resuspendiert.

Um den Einfluss einer Proteindegradation während des Zellaufschlusses zu untersuchen, wurde in einigen Experimenten dem Puffer B und dem Puffer M ein Proteaseinhibitor-Cocktail in einer Konzentration von 2 % zugesetzt.

3.2.4 Bestimmung der Gesamt-Proteinkonzentration nach Bradford

Um vergleichbare Mengen Gesamtprotein in einem Gel aufzutragen wurde in den beiden Fraktionen des Hefeauflusses (siehe Abschnitt 3.2.3) die Gesamtmenge an Protein bestimmt. Dafür wurde das Kit *Bio-Rad Protein Assay* nach den Herstellerangaben verwendet. Die Fraktionen aus dem Zellaufschluss wurden in geeigneter Weise in 800 µl dd H₂O verdünnt und mit 200 µl des Konzentrates gemischt. Nach 5 bis 15 min Standzeit wurde die Absorption bei 595 nm gegen einen *blank* gemessen und eine Proteinkonzentration basierend auf einer Kalibrierung mit bovinem Serumalbumin (BSA) berechnet.

3.2.5 SDS-PAGE

Die Proteine des Zellaufschlusses aus Abschnitt 3.2.3 wurden in einer vertikalen, diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Größe voneinander getrennt. Dafür werden die Proben im Verhältnis 3 : 1 mit SDS-Ladepuffer (4X) gemischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Der SDS-Ladepuffer (4X) enthielt denaturierende (SDS) und reduzierende (DTT) Reagenzien.

Zwischen eine jeweils 10x10 cm große Glas- und Keramikplatte wurden Abstandshalter eingelegt, sodass zwischen den beiden Platten ein schmaler Hohlraum entstand. Diese Platten wurden in den Gelgießstand eingespannt. Zunächst wurde das Trenngel nach Tabelle 3.8 angesetzt und in den Hohlraum gegeben. Während des Polymerisierens wurde die Grenzschicht zur Luft hin mit Isopropylalkohol überschichtet. War das Trenngel ausgehärtet, wurde das Sammelgel nach Tabelle 3.8 angesetzt, auf das Trenngel geschichtet und ein Kamm eingesetzt.

3.2 Expression in *S. cerevisiae*

Tabelle 3.8: Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE (Angaben für 2 Gele)

Reagenz	für Sammelgel (5 %)	für Trenngel (12,5 %)
dd H ₂ O	2,4 ml	5,25 ml
Sammelgelpuffer (4X)	1 ml	–
Trenngelpuffer (4X)	–	3 ml
Rotiphorese® Gel 40	0,6 ml	3,75 ml
TEMED	6 µl	10 µl
APS (10 %)	25 µl	80 µl

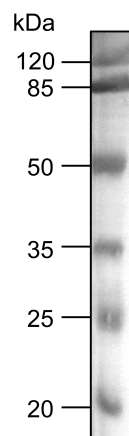


Abbildung 3.4: Protein Marker III (*pre-stained*), peqGOLD für die SDS-PAGE in einem 12,5-%igen Polyacrylamidgel.

Nach dem Aushärten der Gele wurde Kathodenpuffer in die Apparatur eingefüllt, die Proben-
schen wurden gespült und das Gel wurde mit Marker (Protein Marker III (*pre-stained*), peqGOLD;
5 µl; siehe Abbildung 3.4) und den mit Ladepuffer inkubierten Proben (1,5 bis 25 µl pro Tasche)
beladen. Für die Sammelphase wurde eine Spannung von 160 V für 10 bis 15 min angelegt. Hatten
alle Proben die Grenze zum Trenngel erreicht und befanden sich auf einer Höhe, wurde die Spannung
auf 200 V erhöht und für weitere 60 bis 75 min gehalten, bis der Farbstoff aus dem Gel ausgetreten
war.

3.2.6 Western Blot

Die Proteine aus dem Trenngel einer SDS-PAGE (siehe Abschnitt 3.2.5) wurden auf eine Mem-
bran geblottet, um dort die exprimierten Proteine mit gegen die Affinitäts-*tags* gerichteten Antikör-
pern spezifisch nachzuweisen.

Dafür wurde zunächst eine PVDF-Membran in Methanol aktiviert und dann für mindestens 5 min
zusammen mit Whatman®-Papieren im Transferpuffer äquilibriert. Das Trenngel wurde dabei auf der

Kathodenseite von der PVDF-Membran aufgelegt und diese auf beiden Seiten je von 3 Whatman®-Papieren eingerahmt. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgte bei 17 V über 1 h.

Nach dem Transfer wurde die Membran in 20 ml MTBST für 1 h unter Schütteln bei Raumtemperatur geblockt. Der Primärantikörper wurde 1 : 5.000 in 10 ml MTBST verdünnt und unter Schütteln für 1,5 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C mit der Membran inkubiert. Die Membran wurde dreimal für je mindestens 15 min mit 20 ml TBST auf dem Wippschüttler gewaschen und dann mit dem Sekundärantikörper (1 : 5.000 in 10 ml MTBST) für 1,5 h bei Raumtemperatur auf dem Wippschüttler inkubiert. Die Membran wurde erneut dreimal gewaschen (mindestens 15 min, 20 ml TBST, unter Schütteln). Die Detektion erfolgte über Chemilumineszenz mit dem Kit *Clarity Western ECL Substrate* (1 : 1; 1 ml Gesamtvolumen) im *ChemoStar Imager*. Der Kontrast der Aufnahme wurde mit ImageJ optimiert.

3.3 Funktionelle Charakterisierung in *S. cerevisiae*

3.3.1 ¹⁴C-Substrat-Transportassay

Der verwendete ¹⁴C-Substrat-Transportassay wurde bereits in der Literatur beschrieben [55]. Dafür wurden Hefezellen einem einwärts gerichteten Substratgradienten ausgesetzt. Dabei enthielt ein Teil der Moleküle an einer Position das radioaktive ¹⁴C anstelle des stabilen ¹²C. Nach einer definierten Aufnahmezeit wurde der Transport gestoppt und der Überstand entfernt. Die in der Zelle verbleibende Aktivität wurde mithilfe eines Szintillationscocktails detektiert und ließ direkt auf die aufgenommene Menge an Substrat schließen. Die β-Strahlung, die beim Zerfall der instabilen Atome zu ¹⁴N entsteht, regt Moleküle im Szintillationscocktail an. Die dabei entstehende Fluoreszenz wird vom Detektor erfasst. Dabei wurde die Strahlung im Energiebereich von 4 bis 156 keV dem Zerfall von ¹⁴C zugeschrieben und die *counts* pro Minute in diesem Energiebereich zur Auswertung verwendet.

Falls nicht anders angegeben, wurde wie folgt vorgegangen: Es wurden 5 ml SD-AHLW-Medium mit einem Klon transformierter *S. cerevisiae* inokuliert und für einen Tag bei 29 °C und 220 U min⁻¹ im Orbitalschüttler inkubiert. Von dieser Vorkultur wurden am nächsten Tag 70 µl in 5 ml SD-AHLW-Medium übertragen und diese Kultur erneut bei 29 °C und 220 U min⁻¹ für einen Tag im Orbitalschüttler inkubiert. Aus dieser zweiten Vorkultur wurde dann am nächsten Tag eine Hauptkultur mit einem Volumen von 30 bis 200 ml für den folgenden Tag angesetzt (29 °C; 220 U min⁻¹ im Orbitalschüttler). Die Zellen wurden bei einer OD₆₀₀ von 0,85 bis 1,0 geerntet (4.000 g; 5 min; 4 °C) und einmal mit 50 ml kaltem dd H₂O gewaschen (4.000 g; 5 min; 4 °C). Das Zellpellet wurde für mindestens 30 min und höchstens 1,5 h auf Eis gehalten, bevor mit Messpuffer eine OD₆₀₀ von 50 ± 5 eingestellt wurde. Auch die Suspension wurde bis zur Verwendung auf Eis gehalten.

80 µl dieser Zellsuspension wurden in ein 1,5-ml-Reagiergefäß vorgelegt und für 2 min auf 19 °C

3.3 Funktionelle Charakterisierung in *S. cerevisiae*

Raumtemperatur vorgewärmt. Dann wurde sie mit 20 µl der Substratlösung (5X) versetzt und durch mehrmaliges auf- und abpipettieren gemischt. Die Substratlösung enthielt dabei sowohl unmarkierte Moleküle als auch markierte ^{14}C -Moleküle mit einer definierten Aktivität. Nach Zugabe der Substratlösung wurden die Suspensionen nicht erneut gemischt. Nach einer definierten Aufnahmezeit wurde der Transport durch Zugabe von 1 ml eiskaltem dd H_2O gestoppt und der Überstand über eine Filtration durch einen Glasfilterfaser entfernt. Der Filter wurde einmal mit 6 bis 7 ml eiskaltem dd H_2O gewaschen. Die Filter wurden in ein Szintillationsvial mit 3 ml Szintillationscocktail überführt und die Signale am nächsten Tag im *Tri-Carb 2000 TR Liquid Scintillation Analyzer* detektiert.

Die Stoffmenge, die sich zu diesem definierten Zeitpunkt unter den gegebenen Messbedingungen in der Zelle befand, wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Aufnahme}(\text{nmol mg}^{-1}) = \text{counts}_{\text{Probe}} \frac{n_{^{14}\text{C}} \text{Anteil}_{^{14}\text{C}}}{m_{\text{Hefe}} \text{counts}_{\text{max}}} \quad (3.3)$$

$\text{counts}_{\text{Probe}}$: *counts* in der Probe

$n_{^{14}\text{C}}$: Stoffmenge an radioaktiv markiertem Substrat in der Probe in nmol

$\text{Anteil}_{^{14}\text{C}}$: Anteil an radioaktiv markiertem Substrat in der Probe

m_{Hefe} : Masse der Hefe in einer Probe; 5,6 mg

$\text{counts}_{\text{max}}$: maximal mögliche *counts* in einer Probe

Zur Bestimmung des Hintergrundes wurde die Aufnahme in Hefen, die mit dem Leerplasmid transformiert worden waren, gemessen. Sofern nichts anderes angegeben ist, wurde für jedes biologische Replikat der Mittelwert von technischen Duplikaten bestimmt. Von der Aufnahme in heterolog exprimierenden Zellen wurde, sofern nichts anderes angegeben ist, dieser Hintergrund abgezogen. Die gemessenen Aufnahme-Werte wurden gegen eine zweite Größe, wie zum Beispiel Aufnahmezeit oder pH-Wert, aufgetragen und mit einer der folgenden Funktionen durch die Mittelwerte gefittet:

- Gerade

Die Funktion beschreibt einen linearen Verlauf.

$$y = m * x + b \quad (3.4)$$

m: Steigung

b: Ordinatenabschnitt

- Exponentialfunktion

Diese Funktion beschreibt einen exponentiellen Anstieg oder Abfall.

$$y = y_0 + ae^{xb^{-1}} \quad (3.5)$$

y_0 : *offset*

a: Amplitude

b: Zeitkonstante

- *exponential rise to max*

Die Funktion beschreibt ein exponentiell ansteigendes, auf einen Grenzwert beschränktes Wachstum.

$$y = a(1 - e^{(-bx)}) \quad (3.6)$$

a: Grenzwert

b: Geschwindigkeitskonstante

- Sigmoidfunktion

Diese Funktion wird auch als *dose response curve* verwendet und hat einen sigmoidalen Verlauf zwischen zwei Asymptoten mit einem definierten Zentrum, das den Wendepunkt der Kurve beschreibt.

$$y = a_1 + \frac{a_2 - a_1}{1 + 10^{(x_0 - x)p}} \quad (3.7)$$

a_1, a_2 : Asymptoten, mit $a_1 < a_2$

x_0 : Zentrum; x-Wert, an dem y auf der Hälfte zwischen a_1 und a_2 liegt

p: *hill slope*

- Zweistufige Sigmoidfunktion

Diese Funktion beschreibt zwei hintereinanderliegende einzelne Sigmoidfunktionen.

$$y = a_1 + (a_2 - a_1) \left(\frac{p}{1 + 10^{(x_{0,1} - x)h_1}} \frac{1 - p}{1 + 10^{(x_{0,2} - x)h_2}} \right) \quad (3.8)$$

a_1, a_2 : Asymptoten

$x_{0,1}, x_{0,2}$: Zentren der beiden Teilkurven

h_1, h_2 : Steigungen der beiden Teilkurven

p: *proportion*

Mit diesem Versuchsaufbau ließen sich, mit leicht unterschiedlichem Aufbau oder unterschiedlichen Messbedingungen, verschiedene Transportereigenschaften messen. Folgende Messbedingungen wurden in dieser Arbeit untersucht:

Zeitabhängige Aufnahme

Zur Bestimmung der Zeitabhängigkeit der Aufnahme über einen Transporter oder Kanal wurde die Aufnahme nach verschiedenen Zeitpunkten gestoppt. Dabei wurde jeder Zeitpunkt in einem einzelnen Aliquot bestimmt. Die erhaltenen Messwerte der Aufnahme wurden anschließend über die Aufnahmezeit aufgetragen. Die Aufnahmekurven wurden bei einem kurvenförmigen Verlauf nach Gleichung 3.6 oder bei einem linearen Verlauf nach Gleichung 3.4 gefittet. Für die Beurteilung der Leitfähigkeit der Basigin-Mutanten wurden die Zellen 10 min lang auf Raumtemperatur aufgewärmt.

Michaelis-Menten-Konstanten

Die Affinität von einem Substrat zum Transporter lässt sich über die Michaelis-Menten-Konstante ausdrücken ([147]). Zur Bestimmung dieser Größe wurde die initiale Transportrate gemessen. Für jede Rate wurde jeweils ein Messwert zu einem Zeitpunkt herangezogen, der im steil ansteigenden, quasilinearen Bereich der zeitabhängigen Aufnahme lag. Aus dieser Aufnahme und der Aufnahmezeit wurde die initiale Rate berechnet und diese gegen die Substratkonzentration aufgetragen. Die Kurve wurden nach Gleichung 3.6 gefittet und die Michaelis-Menten-Konstante wie folgt berechnet:

$$K_m = \ln(0,5)(-b^{-1}) \quad (3.9)$$

K_m : Michaelis-Menten-Konstante

b : Geschwindigkeitskonstante aus dem Fit *exponential rise to max*

Aus diesem Fit lies sich auch die maximale Transportgeschwindigkeit v_{\max} ablesen. Diese stellt den Grenzwert der so gefitteten Kurve dar.

pH-Abhängigkeit

Um die pH-Abhängigkeit der Aufnahme zu untersuchen, wurde die initiale Transportrate wie oben beschrieben über einen einzelnen Zeitpunkt im quasilinearen Bereich der Aufnahmekurve bestimmt und über den pH-Wert des Messpuffers aufgetragen. Die Puffer waren wie in Tabelle 2.6 zusammengesetzt oder es wurden Zitronensäure-Phosphat-Puffer in H_2O verwendet, die auch für die Untersuchung der Schwerwasser-Effekte genutzt wurden. Die so bestimmten Kurven wurden mit einer Exponentialfunktion (siehe Gleichung 3.5), einer einfachen oder einer doppelten Sigmoidfunktion (siehe Gleichung 3.7 beziehungsweise siehe Gleichung 3.8) gefittet.

Aktivierungsenergie

Für die Bestimmung der Aktivierungsenergie wurde die initiale Transportrate aus einem einzelnen Zeitpunkt im quasilinearen Bereich der Aufnahmekurve bestimmt und über die Messtemperatur

aufgetragen. Dafür wurden die Aliquots der Hefesuspension auf verschiedene Temperaturen erwärmt oder gekühlt. Temperaturen oberhalb der Raumtemperatur von 19 °C wurden mithilfe eines Heizblockes für 1,5-ml-Reagiergefäße erreicht, Temperaturen unterhalb von 19 °C über das Temperieren im Kühlschrank *MF-6W*. Dabei wurden die Reagiergefäße vorgewärmt oder vorgekühlt. Mit einem Thermometer wurde regelmäßig die Temperatur innerhalb der mit Hefesuspension befüllten Reagiergefäße überprüft. Der natürliche Logarithmus der gemessenen Raten wurde dann gegen den Kehrwert der Temperatur in Kelvin aufgetragen:

$$\underbrace{\ln(k)}_y = \underbrace{\ln(k_0)}_b - \underbrace{\frac{E_A}{R}}_m \underbrace{\frac{1}{T}}_x \quad (3.10)$$

k: initiale Aufnahmerate

$\ln(k_0)$: Ordinatenabschnitt der Gerade

E_A : Aktivierungsenergie in $\frac{J}{mol}$

R: allgemeine Gaskonstante ($8,314 \frac{J}{molK}$)

T: Temperatur in Kelvin

Diese Auftragung im Arrhenius-Plot erlaubt die Berechnung der Aktivierungsenergie aus der Steigung und der allgemeinen Gaskonstanten.

Kompetitive Inhibition

Durch Zugabe einer zweiten, unmarkierten Substanz in die Substratlösung kann überprüft werden, ob diese Substanz ebenfalls ein Substrat für den Transporter oder Kanal ist. Um dies zu überprüfen, enthielt die Substratlösung (5X) neben markiertem und unmarkiertem Substrat auch eine unmarkierte weitere Verbindung. Hier wurde ebenfalls eine initiale Rate über einen Messpunkt im quasilinearen Bereich der zeitabhängigen Aufnahmekurve bestimmt. Die Konzentration an Substrat wurde dabei nahe bei oder oberhalb der Michaelis-Menten-Konstante gewählt, damit eine höhere Konzentration an Substratmolekülen und damit eine höhere Transportgeschwindigkeit nicht einen inhibitorischen Effekt überdeckte.

An jedem Messtag wurde zunächst die Aufnahme mit einer Substratlösung gemessen, die diese zweite Verbindung nicht enthielt. Dann wurde die Aufnahme mit der Substratlösung bestimmt, die beide Verbindungen enthielt. Diese beiden Messwerte wurden schließlich miteinander verglichen.

Kovalent bindende Inhibitoren

Die thermisch instabilen Inhibitoren Propyl- und Benzylmethanthiosulfonat (PMTS und BMTS) wurden erst direkt vor Verwendung aufgetaut und je 1 µl als Stammlösung (80X) in DMSO in die 1,5-ml-Reagiergefäße vorgelegt. Die Zellsuspension wurde vom Eis genommen, direkt auf den Inhibitor

3.3 Funktionelle Charakterisierung in *S. cerevisiae*

gegeben und kurz auf dem Vortex gemischt. Nach der Inkubationszeit wurde die Substratlösung (5X) zugegeben und kurz gemischt. Die Aufnahme wurde nach 2 min wie oben beschrieben gestoppt. Als Vergleich für nicht-inhibierten Transport wurde dieselbe Zellsuspension verwendet, die auf 1 µl DMSO gegeben wurden. Zur Bestimmung des Hintergrundes wurden nicht-exprimierende Zellen verwendet, die ebenfalls mit 1 µl DMSO vorinkubiert wurden. Die in Gegenwart des Inhibitors verbleibende Transportaktivität wurde mit Gleichung 3.11 berechnet.

$$\text{Aktivität(\%)} = 100 \frac{\text{Aufn. mit Inhibitor (nmol mg}^{-1}) - \text{Hintergr. (nmol mg}^{-1})}{\text{Aufn. ohne Inhibitor (nmol mg}^{-1}) - \text{Hintergr. (nmol mg}^{-1})} \quad (3.11)$$

Schwerwasser-Effekte

Die Hefekulturen wurden wie oben beschrieben angesetzt. Am Messtag wurden die Kulturen vor der Ernte zunächst halbiert und jede Hälfte wie oben beschrieben geerntet. Nach der Ernte wurde jedes Pellet zweimal entweder mit je 1 ml dd H₂O oder 1 ml D₂O gewaschen. Nach der Inkubationszeit auf Eis für mindestens 30 min wurde die OD₆₀₀ entsprechend mit dem H₂O- oder D₂O-Messpuffer eingestellt. Auch die Substratlösung (5X) wurde je einmal mit H₂O und einmal mit D₂O hergestellt. Nicht-exprimierende Hefen wurden unter gleichen Bedingungen ebenfalls in H₂O und in D₂O vermessen. Es wurde jeweils der Wert für den Hintergrund im selben Lösungsmittel von den Messwerten abgezogen.

Efflux-Messungen

Neben den oben beschriebenen *zero-trans*-Influx-Messungen in die Zellen hinein wurden auch *zero-trans*-Efflux-Messungen durchgeführt. Die Zellen wurden eine definierte Zeit lang einem einwärts gerichteten Substratgradienten ausgesetzt. Dann wurden die Zellen durch Zentrifugation (12.225 g; 10 s; 19 °C) abgetrennt und in einem substratfreien Messpuffer resuspendiert. Es wurden für einzelne Zeitpunkte entweder einzelne Aliquots angelegt, bei denen der Ausstrom durch Zusatz von 1 ml eiskaltem dd H₂O und anschließende Filtration gestoppt wurde. Andernfalls wurden größere Volumina von Suspension und Substratlösung inkubiert, aus denen die Aliquots zu 100 µl zu definierten Zeitpunkten entnommen und direkt auf den Filter gegeben wurden. Die Filter wurden wie oben beschrieben gewaschen und ausgezählt. Die Substrat-Menge, die sich zum jeweiligen Zeitpunkt in der Zelle befand, wurde gegen die Efflux-Zeit aufgetragen und exponentiell (siehe Gleichung 3.5) gefittet.

3.3.2 Lichtstreuungsassay

Der Lichtstreuungsassay basiert darauf, dass die Lichtstreuung einer Suspension schrumpfender oder schwellender Protoplasten gemessen wird, die einem osmotischen und chemischen Gradienten ausgesetzt sind. Die Methode wurde für Kanalproteine bereits in [39] beschrieben.

Zunächst wurden 5 ml SD-AHLW-Medium mit einem Klon transformierter *S. cerevisiae* inokuliert. Diese Vorkultur wurde für einen Tag bei 29 °C und 220 U min⁻¹ im Orbitalschüttler inkubiert. Am folgenden Tag wurde aus dieser Vorkultur eine Hauptkultur mit einem Volumen von 50 ml für den folgenden Tag angesetzt (29 °C; 220 U min⁻¹ im Orbitalschüttler).

Die Zellen wurden am nächsten Tag bei einer OD₆₀₀ von 1 ± 0,1 in einem vorher gewogenen Zentrifugenröhrchen geerntet (5 min; 2.000 g; 4 °C). Das Pellet wurde in 3 ml Puffer I resuspendiert und erneut 5 min bei 2.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet gewogen. Dann wurde es in 2 ml Puffer I resuspendiert und für 15 min bei 30 °C auf dem Orbitalschüttler mit 140 U min⁻¹ inkubiert. Danach wurden 100 mg BSA, 4 ml Puffer II und Zymolyase (400 U pro Gramm Pellet) zugegeben und die Mischung wurde für 60 min bei 30 °C und 140 U min⁻¹ auf dem Orbitalschüttler inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zentrifugation (5 min; 2.000 g; 4 °C) gestoppt und das Pellet unter vorsichtigem Schütteln auf Eis in 5 ml Puffer III resuspendiert. Die Suspension wurde erneut zentrifugiert (5 min; 2.000 g; 4 °C), das Pellet durch vorsichtiges Schütteln auf Eis in 2 ml Puffer III resuspendiert und die OD₆₀₀ der Zellsuspension bestimmt. Die Protoplasten wurden auf eine OD₆₀₀ von 2 eingestellt und vor Verwendung für eine Nacht im Kühlschrank gelagert.

Zum Start der Messung wurde die Protoplastensuspension im Verhältnis 1 : 1 mit dem hypertonen Substratpuffer in der Mischkammer der *Stopped Flow* gemischt. Die Mischung wurde mit Licht bestrahlt und das Streulicht im 90°-Winkel zur Lichtquelle vom Detektor gemessen. Zusätzlich war ein Verstärker angeschlossen. Die Geräteparameter sind in Tabelle 3.9 aufgeführt.

Tabelle 3.9: **Geräteeinstellungen für die Lichtstreuungsmessung**

Parameter	Wert
Lampe	Quecksilber/Xenon
Filter	524 nm
Mischungsverhältnis	1:1
Volumen pro Schuss	150 µl gesamt (je 75 µl)
Flussrate	8 ml s ⁻¹ gesamt (je 4 ml s ⁻¹)
Start der Datenerfassung	10 ms vor dem Stop
Aufnahmeserie	Fluoreszenz in Volt
Kanal	1
weitere Einstellungen	<i>trigger</i>
<i>sampling period</i>	20 ms
Endzeit	120 s
Datenpunkte	6001
Verstärker	800, 300 µs Ausgangsfilter, <i>PM out</i> , lokal

An jedem Messtag wurde der Transport sowohl der Transporter exprimierenden wie auch der nicht-exprimierenden Zellen unter denselben Messbedingungen gemessen. Jeweils 9 Einzelmessungen wurden zu einem Mittelwert verrechnet. Die biphasischen Kurven wurden wie folgt normiert: Zunächst wurde der Messpunkt nach 20 ms auf den Ursprung des Koordinatensystems (0 s/0 V) gesetzt. Dann wurde der höchste Punkt der Kurve durch Multiplikation der gesamten Kurve auf den Wert von 1 V gesetzt und die Kurve dementsprechend gestreckt oder gestaucht. Zur Beurteilung einer Leitfähigkeit oder Nicht-Leitfähigkeit wurden die Kurven in einem Zeitraum von 20 bis 90 s Messdauer linear gefittet. Von der Steigung der exprimierenden Zellen wurde die Steigung der nicht-exprimierenden Zellen als Hintergrund abgezogen.

3.4 Bioinformatische Methoden

3.4.1 Berechnung des Volumens übertragener Gruppen

Die Berechnung des van-der-Waals-Volumens von übertragenen Gruppen wurde mit Chemicalize durchgeführt.

3.4.2 Alignments

Die Primärsequenzen der Proteine wurden von der NCBI Proteindatenbank [141] übernommen. Das Alignment der Sequenzen von MCT1 bis 14 und SfMCT wurde mit *MegAlign* nach der *clustal V*-Methode [148] durchgeführt und gegebenenfalls manuell editiert. Die Darstellung dieser Alignments erfolgte mit *TeXshade* im *similarity shading mode* [144]. Dabei wurden jeweils nur die gezeigten Sequenzen bei der Einfärbung des Alignments berücksichtigt.

3.4.3 Proteinstrukturen und -modelle

Verfügbare Proteinstrukturen wurden von der *Protein Data Bank* [149] übernommen und mit *ChimeraX* dargestellt [139]. Waren keine experimentell aufgeklärten Strukturen vorhanden, wurden Modelle mit *SWISS-MODEL* [143] basierend auf der Struktur von MCT1 mit gebundenem L-Laktat (PDB ID # 6LZ0 [62]) erstellt. Gegebenenfalls wurden Wasserstoffatome in *ChimeraX* ergänzt. Die pK_S-Werte der Aminosäuren wurden mittels *residue depth* [142] bestimmt.

4 | Ergebnisse

Um den Transportmechanismus in der MCT-Familie zu untersuchen, wurde die Substratpassage über verschiedene Membranproteine funktionell charakterisiert. Die heterologe Proteinexpression in *S. cerevisiae* wurde in der Vergangenheit bereits erfolgreich zur Charakterisierung von Transportern und Kanälen eingesetzt [39, 55, 60].

In dieser Arbeit wurden sowohl die beiden Transporter MCT1 und MCT12 verwendet, wie auch das Kanalprotein AQP9. Da die Substratpassage über Kanäle rein diffusionsgetrieben ist, stellte AQP9 eine wertvolle Kontrolle für die Transporteigenschaften der MCT und die Integrität des Expressionssystems dar. Die *S. cerevisiae*-Zellen zeichnen sich durch eine hohe Stabilität gegenüber niedrigen pH-Werten aus [150, 151], was die Charakterisierung der Transporter im stark sauren Milieu ermöglicht hat. Die Expression der Proteine erfolgte, sofern nicht anders angegeben, in Hefen vom Stamm W303-1A mit *knock-outs* für die endogenen Monocarboxylattransporter der Hefe *jen1* und *ady2* [152, 153]. Diese *knock-outs* gewährleisteten einen niedrigen Hintergrund für Transportassays mit den Substraten L-Laktat, Acetat und Propionat. Da sich die physikochemischen Eigenschaften von Kreatin und L-Laktat deutlich unterscheiden, wurde davon ausgegangen, dass *jen1* und *ady2* keine Kreatin-Aufnahme vermitteln. Die Transportassays mit Kreatin erfolgten daher in Hefen vom Stamm W303-1A ohne *knock-outs*.

Es wurden entweder die Sequenzen der Wildtyp-Proteine verwendet oder die Sequenzen wurden über ortsgerichtete *in-vitro*-Mutagenese (siehe Abschnitt 3.1.3) verändert. Plasmide mit den codierenden Sequenzen wurden in die Hefen eingebracht (siehe Abschnitt 3.2.1). Die heterologe Expression wurde mit einem Western Blot überprüft (siehe Abschnitt 3.2.5 und Abschnitt 3.2.6). Die Membranproteine wurden mithilfe des ^{14}C -Substrat-Transportassays (siehe Abschnitt 3.3.1) und im Lichtstreuungsassay (siehe Abschnitt 3.3.2) charakterisiert.

4.1 Expression von MCT12 in *S. cerevisiae*

Um mechanistische Aussagen treffen zu können, die für die ganze Transporterfamilie gültig sind, wurde ein Zwitterionen-Uniporter zur Charakterisierung ausgewählt. Über den Zwitterionen-Uniporter MCT12 ist, gerade im Vergleich zu den L-Laktat-Protonen-Cotransportern MCT1, MCT2 und MCT4, deutlich weniger bekannt [45]. Daher wurde die für MCT12 codierende Sequenz in die Hefen eingebracht. Da MCT12 Kreatin transportiert [111], wurde hier der Stamm W303-1A ohne *knock-outs* gewählt.

4.1 Expression von MCT12 in *S. cerevisiae*

Expression unter initialen Bedingungen

In der Literatur ist beschrieben, dass MCT12 beim *trafficking* in HEK-293-Zellen auf Basigin als *chaperone* angewiesen ist [154]. Im Expressionssystem *S. cerevisiae* wurde außerdem gezeigt, dass die Fusion mit Basigin die MCT1-vermittelte L-Laktataufnahme erhöht [60]. Daher wurde auch ein Fusionsprotein aus Basigin und MCT12 hergestellt. Die membrannahe Ig-I-Domäne des Basigins vermittelt die Erhöhung des Transportes in MCT1 [60]. Dieser Effekt der Erhöhung des Transportes und der Verbesserung des *traffickings* könnte auch für MCT12 in *S. cerevisiae* relevant sein. Um die Länge des Fusionsproteins zu begrenzen, wurde die Basigin-Ig-I-Variante gewählt. Diese trägt nur eine extrazelluläre Domäne und ist daher deutlich kürzer als andere Basigin-Varianten. Im Fusionsprotein wurde Basigin Ig-I N-terminal an MCT12 angefügt.

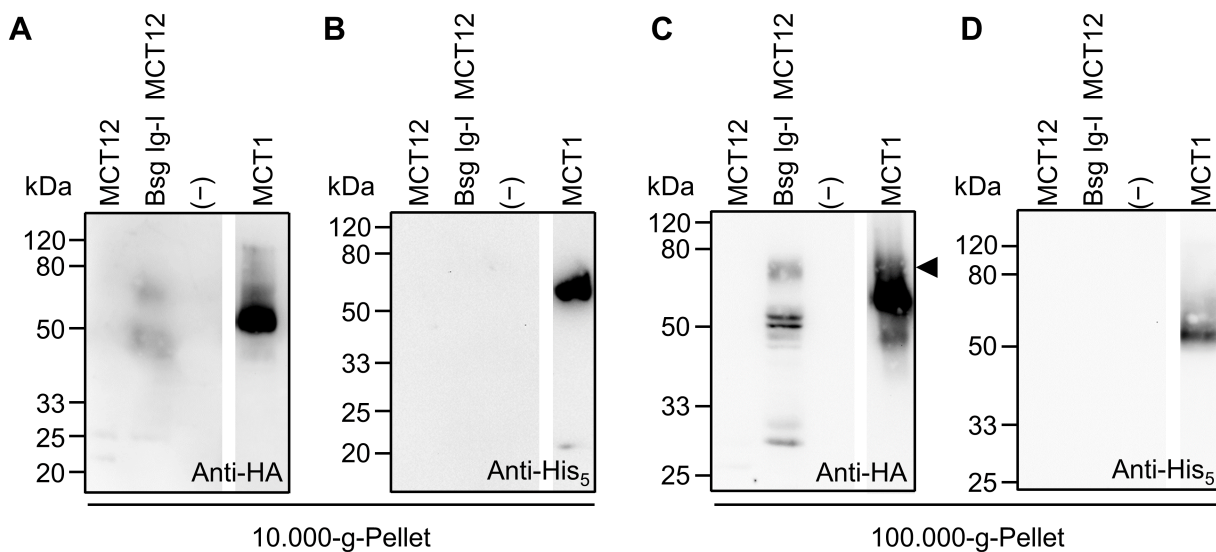


Abbildung 4.1: **Expression von MCT12 in *S. cerevisiae* unter initialen Bedingungen.** Die Detektion erfolgte für A und C mit dem Anti-HA-, für B und D mit dem Anti-His₅-Primärantikörper. MCT1 ist als Kontrolle mit aufgetragen. Die Markierung gibt die erwartete Größe des Fusionsproteins von 76 kDa an (Gesamtprotein: 30 µg pro lane, Belichtungszeit: 7 min).

Die Expression des Transporters mit und ohne Basigin-Fusion wurde mithilfe eines Western Blots überprüft (siehe Abbildung 4.1). Es wurden sowohl die 10.000-g- als auch die 100.000-g-Fraktion des Hefeaufschlusses untersucht. Dabei wurde mit beiden möglichen Primärantikörpern detektiert: mit einem gegen den N-terminalen HA-tag und mit einem gegen den C-terminalen His-tag gerichteten Antikörper. Für MCT12 wurde eine Bande bei 56 kDa erwartet und für das Fusionsprotein eine Bande bei 76 kDa. Die Positivkontrolle MCT1 in W303-1A Δ jen1 Δ ady2 war mit beiden Antikörpern und in beiden Fraktionen des Hefeaufschlusses sichtbar. Für beide MCT12-Konstrukte wurden mit dem Anti-His₅-Antikörper keine Signale erfasst. MCT12 ohne die Fusion mit Basigin wurde in diesem Hefeaufschluss nicht detektiert. Das Fusionsprotein mit Basigin zeigte eine Bande im Western Blot auf der erwarteten Höhe in der mikrosomalen Fraktion (siehe Abbildung 4.1 C, Markierung). Gleichzeitig wurden jedoch auch deutlich kleinere Proteine detektiert. Dies deutet darauf hin, dass die

Basigin-Fusion die Expression von MCT12 steigert. Dass mit dem Anti-His₅ -Primärantikörper keine Signale detektiert werden konnten, lässt darauf schließen, dass der C-Terminus von MCT12 entweder für den Antikörper nicht zugänglich ist oder dass das Protein nicht vollständig exprimiert wurde. Für eine unvollständige Expression spricht außerdem das Auftreten von kleineren Proteinen. Diese Proteine könnten Abbruchfragmente der Translation darstellen oder während des Zellaufschlusses aus dem vollständigem Protein entstanden sein.

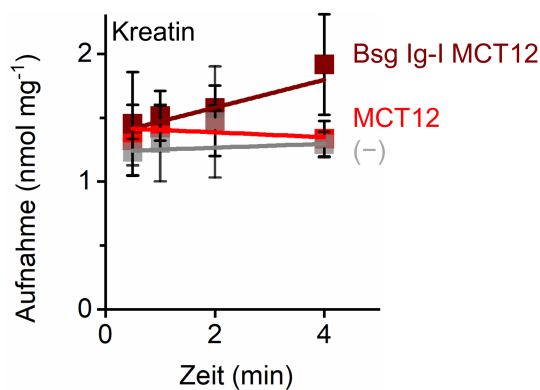


Abbildung 4.2: **Aufnahme über MCT12 und dem Basigin-Ig-I-MCT12-Fusionsprotein im Vergleich zu nicht-exprimierenden Zellen.** Der Kreatin-Gradient betrug 20 mM. Die Messung wurde in einem Messpuffer mit pH 7,8 durchgeführt. Fehler stellen Standardabweichung der technischen Triplikate dar (N = 1).

Außerdem wurde die Funktion von MCT12 und dem Fusionsprotein Basigin-Ig-I-MCT12 in diesem Expressionssystem untersucht (siehe Abbildung 4.2). Unter den gewählten Versuchsbedingungen (20 mM Kreatin, pH 7,8) wurde für MCT12 kein messbarer Transport beobachtet. Die Aufnahme von MCT12 exprimierenden Zellen schien gleich groß wie die Aufnahme nicht-exprimierender Zellen. Für das Fusionsprotein aus Basigin Ig-I und MCT12, für das im Western Blot eine Expression gezeigt wurde, wurde nach 4 min eine Aufnahme gemessen, die oberhalb des Hintergrundes lag. Diese Leitfähigkeit war jedoch zu gering, um im Folgenden weiter charakterisiert zu werden.

Um den Transport über MCT12 sowohl mit als auch ohne Basigin-Fusion messbar zu machen, wurde daher zunächst eine Steigerung der Expression angestrebt.

Codon-Optimierung einer Adenin-reichen Sequenz

Die Basensequenz des *sense*-DNA-Stranges kann unabhängig von der Verfügbarkeit von entsprechender tRNA die Expression beeinflussen [145]. An besonders adeninreichen Sequenzen kann *ribosome sliding* auftreten. Bei diesem Phänomen verrutscht der DNA-Strang am Ribosom, sodass es zur frühzeitigen Termination der Translation kommen kann [145]. MCT12 besitzt eine besonders Adenin-reiche Sequenz im N-Terminus. Um einen frühen Abbruch der Translation in diesem Bereich zu umgehen, wurden in diesem Bereich Codons ausgetauscht. Die Gensequenz im MCT12 wurde dann durch den optimierten N-Terminus ersetzt. Die Sequenz (optMCT12) codierte für dieselben

4.1 Expression von MCT12 in *S. cerevisiae*

Aminosäuren wie das Ausgangsgen, jedoch enthielt die DNA dieses Konstruktes weniger Adenin.

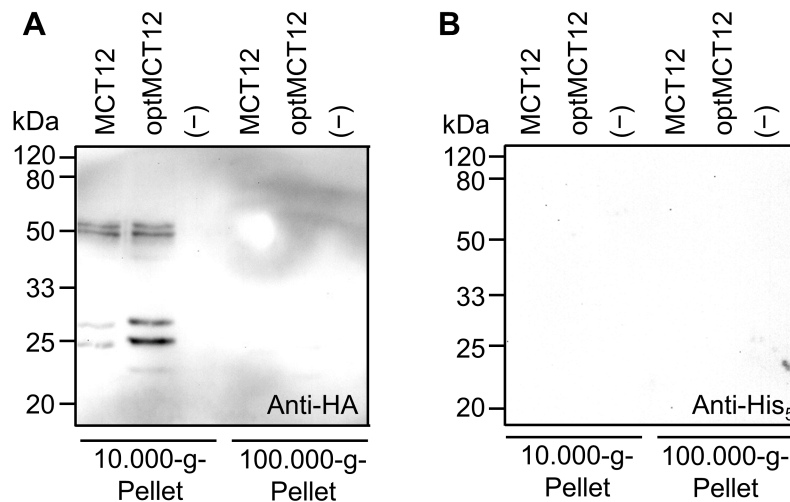


Abbildung 4.3: **Vergleich der Expression von MCT12 und optMCT12 in *S. cerevisiae* im Western Blot.** Die Detektion erfolgte für A mit dem Anti-HA- und für B mit dem Anti-His₅-Primärantikörper (Gesamtprotein: 20 µg pro lane, Belichtungszeit: 20 min).

Hefen wurden mit dem Plasmid transformiert, das für optMCT12 codiert (siehe Abschnitt 3.2.1). Die Expression des Proteins basierend auf der Ausgangs-Sequenz und der optimierten Sequenz wurde mit einem Western Blot untersucht (siehe Abbildung 4.3). Bei Detektion mit dem Anti-HA-Antikörper führten sowohl die optimierte als auch die nicht-optimierte Sequenz zu Signalen im 10.000-g-Pellet (siehe Abbildung 4.3 A). Dabei war die beobachtete Signalintensität im Zellaufschluss der Hefen, die mit der optimierten Sequenz transformiert waren, höher. Am stärksten war dieser Effekt in den Banden bei niedrigeren Proteinmassen ausgeprägt. Auffällig war, dass die Optimierung der Sequenz nicht zu einer Verringerung der Anzahl der Banden geführt hat. Im 100.000-g-Pellet und bei Detektion mit dem Anti-His₅-Antikörper wurden hier keine Signale beobachtet. Die Optimierung der Sequenz im N-Terminus könnte folglich zu einer verbesserten Translation geführt haben. Die Banden bei kleineren Proteinmassen und die Abwesenheit von Signalen des Anti-His₅-Antikörpers deuteten jedoch auf weitere Komplikationen bei der Expression hin. Zur weiteren Optimierung und Charakterisierung wurde das Plasmid mit der optimierten DNA-Sequenz verwendet.

Nach der Optimierung der DNA-Sequenz sollte im Folgenden auch der Einfluss der Kulturbedingungen auf die heterologe Expression der Membranproteine untersucht werden, um auch hier eine Steigerung der Expression zu erreichen.

Optimierung der Kulturbedingungen

Verschiedene Zusätze zum Medium können die Expression von Membranproteinen in Hefen erhöhen, indem sie die Faltung der Proteine während der Synthese stabilisieren [155]. Zu den beschriebenen Zusätzen, den *chemical chaperones*, gehören 10 % Glycerol, 2,5 % DMSO, 0,04 mg ml⁻¹ Histidin und im Falle der Expression eines Rezeptores der Zusatz von Liganden [156, 157].

Auch die Absenkung der Inkubationstemperatur während der Wachstumsphase der Hefen auf 20 °C kann einen positiven Effekt auf die Expression haben [157]. Diese verschiedenen Bedingungen und der Zusatz von 50 mM Kreatin, dem Substrat des Transporters, wurden im Folgenden untersucht. Außerdem wurde das Medium zusätzlich zu den in den Methoden aufgeführten Zusätzen, für die die Hefen auxotroph sind, mit allen noch nicht enthaltenen Aminosäuren supplementiert.

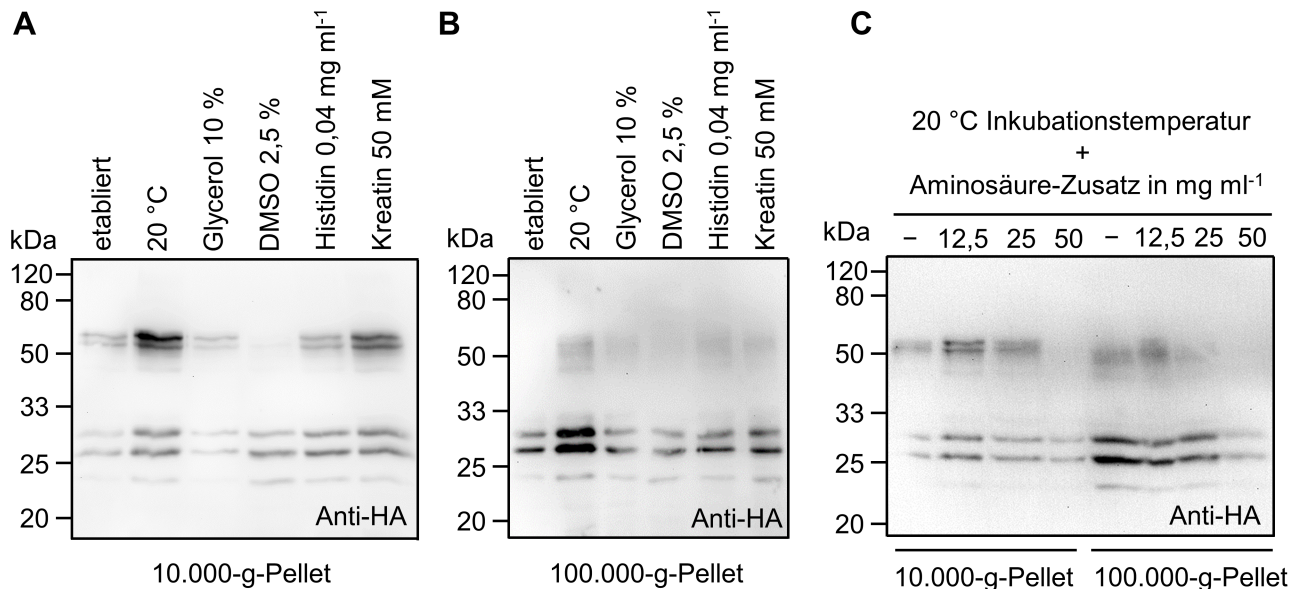


Abbildung 4.4: **Western Blot der Expression von optMCT12 mit verschiedenen Zusätzen und bei verschiedenen Inkubationstemperaturen.** Die Detektion erfolgte mit dem Anti-HA-Primärantikörper. (Gesamtprotein: A und B 20 µg pro lane, C 15 µg im 10.000-g-Pellet und 40 µg im 100.000-g-Pellet, Belichtungszeit: 9 min für A und B, 20 min für C).

Die Kontrolle der Expression erfolgte mittels Western Blot (siehe Abbildung 4.4). Dabei zeigte sich eine Erhöhung der Signalintensität, wenn die Hefen bei 20 °C inkubiert worden waren und beim Zusatz von 50 mM Kreatin. Die Signale im Zellaufschluss unter anderen Bedingungen zeigten keine Veränderung (Glycerol, Histidin) oder sogar eine Verringerung des Signals (DMSO) (siehe Abbildung 4.4 A und B). Der Effekt fiel dabei im 10.000-g-Pellet stärker aus als im 100.000-g-Pellet. An der Anzahl und Lage der Banden bei kleineren Molekulargewichten traten jedoch keine Veränderungen auf. Um den Einfluss des Aminosäure-Zusatzes zum Medium zu untersuchen, wurde bereits die Inkubationstemperatur von 20 °C für die Wachstumsphase der Hefen gewählt. Außerdem wurden drei verschiedene Konzentrationen der zugesetzten Aminosäuren getestet: je 12,5, 25 oder 50 mg ml⁻¹ je Aminosäure im Medium.

Der Zusatz der Aminosäure-Mischung wies einen konzentrationsabhängigen Effekt auf (siehe Abbildung 4.4 C). Während die niedrigste Konzentration zu einer Steigerung der Signalintensität im 10.000 g-Pellet führte, blieb die Signalintensität mit einem Zusatz von 25 mg ml⁻¹ gleich und verringerte sich bei 50 mg ml⁻¹. Es ist bekannt, dass Hefen mit einem mutierten *leu2*-Gen, wie zum Beispiel W303-1A, empfindlich auf hohe Konzentrationen von Aminosäuren reagieren [158]. Daher beruht die

4.1 Expression von MCT12 in *S. cerevisiae*

abnehmende Expression von MCT12 bei höheren Aminosäurekonzentrationen wahrscheinlich auf der Toxizität der Aminosäuren. Niedrige Konzentrationen schienen jedoch die Expression zu steigern. Im nächsten Schritt wurden alle Strategien, die die Expression von MCT12 steigern konnten, kombiniert: Fusion mit Basigin, optimierte Gensequenz, niedrige Temperatur von 20 °C in der Wachstumsphase der Hefen, Zusatz von Kreatin und von Aminosäuren in einer Konzentration von 12,5 mg ml⁻¹. Auch hier erfolgte die Kontrolle der Expression mit einem Western Blot (siehe Abbildung 4.5).

optMCT12 konnte als vollständiges Protein nur im 10.000-g-Pellet und mit dem HA-Antikörper nachgewiesen werden (Abbildung 4.5 A). In diesem Bereich ist eine Steigerung der Bandenintensität mit zunehmender Anzahl der Änderungen zu erkennen. Diese Steigerung der Expression war auch für die Basigin-Ig-I-Fusion im 10.000-g-Pellet mit dem Anti-HA-Primärantikörper sichtbar (Abbildung 4.5 C). Beide Proteine wurden als schwache Banden auf der erwarteten Höhe nachgewiesen (siehe Markierung in Abbildung 4.5). Der Anti-His₅-Primärantikörper detektierte jedoch nur die Positivkontrolle (MCT1 exprimiert in W303-1A Δ jen1 Δ ady2). Der Aufschluss der nicht-exprimierenden Hefen in 4.5 E und F zeigt keine unspezifischen Banden. Die Lage und Anzahl der beobachteten Banden bei kleineren Molekulargewichten wurde durch die Optimierung der Expressionsbedingungen nicht reduziert.

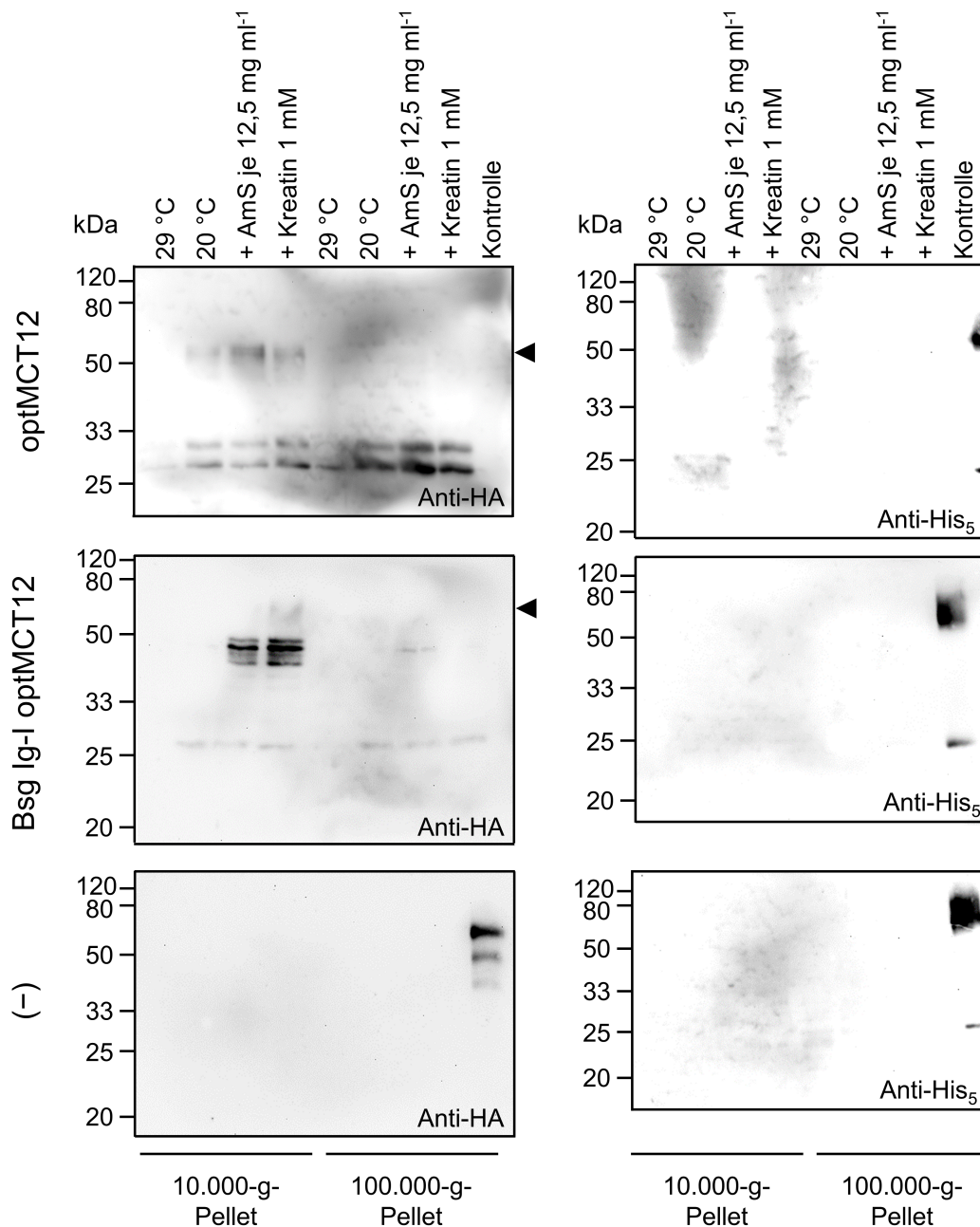


Abbildung 4.5: **Western Blot der Expression von optMCT12 und Basigin Ig-I optMCT12 (Bsg-Ig-I optMCT12) und von nicht-exprimierenden Zellen (-) unter optimierten Bedingungen.** Die Detektion erfolgte mit dem Anti-HA- (für A, C, E) oder mit dem Anti-His₅-Primärantikörper (B, D, F) (Gesamtprotein: 10 µg pro lane im 10.000-g-, 50 µg im 100.000-g-Pellet. Kontrolle A und C: (-) 10.000-g-Pellet, bei 29 °C inkubiert. Kontrolle B, D, E, F: MCT1 exprimiert in W303-1A Δ jen1 Δ ady2, 2 µg Gesamtprotein, 100.000-g-Pellet. Belichtungszeit: 35 min).

Zusatz von Proteaseinhibitoren während des Hefeauflusses

Um zu überprüfen, ob ein proteolytischer Abbau während des Zellaufschlusses die Ursache für die niedermolekularen Proteine im Western Blot war, wurden optMCT12 und das Basigin-Fusionsprotein wie oben beschrieben unter optimierten Bedingungen exprimiert und der Zellaufschluss aus derselben Kultur zeitgleich jeweils mit und ohne Zusatz von Proteaseinhibitoren durchgeführt.

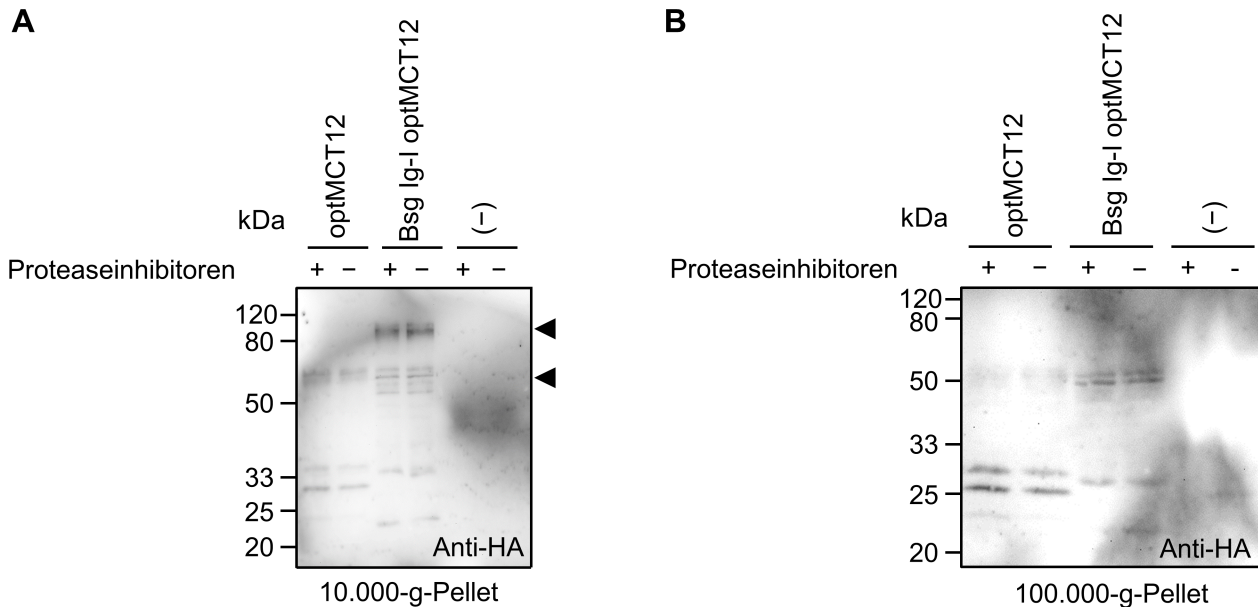


Abbildung 4.6: **Western Blot des Zellaufschlusses mit oder ohne (+ beziehungsweise) Zusatz von Proteaseinhibitoren.** Die Detektion erfolgte mit dem Anti-HA- (A) oder dem Anti-His₅-Primärantikörper (B). Banden auf der erwarteten Größe von 61 beziehungsweise 76 kDa sind mit einer Markierung gekennzeichnet (Gesamtprotein: 5 µg pro lane für A, 10 µg für B, Belichtungszeit: 35 min)

Sowohl für optMCT12 als auch für das Basigin-Fusionskonstrukt wurden Banden auf der Höhe des erwarteten Molekulargewichtes nachgewiesen (siehe Abbildung 4.6 A, Markierung). Der Zusatz von Proteaseinhibitor-Cocktail (+) führte nicht zu einer Verringerung der Anzahl oder der Intensität der Proteinbanden bei kleineren Molekulargewichten im 10.000-g- oder im 100.000-g-Pellet. Daher entstehen diese kleineren Proteine wahrscheinlich nicht durch proteolytischen Abbau des vollständigen Proteins während des Zellaufschlusses. Wahrscheinlich entsteht die Fragmentierung des MCT im Rahmen der Transkription oder Translation.

Funktionalität von MCT12 nach Optimierung

Hefen, die mit dem Plasmid für die Expression von optMCT12 oder das Fusionsprotein transformiert worden waren, wurden unter optimierten Bedingungen kultiviert und die Transporter wurden auf Leitfähigkeit für Kreatin hin untersucht. Takahashi *et al.* (2020) konnten bei heterologer Expression von MCT12 in HEK-293-Zellen keinen Influx von Kreatin messen, dafür jedoch Efflux [115]. Daher wurde sowohl der Einstrom als auch der Ausstrom von Kreatin in optMCT12 exprimierende und nicht-exprimierende (–) Zellen untersucht.

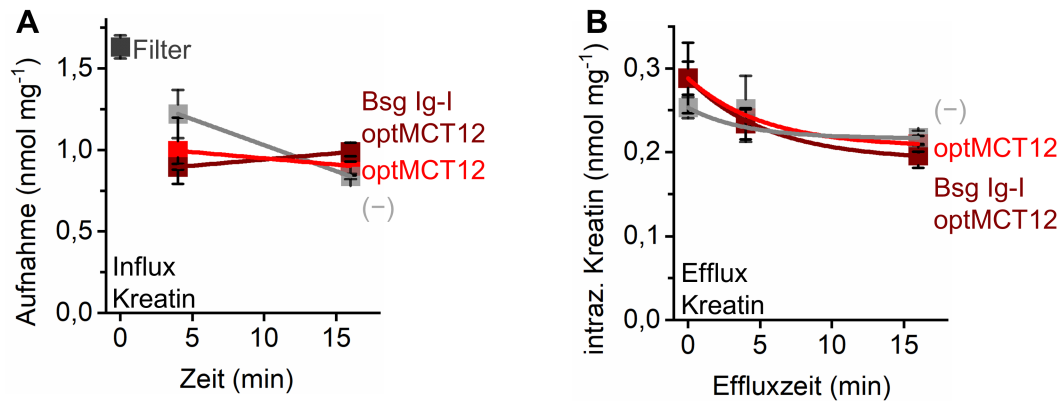


Abbildung 4.7: **Kreatin-Influx (A) und Efflux (B) von optMCT12, Basigin-Ig-I-optMCT12 und (-) nach Optimierung der Expression.** Für den Influx (A) ist außerdem der gemessene Wert aufgeführt, der durch auftragen der Substratlösung direkt auf den Filter gemessen wurde. Der Kreatingradient für den Influx und die Beladung betrug 10 mM, der Messpuffer war auf pH 8,0 eingestellt. Unterschiedliche Skalierung der y-Achse in A und B. Fehler geben S.E.M. an (N = 2).

Die Ergebnisse der Funktionsuntersuchung sind in Abbildung 4.7 dargestellt. Für den Influx (Abbildung 4.7 A) wurde kein Unterschied zwischen den exprimierenden (optMCT12 und Bsg-Ig-I optMCT12) und den nicht-exprimierenden (–) Zellen gemessen. Hier wurde kein zeitabhängiger Anstieg der Messwerte beobachtet. Wurde die Substratlösung direkt auf den Filter gegeben, ergab sich der in Grau eingezeichnete Messpunkt. Diese scheinbare gemessene Aufnahme, die durch den Filter begründet war, lag oberhalb der Messwerte für die Proben, die Hefen enthielten. Auch für den Efflux (siehe Abbildung 4.7 B) konnte kein Unterschied zwischen exprimierenden und nicht-exprimierenden Zellen festgestellt werden. Hier war ein zeitabhängiger Abfall des gemessenen Kreatins in der Zelle erkennbar, der für alle drei Hefekulturen unabhängig davon, ob heterolog Transporter exprimiert wurden, identisch verlief.

Obwohl eine Steigerung der Expression im Western Blot nachweisbar war, konnte für die so behandelten Hefen keine MCT12 vermittelte Leitfähigkeit für Kreatin festgestellt werden. Daher war MCT12 in dieser Arbeit einer Charakterisierung in *S. cerevisiae* nicht zugänglich. Im Folgenden wurde der Fokus der Arbeit auf die funktionale Charakterisierung von MCT1 gelegt.

4.2 Identifizierung der Laktat-Antenne im humanen Basigin

Der Transport über MCT1 wird durch die Interaktion mit anderen Proteinen beeinflusst [45]. Diese Beeinflussung des Transportes durch die Proteine findet noch außerhalb des Transportpfades statt. In menschlichen Zellen und in verschiedenen heterologen Expressionssystemen ist MCT1 für das *trafficking* auf Basigin angewiesen [99, 128, 159]. In *S. cerevisiae* kann MCT1 auch ohne das *chaperone* exprimiert werden, was die gezielte Untersuchung des Einflusses von Basigin auf den durch MCT1 vermittelten Transport ermöglicht [60]. Über den Effekt des *traffickings* hinaus kann Basigin über Oberflächenladungen Protonen elektrostatisch anziehen und so die Konzentration des Cosubstrates am Eingang des Transportpfades erhöhen. Da die Gradienten von Protonen und L-Laktat durch den Cotransport gekoppelt sind, führt dies insgesamt zu einer höheren Aufnahme von L-Laktat über MCT1.

Basigin ist mit einer α -helikalen TM in der Membran verankert. Der C-Terminus liegt innerhalb der Zelle. Extrazellulär schließen sich je nach Variante des Proteins bis zu drei Immunglobulin-artige Domänen an. An der Oberfläche der Membran liegt eine Ig-I-Domäne, weiter N-terminal eine Ig-C2-Domäne und dann schließt sich eine Ig-V-Domäne an (UniProt ID #P35613). Die membrannahe Ig-I-Domäne trägt die Oberflächenladungen und vermittelt die Anziehung der Protonen und die höhere L-Laktat-Aufnahme [60]. Ein überwiegend positiv geladener Bereich auf der gegenüberliegenden Seite des Basigins könnte eine L-Laktat-Antenne darstellen und das negativ geladene Substrat analog zu den Protonen anreichern. Ein entsprechendes Fusionsprotein aus Basigin Ig-I und MCT1, in dem alle positiv geladenen Aminosäuren in diesem stark geladenen Bereich entfernt und durch Alanin ersetzt wurden, war jedoch nicht funktional [60]. In Zusammenarbeit mit Dr. Anna-Lena Köpnick wurden im Folgenden weitere mutierte Fusionsproteine generiert, exprimiert und ihre Funktion im Radioassay untersucht.

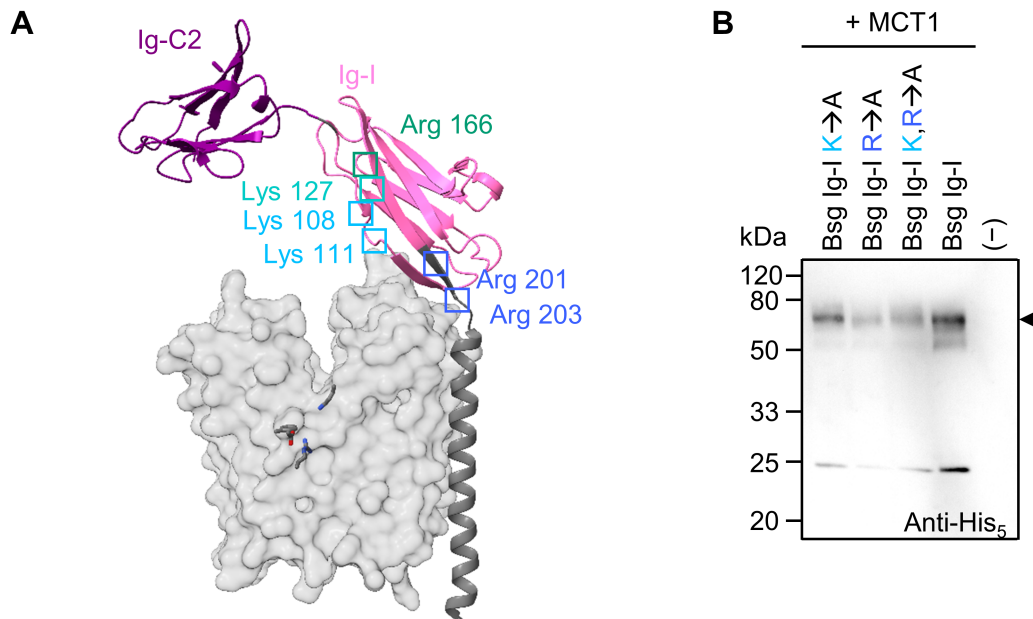


Abbildung 4.8: **Position der eingefügten Mutationen und Western Blot der Fusionsproteine.** A: kryoelektronenmikroskopische Struktur von MCT1 im Komplex mit Basigin (PDB #6LZ0). Die Oberfläche von MCT1 und die Seitenketten der Positionen 38, 309, 313 und 367 sind dargestellt. Es ist die Sekundärstruktur von Basigin dargestellt, da hier nicht die Position aller Atome der Seitenketten aufgelöst wurden. Das untersuchte Fusionsprotein verbindet den C-Terminus von Basigin mit dem N-Terminus des MCT1 über einen Linker. Die Ig-C2-Domäne (violett) und die Ig-V-Domäne (nicht in der abgebildeten Struktur enthalten) waren im Fusionsprotein nicht enthalten. Die mutierten Positionen im Basigin sind gekennzeichnet und benannt. B: Kontrolle der Expression der Fusionsproteine mit einem Western Blot. Die Markierung gibt die erwartete Größe des Fusionsproteins (77 kDa) an. Die Detektion erfolgte mit dem Anti-His₅-Antikörper (10 µg Gesamtprotein, 10 min Belichtungszeit).

In Abbildung 4.8 A sind die mutierten Positionen in der Struktur von MCT1 zusammen mit Basigin (PDB ID # 6LZ0) hervorgehoben. Um gezielt den Einfluss der Ig-I-Domäne zu untersuchen, wurde ein Fusionskonstrukt aus Basigin Ig-I und MCT1 verwendet. Innerhalb des Basigins wurden einzelne Positionen mutiert. Das Erhalten beziehungsweise Wiedereinführen von Arginin 166 war von entscheidender Bedeutung für die Funktion des Fusionsproteins. Es wurden folgende Konstrukte untersucht: Zum einen wurde die Doppelmutante aus den zwei Lysinen, die weiter von der Binde-tasche entfernt sind (K108A und K111A, im Folgenden K → A), hergestellt. Ferner wurde eine Doppelmutante der zwei Arginine, die sich direkt oberhalb der Proteinoberfläche befinden, generiert (R201A und R203A, im Folgenden R → A). Auch das Konstrukt für eine Fünffachmutante, die sowohl die bereits genannten Mutationen beinhaltet wie auch eine weitere Mutation am Lysin 127, wurde hergestellt (K108A K111A K127A R201A R203A, im Folgenden K, R → A). Die Expression der Fusionskonstrukte aus MCT1 und Basigin Ig-I jeweils als Wildtyp und mit den aufgeführten Punktmutationen wurde mit einem Western Blot bestätigt. Alle Fusionsproteine erscheinen auf der erwarteten Laufhöhe (siehe Abbildung 4.8 B, Markierung). Für alle Fusionsproteine werden auch Banden bei kleineren Molekulargewichten detektiert.

4.2 Identifizierung der Laktat-Antenne im humanen Basigin

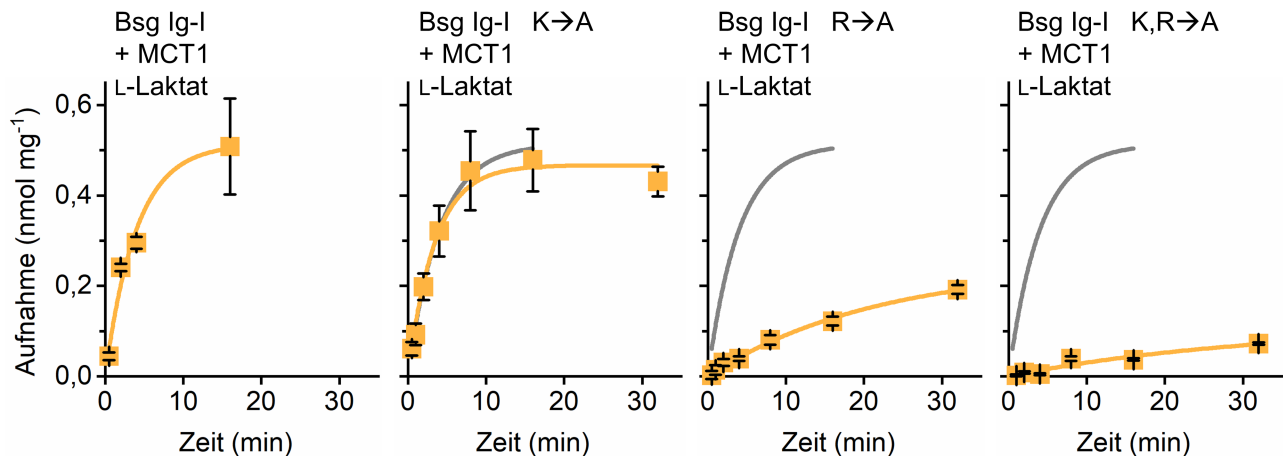


Abbildung 4.9: **Zeitabhängige Aufnahme über das Basigin-Ig-I-MCT1-Fusionsprotein als Wildtyp und als Mutante.** Es wurde die Aufnahme bei einer extrazellulären Konzentration von 1 mM L-Laktat bei einem pH von 6,8 gemessen. Die Aufnahmekurve des Wildtyps (ganz links) ist in den weiteren Abbildungen als graue Linie eingezeichnet. In diesem Experiment wurden die Hefezellen 10 min vorgewärmt. Fehler stellen S.E.M. dar (N = 2 - 4).

Um die Vergleichbarkeit dieser Aufnahmekurven mit den Werten für andere Basigin-Konstrukte zu gewährleisten, wurden in der Probenvorbereitung und der Datenerhebung für den Radioassay im Vergleich zu der unter Abschnitt 3.3.1 beschriebenen Methode Veränderungen vorgenommen (Vorwärmzeit der Zellen bei Raumtemperatur: 10 min, technische Triplikate, siehe Abbildung 4.9). Die in diesem Abschnitt aufgeführten Werte sind deswegen mit denen aus anderen Abschnitten, wie unter 4.4.2, nicht direkt vergleichbar. Wurde die L-Laktataufnahme über das Fusionsprotein aus dem Wildtyp Basigin Ig-I und MCT1 gemessen, stieg die Aufnahme in die Hefezellen zu Beginn der Messung exponentiell an und erreichte ein Plateau bei $(0,51 \pm 0,05) \text{ nmol mg}^{-1}$ (siehe Abbildung 4.9 ganz links). Da der L-Laktatgradient zu Beginn der Messung am höchsten ist, steigt die Aufnahme zunächst stark an. Nach einer gewissen Messzeit befindet sich auch L-Laktat in den Zellen und kann diese über die entgegengesetzte Richtung über den Transporter wieder verlassen. Die Kurve der Aufnahme steigt dann flacher an und erreicht ein Plateau. Ist dieses Plateau erreicht, befindet sich der Transport im Äquilibrium. Der Einstrom und der Ausstrom von Substrat sind dann gleich schnell und die gemessene Aufnahme verändert sich nicht mehr.

Der Kurvenverlauf und die Lage des Äquilibriums des Fusionsproteins aus dem Wildtyp Basigin Ig-I und MCT1 waren vergleichbar mit den Werten, die Dr. Anna-Lena Köpnick für dieses Konstrukt unter denselben Messbedingungen erhalten hatte. Zuvor hatte sie die Aufnahme von MCT1 ohne Basigin-Fusion gemessen. Diese lag deutlich unterhalb der Werte für das Fusionskonstrukt. Wurden im Basigin die Ladungen der Lysine weiter oberhalb des Eingangs zum Transportpfad entfernt, veränderte dies nicht die Aufnahme im Vergleich zum Wildtyp (siehe Abbildung 4.9 Mitte links, die graue Linie zeigt den Kurvenverlauf des Wildtyps an). Eine deutlich niedrigere Aufnahme wurde gemessen, sobald die Ladungen der zwei Arginine dicht an der Transporter-Oberfläche entfernt wurden (siehe Abbildung 4.9 Mitte rechts). Die Aufnahme stieg im Verlauf der Zeit deutlich flacher

an. Das extrapolierte Plateau der Kurve lag mit $(0,25 \pm 0,03) \text{ nmol mg}^{-1}$ nur halb so hoch wie für den Wildtyp und für die Lysin-Mutante. Wurden die oben genannten Mutationen kombiniert und außerdem die Mutation an Lysin 127 hinzugefügt, war die resultierende Aufnahme noch einmal deutlich geringer (siehe Abbildung 4.9 rechts). Das Plateau der Kurve lag bei $(0,11 \pm 0,07) \text{ nmol mg}^{-1}$ und damit nah an der Aufnahme-Kapazität, die für MCT1 unter diesen Messbedingungen ohne Basigin-Fusion bestimmt wurde ($(0,11 \pm 0,01) \text{ nmol mg}^{-1}$, [60]).

Die Erhöhung des von MCT1 vermittelten Transportes durch Basigin war abhängig von den Oberflächenladungen von Arginin 201 und Arginin 203. Die weiter vom Eingang des Transportpfades entfernten Lysin 108 und Lysin 111 trugen zu diesem Effekt nicht messbar bei. Die positiven Ladungen in der Ig-I-Domäne des Basigins könnten über eine elektrostatische Anziehung des Substrates den Transport erleichtert haben. Durch die lokale Erhöhung der L-Laktat-Konzentration wurde analog zu den Protonen die Aufnahme in die Zellen erhöht. So beeinflusste Basigin die Aufnahme von L-Laktat außerhalb des Transportpfades.

4.3 Inhibition von MCT1 durch Cysteinmodifikatoren

Um zu untersuchen, ob sich im MCT1 experimentell Hinweise auf einen *rocker-switch*-Mechanismus finden lassen, können Cysteinmodifikatoren verwendet werden. Cystein 159 im MCT1 befindet sich in einer Engstelle zwischen den beiden Transporterhälften (siehe Abbildung 4.10). Diese Proteinhälften müssen sich für einen *rocker-switch*-Mechanismus in einer Kippbewegung gegeneinander bewegen können [122]. Wird an dieser Position die Seitenkette des Cysteins durch eine Modifizierung vergrößert, könnte dies die Translokation und damit den Transport hemmen.

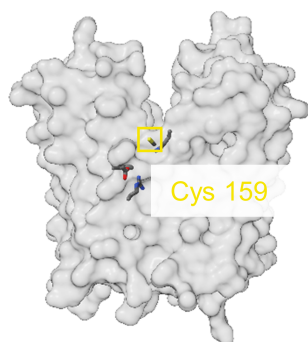


Abbildung 4.10: **Cystein 159 befindet sich an einer Engstelle zwischen den Transporterhälften.** Dargestellt ist die Oberfläche von MCT1 (PDB ID #6LZ0) und die Seitenketten von Position 38, 309, 313, 367 und Cystein 159. Letzteres ist in der Struktur markiert.

p-Chlormercuribenzolsulfonat (*p*CMBS) überträgt voluminöse Gruppen auf Cysteine (berechnetes van-der-Waals-Volumen 135 \AA^3) [123] und inhibiert den Transport über MCT1 [126]. Die Bindestelle für diesen Inhibitor, auf den das Molekül eine funktionelle Gruppe überträgt, stellt das Cystein 159 in der Engstelle zwischen den Transporterhälften im MCT1 dar [123]. Mit Cystein-Modifikatoren, die kleinere Gruppen übertragen, wurde im Gegensatz zu *p*CMBS nur eine teilweise Hemmung erreicht [123]. Methyl-Methanthiosulfonat (MMTS) überträgt eine deutlich kleinere Gruppe (berechnetes van-der-Waals-Volumen 44 \AA^3) und modifiziert abgesehen vom Cystein 159 noch weitere Cysteine im Protein [123]. Für Versuche mit Modifikatoren, die Gruppen von einer mittleren Größe übertragen, Propyl-Methanthiosulfonat (PMTS) und Benzyl-Methanthiosulfonat (BMTS), wurden von Dr. Anna-Lena Köpnick zunächst Inkubationsbedingungen gewählt, die anhand der deutlich kleineren Verbindung MMTS optimiert worden waren. In Zusammenarbeit mit Dr. Anna-Lena Köpnick wurde im Folgenden die maximal erreichbare Hemmung des MCT1-Transports mit PMTS und BMTS bestimmt. Außerdem wurde untersucht, ob PMTS und BMTS selektiv das Cystein 159 modifizieren so wie das *p*CMBS oder auch andere Cysteine wie das MMTS.

In Abbildung 4.11 A sind die Strukturen der beiden getesteten Verbindungen PMTS und BMTS gezeigt. Diese Verbindungen können einen Teil des Moleküls (markiert in Abbildung 4.11 A) auf das Schwefel-Atom eines Cysteins übertragen. Dieser Schwefel ist dann über eine Disulfidbrücke mit dem übertragenen Rest verbunden.

4.3 Inhibition von MCT1 durch Cysteinimodifikatoren

Um zu untersuchen, welches der 12 Cysteine im MCT1 durch die beiden Verbindungen modifiziert wird, wurde die MCT1-C159S-Mutante verwendet. Die Mutante kann an Position 159 durch den Austausch zum Serin nicht modifiziert werden. Indem das Ausmaß der Hemmung von Mutante und Wildtyp bestimmt wird, kann ein Teil des beobachteten Effektes gezielt Cystein 159 zugeordnet werden. Im Folgenden wurde die Inhibition der durch MCT1 vermittelten L-Laktataufnahme für den Wildtyp und für die C159S-Mutante bestimmt. Beide Proteine waren im Western Blot nachweisbar und wurden vergleichbar stark exprimiert (siehe Abbildung 4.11 B). Sie weisen außerdem im unmodifizierten Zustand ähnliche Transporteigenschaften auf [123].

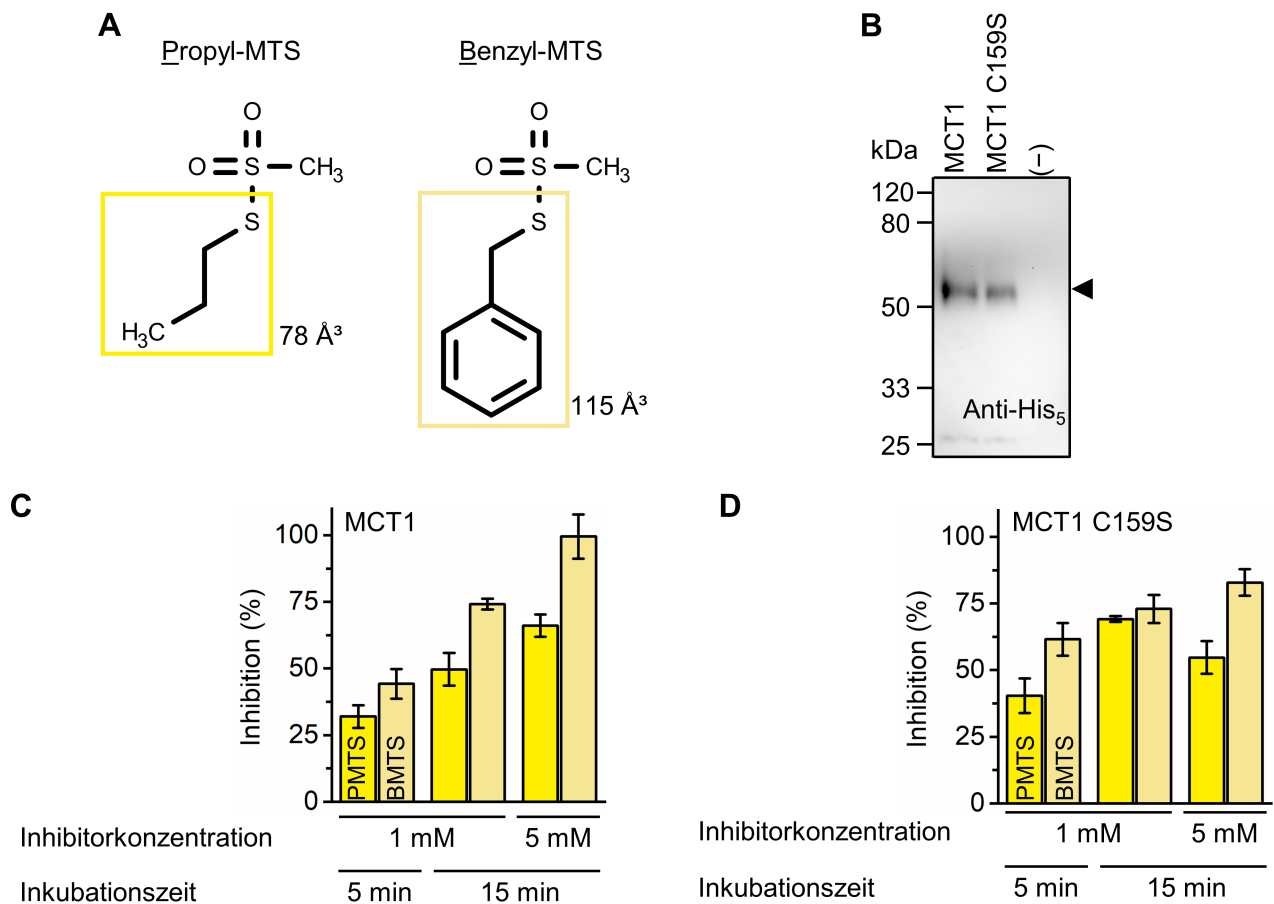


Abbildung 4.11: **Strukturen von PMTS und BMTS und ihre Inhibition des durch MCT1 und MCT1 C159S vermittelten Transportes.** A: Strukturformeln der Inhibitoren und berechnetes van-der-Waals-Volumen der übertragenen Gruppen (markiert). B: Western Blot von MCT1 als Wildtyp und als C159S-Mutante. Aufgetragen ist das 100.000-g-Pellet des Zellaufschlusses. Nicht-exprimierende Zellen (–) dienen dem Ausschluss von unspezifischen Banden. Die Detektion erfolgt mit dem Anti-His₅-Primärantikörper (25 µg Gesamtprotein, 35 min Belichtungszeit). C, D: Inhibition von MCT1 und der MCT1-C159S-Mutante im Vergleich zu Hefen, die mit Lösungsmittel (DMSO) inkubiert wurden. Die L-Laktatkonzentration betrug 1 mM, die Aufnahmezeit 2 min und der pH-Wert des Messpuffers war auf pH 6,8 eingestellt. Die L-Laktataufnahme von nicht-exprimierenden Hefezellen, die mit dem Lösungsmittel (DMSO) inkubiert wurden, wurden von allen Messwerten abgezogen. Fehler stellen S.E.M. dar (N = 3).

Die Inhibition von durch MCT1 vermitteltem L-Laktattransport wurde über die Reduktion der initialen Transportraten von 1 mM L-Laktat bei einem pH von 6,8 bestimmt. Die Inkubation mit

4.3 Inhibition von MCT1 durch Cysteinmodifikatoren

dem Inhibitor erfolgte bei 19 °C entweder für 5 min oder für 15 min. Für den Wildtyp (siehe Abbildung 4.11 C) führte eine längere Inkubationszeit zu einer höheren Inhibition der initialen Aufnahme, sowohl für PMTS als auch für BMTS. Eine Erhöhung der Konzentration des Inhibitors von 1 auf 5 mM unter diesen Bedingungen führte im Fall von BMTS zu einer vollständigen Inhibition des durch MCT1 vermittelten Transportes (siehe Abbildung 4.11 C, helles gelb). Bei der Behandlung mit PMTS konnte der Transport nur zu $(66 \pm 5) \%$ inhibiert werden (siehe Abbildung 4.11 C, eingezeichnet in gelb).

Die Inhibition unter diesen Bedingungen wurde auch für die MCT1-C159S-Mutante überprüft (siehe Abbildung 4.11 D). Auch für dieses Protein führte eine Steigerung der Inkubationszeit zu einer höheren Inhibition des Transportes. Eine zusätzliche Erhöhung der Konzentration der Modifikatoren führte für PMTS nicht zu einer weiteren Erhöhung der Hemmung (15 min, 5 mM: $(55 \pm 7) \%$). Für BMTS ergab sich nur eine geringe Zunahme der Inhibition um 10-%-Punkte auf $(83 \pm 5) \%$. Zusammengefasst deuteten diese Ergebnisse darauf hin, dass 15 min Inkubationszeit und 5 mM Inhibitor-Konzentration ausreichend waren, um den maximalen Effekt der Cysteinmodifikatoren zu erreichen. Im Falle von beiden Modifikatoren war die MCT1-C159S-Mutante weniger hemmbar als der Wildtyp.

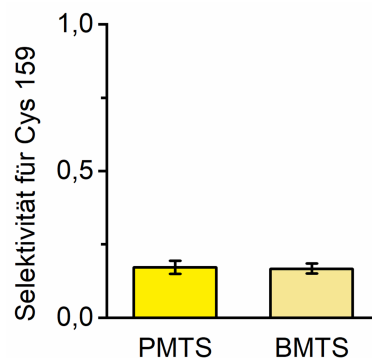


Abbildung 4.12: **Selektivität von PMTS und BMTS für Cystein 159.** Differenz der Inhibition von Wildtyp und C159S Mutante im Verhältnis zur Inhibition des Wildtyps. Die zugrundeliegenden Daten wurden aus Abbildung 4.11 B und C (5 mM, 15 min) entnommen. Fehler stellen S.E.M. dar.

Um zu beleuchten, in welchem Ausmaß die Modifikation durch PMTS und BMTS selektiv für Cystein 159 ist, wurde die Differenz der Inhibition von MCT1-C159S-Mutante und Wildtyp mit der Inhibition des Wildtyps ins Verhältnis gesetzt. So lässt sich der Beitrag von Cystein 159 für die Gesamt-Inhibition von MCT1 ausdrücken. Dabei bedeutet ein Wert nahe bei 1, dass die Inhibition vollständig auf Cystein 159 zurückzuführen ist, während Werte nahe bei 0 darauf hindeuten, dass diese Position für die Inhibition nicht relevant ist. Dieses Maß für die Selektivität ist in Abbildung 4.12 für PMTS und BMTS aufgeführt. Die niedrigen Werte deuten darauf hin, dass Cystein 159 für den Inhibitionsmechanismus beider Substanzen eine untergeordnete Rolle spielt. Für beide Inhibitoren ergibt sich jeweils ein sehr ähnlicher und niedriger Wert (PMTS: $0,172 \pm 0,022$; BMTS: $0,168 \pm 0,017$). Der Größenunterschied der Stoffe führte nicht dazu, dass sich die Selektivität für

Cystein 159 ändert.

Beide untersuchten Verbindungen können den L-Laktattransport über MCT1 deutlich hemmen (siehe Abbildung 4.11 C). Die Hemmung beruht wahrscheinlich zum Teil auf der Modifizierung von Cystein 159 in der Scharnierregion von MCT1. Dies ähnelt dem Mechanismus der Inhibition durch *p*CMBS [123]. Dass neben dem Cystein 159 weitere Cysteine modifiziert werden, haben PMTS und BMTS mit dem deutlich kleineren MMTS gemeinsam [123].

Die Modifizierung innerhalb der Scharnierregion beeinflusst den Transport stark. Dies deutet darauf hin, dass der Transporter MCT1 in diesem Teil des Proteins frei beweglich sein muss. Dieses Verhalten kann durch den *rocker-switch*-Mechanismus erklärt werden, da hier die beiden Hälften des Proteins während jeder Translokation eine deutliche Kippbewegung vollführen müssen.

4.4 Zeitabhängige Substratpassage über AQP9, MCT1 und MCT1-Mutanten

Während die Modifizierung des Cysteins 159 wertvolle Informationen über die Bewegung des Proteins im Translokationszyklus liefert, können anhand der zeitabhängigen Substratpassage Aussagen über die Vorgänge innerhalb des Transportpfades gewonnen werden. Der zeitliche Verlauf der Aufnahme deutet direkt darauf hin, ob ein Transportprozess nur in eine Richtung (unidirektional) oder in beide Richtungen gleichzeitig (bidirektional) abläuft. Ob der Transport auch aus dem Zellinneren nach außen hin möglich ist, kann in Efflux-Messungen direkt untersucht werden. Auch die Kapazität des Transportes, also die Höhe des Plateaus in einer exponentiell auf ein Maximum ansteigenden Kurve, enthält Informationen. Hier kann abgelesen werden, ob ein Membranprotein ein Substrat über seinen Substratgradienten hinaus anreichern kann. Da es sich bei MCT1 um einen L-Laktat-Protonen-Cotransporter handelt, ist eine derartige Anreicherung von L-Laktat bei hohen Protonenkonzentrationen, also niedrigen pH-Werten, zu erwarten.

Für die zeitabhängige Aufnahme über einen Kanal wie das humane AQP9 können gut Voraussetzungen getroffen werden. Der Kanal leitet jeweils ein Teilchen gleichzeitig. Daher wird die Aufnahme allein von den Konzentrationsgradienten des Substrates angetrieben [39]. So soll im Folgenden zunächst gezeigt werden, wie anhand von Zeitkurven bidirektionaler und unidirektionaler Transport unterschieden werden können. Außerdem soll bestätigt werden, dass die *S. cerevisiae*-Zellen auch niedrige pH-Werte tolerieren und Messungen bei hohen Protonenkonzentrationen möglich sind.

4.4.1 AQP9-vermittelte Glycerol- und Milchsäure-Aufnahme

Humanes AQP9 ist ein Kanal, der die diffusionsgetriebene Passage von kleinen, ungeladenen Molekülen wie Glycerol und Milchsäure über die Membran ermöglicht [39]. Da die Aufnahme von Glycerol nicht mit der von weiteren Molekülen gekoppelt ist, wird hier eine äquilibrierende Aufnahme erwartet. Im ^{14}C -Substrat-Transportassay kann die Substrataufnahme über vergleichsweise lange Zeiträume beobachtet werden [60]. Daher kann hier auch die Einstellung des Äquilibriums beobachtet werden, in dem die Konzentration an Glycerol innerhalb der Zelle genau so groß ist wie die außerhalb der Zelle.

4.4 Zeitabhängige Substratpassage über AQP9, MCT1 und MCT1-Mutanten

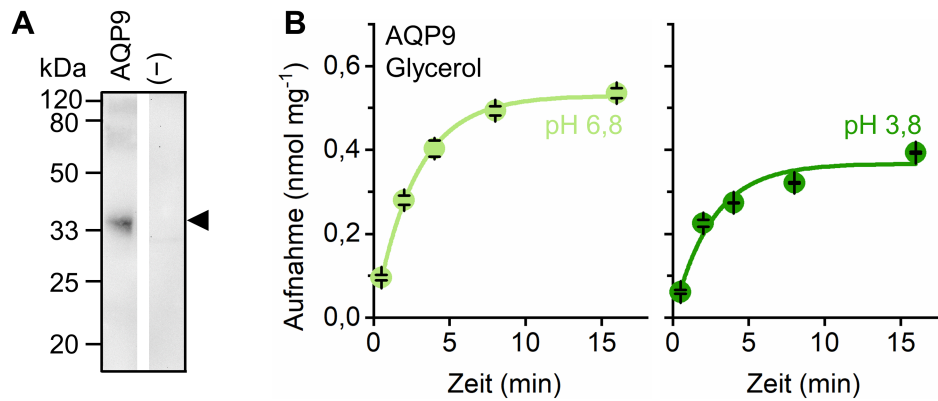


Abbildung 4.13: **AQP9 im Western Blot und Glycerolaufnahme bei verschiedenen pH-Werten.** A: 10.000-g-Pellet des Zellaufschlusses. Die Detektion erfolgte mit dem Anti-HA-Primärantikörper. In der *lane*, die mit (–) angegeben ist, wurde der Zellaufschluss von nicht-exprimierenden Hefen aufgetragen (Gesamtprotein: je 7 µg pro *lane*; Belichtungsdauer: 45 min). B: Zeitabhängige Aufnahme von Glycerol in AQP9 exprimierende Zellen. Die extrazelluläre Glycerolkonzentration betrug 1 mM. Der pH-Wert betrug 6,8 (links) beziehungsweise 3,8 (rechts). Die Aufnahme in nicht exprimierende Hefezellen wurde, wie auch in allen folgenden Abbildungen, als Hintergrund abgezogen. Fehler stellen den Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M.) dar (N = 3).

Die Expression wurde mit einem Western Blot überprüft (siehe Abbildung 4.13 A). Der Western Blot zeigt Banden auf der erwarteten Höhe für das Protomer (36 kDa, siehe Markierung) und für zwei Oligomere bei höheren Molekulargewichten. Die Glycerolaufnahme in AQP9-exprimierende Hefezellen über die Zeit stieg zu Beginn der Messung steil an (siehe Abbildung 4.13 B; pH 6,8). Die Kurve flachte dann ab und erreichte bei ungefähr 8 min ein Plateau. In diesem Zustand befand sich der Transport im Äquilibrium. Da Glycerol unabhängig von anderen Teilchen über AQP9 geleitet wird, ist die Konzentration an Glycerol im Äquilibrium in der Zelle genau so hoch wie außerhalb der Zelle. Da das Zellvolumen im Assay im Vergleich zum Messpuffervolumen vernachlässigbar klein ist [60], wird auch nur ein vergleichsweise kleiner Teil des extrazellulären Glycerols aufgenommen. Damit bleibt die extrazelluläre Glycerolkonzentration während der gesamten Messzeit unverändert bei 1 mM. Im Äquilibrium ist die extrazelluläre Substratkonzentration genauso groß wie die intrazelluläre. Damit entsprach eine Aufnahme von $(0,53 \pm 0,01)$ nmol mg⁻¹ Substrat, die bei dieser Messung mit 1 mM Glycerol erreicht wurde, auch einer intrazellulären Konzentration von 1 mM. Wurde dieses Experiment bei einer 1.000-fach höheren Protonenkonzentration, also bei einem pH von 3,8, durchgeführt, so verlief die zeitabhängige Aufnahme ähnlich (siehe Abbildung 4.13 B; pH 3,8; Äquilibrium bei $(0,37 \pm 0,02)$ nmol mg⁻¹). Da Protonen an dieser Substratbewegung von Glycerol nicht beteiligt sind, wurde erwartet, dass ein veränderter pH-Wert die Glycerolaufnahme nicht verändert. Die beobachtete Abweichung könnte mechanistisch durch ein leicht verändertes Zellvolumen entstanden sein. Die beobachteten Aufnahmen liegen jedoch in einer vergleichbaren Größenordnung. Die Zellen und auch das exprimierte Protein werden im stark Säuren folglich nur wenig beeinflusst.

Auch die zeitabhängige L-Milchsäureaufnahme in AQP9 exprimierende Zellen wurde untersucht. Dazu wurde der Substratlösung 1 mM L-Laktat zugesetzt, das entsprechend des Protonierungs-

4.4 Zeitabhängige Substratpassage über AQP9, MCT1 und MCT1-Mutanten

gleichgewichtes bei verschiedenen pH-Werten in unterschiedlichen Mengen als L-Milchsäure vorlag. Da AQP9 nur L-Milchsäure leitet, jedoch kein L-Laktat, wurde erwartet, dass nur im Sauren eine Aufnahme messbar ist [39]. Das Substrat steht hier in einem Protonierungsgleichgewicht mit seinem Anion und Protonen. Da der intrazelluläre pH-Wert der Hefen unter den Messbedingungen ungefähr konstant und annähernd neutral ist [150], kann nur außerhalb der Zellen das Substrat des Kanals vorliegen. Damit wird unter diesen Messbedingungen, im Gegensatz zur oben beschriebenen Glycerolaufnahme, ein unidirektionaler Einstrom von L-Milchsäure in die Hefezellen erwartet.

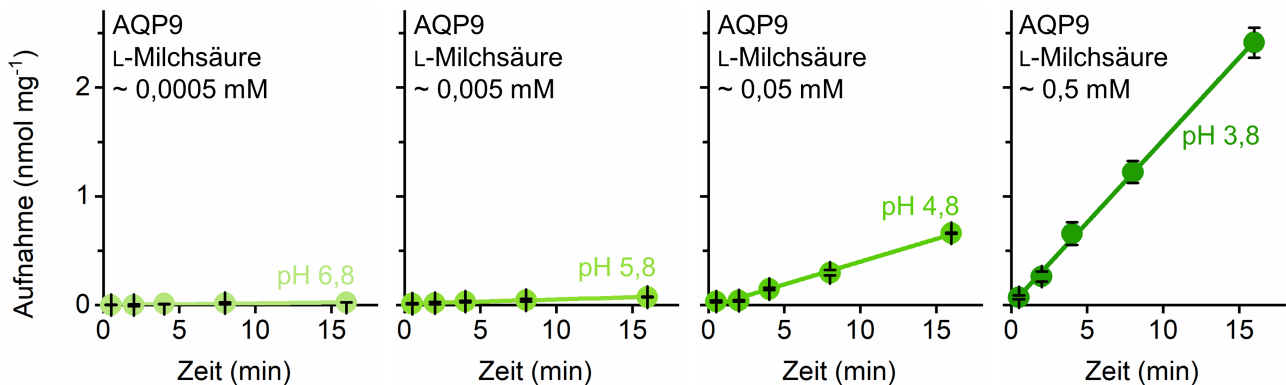


Abbildung 4.14: **Zeitabhängige Milchsäureaufnahme über AQP9 bei verschiedenen pH-Werten.** Der Substratlösung wurde 1 mM L-Laktat zugegeben, das gemäß dem Protonierungsgleichgewicht zu verschiedenen Mengen als L-Milchsäure vorlag. Die L-Milchsäurekonzentration beim gegebenen pH-Wert und der pH-Wert des Messpuffers sind angegeben. Die Aufnahme in nicht exprimierende Hefezellen wurde als Hintergrund abgezogen. Fehler stellen S.E.M. dar (N = 2).

Bei einem pH-Wert von 6,8 lag eine niedrige Konzentration an freiem Substrat für den Kanal vor. Unter diesen Bedingungen wurde keine und bei pH 5,8 nur eine sehr geringe Aufnahme in die Hefezellen beobachtet (Abbildung 4.14 links und Mitte links, 0,0005 und 0,005 mM L-Milchsäure). Bei einem pH-Wert von 4,8 und 3,8 wurde hingegen eine deutliche Aufnahme von L-Milchsäure in die Zellen gemessen (Abbildung 4.14 Mitte rechts und rechts, 0,05 und 0,5 mM L-Milchsäure). Im Gegensatz zur Glycerolaufnahme in Abbildung 4.13 B verlief die zeitabhängige Aufnahme hier nicht in einem exponentiellen Anstieg, sondern linear. Dabei lagen die gemessenen Werte deutlich oberhalb der Werte, die dem Äquilibrium der Glycerolaufnahme entsprachen (L-Milchsäure, pH 3,8, 16 min: $(2,4 \pm 0,2)$ nmol mg⁻¹; Glycerol, pH 6,8, Äquilibrium: $(0,53 \pm 0,01)$ nmol mg⁻¹). Der lineare Anstieg der Messwerte deutet auf eine unidirektionale Aufnahme hin, bei der L-Milchsäure durch den Kanal in die Zelle diffundiert und intrazellulär dem Gleichgewicht entzogen wird. Da die markierte Position des L-Laktats beziehungsweise der L-Milchsäure unabhängig vom Protonierungszustand im Molekül vorliegt, war diese Akkumulation von L-Laktat im Zellinneren messbar.

Die Steigung der Geraden und damit die Geschwindigkeit der Aufnahme spiegelt nicht exakt das Protonierungsgleichgewicht wider. Bei einem extrazellulären pH-Wert von 3,8 beträgt die Steigung $(0,1515 \pm 0,0031)$ nmol mg⁻¹ min⁻¹. Diese ist um Faktor 3,6 größer als die bei einem pH von 4,8 $((0,0418 \pm 0,0021)$ nmol mg⁻¹ min⁻¹). Dabei ist die Protonenkonzentration bei pH 3,8 10-fache höher

als bei pH 4,8. AQP9 kann anionisches Substrat über ein Cluster an positiv geladenen Argininen anreichern und so die Protonierung zu L-Milchsäure um bis zu Faktor 10 erhöhen [39]. Somit könnte hier der Effekt einer höheren Substratkonzentration durch eine geringere Anziehung von L-Laktat teilweise kompensiert werden, sodass der beobachtete Effekt geringer ausfällt.

Sowohl die Aufnahme von Glycerol als auch von L-Milchsäure folgten dem erwarteten Verlauf, sowohl im neutralen Milieu wie auch bei niedrigen pH-Werten. Dabei konnte deutlich zwischen unidirektionaler (L-Milchsäure) und bidirektionaler (Glycerol) Bewegung der Substrate unterschieden werden. Auch die Umrechnung von gemessener Aufnahme in eine intrazelluläre Konzentration konnte für die folgenden Experimente etabliert werden ($0,53 \text{ nmol mg}^{-1}$ entsprechen 1 mM).

4.4.2 MCT1-vermittelter Laktattransport

Im Folgenden wurde die zeitabhängige Aufnahme von L-Laktat über MCT1 bei verschiedenen extrazellulären pH-Werten untersucht. Die Kurven bei einem pH-Wert von 6,8 und 5,8 in diesem Expressionssystem, jedoch bei einer leicht veränderten Durchführung, waren bereits in der Literatur zu finden [60]. In dieser Arbeit wurde auch die zeitabhängige Aufnahme bei niedrigeren pH-Werten untersucht. Die Werte bei pH 6,8 und bei pH 5,8 wurden ebenfalls aufgenommen, um für alle Werte gleiche Messbedingungen herzustellen. Für MCT1 wurde in diesem Expressionssystem auch Efflux gezeigt.

Die Expression von MCT1 wurde anhand der mikrosomalen Fraktion des Zellaufschlusses mit einem Western Blot überprüft (siehe Abbildung 4.15 A). Der Western Blot zeigt zwei Signale: eine Bande auf der erwarteten Höhe für das vollständige Protein bei 58 kDa (siehe Markierung) und ein Protein mit einer niedrigeren Masse von ungefähr 25 kDa, das wahrscheinlich ein Abbruchfragment des Proteins im großen *loop* zwischen TM6 und TM7 darstellt. In nicht-exprimierenden Zellen waren keine Signale sichtbar.

4.4 Zeitabhängige Substratpassage über AQP9, MCT1 und MCT1-Mutanten

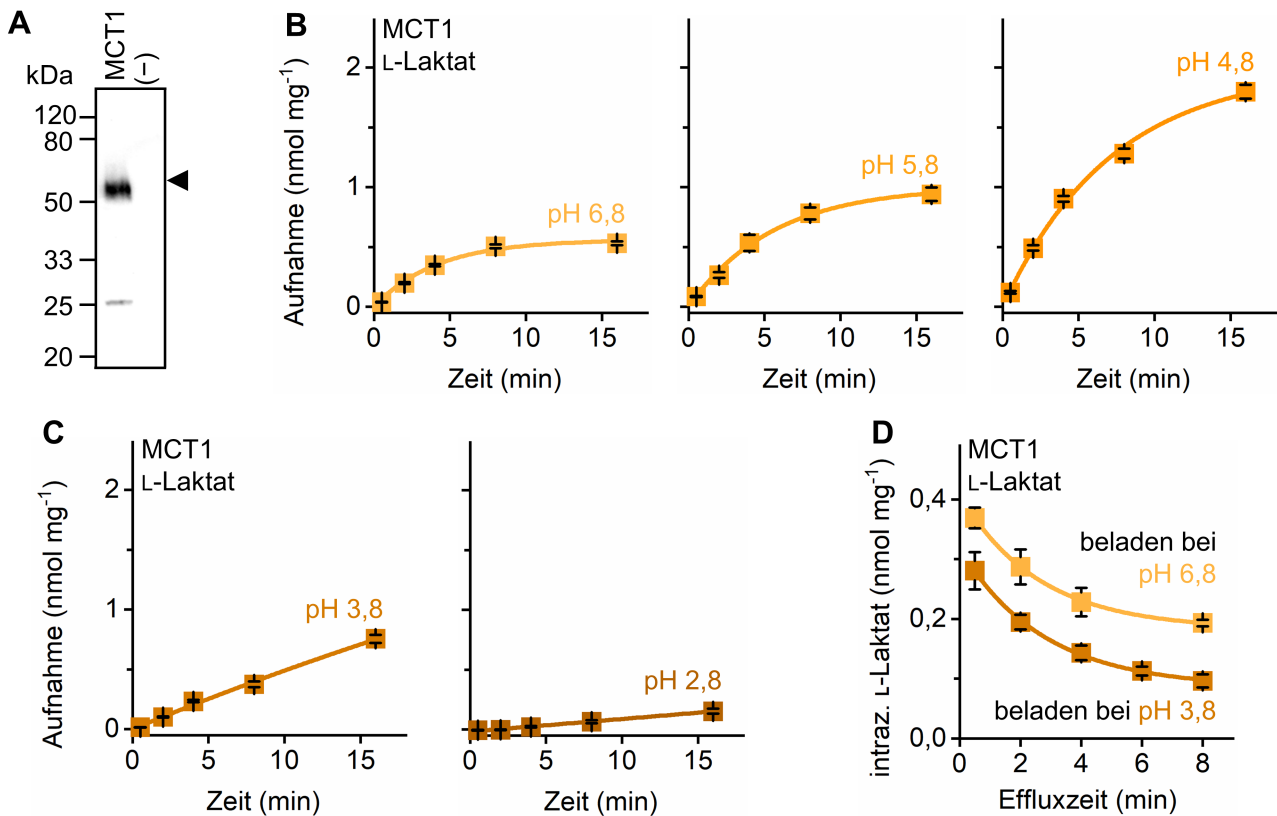


Abbildung 4.15: **Western Blot und zeitabhängige Aufnahme von MCT1 exprimierenden Zellen bei verschiedenen pH-Werten.** A: MCT1 wurde in der mikrosomalen Fraktion des Hefeaufschlusses über den Anti-His₅-Primärantikörper nachgewiesen. Nicht-exprimierende Zellen wurden in der *lane* mit (–) aufgetragen. (Gesamtprotein: 25 µg pro *lane*, Belichtungszeit: 14 min). B, C: Aufnahme von L-Laktat über MCT1, der pH-Wert ist angegeben. Die Substratkonzentration im Puffer betrug 1 mM. Fehler stellen S.E.M. dar (N = 3 - 5). D: Efflux von L-Laktat über MCT1. Die Zellen wurden mit 1 mM für 8 min bei pH 3,8 oder pH 6,8 beladen und in substratfreiem Messpuffer mit einem pH-Wert von 6,8 resuspendiert. Fehler geben Standardabweichung der technischen Replikate an (N = 1).

Im ¹⁴C-Substrat-Transportassay wurde die zeitabhängige Aufnahme von L-Laktat in MCT1 exprimierende Zellen bei verschiedenen pH-Werten gemessen. Bei einem pH von 6,8 ergab sich ein exponentieller Anstieg der Aufnahme über die Zeit bis zu einem Maximum (siehe Abbildung 4.15 B; links). Das Plateau der Aufnahmekurve wurde nach 8 min erreicht und lag bei $(0,56 \pm 0,03)$ nmol mg⁻¹. Bei einem niedrigeren pH von 5,8, einer 10-fach höheren Protonenkonzentration, wurde das Äquilibrium erst nach 16 min erreicht und lag mit $(1,0 \pm 0,1)$ nmol mg⁻¹ doppelt so hoch wie bei pH 6,8 (siehe Abbildung 4.15 B; Mitte). Bei einer weiteren Reduktion des pHs auf 4,8 konnte in den 16 min der Messung kein Plateau in der zeitabhängigen Aufnahme gemessen werden (siehe Abbildung 4.15 B; rechts). Das aus dem Kurvenfit ($R^2 = 0,996$) extrapolierte Plateau lag hier bei $(2,0 \pm 0,1)$ nmol mg⁻¹, also doppelt so hoch wie bei pH 5,8 und viermal so hoch wie im annähernd neutralen Milieu bei pH 6,8.

Eine weitere Erhöhung der Protonenkonzentration (siehe 4.15 C; pH 3,8 und pH 2,8) führte zu einem Abflachen der zeitabhängigen Aufnahme. Bei niedrigerem pH-Wert verlief die zeitabhängige Aufnahme im Messzeitraum von 16 min aufgrund der deutlich niedrigeren Geschwindigkeit scheinbar

linear (pH 3,8 und pH 2,8). Die Steigung im quasilinearen Bereich bei pH 3,8 ist deutlich niedriger als der aller bei höherem pH-Wert gemessenen Kurven. Eine weitere Erhöhung der Protonenkonzentration auf pH 2,8 führte zu einer niedrigeren Steigung. Die initiale Aufnahme rate stieg folglich von pH 6,8 im Vergleich zu der bei pH 4,8 und sank bei niedrigeren pH-Werten wieder.

Es wurde auch die entgegengesetzte Transportrichtung untersucht: der Efflux von L-Laktat über MCT1 (siehe Abbildung 4.15 D). Die Menge an Laktat, die sich nach einer gegebenen Efflux-Zeit noch in den Zellen befand, fiel exponentiell über die Zeit ab. Der pH-Wert des Puffers, der zum Beladen der Zellen verwendet wurde (pH 6,8 oder pH 3,8), hatte einen Einfluss auf die Belademenge der Zellen. Bei einem pH-Wert von 6,8 wurde in den 8 min Beladezeit insgesamt etwas mehr Substrat aufgenommen als bei pH 3,8. Damit beginnen die Efflux-Kurven der bei pH 6,8 beladenen Zellen auf einem höheren Wert. Der pH-Wert, der zum Beladen der Zellen angelegt wurde, veränderte nicht den zeitlichen Verlauf der Abnahme an intrazellulärem L-Laktat, also die Kurvenform. Beladen bei pH 6,8 fiel der Wert von $0,37 \pm 0,01 \text{ nmol mg}^{-1}$ (30 s, frühester Messpunkt) auf $0,19 \pm 0,01 \text{ nmol mg}^{-1}$ nach 8 min, also auf die Hälfte der ursprünglichen Beladung. Wurden die Zellen in pH 3,8 beladen, fiel die Menge an intrazellulärem L-Laktat nach 8 min auf ein Drittel der Beladung (von $0,28 \pm 0,01 \text{ nmol mg}^{-1}$ auf $0,10 \pm 0,01 \text{ nmol mg}^{-1}$).

Die zeitabhängigen Aufnahme- und Efflux-Kurven von MCT1 bestätigen den bidirektionalen Transport, der in der Literatur bereits beschrieben ist [160]. Die Form der Kurven und die höhere Aufnahme bei pH 5,8 im Vergleich zu pH 6,8 ähneln den Daten aus der Literatur im selben Expressionssystem [60]. Durch die kürzere Aufwärmzeit der Zellen (2 min in dieser Arbeit, 10 min in [60]) wurde insgesamt eine höhere Aufnahmemenge erreicht.

Die Form der zeitabhängigen Aufnahmekurven ist vergleichbar mit denen der Glycerolaufnahme über AQP9 (siehe Abschnitt 4.4.1). Der Cotransporter MCT1 koppelt die Konzentrationsgradienten der Substrate L-Laktat und Protonen, weshalb die Aufnahme zum sauren Milieu hin stark zunimmt, während die Glycerolaufnahme über AQP9 bei 1.000-fach höherer Protonenkonzentration kaum verändert ist (pH 3,8 und pH 6,8). Bei einem pH-Wert von 3,8 und niedriger liegt L-Laktat mindestens zur Hälfte als L-Milchsäure vor. In diesem pH-Bereich nimmt die Aufnahme über MCT1 ab. Dass der Transport über MCT1 bidirektional ist, wird auch anhand des deutlichen Effluxes sichtbar. Dieser ist auch sichtbar, wenn die Hefezellen bei einem pH-Wert von 3,8 beladen und dann in neutralem Puffer resuspendiert wurden. Dies deutet darauf hin, dass die Abnahme des Transportes über MCT1 im sauren Milieu nicht durch eine irreversible Schädigung des Proteins verursacht wird, sondern wahrscheinlich eine mechanistische, reversible Ursache hat.

4.4.3 MCT1 K38X-vermittelter Laktattransport

Die Seitenkette eines Lysins an Position 38 ist für die Funktion von MCT1 von zentraler Bedeutung [135]. Daher ist es denkbar, dass die Seitenkette von Lysin 38 am Transportmechanismus beteiligt ist. Um die Funktion von Lysin 38 zu untersuchen, wurden verschiedene Punktmutanten

4.4 Zeitabhängige Substratpassage über AQP9, MCT1 und MCT1-Mutanten

von MCT1 (MCT1 K38X) generiert und charakterisiert. Untersucht wurden an dieser Position der Austausch zu Alanin, Cystein, Glutamat, Methionin, Arginin und Tyrosin.

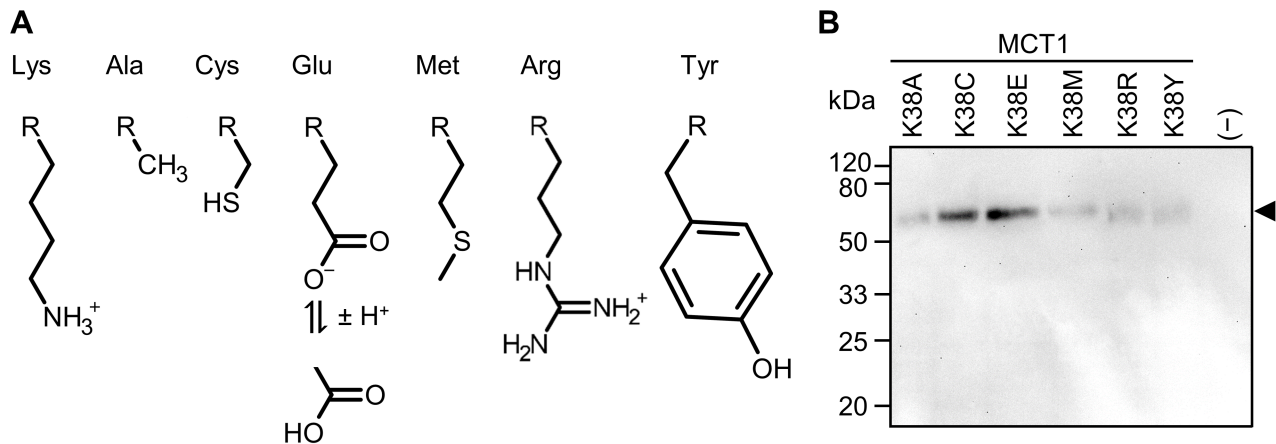


Abbildung 4.16: **Strukturformeln der Aminosäure-Seitenketten und Western Blot von MCT1 K38X exprimierenden Zellen** B: Aufgetragen ist die mikrosomale Fraktion der Hefen, die die Punktmutanten exprimieren, oder nicht-exprimierenden (—) Hefezellen. Die Detektion erfolgte mit dem Anti-His₅-Primärantikörper. Die Markierung gibt die für die vollständigen Proteine erwartete Höhe der Banden an (Gesamtprotein: 10 µg pro lane, Belichtungszeit: 45 min).

Die Seitenketten der untersuchten Aminosäuren sind in Abbildung 4.16 A dargestellt. Lysin ist eine basische Aminosäure, die bei physiologischem pH-Wert protoniert vorliegt (pK_S 10,5 Pubchem ID #5962). Die Seitenketten von Alanin, Cystein und Methionin sind permanent neutral. Methionin weist dabei eine vergleichbare Größe auf wie Lysin. Die Seitenkette des Glutamats ist im Neutralen negativ geladen und protonierbar zur neutralen Säure (pK_S 4,3 Pubchem ID #33032). Arginin enthält eine stark basische Guanidin-Funktion und ist daher im untersuchten pH-Bereich permanent positiv geladen (pK_S 13,2 Pubchem ID #6322). Tyrosin weist als einzige untersuchte Aminosäure eine große, aromatische Seitenkette auf. Die Phenolgruppe ist schwach sauer (pK_S 10,7 Pubchem ID #6057). Die Expression aller Punktmutanten wurde im Western Blot gezeigt (siehe Abbildung 4.16 B, die Markierung zeigt die erwartete Höhe des vollständigen Proteins bei 58 kDa an).

4.4 Zeitabhängige Substratpassage über AQP9, MCT1 und MCT1-Mutanten

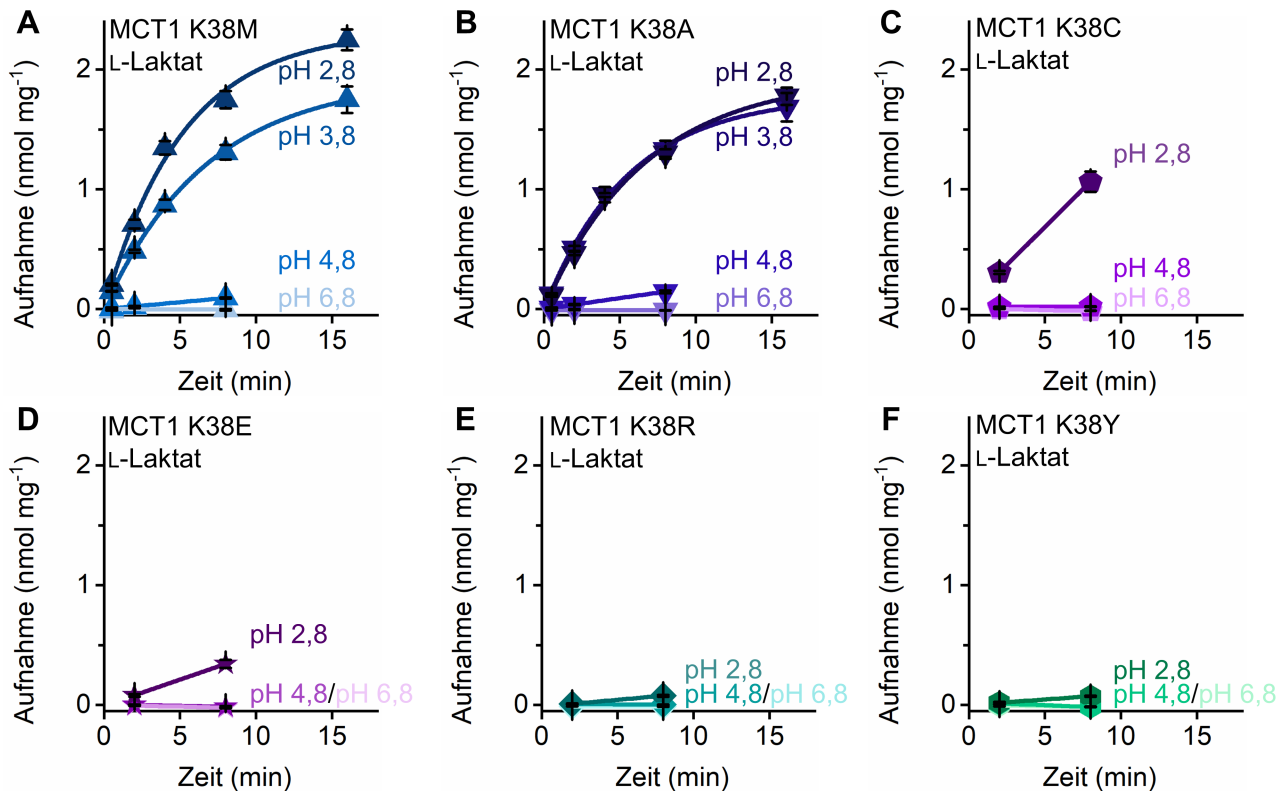


Abbildung 4.17: **Zeitabhängige Aufnahme in MCT1 K38X exprimierende Zellen bei verschiedenen pH-Werten.** Aufnahme von L-Laktat. Der pH-Wert und das untersuchte Protein sind angegeben. Die Substratkonzentration im Puffer betrug 1 mM. Fehler stellen S.E.M. dar (N = 2 - 3).

Die Aufnahme von L-Laktat über die Punktmutanten von MCT1 wurde bei verschiedenen pH-Werten bestimmt (Abbildung 4.17). Bei einem extrazellulären pH-Wert von 6,8 war im Gegensatz zum Wildtyp kein Transport über die K38M-Mutante messbar (Abbildung 4.17 A). Bei pH 4,8, dem pH-Wert, bei dem der maximale Transport im Wildtyp gemessen wurde, wurde nur eine geringe Aufnahme gemessen (8 min: $(0,09 \pm 0,01) \text{ nmol mg}^{-1}$). Bei einem saureren pH-Wert von 3,8 transportiert die K38M-Mutante. Wie im Wildtyp folgte die Aufnahme einem exponentiellen Anstieg und erreichte nach 16 min Aufnahmezeit ein Plateau (Abbildung 4.17 A). Die Kapazität des Transportes wurde bei einem noch niedrigeren pH-Wert von 2,8 noch einmal höher und schneller. Die K38M-Mutante zeigte unter diesen Bedingungen eine höhere Aufnahme von L-Laktat als für das Wildtyp Protein bestimmt werden konnte (MCT1 K38M, pH 2,8, 16 min: $(2,25 \pm 0,09) \text{ nmol mg}^{-1}$; MCT1, pH 4,8, 16 min: $(1,80 \pm 0,06) \text{ nmol mg}^{-1}$). In den pH-Bereichen, in denen das Wildtyp-Protein hohen Transport zeigte, war die K38M-Mutante nicht aktiv. Erst bei hohen Protonenkonzentrationen, bei einem pH-Wert von 3,8 und niedriger, transportiert die K38M-Mutante. Für den Wildtyp war in diesem stark sauren Milieu kaum Transport messbar.

Die L-Laktataufnahme über MCT1 K38A folgte einem vergleichbaren Verlauf wie die der K38M-Mutante (Abbildung 4.17 B). Die Alanin-Punktmutante war bei pH 6,8 nicht aktiv. Bei einem pH-Wert von 4,8 wurde Transport messbar, der zum stark sauren Milieu hin deutlich stärker wurde. K38C und K38E exprimierende Hefezellen waren nicht nur bei pH 6,8, sondern auch bei pH 4,8 inaktiv

4.4 Zeitabhängige Substratpassage über AQP9, MCT1 und MCT1-Mutanten

(Abbildung 4.17 C und D). Nur im stark sauren Milieu konnte deutlicher Transport gemessen werden, der für die K38E-Mutante niedriger war als für die anderen Mutanten mit neutralen Seitenketten unter diesen Bedingungen.

K38R und K38Y waren bei pH 6,8 und pH 4,8 nicht aktiv (Abbildung 4.17 E und F). Im stark sauren Milieu, bei einem pH-Wert von 2,8, wurde Transport gemessen. Dieser war jedoch sehr niedrig und kaum messbar.

Wurde das positiv geladene Lysin durch eine neutrale Aminosäure wie Methionin, Alanin, Cystein oder Glutaminsäure im stark sauren Milieu ausgetauscht, so blieb die Funktion von MCT1 erhalten. Diese Transportaktivität wurde jedoch nur im sauren bis stark sauren Milieu beobachtet. Eine negative Ladung an dieser Position, wie in der K38E-Mutante bei einem pH-Wert von 4,8 und höher, wird nicht toleriert. Interessanterweise führt auch der Austausch zum permanent positiv geladenen Arginin zu einem Verlust der Funktion. Dies deutet darauf hin, dass im Wildtyp sowohl die positive Ladung des Lysins zusammen mit der Fähigkeit zur Deprotonierung an Position 38 entscheidend sind. Lysin ist die einzige proteinogene Aminosäure, die diese beiden Eigenschaften aufweist. Damit kann an dieser Position wahrscheinlich keine andere Position eingefügt werden, die das Transportverhalten des Wildtyps erhält. Dies wurde bereits vermutet [96]. Tyrosin besitzt die voluminöseste Seitenkette der untersuchten ausgetauschten Aminosäuren. Da die K38Y-Mutante eine kaum messbare Aktivität aufweist, und die Seitenkette der Position 38 in den Transportpfad hineinragt, könnte der Austausch zum Tyrosin den Transportpfad blockieren und so den Transport deutlich verringern.

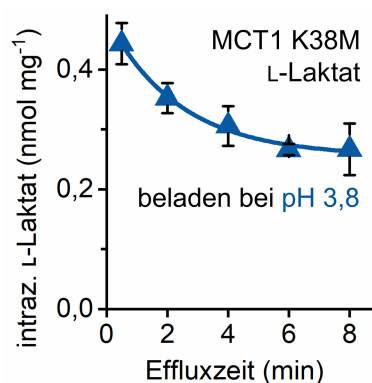


Abbildung 4.18: **Zeitabhängiger Efflux über MCT1 K38M.** Aufgrund der hohen Transportaktivität der MCT1 K38M-Mutante bei pH 3,8 wurden die Zellen nur für 1,5 min beladen. Damit war die Belademenge vergleichbar zu der der Wildtyp exprimierenden Zellen in Abbildung 4.15 D. Die Substratkonzentration im Beladepuffer betrug 1 mM L-Laktat. Die Zellen wurden in substratfreiem Puffer mit pH 6,8 resuspendiert. Fehler geben die Standardabweichung der technischen Replikate an (N = 1).

Außerdem wurde der Efflux von L-Laktat stellvertretend an der K38M-Mutanten untersucht (siehe Abbildung 4.18). Die Zellen wurden bei pH 3,8 beladen, in einem pH-Bereich, in dem das Protein einen hohen Influx von L-Laktat vermittelt hat. Der Efflux wurde in einem Messpuffer mit einem pH-Wert von 6,8 bestimmt. Bei diesem pH-Wert konnte für dieses Protein zuvor keine Aufnahme gezeigt werden. Die Menge an intrazellulärem L-Laktat sank hier exponentiell über die Zeit ab. Zum

frühesten Messzeitpunkt, nach 30 s, waren $(0,44 \pm 0,1)$ nmol mg^{-1} enthalten, nach 8 min waren es etwas mehr als die Hälfte $(0,27 \pm 0,1)$ nmol mg^{-1} . Dass die K38M-Mutante bei einem pH-Wert von 6,8 auf beiden Seiten der Membran keine Aufnahme, aber einen messbaren Efflux zeigt, deutet darauf hin, dass sich die Mechanismen von Influx und Efflux im MCT1 unterscheiden könnten. Um dies weiter zu untersuchen, könnten in Zukunft weitere Messungen des Efflux über den Wildtyp und die K38M-Mutante von MCT1 bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt werden.

Die Transportaktivität von MCT1 bleibt auch bei einem Austausch von Lysin 38 erhalten, diese verschiebt sich jedoch in den stark Sauren pH-Bereich, in dem der Wildtyp von MCT1 kaum noch transportiert. An Position 38 werden für einen funktionsfähigen Transporter nur neutrale und unverzweigte Seitenketten toleriert. Der Transport über eine derartige Mutante wird in dieser Arbeit stellvertretend anhand der K38M-Mutanten charakterisiert. Voluminöse (Tyrosin) oder geladene Seitenketten (Glutamat bei einem pH von 4,8 oder höher, Arginin unter allen getesteten Bedingungen) führen zu einem Verlust der Transportaktivität unter allen getesteten Bedingungen.

4.4.4 Funktionalität von MCT1 D309N

Neben Lysin 38 könnte auch Aspartat 309 im Transportmechanismus eine entscheidende Rolle spielen. Die Protonierung von Aspartat 309 könnte im MCT1-vermittelten Transport der Schritt sein, der die Translokation auslöst [62]. Damit würde Aspartat 309 eine Bindestelle für das Co-substrat, das Proton, darstellen. Diese Theorie stützt sich unter anderem darauf, dass die Struktur der D309N Mutante in der *inward-open*-Konformation aufgelöst wurde [62]. Asparagin imitiert den Zustand der protonierten Seitenkette der Asparaginsäure. Um die Funktion von Aspartat 309 im Transportmechanismus zu untersuchen, wurde diese Mutante (MCT1 D309N) in Hefen exprimiert. Außerdem wurde diese Mutation mit verschiedenen Mutationen am Lysin 38 zu Doppelmutanten kombiniert, um zu untersuchen, ob diese beiden Positionen gegebenenfalls zusammen eine Wirkung auf den Transport ausüben.

4.4 Zeitabhängige Substratpassage über AQP9, MCT1 und MCT1-Mutanten

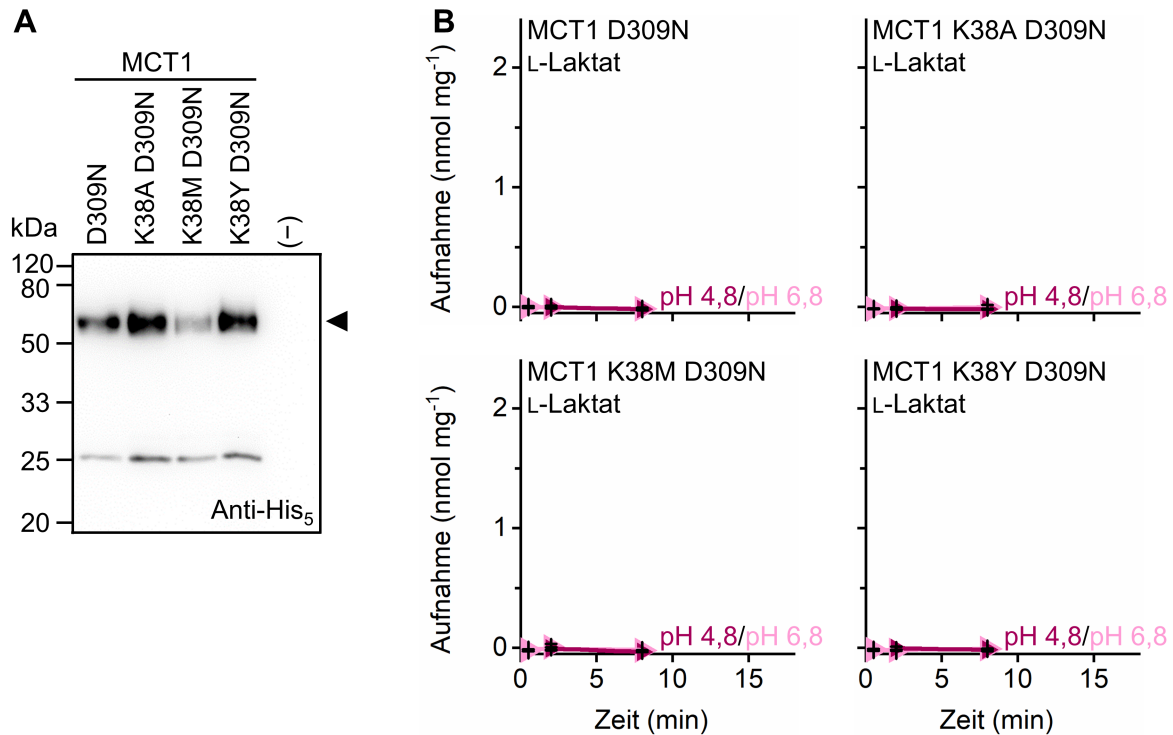


Abbildung 4.19: **Western Blot und zeitabhängige Aufnahme der D309N Einfach- und Doppelmутanten.** A: Es wurde der Anti-His₅-Antikörper verwendet. Aufgetragen ist die mikrosomale Fraktion. (20 µg Gesamtprotein, 10 min Belichtungszeit) B - E: Aufnahme von 1 mM L-Laktat über die angegebenen Proteine beim angegebenen pH-Wert. Fehler geben die Standardabweichung der technischen Replikate an (N = 1).

Die Expression wurde mit einem Western Blot überprüft (siehe Abbildung 4.19 A, die Markierung gibt die erwartete Laufhöhe für das vollständige Protein mit 58 kDa an). Es wurden sowohl die Einzel- als auch die Doppelmутanten in der mikrosomalen Fraktion mit dem Anti-His₅-Antikörper detektiert. Dabei wurde jeweils eine Bande auf der Höhe für das vollständige Protein beobachtet (siehe Markierung) und eine Bande auf der Höhe von 25 kDa. Die Konstrukte wurden mit 1 mM L-Laktat im sauren (pH 4,8) und im neutralen Milieu (pH 6,8) auf Leitfähigkeit hin untersucht (siehe Abbildung 4.19 B). Für die Einfachmutante D309N wurde keine Leitfähigkeit festgestellt (siehe Abbildung 4.19 B oben links). Der Funktionsverlust konnte über keine weitere untersuchte Mutation am Lysin 38 wiederhergestellt werden (siehe Abbildung 4.19 B).

Der Funktionsverlust der D309N Mutante deutet darauf hin, dass die Ladung an dieser Position für die Funktionalität von MCT1 von entscheidender Bedeutung ist. Die Funktionalität konnte durch eine weitere Mutation am Lysin 38 zu einer neutralen Position nicht wiederhergestellt werden. Im Falle der drei Doppelmутanten ist die Anzahl an Ladungen in der Bindetasche identisch mit der im Wildtyp, da jeweils eine positive Ladung (vom Lysin) und eine negative Ladung (vom Aspartat) entfernt wurde. Dies legt nahe, dass nicht nur die Anzahl der Ladungen in der Bindetasche relevant ist, sondern auch die Lokalisation dieser Ladungen.

4.5 Aktivierungsenergie von durch MCT1 und MCT1 K38M vermittelten Transport

Die K38M-Mutante (siehe Abschnitt 4.4.3) ist für diese Arbeit besonders interessant. Der Austausch von Lysin 38 durch ein Methionin verändert die Eigenschaften des Transporters MCT1 deutlich. Gleichzeitig ist dieser veränderte Transporter funktional. Über den Vergleich der Transporteigenschaften von MCT1 und MCT1 K38M kann direkt der Einfluss der Aminofunktion des Lysins 38 auf den Transport untersucht werden.

Eine charakteristische Kenngröße eines Transporters ist die Aktivierungsenergie. Die Aktivierungsenergie beschreibt eine Energiebarriere, die für einen Vorgang, wie zum Beispiel die Aufnahme eines Moleküls über die Plasmamembran hinweg, überwunden werden muss [161]. Die Diffusion eines Ions durch die lipophile Membran muss eine hohe Energiebarriere von ungefähr 250 kJ mol^{-1} überwinden [161]. Membranproteine können die Aktivierungsenergie deutlich senken. Kanäle können die Aktivierungsenergie auf ungefähr 20 kJ mol^{-1} senken [161, 162]. Die korrespondierenden Werte für Transportproteine liegen meist deutlich höher als die der Kanäle, da sich Transporter für die Bewegung des Teilchens über die Membran selbst innerhalb der Membran bewegen müssen [161]. Im Folgenden wurden die Aktivierungsenergien vom MCT1 Wildtyp und von der K38M-Mutanten bestimmt, um den Einfluss der Ladung an Position 38 auf die Energiebarriere des Transportes zu untersuchen. Dafür wurde der pH von 3,8 gewählt, um das Transportverhalten beider Konstrukte unter identischen Bedingungen vergleichen zu können.

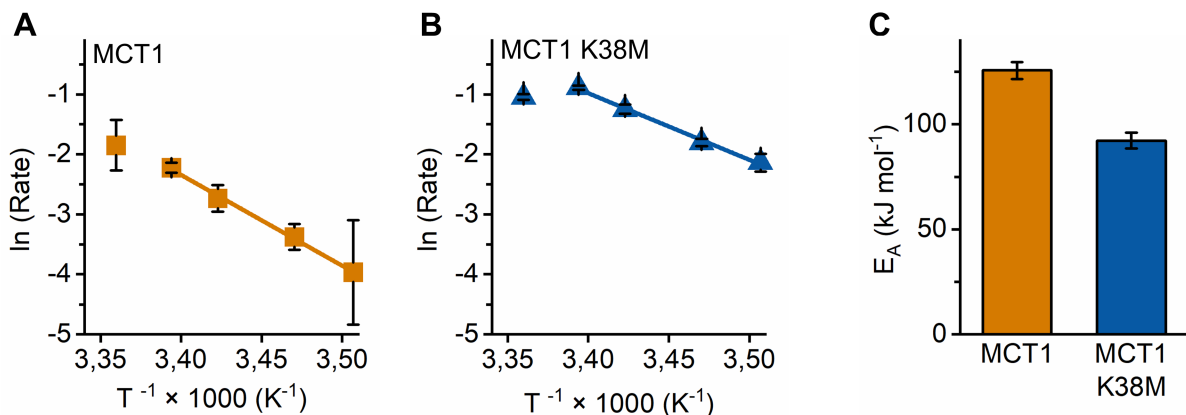


Abbildung 4.20: **Temperaturabhängige Laktataufnahme von Wildtyp (A) und K38M-Mutante (B) und daraus abgeleitete Aktivierungsenergien (E_A , C)** Die Konzentration an L-Laktat betrug 1 mM, der pH-Wert des Messpuffers betrug 3,8. A: Aufnahmezeit 4 bis 8 min. B: Aufnahmezeit 1 bis 2 min. Fit ohne $(3,36 \times 10^{-3}) \text{ K}^{-1}$, entspr. $24,5 \text{ }^\circ\text{C}$. Fehler stellen S.E.M. dar ($N = 2$).

Abbildung 4.20 A zeigt die gemessenen Raten bei verschiedenen Temperaturen im Arrhenius-Plot für das Wildtyp-Protein. Es wurden Raten im Temperaturbereich von 12 bis $24,5 \text{ }^\circ\text{C}$ bestimmt. Zu höheren Temperaturen, in dieser Darstellung nach links, stiegen die Raten stets an. Bis zu

4.5 Aktivierungsenergie von durch MCT1 und MCT1 K38M vermittelten Transport

einer Temperatur von 21,5 °C (entspr. $(3,40 \times 10^{-3}) \text{ K}^{-1}$) war der Anstieg in dieser Darstellung linear. Bei der höchsten aufgetragenen Temperatur liegt der Messwert nicht mehr auf der Geraden, sondern etwas niedriger. Daher wurde dieser Messwert nicht zur Interpolation der Geraden und damit zur Bestimmung der Aktivierungsenergie verwendet. Dass die Raten bei höheren Temperaturen nicht mehr dem Verlauf der vorherigen Messwerte folgten, deutete auf einen biphasischen Verlauf mit niedrigeren Steigungen und damit niedrigeren Aktivierungsenergien bei höheren Temperaturen hin. Ein derartiger Verlauf wurde bereits für das Wildtyp MCT1 und für andere Transportproteine beschrieben [163, 164, 165]. Diese zweite Phase beginnt in Abbildung 4.20 B wahrscheinlich im oberen Bereich der betrachteten Temperaturen, also zwischen 21,5 °C und 24,5 °C. Daher wurden für die Bestimmung der Aktivierungsenergie nur die Messwerte bei 21,5 °C und darunter zugrunde gelegt.

Der biphasische Verlauf konnte auch für die K38M-Mutante beobachtet werden. Die gemessenen Raten waren hier deutlich höher und die Steigung der interpolierten Geraden geringer. In diesem Fall lag der bei 24,5 °C (entsprechend $(3,36 \times 10^{-3}) \text{ K}^{-1}$) gemessene Wert sogar unterhalb des Wertes bei nächstniedrigeren Temperaturen. Die aus der Steigung der gefitteten Geraden abgeleiteten Aktivierungsenergien sind in Abbildung 4.20 C aufgetragen. Die bestimmte Aktivierungsenergie für das Wildtyp Protein war mit $(126 \pm 5) \text{ kJ mol}^{-1}$ etwa 1,4-mal so groß wie die Aktivierungsenergie der K38M-Mutante $((92 \pm 4) \text{ kJ mol}^{-1})$.

Dass die Geraden zu höheren Temperaturen hin abflachen, deutet darauf hin, dass die gemessenen Aktivierungsenergien sich nicht direkt auf die physiologische Temperatur von 37 °C übertragen lassen. Die für das Wildtyp-Protein bestimmte Aktivierungsenergie war jedoch deutlich größer als die der K38M-Mutante. Dies weist darauf hin, dass eine Ladung an Position 38 die Energiebarriere für den Transport messbar erhöht. Die Lage der bei 24,5 °C (entsprechend $(3,36 \times 10^{-3}) \text{ K}^{-1}$) bestimmten Werte für Wildtyp und Mutante deuten außerdem darauf hin, dass die Gerade im Diagramm des Wildtyps bei höheren Temperaturen (nach links im Diagramm) deutlich steiler ansteigt als die der Mutante. Dies würde auch bei höheren Temperaturen in einer deutlich höheren Aktivierungsenergie im Vergleich zur Mutante resultieren.

4.6 Substrate, Nicht-Substrate und Transportkinetik von MCT1 und MCT1 K38M

Die positive Ladung von Lysin 38 könnte nicht nur einen Einfluss auf die Aktivierungsenergie des Transportes haben, sondern auch die Substratselektivität von MCT1 verändern. Die K38M-Mutante war in Abschnitt 4.4.3 nur bei einem pH von 3,8 oder weniger deutlich aktiv. In diesem pH-Bereich liegt kaum anionisches L-Laktat vor, sondern hauptsächlich die neutrale L-Milchsäure. Daher wird im Folgenden gezielt untersucht, ob die K38M-Mutante die protonierte Säure als Substrat gegenüber dem Anion bevorzugt. Auch die Transportkinetik könnte durch die positive Ladung der Aminofunktion von Lysin verändert werden. Daher wurden im Folgenden das Substratspektrum von MCT1 und MCT1 K38M untersucht und die Transportkinetik anhand der Michaelis-Menten-Konstante (K_m) und der maximalen Transportgeschwindigkeit (v_{max}) charakterisiert.

4.6.1 Identifizierung von Substraten und Nicht-Substraten

Für die Identifizierung von Substraten und Nicht-Substraten für MCT1 wurde der Lichtstreuungsassay verwendet. Die Ergebnisse, die so erhalten wurden, wurden in einem kompetitiven Radioassay verifiziert.

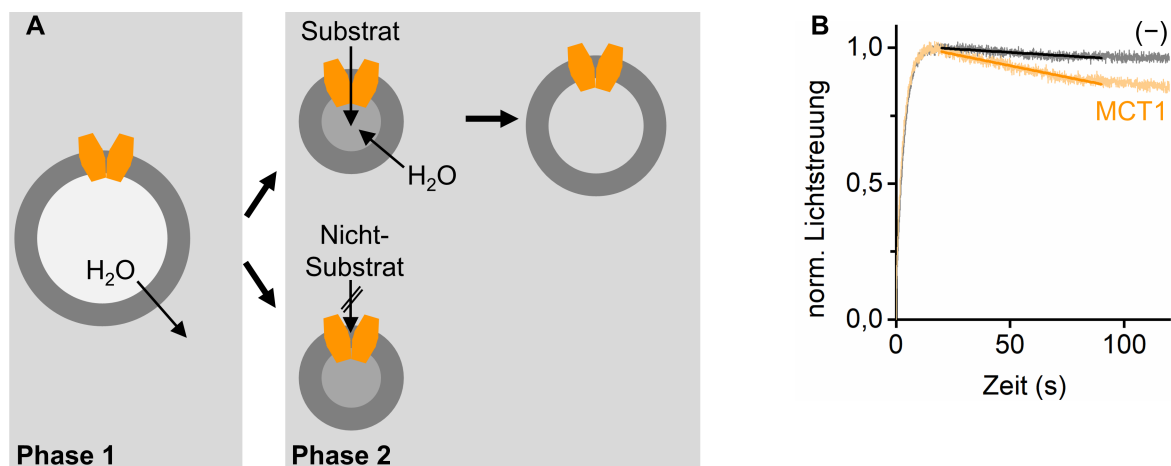


Abbildung 4.21: **Messprinzip des Permeabilitätsassays und Beispielkurve einer Messung mit Substrat.** A: In Phase 1 der Messung strömt Wasser aus den Protoplasten aus. Werden MCT1-exprimierende Protoplasten einem Substratgradienten ausgesetzt, strömen Substrat und Wasser ein, sodass die Protoplasten wieder etwas anschwellen (Phase 2). Ist die zugesetzte Verbindung kein Substrat, bleiben die Protoplasten im geschrumpften Zustand. B: Beispielkurve für MCT1 exprimierende und nicht-exprimierenden (–) Zellen, die einem L-Laktatgradienten von 300 mM und einem pH-Wert von 5 ausgesetzt waren. Während die Lichtstreuung von exprimierenden Protoplasten in Phase 2 sinkt, bleibt die Lichtstreuung der nicht-exprimierenden Zellen konstant hoch. Die eingezeichneten Geraden stellen den linearen Fit im Zeitraum 20 bis 90 s dar, der zur Beurteilung der Leitfähigkeit verwendet wurde.

Die Änderung des Protoplastenvolumens und die Substratströme beim Permeabilitätsassay sind in Abbildung 4.21 A schematisch dargestellt. In Abbildung 4.21 B ist beispielhaft eine Messung mit

4.6 Substrate, Nicht-Substrate und Transportkinetik von MCT1 und MCT1 K38M

L-Laktat als Substratmolekül gezeigt. Werden Hefeprotoplasten einem hypertonen Substratpuffer ausgesetzt, strömt Wasser aus den Zellen aus. Die Protoplasten schrumpfen und die Lichtstreuung erhöht sich (1. Phase der Messung, 0 bis 20 s). Enthält der hypertone Puffer ein Substrat für das untersuchte Membranprotein, hier MCT1, strömt Substrat über den Transporter in die Zelle ein. Da sich nun die Osmolarität innerhalb der Zelle erhöht, strömt Wasser nach (2. Phase der Messung, 20 s bis 120 s). Die Zellen schwellen wieder leicht an und die Lichtstreuung sinkt. Nicht-exprimierende Zellen zeigen einen anderen Kurvenverlauf: in der 1. Phase der Messung erhöht sich auch hier das Signal der Lichtstreuung. Da diese Zellen aber deutlich weniger permeabel für die zugesetzten Substratmoleküle sind, bleibt der Substrat- und Wassereinstrom in der 2. Phase aus und das Signal bleibt hoch. Genau so verhielten sich MCT1-exprimierende Zellen, wenn das zugesetzte Molekül kein Substrat war. Auch hier bleiben die Protoplasten geschrumpft und die Lichtstreuung bleibt hoch.

Dieses biophysikalische Messprinzip benötigt keine Markierung der Substratmoleküle und ist daher gut geeignet, viele verschiedene Moleküle zu untersuchen. Dieser Assay ist für die Untersuchung von Kanälen etabliert [39]. Die Messdauer beträgt bei der Messung der Aufnahme über Kanäle bis zu eine Minute. Da der Substratstrom über einen *alternating-access*-Transporter wie MCT1 deutlich langsamer abläuft als über einen Kanal, wurde die Messzeit auf 120 s verlängert. Um zwischen Substraten und Nicht-Substraten zu unterscheiden, wurde die Kurve der 2. Phase der Messung im Bereich 20 bis 90 s linear gefittet und die Differenz der Steigung von nicht-exprimierenden und MCT1-exprimierenden Hefen betrachtet.

Enthält die Lösung ein Substrat, ist insgesamt eine hohe Differenz der Steigung zwischen exprimierenden und nicht-exprimierenden Protoplasten zu erwarten. Ist die zugesetzte Verbindung kein Substrat von MCT1, wird eine niedrige Differenz zwischen exprimierenden und nicht-exprimierenden Protoplasten erwartet. Alle Messungen wurden bei zwei verschiedenen pH-Werten durchgeführt (pH 5 und pH 7). Basierend auf den Messungen der Aufnahme über MCT1 im ^{14}C -Substrat-Transportassay (siehe Abschnitt 4.4.2), wird erwartet, dass die Differenz der Steigung bei pH 5 höher ist als bei pH 7.

4.6 Substrate, Nicht-Substrate und Transportkinetik von MCT1 und MCT1 K38M

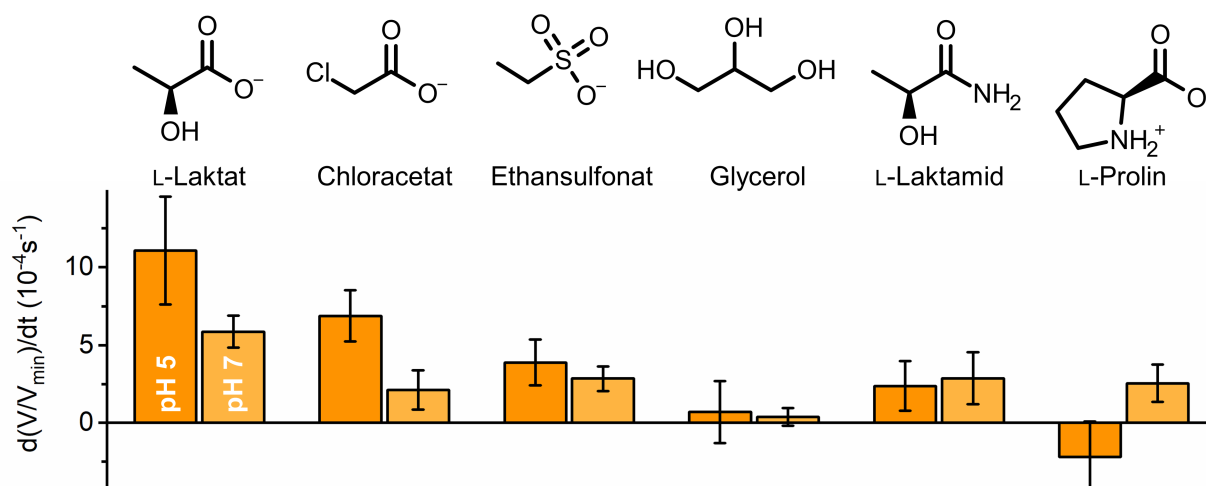


Abbildung 4.22: **Ergebnisse des Permeabilitätsassays und Strukturformeln der untersuchten Verbindungen.** Der chemische Gradient betrug je 300 mM. Die Steigungen des linearen Fits in Phase 2 von MCT1 exprimierenden und nicht-exprimierenden Zellen wurden bestimmt und die mit (-1) multiplizierte Differenz wurde zur Beurteilung der Leitfähigkeit herangezogen. Alle Werte wurden einmal bei pH 5 und einmal bei pH 7 aufgenommen. Fehler stellen S.E.M. dar (N = 3).

Die Aufnahme von L-Laktat über MCT1 wurde unter 4.4.2 bereits im Radioassay gezeigt. Auch im Lichtstreuungsassay konnte diese Leitfähigkeit gemessen werden. Die Werte für die Differenz der Steigungen im Vergleich zum Hintergrund sind sowohl bei pH 5,0 als auch bei pH 7,0 deutlich größer als Null (siehe Abbildung 4.22 ganz links, pH 5,0: $11,1 \pm 3,5$; pH 7,0: $5,9 \pm 1,0$). Auch, dass die Aufnahme zu niedrigeren pH-Werten hin (jedoch oberhalb von pH 4,8) zunimmt, kann im Lichtstreuungsassay bestätigt werden. Die Messwerte sind bei pH 5,0 größer als bei pH 7,0. Wird jedoch im Gegensatz dazu ein Nicht-Substrat wie das L-Prolin [63] zugesetzt, sind die Messwerte deutlich niedriger (siehe Abbildung 4.22 ganz rechts). Der Fehlerbalken bei pH 5,0 schließt Null ein, der Fehlerbalken der Messung bei pH 7,0 endet nur knapp über Null. Auch die charakteristische pH-Abhängigkeit, dass die Werte im Säuren zunehmen, kann nicht beobachtet werden. Damit konnte der Assay im Folgenden eingesetzt werden, um Substrate und Nicht-Substrate zu unterscheiden.

Messwerte oberhalb von Null wurden auch für Chloracetat und für Ethansulfonat beobachtet. Hier waren die gemessenen Unterschiede zwischen exprimierenden und nicht-exprimierenden Protoplasten insgesamt niedriger, die pH-Abhängigkeit blieb jedoch bestehen. Für Glycerol und L-Laktamid wurden im Gegensatz dazu niedrige Werte gemessen. Hier war genau wie bei L-Prolin keine pH-Abhängigkeit der Messwerte sichtbar. Somit deutete die Messung darauf hin, dass es sich bei Chloracetat und Ethansulfonat um Substrate und bei Glycerol und L-Laktamid um Nicht-Substrate handeln könnte. Diese vier Verbindungen wurden auch in einem kompetitiven Radioassay untersucht.

In einem Kompetitionsassay wurde zu den Zellen zusätzlich zu 4 mM des Substrates L-Laktat eine zweite Verbindung in derselben Konzentration zugegeben. Handelt es sich bei dieser Verbindung auch um ein Substrat, konkurriert es mit L-Laktat um den Transport und die Transportrate sinkt. Handelt es sich bei der Verbindung nicht um ein Substrat, ist die Transportrate unverändert.

4.6 Substrate, Nicht-Substrate und Transportkinetik von MCT1 und MCT1 K38M

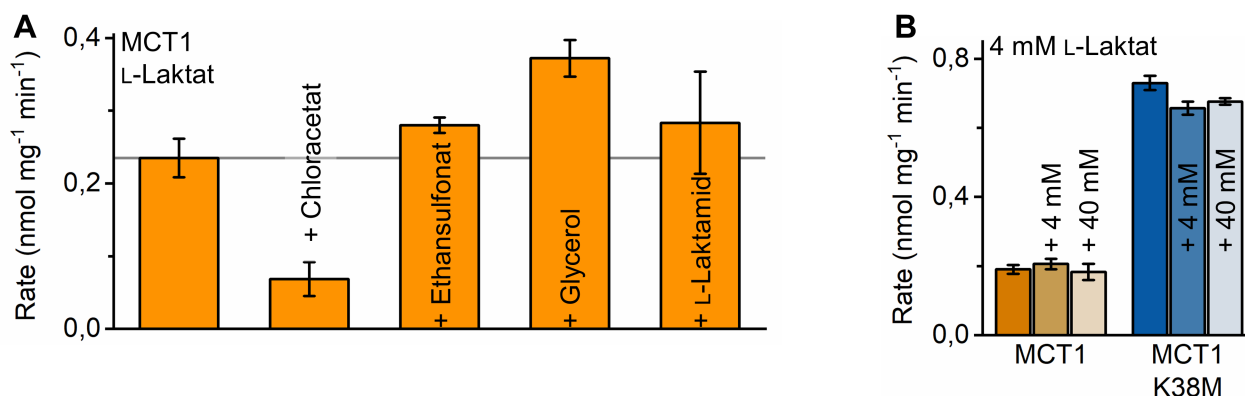


Abbildung 4.23: **Die Ergebnisse des kompetitiven Radioassays bestätigen Beobachtungen aus dem Lichtstreuungsassay.** Die L-Laktatkonzentration betrug 4 mM. A: Messung der L-Laktataufnahme bei pH 4,8 für je 2 min. Die Konzentration der Zusätze betrug je 4 mM. Die graue Linie zeigt die Höhe der Rate ohne Zusätze an. Fehler geben Standardabweichung der technischen Replikate an (N = 1). B: Messung der L-Laktataufnahme bei pH 3,8 ohne und mit Zusatz von L-Laktamid (4 oder 40 mM). Aufnahmezeit 8 min für den Wildtyp, 2 min für die K38M-Mutante. Fehler stellen S.E.M. dar (N = 2 - 3).

Der Zusatz von Chloracetat führte im Vergleich zum Experiment ohne Zusätze zu einer deutlichen Reduktion der Transportrate um ungefähr 70 % (siehe 4.23 A; $(0,235 \pm 0,019)$ nmol mg⁻¹ min⁻¹ ohne Zusatz, $(0,068 \pm 0,016)$ nmol mg⁻¹ min⁻¹ mit Chloracetat). Der Zusatz von Ethansulfonat, Glycerol und L-Laktamid führte nicht zu einer Reduktion der Transportrate.

L-Laktamid stellte in diesem Experiment eine Modellsubstanz für die protonierte Milchsäure dar. Beide Verbindungen besitzen eine ähnliche Struktur und unterscheiden sich nur an der funktionellen Gruppe am C₁. Während die L-Milchsäure eine Carbonsäure trägt und damit in wässriger Lösung sauer reagiert, besitzt das L-Laktamid eine permanent neutrale Amid-Funktion. In dem pH-Bereich, in dem Messungen mit dem Radioassay durchgeführt wurden, verändert sich der Protonierungsstatus des L-Laktats. Um zu untersuchen, ob MCT1 oder MCT1 K38M auch L-Milchsäure als Substrat akzeptieren, wurde das Konkurrenzexperiment mit diesem Molekül auch bei pH 3,8, also in Gegenwart von L-Milchsäure, durchgeführt (siehe Abbildung 4.23 B). Sowohl für den Wildtyp wie auch für die K38M-Mutante führte ein Zusatz von L-Laktamid in gleicher Menge oder im 10-fachen Überschuss nicht zu einer Reduktion der Transportrate.

Dies deutet darauf hin, dass sowohl der Wildtyp als auch die K38M-Mutante die De-/Protonierbarkeit des Substrates abfragen können, da keiner der beiden Transporter das permanent protonierte L-Laktamid als Substrat akzeptiert.

4.6.2 Substrataffinität für MCT1 und MCT1 K38M

Die maximale Transportgeschwindigkeit (v_{\max}) und die Affinität eines Substrates für den Transporter (Michaelis-Menten-Konstante, K_m) enthalten Hinweise auf den Transportmechanismus [130]. Dazu gehört zum Beispiel die Reihenfolge, in der Substrat und Cosubstrat binden [130]. Außerdem könnte der Protonierungsstatus einzelner Seitenketten im Protein oder der Protonierungsstatus des

4.6 Substrate, Nicht-Substrate und Transportkinetik von MCT1 und MCT1 K38M

Carboxylates im Substrat die gemessene Affinität beeinflussen. Die Werte, die für K_m als auch v_{max} gemessen werden, können dabei von anderen Faktoren im Versuch beeinflusst werden und werden daher im Folgenden mit dem Zusatz „*app*“ für „*apparent*“, also „scheinbar“ versehen [130, 166]. Es wurden $K_{m, app}$ als auch $v_{max, app}$ für verschiedene Substrate, verschiedene pH-Werte und verschiedene Konstrukte (Wildtyp und K38M-Mutante) experimentell bestimmt (siehe Abbildung 4.24 A - D).

Die Messwerte für pH 7,8 in Abbildung 4.24 B wurden von Jana D. R. Schmidt erhoben. Im Neutralen (pH 6,8) ergaben sich ähnliche Kurvenverläufe für L-Laktat, Acetat und Propionat (Abbildung 4.24 A). Bei einem höheren pH-Wert von 7,8, bei einer 10-fach niedrigeren Protonenkonzentration, wurde ein deutlich höheres Plateau für die Messwerte erreicht (Abbildung 4.24 B, geänderte Skalierung). Dieses Plateau wurde bei einer deutlich höheren L-Laktat-Konzentration erreicht.

Bei einem sauren pH-Wert von 4,8 wurden deutlich höhere Raten als bei pH 6,8 gemessen (Abbildung 4.24 C links), die Kurvenform blieb dabei ähnlich zu den Kurven im Neutralen. Eine noch 10-fach höhere Protonenkonzentration, entsprechend einem pH von 3,8, ergab für den Wildtyp eine deutlich abgeflachte Kurvenform (Abbildung 4.24 C rechts). Unter den selben Messbedingungen wurde für die K38M-Mutante wieder eine deutlich steilere Kurve beobachtet, ähnlich dem Wildtyp bei pH 4,8 (Abbildung 4.24 D, vergleiche C links).

Die maximale beobachtete Transportgeschwindigkeit ($v_{max, app}$) kann direkt aus diesen Kurven abgelesen werden: sie entspricht jeweils der Plateauhöhe des Kurvenfits. Die maximale Transportgeschwindigkeit für alle oben beschriebenen Messbedingungen sind in Abbildung 4.24 E dargestellt. $v_{max, app}$ war stark abhängig vom pH-Wert des Messpuffers. Bei pH 7,8 lag dieser Wert um den Faktor 7,5 höher als im Neutralen bei pH 6,8 (pH 6,8: $(0,30 \pm 0,02) \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$; pH 7,8: $(2,3 \pm 0,3) \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Es ist auffällig, dass der Transport bei einer niedrigeren Konzentration an Cosubstrat deutlich schneller wird. Hier könnte die Deprotonierung einer Seitenkette im Protein für die Erhöhung von $v_{max, app}$ verantwortlich sein. Da diese Deprotonierung im schwach Alkalischen stattfindet, könnte es sich hier um eine Aminofunktion handeln. Damit könnte die Entfernung der Ladung an Position 38 durch eine Deprotonierungsreaktion die $v_{max, app}$ erhöhen.

4.6 Substrate, Nicht-Substrate und Transportkinetik von MCT1 und MCT1 K38M

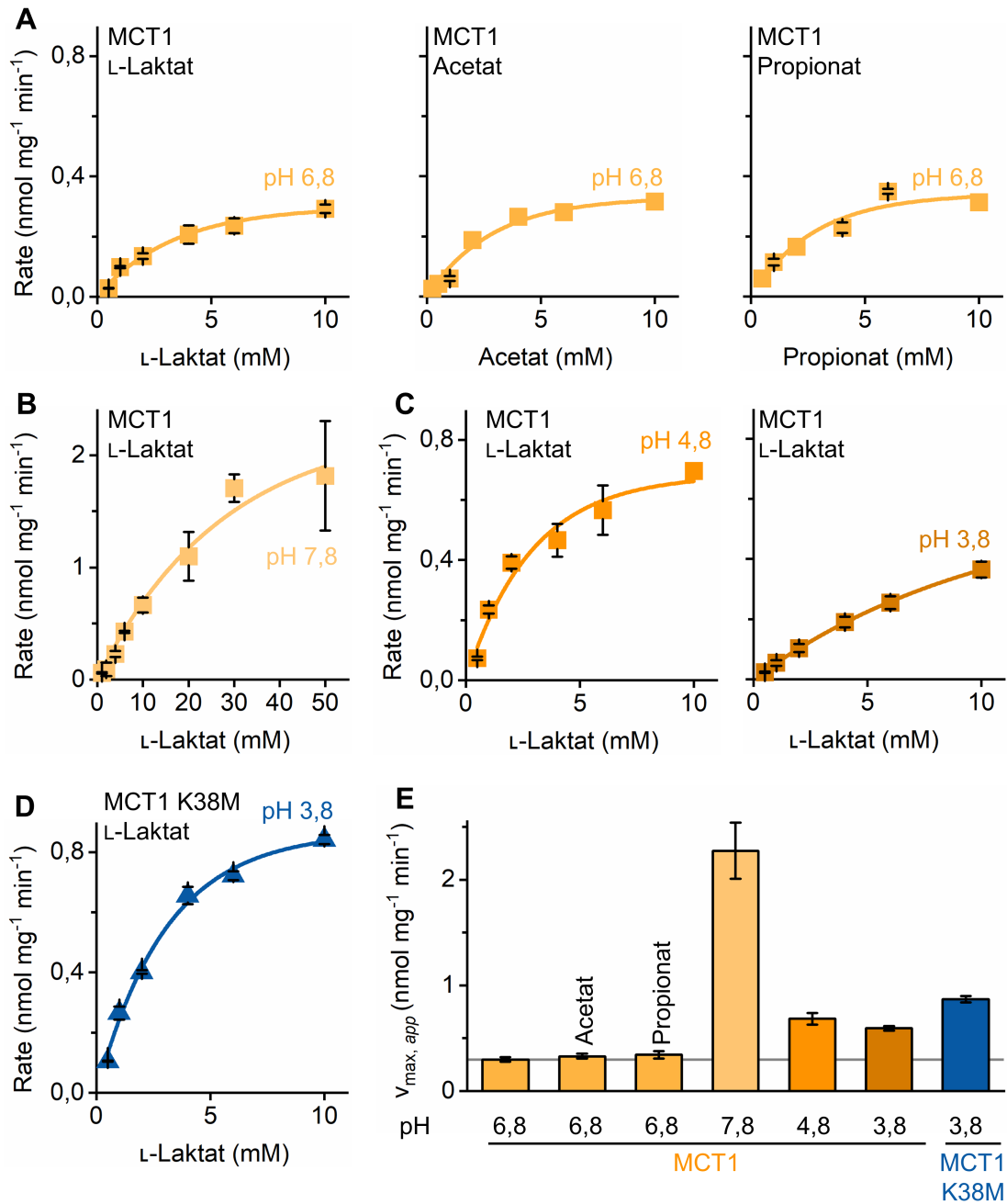


Abbildung 4.24: **Konzentrationsabhängige Transportrate für verschiedene Substrate, pH-Werte und Proteine.** Die Messbedingungen sind in der Abbildung angegeben. B: Der Verlauf der Messwerte machte eine höhere L-Laktatkonzentration und eine andere Skalierung der Achsen notwendig. E: $v_{max, app}$ -Werte abgeleitet aus den Kurvenfits für A-D. Die graue Linie zeigt den Wert für L-Laktat bei einem pH-Wert von 6,8 an. Es wurde die initiale Transportrate bei 2 min Aufnahmezeit oder 1 min für pH 7,8 und 8 min für pH 3,8 gemessen. A-D: Für Punkte, die in mehreren biologischen Replikaten bestätigt wurden, geben die Fehler den S.E.M. an (A: N = 1 - 3, B: N = 3, C: N = 1 - 3, D: N = 2). E: Fehler geben Standardfehler der Fitvariablen an.

Auch im sauren Milieu (pH 3,8 und 4,8) lagen die bestimmten maximalen Raten oberhalb von denen im Neutralen (siehe auch graue Linie in Abbildung 4.24 E): ungefähr doppelt so hoch bei einem pH von 4,8 (pH 4,8: $(0,64 \pm 0,03) \text{ nmol } mg^{-1} \text{ min}^{-1}$) und fast 3-fach so hoch bei einem pH von 3,8 für die K38M-Mutante ($(0,87 \pm 0,03) \text{ nmol } mg^{-1} \text{ min}^{-1}$). Hier könnte die höhere Konzentration an

4.6 Substrate, Nicht-Substrate und Transportkinetik von MCT1 und MCT1 K38M

Cosubstrat die $v_{\max, app}$ erhöht haben.

Für den pH-Wert von 6,8 war $v_{\max, app}$ konstant, unabhängig davon, mit welchem Substrat die Messung durchgeführt wurde. Die Größe des anionischen Substrates scheint im Rahmen der untersuchten Moleküle keinen Einfluss auf $v_{\max, app}$ zu haben.

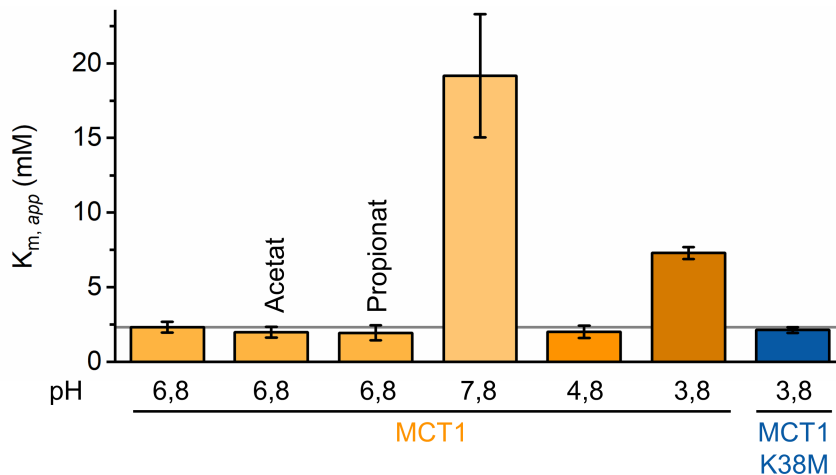


Abbildung 4.25: $K_{m, app}$ -Werte unter den oben aufgeführten Messbedingungen. Werte für $K_{m, app}$ wurden aus den Kurvenfits aus Abbildung 4.24 A - D abgeleitet. Das untersuchte Substrat ist L-Laktat, falls nichts anderes angegeben ist. Fehler stellen den Standardfehler des Kurvenfits dar ($N = 1 - 3$).

Über die Ratenkonstante der oben aufgetragenen Kurvenfits wurde die Michaelis-Menten-Konstante unter den jeweiligen Bedingungen bestimmt (siehe Abbildung 4.25). Die Affinität von L-Laktat für den Wildtyp-Transporter lag bei pH 7,8 mit (19 ± 4) mM und bei pH 3,8 mit $(7,3 \pm 0,4)$ mM deutlich höher als unter den anderen Messbedingungen. Bei pH 3,8 liegt zur Hälfte L-Laktat und L-Milchsäure vor. Das L-Laktat stellt wahrscheinlich das Substrat dar. Diese Abnahme der Konzentration durch die Protonierung wurde bei der Auftragung der Konzentrationen nicht berücksichtigt. Dies ist wahrscheinlich die Ursache dafür, dass unter diesen Bedingungen ein höherer Wert für $K_{m, app}$ und damit eine niedrigere Affinität bestimmt wurde.

Am deutlichsten unterscheiden sich hier wieder die Werte, die bei pH 6,8 und bei pH 7,8 bestimmt wurden. Auch im Falle des höheren $K_{m, app}$ -Wertes könnte hier die Ursache in der Deprotonierung einer Aminofunktion, wie dem Lysin 38, bestehen. Die positive Ladung an dieser Position könnte die Substrataffinität des L-Laktat-Anions durch elektrostatische Anziehung deutlich erhöhen. Wird diese Ladung entfernt, in dem die Aminofunktion deprotoniert wird, verringert sich auch die gemessene Substrataffinität.

Neben $v_{\max, app}$ war auch der bestimmte $K_{m, app}$ -Wert unabhängig vom verwendeten Substrat und lag bei ungefähr 2,3 mM (Wert für L-Laktat bei pH 6,8; siehe auch graue Linie). Im Bereich von pH 6,8 bis pH 4,8 war der $K_{m, app}$ -Wert außerdem unabhängig von der Protonenkonzentration. Diese Daten deuten darauf hin, dass die funktionelle Gruppe im Substrat, die für die Affinität am Transporter verantwortlich ist, das Carboxylat ist. Dieses Strukturmerkmal ist allen drei getesteten Substraten gemeinsam und führt zu einer identischen Affinität am Transporter.

4.6 Substrate, Nicht-Substrate und Transportkinetik von MCT1 und MCT1 K38M

Es ist auffällig, dass sich der für die K38M-Mutante bei pH 3,8 gemessene $K_{m, app}$ -Wert nicht von dem unterscheidet, der für den Wildtyp im Neutralen bestimmt wurde. Obwohl in der Mutante an Position 38 keine positive Ladung eine elektrostatische Anziehung des Substrates vermitteln kann, kann das Substrat trotzdem mit einer vergleichsweise hohen Affinität an den Transporter binden. Der $K_{m, app}$ -Wert der Mutante ist sogar deutlich niedriger als der, der für den Wildtyp bei pH 7,8 bestimmt wurde, obwohl die Anzahl an Ladungen innerhalb der Bindetasche in den beiden Proteinen unter jeweiligen Bedingungen identisch ist. Da die Protonen jedoch das Cosubstrat darstellen und deren Konzentration bei pH 3,8 10.000-fach höher ist als bei pH 7,8, sind diese beiden Versuchsbedingungen nicht direkt vergleichbar.

Dass die Werte, die für $v_{max, app}$ und $K_{m, app}$ für MCT1 bestimmt wurden, oberhalb von pH 6,8 drastisch abweichen, deutet darauf hin, dass die positive Ladung von Lysin 38 wesentlich an der Substratbindung und am Transportmechanismus beteiligt ist.

4.7 Protonierungsreaktionen in durch MCT1 vermitteltem Transport

Wie in Kapitel 4.4.2 und in Kapitel 4.4.3 dargestellt, ist der L-Laktattransport über den Wildtyp und über die K38M-Mutante von MCT1 stark von der Protonenkonzentration abhängig. Die Protonenkonzentration kann den Transport durch verschiedene Mechanismen beeinflussen. Durch die Protonierung der Carbonsäure des Substrates können Protonen das L-Laktat in L-Milchsäure umwandeln, die wahrscheinlich nicht transportiert wird. Damit haben Protonen bei einem pH-Wert von 3,8 und darunter einen Einfluss auf die Substratkonzentration.

Auch der Protonierungsstatus von Aminosäureseitenketten im Protein kann den Transport beeinflussen. In Abschnitt 4.6.2 gab es bereits Hinweise darauf, dass der Protonierungsstatus und damit die Ladung des Lysins 38 den Transport beeinflussen kann. Die Untersuchung des Transportes über einen breiten pH-Bereich hinweg macht all diese Effekte, die einen Einfluss auf die Transportgeschwindigkeit haben, sichtbar.

Werden in Messungen die Konzentrationen von Substrat und Cosubstrat variiert, liefert dies Hinweise auf die Reihenfolge, in der die Teilchen an den Transporter binden [125]. Während in Abschnitt 4.6.2 vor allem die Konzentration an L-Laktat und weiteren anionischen Substraten über einen breiten Konzentrationsbereich mit vielen Messpunkten hinweg variiert wurde, wird dies im Folgenden für Protonen gemessen.

Zuletzt sollen die Protonen im ^{14}C -Substrat-Transportassay vollständig durch Deuteronen ausgetauscht werden. Da Deuteronen doppelt so schwer sind wie Protonen, beeinflusst dieser Austausch Protonen-abhängige Reaktionen [167]. Indem quantifiziert wird, wie sehr sich der Transport unter diesen Bedingungen verändert, werden Rückschlüsse auf die Anzahl der Protonierungsschritte im Transportmechanismus und die Identität von Protonenbindestellen geschlossen [167, 168].

4.7.1 pH-Abhängigkeit des Transportes über MCT1 und MCT1 K38M

Im Folgenden wurde die initiale Transportrate bestimmt. Diese entspricht der Geschwindigkeit der Substrataufnahme direkt zum zeitlichen Beginn der Messung. Zu diesem Zeitpunkt ist der Substratgradient und damit die Transportgeschwindigkeit unter den gewählten Messbedingungen am höchsten. Dieser Wert wurde bei verschiedenen pH-Werten, also bei verschiedenen Protonenkonzentrationen bestimmt. Die Aufnahmeraten von 1 mM L-Laktat über MCT1 und die K38M-Mutante bei verschiedenen pH-Werten sind in Abbildung 4.26 A dargestellt. Diese ergaben für den Wildtyp einen komplexen Kurvenverlauf.

4.7 Protonierungsreaktionen in durch MCT1 vermitteltem Transport

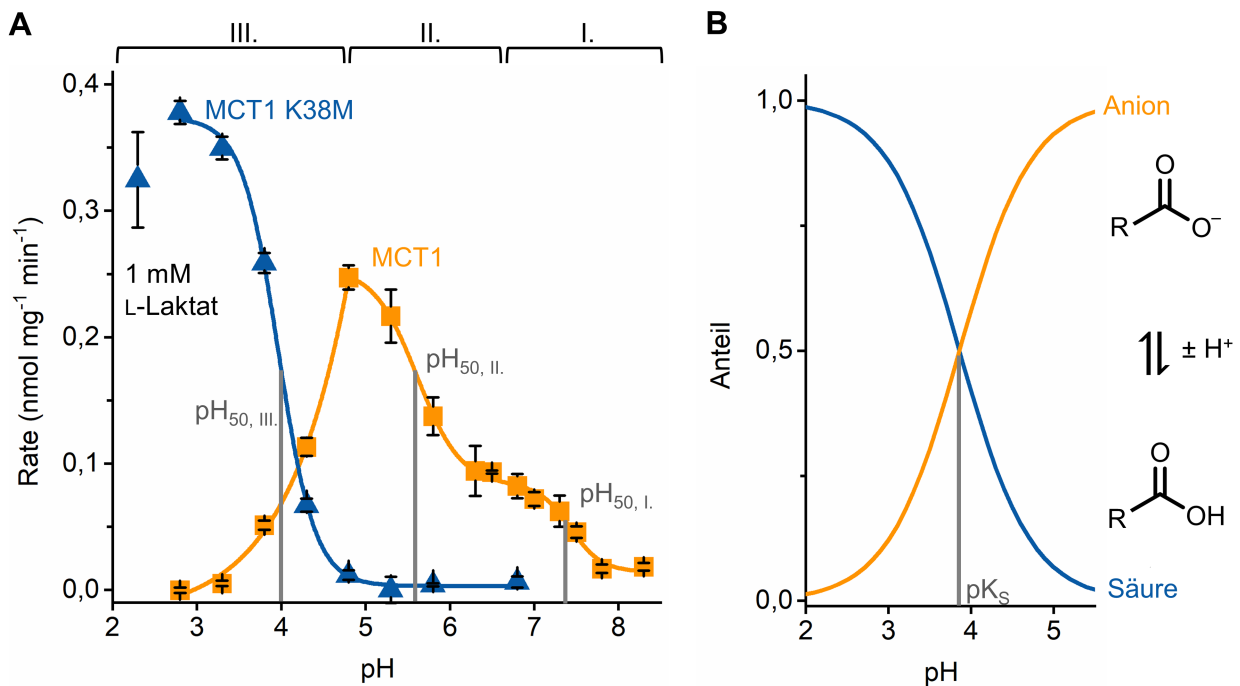


Abbildung 4.26: **pH-Abhängigkeit der initialen Aufnahmeraten für MCT1 und MCT1 K38M.** Alle initialen Aufnahmeraten wurden bei 2 min Aufnahmezeit gemessen. A: Die pH-Abhängigkeit des Transportes über MCT1 folgt einem komplexen Kurvenverlauf mit einem doppelt sigmoidalen Anstieg und einem darauffolgenden exponentiellen Abfall vom Neutralen zum Sauren hin. Für MCT1 K38M ergab sich im Gegensatz dazu ein einfach sigmoidaler Anstieg im stark sauren Milieu. Die L-Laktat-Konzentration betrug 1 mM. Die Messwerte für das Wildtyp-Protein sind als orangefarbene Quadrate dargestellt. Die Messwerte für die K38M-Mutante sind als blaue Dreiecke eingezeichnet. Die Wendepunkte der sigmoidalen Kurven stellen die pH₅₀-Werte dar und wurden nach den drei Bereichen der pH-Kurve I., II. und III. nummeriert. Fehler stellen S.E.M. dar (N = 3 - 6). B: Protonierungsgleichgewicht einer Carbonsäure mit einem pK_s-Wert von 3,8 bei pH 2 - 5,5.

Vom Neutralen ausgehend in Richtung der sauren pH-Werte steigt die Transportrate in zwei Stufen sigmoidal an (siehe Abbildung 4.26 A I. und II.). Der pH₅₀-Wert gibt den pH-Wert an, an dem die Hälfte des maximalen Influxes erreicht wird [130]. In Bereich I. lag dieser Wert für MCT1 bei $7,43 \pm 0,07$, der Wert für pH_{50, II.} betrug $5,61 \pm 0,05$. Die höchste Transportrate wurde mit $(0,25 \pm 0,01) \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ bei einem pH-Wert von 4,8 beobachtet. Bei einer noch höheren Protonenkonzentration, einem niedrigeren pH-Wert, fiel die Transportrate exponentiell ab (siehe Abbildung 4.26 A III.). Bei einem pH-Wert von 2,8 war unter diesen Bedingungen kein Transport messbar. Für die K38M-Mutante ergab sich ein anderer Kurvenverlauf: Zum Sauren hin steigen die Messwerte einfach sigmoidal an und erreichen bei einem pH-Wert von 2,8 ein Plateau. Bei pH 2,8 wurde die höchste Transportrate gemessen. Diese betrug mit $(0,38 \pm 0,01) \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ das 1,6-fache der höchsten Transportrate, die für den Wildtyp gemessen wurde. Der Wendepunkt des sigmoidalen Kurven-Fits, pH_{50, III.}, liegt bei einem pH-Wert von $4,00 \pm 0,02$. Es ist auffällig, dass die Kurven von Wildtyp und K38M-Mutante zwischen pH 3 und 5 spiegelbildlich verlaufen: Während die Funktion des Wildtyps in dem pH-Bereich stark abnimmt, steigt die Leitfähigkeit der Mutante im selben Maße an. Die Kurven ähneln in ihrer Lage und ihrer Form stark dem Protonierungsgleichgewicht

einer Carbonsäure, wie in Abbildung 4.26 B dargestellt. Bei dieser Carbonsäure kann es sich zum einen um die des Substrates handeln, zum anderen um eine Aspartat- oder Glutamat-Seitenkette des Proteins.

Die unterschiedliche Kurvenform von Wildtyp und K38M-Mutante deutet darauf hin, dass im Transportmechanismus unterschiedlich viele Protonierungsreaktionen ablaufen. Außerdem war der pH-Bereich, in dem die Mutante aktiv war, im Vergleich zum Wildtyp deutlich ins Saure verschoben. Dass mit dem Austausch von Lysin 38 aus dem Protein eine sigmoidale Stufe verloren geht, deutet darauf hin, dass die Aminogruppe des Lysins nicht nur die Substratbindung beeinflusst, sondern auch eine der protonierbaren Positionen darstellt. Da diese Protonierungsreaktion in einem pH-Bereich von 6 bis 8 abläuft, handelt es sich dabei wahrscheinlich um die protonierbare Position aus Teilkurve I (siehe Abbildung 4.26). Die gegenläufige Kurvenform im Säuern (siehe Abbildung 4.26 III.) deutet darauf hin, dass die Protonierungsreaktion, die den Transport über die Mutante ermöglicht, dieselbe Reaktion ist, die den Transport im Wildtyp zum Erliegen kommen lässt.

4.7.2 Konzentrationsabhängigkeit der pH-Kurven von MCT1

Der doppelt-sigmoidale Teil der pH-Kurve des Wildtyps wurde im Folgenden auf eine Abhängigkeit von der L-Laktatkonzentration überprüft. Sollte sich ein Teil dieser Kurve bei höheren L-Laktatkonzentrationen verschieben, deutet das darauf hin, dass die jeweilige protonierbare Position abhängig von L-Laktat existiert [130]. Bei dieser protonierbaren Position könnte es sich dann entweder um das Anion selbst handeln oder um eine protonierbare Position, die erst durch die L-Laktat-Bindung im Transporter entsteht.

Wurden 2 mM Laktat verwendet (siehe Abbildung 4.27 A), ergab sich ein ähnlicher Kurvenverlauf wie bei Verwendung von 1 mM L-Laktat (graue Linie). Von pH 5,3 auf pH 4,8 war jedoch im Gegensatz zu den vorher gezeigten Daten keine weitere Steigerung der Rate messbar. Die bestimmten Aufnahmeraten waren insgesamt höher. Da die verwendeten Konzentrationen in der selben Größenordnung wie der $K_{m, app}$ -Wert liegen, führte eine höhere Substratkonzentration erwartungsgemäß zu einer höheren Transportgeschwindigkeit und damit zu einer höheren initialen Transportrate (siehe auch Abschnitt 4.6.2). Erst ab einer Substratkonzentration von ungefähr 4 mM und höher ist nicht mit einer weiteren Erhöhung der Transportgeschwindigkeit zu rechnen.

Daher wurden auch für die Bestimmung der pH-Abhängigkeit mit 4 mM L-Laktat höhere Raten als für 2 mM gemessen (siehe Abbildung 4.27 B). Die resultierende Kurve wies ebenfalls einen doppelt-sigmoidalen Verlauf auf. Hier wurde jedoch die maximale Rate bei einem höheren pH-Wert erreicht (pH 5,3). Daher wurde der Punkt bei pH 4,8 nicht in den Kurvenfit einbezogen.

4.7 Protonierungsreaktionen in durch MCT1 vermitteltem Transport

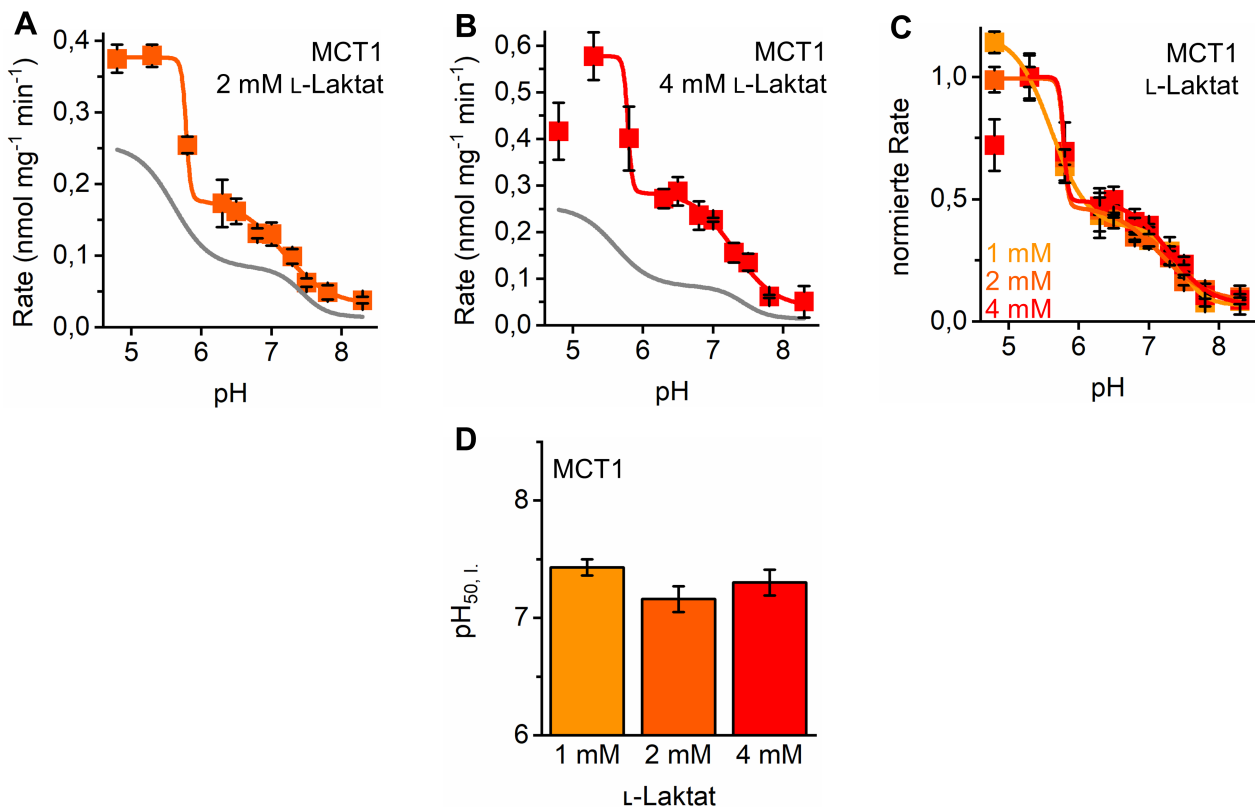


Abbildung 4.27: **pH-abhängige Aufnahmeraten von MCT1 bei höheren Substratkonzentrationen, normiert auf pH 5,3 und Werte für pH_{50, i}.** A, B: pH-Kurve des MCT1 Wildtyps bei einer L-Laktat-Konzentration von 2 und 4 mM. Die graue, gestrichelte Linie gibt zur Orientierung den Kurvenfit bei 1 mM L-Laktat wieder. Die Achsenskalierungen unterscheiden sich. C: Die Raten aus A und B und Abbildung 4.26 A wurden auf den jeweils bei pH 5,3 gemessenen Wert normiert. Gemessen wurde bei 1 mM (orange), 2 mM (dunkles orange) und bei 4 mM L-Laktat (rot). Fehler stellen S.E.M. dar (N = 3 - 6). D: Aus den Fits der Kurven in Abbildung 4.26 bestimmte Werte für pH_{50, i}. Fehler stellen Standardfehler des Kurvenfits dar.

Um die Kurvenform bei verschiedenen L-Laktat-Konzentrationen besser vergleichen zu können, wurden die Raten aus Abbildung 4.26 A und Abbildung 4.27 A und B auf den jeweils bei pH 5,3 gemessenen Wert normiert und übereinandergelegt (siehe Abbildung 4.27 C). Im pH-Bereich von 8,3 bis 6,3 lagen alle drei Kurven übereinander. Bei einem pH-von 6,3 bis 4,8 unterschieden sich die Kurven. Während die bei 1 mM L-Laktat gemessenen Werte bis zu einem pH-Wert von 4,8 kontinuierlich und flach anstiegen, verschoben sich die Kurven bei höheren L-Laktatkonzentrationen nach rechts, also zu höheren pH-Werten. Gemessen bei 2 mM und 4 mM war der Anstieg dagegen deutlich steiler. Bei 2 mM L-Laktat gemessen erreichten die Messwerte bei 2 mM bis pH 4,8 ein Plateau. Im Gegensatz dazu sanken bei pH 4,8 die Werte, wenn mit 4 mM gemessen wurde.

Die Transportrate über den jeweiligen pH-Wert aufzutragen erlaubt eine quantitative Beschreibung der pH-Abhängigkeit des Transportes. Dabei ist der Transport ein komplexer Prozess, in dem viele Teilschritte ablaufen. Im Transportprozess von MCT1 gibt es Positionen, die bei Protonierung die Leitfähigkeit des Transporters erhöhen. Diese Positionen werden in der pH-Kurve als sigmoidale ansteigende Stufen vom Neutralen zum Sauren hin sichtbar. An den Wendepunkten der Kurve, dem

pH_{50} -Wert, ist die Hälfte des Effektes erreicht, der durch die Protonenkonzentration vermittelt wird. Daher kann geschlossen werden, dass an diesem pH-Wert auch die Position zur Hälfte protoniert vorliegt. Somit entspricht der pH_{50} -Wert dem pK_S -Wert der protonierbaren Position. Dieser Wert kann durch eine einzige, aber auch durch das Zusammenspiel mehrerer protonierbarer Positionen im Transportmechanismus beeinflusst werden. Die Summe dieser Effekte beeinflusst den Kurvenverlauf.

Im pH-Bereich von 8,3 bis 6,3 konnten die Messwerte gut mit dem Kurvenfit beschrieben werden. Daher konnte der Wert für $\text{pH}_{50, \text{I}}$ für alle drei Messbedingungen bestimmt werden und ist in Abbildung 4.27 D dargestellt. Unter den gewählten Bedingungen war der Wert für $\text{pH}_{50, \text{I}}$ unabhängig von der L-Laktatkonzentration. Der bestimmte pH_{50} -Wert und damit der pK_S -Wert lag bei $7,43 \pm 0,07$ (Wert bei 1 mM L-Laktat). Der zweite Wendepunkt ($\text{pH}_{50, \text{II}}$) konnte nur für 1 mM L-Laktat präzise bestimmt werden und lag bei $5,61 \pm 0,05$. Für die Messreihen mit einer Substratkonzentration von 2 mM und 4 mM konnten diese Wendepunkte nur mit hoher Unsicherheit bestimmt werden und wurden daher nicht weiter betrachtet. Zur Beurteilung einer Konzentrationsabhängigkeit wurde auf den Vergleich von Form und Lage der Fits zurückgegriffen.

Dass der Wert für $\text{pH}_{50, \text{I}}$ durch die Substratkonzentration nicht beeinflusst wird, deutet darauf hin, dass dieses eine protonierbare Position im Transporter ist, die unabhängig von der Substratbindung existiert. Die zweite protonierbare Position bei $\text{pH}_{50, \text{II}}$ mit einem pK_S -Wert im sauren Bereich könnte das L-Laktat selber darstellen, das an den Transporter gebunden vorliegt und dort eine andere Säurestärke als in Wasser aufweist.

4.7.3 Konzentrationsabhängigkeit der pH-Kurven von MCT1 K38M

Auch für die K38M-Mutante wurde die Konzentrationsabhängigkeit der pH-Kurven überprüft, um zuzuordnen, ob das L-Laktat an der protonierbaren Position im Transportmechanismus beteiligt ist (siehe Abbildung 4.28 A und B). Bei einer L-Laktatkonzentration von 2 mM blieb der einfach-sigmoidale Kurvenverlauf bestehen (siehe Abbildung 4.28 A). Die gemessenen Raten lagen deutlich höher als bei 1 mM (graue Linie). Eine weitere Erhöhung der L-Laktatkonzentration auf 4 mM erhöhte die gemessenen Raten nur gering (siehe Abbildung 4.28 B). Die einfach-sigmoidale Kurvenform blieb bestehen. Bei einem pH-Wert von 2,3 ergab sich bei allen L-Laktatkonzentrationen ein Abfall des Messsignals. Da der weitere Verlauf der Kurvenform jenseits von pH 2,8 nicht beurteilt werden konnte, wurde der Messwert bei pH 2,3 im Kurvenfit nicht berücksichtigt.

4.7 Protonierungsreaktionen in durch MCT1 vermitteltem Transport

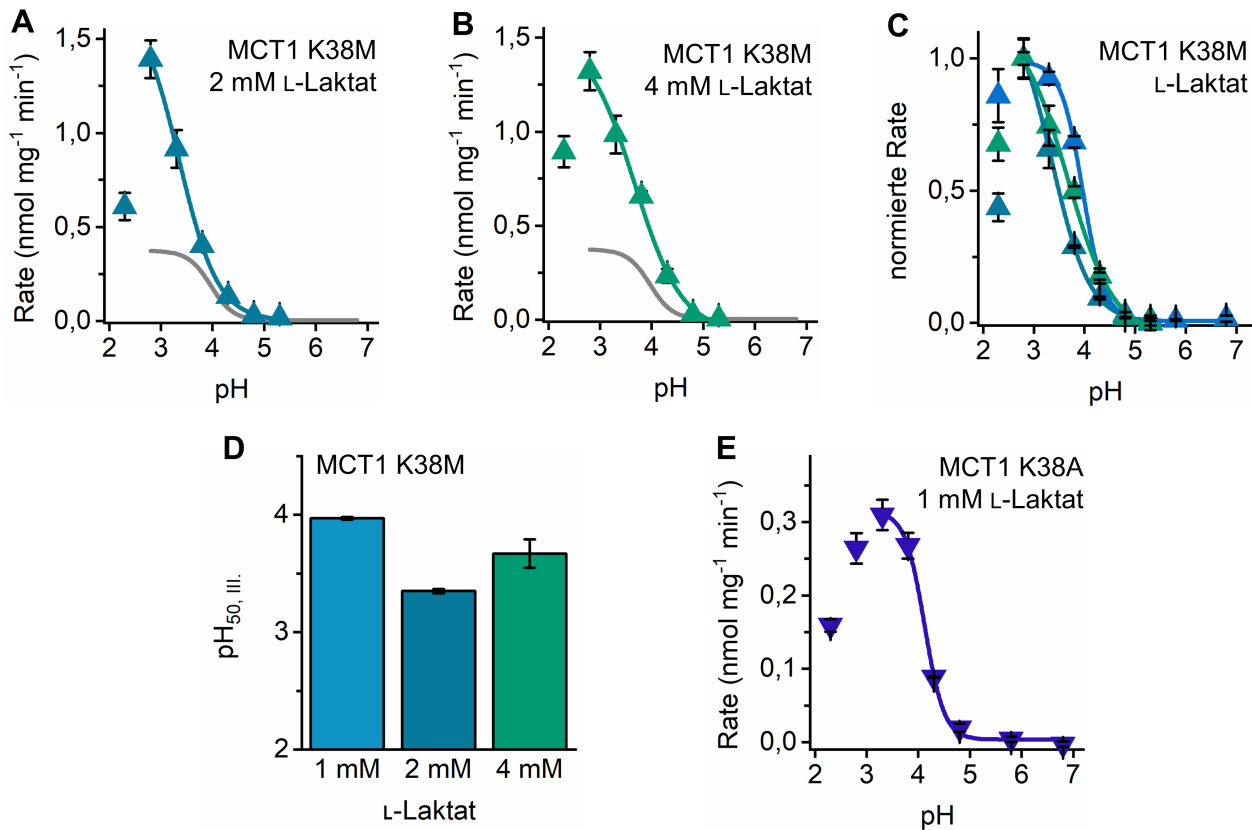


Abbildung 4.28: **pH-Abhängigkeit der initialen Aufnahmeraten für MCT1 K38M und K38A bei verschiedenen Substratkonzentrationen und pH_{50, III.}-Werte der Kurvenfits.** Alle Aufnahmeraten wurden bei 2 min Aufnahmezeit gemessen. A, B: Die pH-Abhängigkeit der initialen Transportrate ist für die K38M-Mutante auch bei einer L-Laktatkonzentration von 2 mM oder 4 mM einfach sigmoidal. Der Kurvenverlauf bei 1 mM ist grau eingezeichnet. Werte gemessen bei pH 2,3 wurden beim Fit nicht berücksichtigt. Fehler stellen S.E.M. dar (N = 2-3). C: Die Kurven der pH-Abhängigkeit gemessen bei verschiedenen Substratkonzentrationen sind gegeneinander verschoben. Werte aus A und B und Abbildung 4.26 A normiert auf die Rate jeweils gemessen bei pH 2,8. Fehler stellen S.E.M. dar (N = 2 - 3). D: pH_{50, III.}-Werte abgeleitet aus Kurven A und B und Abbildung 4.26 A sind voneinander verschieden. Fehler stellen Standardfehler des Kurvenfits dar. E: Der Verlauf der pH-Abhängigkeit von MCT1 K38A gemessen bei 1 mM L-Laktat ähnelt stark dem der K38M-Mutante. Fehler stellen S.E.M. dar (N = 3 - 5).

Zur besseren Vergleichbarkeit der Kurvenformen wurden die Raten aus Abbildung 4.28 A bis B und Abbildung 4.26 A auf den bei pH 2,8 gemessenen Wert normiert und übereinandergelegt (siehe Abbildung 4.28 D). Obwohl alle Kurven eine ähnliche Form aufweisen, unterscheidet sich die Steigung der Kurven im Bereich um pH 3. Während die Kurve, die mit 1 mM L-Laktat erhalten wurde, zwischen pH 5 und pH 4 stark ansteigt, ist dieser steile Teil der Kurve gemessen mit 2 mM und 4 mM L-Laktat in den sauren Bereich verschoben.

Alle drei Messbedingungen erlaubten eine präzise Bestimmung des Wendepunktes der Kurven (siehe Abbildung 4.28 E). Der pH_{50, III.}-Wert war für jede Messbedingung unterschiedlich hoch. Dabei lag der mit 2 mM L-Laktat gemessene Wert unterhalb des Wertes mit 1 mM L-Laktat ($3,35 \pm 0,02$ beziehungsweise $3,97 \pm 0,01$). Die Messung mit 4 mM L-Laktat ergab einen pH_{50, III.}-Wert von $3,67 \pm 0,12$. Diese Werte sind deutlich voneinander verschieden. Demnach könnte L-Laktat

einen Einfluss auf die protonierbare Position beziehungsweise die protonierbaren Positionen haben, die den exponentiellen Anstieg der Transportaktivität im sauren Milieu verursacht beziehungsweise verursachen.

Die Bestimmung des pH-Profiles bei 1 mM L-Laktat wurde auch für die K38A-Mutante durchgeführt. Wie auch für die K38M-Mutante folgten die Messwerte einem einfach-sigmoidalen Kurvenverlauf. Die höchste gemessene Rate betrug mit $(0,31 \pm 0,02) \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ bei pH 3,3 ungefähr das 0,8-fache der maximale Rate für K38M. Der Abfall der Messwerte zum Säuren hin wurde schon ab einem pH von 2,8 gemessen. Die Messwerte für pH 2,3 und 2,8 wurden daher für den Fit nicht berücksichtigt. Der Wendepunkt der Kurve lag bei $4,12 \pm 0,03$ und damit dicht an dem Wert, der für K38M unter denselben Bedingungen gemessen wurde. Da sich Methionin und Alanin in der Länge der Seitenketten unterscheiden aber die erhaltenen pH-Kurven ähnlich aussehen, ist davon auszugehen, dass dieser sterische Effekt an Position 38 zu vernachlässigen ist.

4.7.4 Schwerwasser-Effekt der Aufnahme über AQP9, MCT1 und MCT1 K38M

Der Isotopeneffekt ist ein etabliertes Werkzeug zur Aufklärung von Reaktionsmechanismen [167]. Das Konzept lässt sich auch auf Kanäle und Transporter übertragen [168, 169].

Wird H_2O in einer Reaktion durch D_2O ausgetauscht, so kann dies einen Einfluss auf Reaktionen haben, in denen Protonen involviert sind. Diese Veränderungen können die Kinetik der Reaktion betreffen oder die Lage des Gleichgewichtes von Reaktionen. Über Art und Größe dieser Veränderung kann direkt auf bestimmte Protonierungsschritte in chemischen oder enzymatisch katalysierten Reaktionen geschlossen werden [167]. Daher wurde der ^{14}C -Substrat-Transportassay unter vergleichbaren Bedingungen sowohl in leichtem (H_2O) als auch in schwerem (D_2O) Wasser durchgeführt und die Veränderungen, die durch den Austausch des Lösungsmittels verursacht wurden, erfasst und ausgewertet.

Etablierung des Messsystems

Für die geplanten Experimente wurde ein Messpuffer in Deuteriumoxid mit einer definierten Konzentration Deuteronen, also einem definierten pD-Wert, hergestellt. Dieser Wert kann grundsätzlich mit einer herkömmlichen pH-Elektrode bestimmt werden [170, 171, 172]. Die Glasmembran der pH-Elektrode reagiert auch auf Deuteronen, wenn auch in einem unterschiedlichen Ausmaß. Daher muss bei der Übertragung auf den pD-Wert zum gemessenen Wert noch ein Korrekturfaktor addiert werden [171]. Es wurde lange davon ausgegangen, dass die Werte stets um einen konstanten Wert von 0,4 verschoben seien [171]. Daher werden auf diese Weise in der Literatur häufig die pD-Werte bestimmt [173, 174]. Untersuchungen konnten jedoch zeigen, dass dieser Wert zum Beispiel abhängig von der Glasart der verwendeten Elektrode ist [172]. Da in den geplanten Experimenten die

4.7 Protonierungsreaktionen in durch MCT1 vermitteltem Transport

Protonen- und Deuteronen-Konzentration identisch sein sollte, wurde ein anderes Vorgehen gewählt.

Zur Bestimmung von pD-Werten in Lösungen aus schwerem Wasser (D_2O), wurde eine pD-Elektrode eingesetzt (siehe Kapitel 2.3). Glasmembranelektroden können mit ausreichender Zeit zur Äquilibration in leichtem wie schwerem Wasser verwendet werden, ohne dass große Abweichungen zu erwarten sind [170]. Um die hergestellten Standards [138] zu überprüfen, wurden diese Schwerwasser-Standards an der pH-Elektrode gemessen. Zur Überprüfung der pD-Elektrode wurden die pH-Standards vermessen. Für korrekt hergestellte Schwerwasser-Standards sollten die gemessenen Werte demnach um -0,4 Einheiten verschoben sein. Für die Messung mit einer korrekt kalibrierten pD-Elektrode in leichtem Wasser müsste der gemessene Wert von pH-Standards um 0,4 Einheiten höher ausfallen, als der wahre Wert.

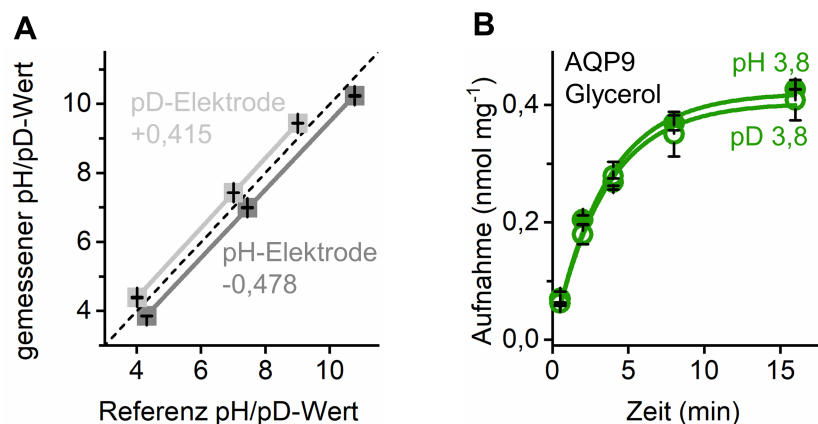


Abbildung 4.29: **Überprüfung der pD-Elektrode und Aufnahme von Glycerol über AQP9 in leichtem und schwerem Wasser.** A: Die Überprüfung der pD-Elektrode und der pD-Standards führt zu den erwarteten Ergebnissen. Die Messwerte der pD-Standards gemessen an der pH-Elektrode sind um 0,478 pH-Einheiten zu niedrigeren Werten verschoben. Im Gegensatz dazu sind die pH-Standards gemessen an der pD-Elektrode um 0,415 Einheiten zu höheren Werten verschoben. Die schwarze gestrichelte Linie stellt die Gerade dar, auf der der gemessene Zahlenwert gleich dem Referenz-Wert ist. Die Verschiebung der Messwerte gegenüber der Geraden weist das erwartete Vorzeichen und den erwarteten Betrag auf. Gezeigt sind die Werte aus 2 technischen Replikaten und ihre Standardabweichung. B: Aufnahme von 1 mM Glycerol über AQP9 bei pH 3,8 (geschlossene Symbole) und pD 3,8 (offene Symbole). Fehler stellen S.E.M. dar (N = 2).

Die Ergebnisse der Messung sind in Abbildung 4.29 A dargestellt. Die gestrichelte Linie stellt die Ursprungsgerade dar, bei der der gemessene Wert dem Referenzwert entspricht. Die Werte, die für die Schwerwasser-Standards mit der pH-Elektrode gemessen wurden, lagen im Mittel 0,478 Einheiten unter dem angegebenen pD-Wert. Diese Abweichung liegt nahe am in der Literatur beschriebenen Korrekturfaktor von 0,4 und ist daher plausibel [171]. Wurden die pH-Standards an der pD-Elektrode vermessen, ergab sich im Mittel eine Abweichung von + 0,415 Einheiten. Dass die Werte jeweils um ungefähr den gleichen Betrag nach oben beziehungsweise nach unten abweichen, spricht für eine zuverlässige Messung des pD-Wertes an der pD-Elektrode. Diese Elektrode wurde im Folgenden zur Einstellung des pD-Wertes aller Schwerwasser-Puffer verwendet.

Um zu überprüfen, ob das schwere Wasser einen unspezifischen Einfluss auf die Hefezellen und

die Aufnahme im ^{14}C -Substrat-Transportassay hatte, wurde die AQP9-vermittelte Glycerolaufnahme in leichtem und in schwerem Wasser gemessen (siehe Abbildung 4.29 B). Da bei der Glycerolaufnahme über AQP9 keine Protonen am Mechanismus teilnehmen, wurde erwartet, dass der Austausch des Lösungsmittels keinen spezifischen Effekt verursacht. Die Aufnahme stieg zunächst exponentiell an und erreicht ein Plateau. Die Kurvenform und die Lage des Äquilibrium war unabhängig vom verwendeten Lösungsmittel. Daher ist nicht davon auszugehen, dass D_2O im Rahmen des Assays einen unspezifischen Einfluss auf die Messwerte hat. Folglich konnten mögliche beobachtete Unterschiede in der Aufnahme in anderen Experimenten, die bei einem Wechsel des Lösungsmittels beobachtet wurden, spezifisch auf einen Isotopeneffekt im Transportprozess zurückgeführt werden.

Schwerwasser-Effekt der Aufnahme von Milchsäure über AQP9

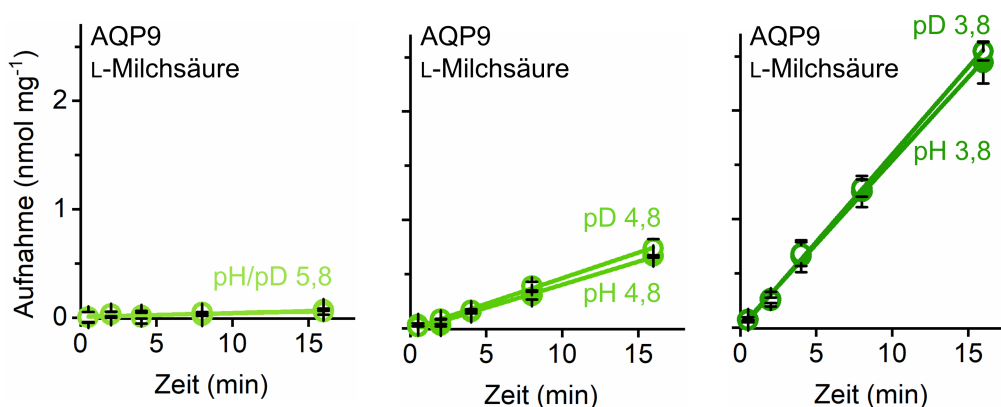


Abbildung 4.30: **Aufnahme von Milchsäure über AQP9 in leichtem und schwerem Wasser.** Es wurde je 1 mM L-Laktat zur Lösung zugesetzt. Die Aufnahme wurde beim angegebenen pH (geschlossene Symbole) und beim angegebenen pD (offene Symbole) gemessen. Fehler geben Standardabweichung der technischen Replikate (pH/pD 5,8; $N = 1$) oder S.E.M. (pH/pD 4,8 und 3,8; $N = 2$) an.

Im Folgenden wurde auch die AQP9-vermittelte Milchsäureaufnahme in leichtem und in schwerem Wasser untersucht (siehe Abbildung 4.30). Wie in Abschnitt 4.4.1 beschrieben, folgte die Aufnahme über die Zeit einem linearen Verlauf. Mit sinkendem pH-Wert wurde die Steigung der Geraden größer. Die Aufnahme, die in schwerem Wasser gemessen wurde, war geringfügig höher als in leichtem Wasser, obwohl die Konzentrationen an Deuteronen und Protonen in beiden Puffern identisch war.

Einige funktionelle Gruppen, wie zum Beispiel Carboxylate, bilden zu Deuteronen stabilere Bindungen aus als zu Protonen. Daher sind Carbonsäuren in schwerem Wasser weniger sauer als in leichtem Wasser. Das Ausmaß, in dem sich pK_S -Werte in schwerem Wasser verschieben, ist spezifisch für einige funktionelle Gruppen. Im Falle der Carbonsäuren sind die pK_S -Werte um ungefähr 0,4 Einheiten nach oben verschoben [175]. Da also in schwerem Wasser bei identischer Protonen- beziehungsweise Deuteronen-Konzentration ein höherer Anteil der Moleküle protoniert vorliegt, ist es grundsätzlich

4.7 Protonierungsreaktionen in durch MCT1 vermitteltem Transport

plausibel, dass die Aufnahme von L-Milchsäure in schwerem Wasser höher ist als in leichtem Wasser. Aufgrund der Verschiebung der pK_S -Werte in D_2O liegt bei einem pD von 3,8 ungefähr 1,4-mal so viel L-Milchsäure vor wie bei einem pH von 3,8. Die Steigung der Geraden in D_2O ist jedoch nur ungefähr 1,05-mal so groß wie die der Geraden in H_2O (D_2O : $(0,1613 \pm 0,0035) \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$; H_2O : $(0,1539 \pm 0,0032) \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$). In D_2O liegt mehr L-Milchsäure vor. Diese kann jedoch im Vergleich zum Anion kaum elektrostatisch auf der Oberfläche von AQP9 angezogen werden [39]. Da so weniger L-Laktat am Eingang des Kanals angereichert und spezifisch dort zu L-Milchsäure protoniert wird, könnte dies die Beobachtung erklären.

Schwerwasser-Effekt des Laktattransportes über MCT1 und MCT1 K38M

Nach der Etablierung des Messsystems wurde der Transport über MCT1 und MCT1 K38M in beiden Lösungsmitteln bestimmt und verglichen, um die Anzahl der Protonierungsschritte im Transportmechanismus und um Hinweise auf die Identität von protonierbaren Positionen zu erhalten. Dafür wurde auch mit diesen Membranproteinen die Aufnahme von L-Laktat über MCT1 und MCT1 K38M bei verschiedenen pH/pD-Werten in H_2O und D_2O bestimmt.

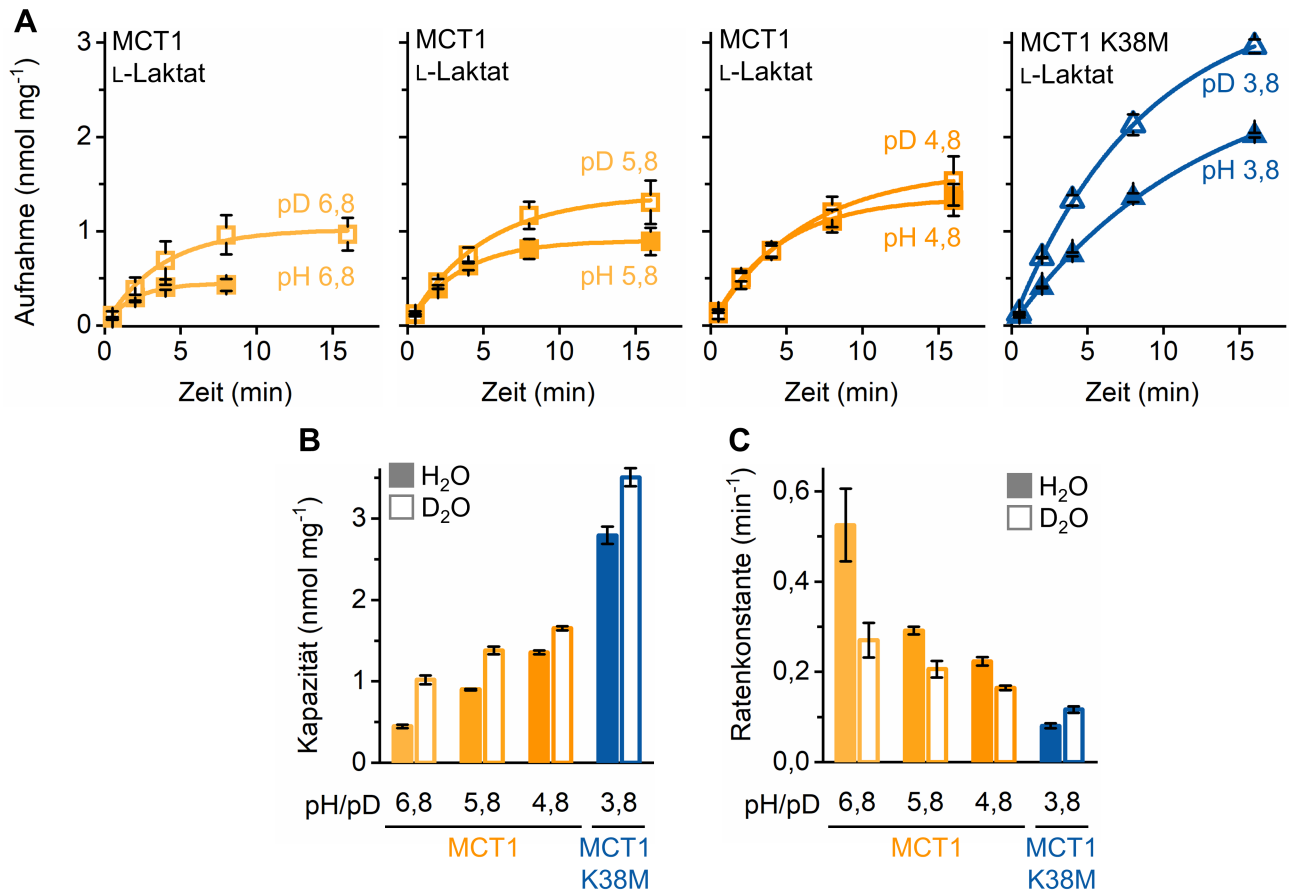


Abbildung 4.31: **Aufnahme von Laktat über MCT1 und MCT1 K38M in leichtem und schwerem Wasser.** A: Gemessen wurde die Aufnahme von 1 mM L-Laktat beim angegebenen pH (geschlossene Symbole) und pD (offene Symbole). Fehler geben S.E.M. an (N = 2). B, C: Aus den Kurven aus A abgeleitete Grenzwerte und Ratenkonstanten der Kurvenfits. Ausgefüllte Balken geben den Wert bestimmt in H₂O an, weiße Balken den Wert bestimmt in D₂O. Fehler geben den Standardfehler des Kurvenfits an.

Bei einem pH/pD-Wert von 6,8 (siehe Abbildung 4.31 A links) wurde in schwerem Wasser (offene Symbole) eine höhere Aufnahme gemessen. Im Äquilibrium des Transportes wurde im Vergleich zum leichten Wasser (geschlossene Symbole) doppelt so viel L-Laktat aufgenommen (D₂O: (1,0 ± 0,1) nmol mg⁻¹; H₂O: (0,45 ± 0,02) nmol mg⁻¹). Bei einem niedrigeren pH/pD-Wert von 5,8 wurde dieser Effekt ebenfalls beobachtet, wenn auch weniger stark ausgeprägt (siehe Abbildung 4.31 A Mitte links). Insgesamt erreichten beide Aufnahmekurven ein etwas höheres Plateau als im Neutralen. Gemessen in einem Puffer mit pH/pD von 4,8 wurde die Aufnahme noch höher (siehe Abbildung 4.31 A Mitte rechts, D₂O: (1,7 ± 0,1) nmol mg⁻¹; H₂O: (1,4 ± 0,1) nmol mg⁻¹). Hier war die Aufnahme in leichtem Wasser fast so groß wie die in schwerem Wasser. Auch für den Transport über die K38M-Mutante, gemessen bei einem pH/pD von 3,8, wurde eine höhere Aufnahme in schwerem Wasser bestimmt (siehe Abbildung 4.31 A rechts).

In Abbildung 4.31 B sind die Kapazitäten des Transportes jeweils in beiden Lösungsmitteln für alle oben genannten Messbedingungen aufgeführt. Die Kapazität lässt sich aus den Kurven direkt als Höhe des Plateaus, also dem Grenzwert des Kurvenfits, ablesen. Für alle Messbedingungen war die

4.7 Protonierungsreaktionen in durch MCT1 vermitteltem Transport

Aufnahme in schwerem Wasser (weißer Balken) höher als die Aufnahme in leichtem Wasser (ausgefüllter Balken). Aus dem Kurvenfit kann auch die Ratenkonstante des Transportes bestimmt werden (siehe Abbildung 4.31 C). Die Ratenkonstante beschreibt die Steilheit der Kurve unabhängig von der Plateauhöhe. Je höher die Ratenkonstante ist, desto früher erreicht die Kurve das Plateau. Bei allen getesteten Messbedingungen waren die Ratenkonstanten für den Transport über den Wildtyp größer in leichtem als in schwerem Wasser. Für die K38M-Mutante ergab sich ein anderes Bild: Hier war die Ratenkonstante in schwerem Wasser größer.

Die Isotopeneffekte von Ratenkonstante und Äquilibrium werden meist als Verhältnis dargestellt [167]. Dafür werden die Werte, die in leichtem Wasser erhalten wurden, durch die Werte in schwerem Wasser dividiert. Ist das Verhältnis größer als 1, wird der beobachtete Effekt als normaler Isotopeneffekt bezeichnet, bei einem Verhältnis kleiner als 1 als inverser Isotopeneffekt.

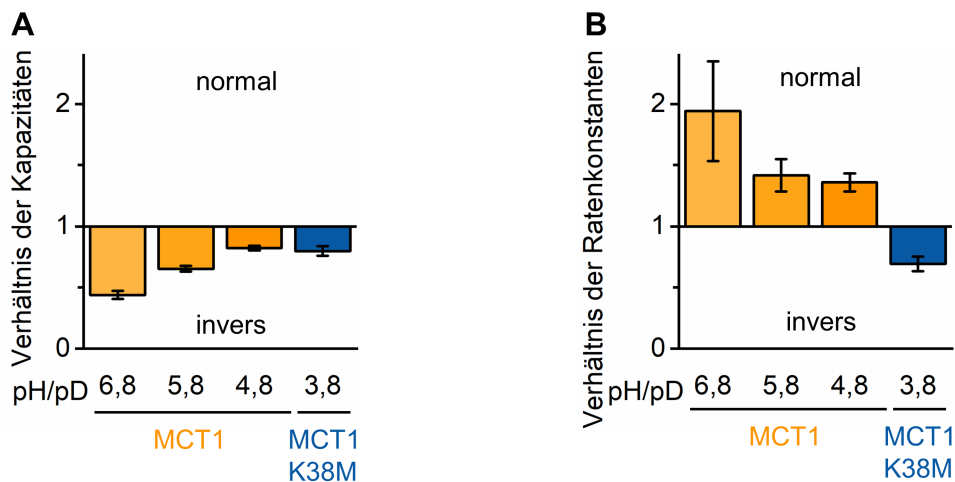


Abbildung 4.32: **Verhältnis von Kapazitäten und Ratenkonstanten bestimmt in leichtem Wasser zu denen in schwerem Wasser.** A: Das Verhältnis der Kapazitäten aus Abbildung 4.31 B ist für alle Messbedingungen kleiner als 1, daher liegt ein inverser Isotopeneffekt vor. B: Im Gegensatz dazu ist das Verhältnis der Ratenkonstanten aus Abbildung 4.31 C für MCT1 und die K38M-Mutante unterschiedlich: für MCT1 sind die Werte größer als 1, was einem normalen Isotopeneffekt entspricht, und für die K38M-Mutante jedoch kleiner als 1 (inverser Isotopeneffekt).

Die Verhältnisse der Kapazitäten, der jeweiligen Lage des Äquilibriums, sind in Abbildung 4.32 A dargestellt. Für alle Messbedingungen ist das Verhältnis kleiner als 1, also lag ein inverser Äquilibriums-Isotopeneffekt vor. Vom Neutralen zum Sauren hin wurde das Ausmaß dieses Effektes kleiner. Für das Verhältnis der Ratenkonstanten ergab sich ein anderes Bild (siehe Abbildung 4.32 B). Der Transport über den Wildtyp unterlag einem normalen kinetischen Isotopeneffekt. Für alle Messbedingungen war das Verhältnis größer als 1. Wurde jedoch die Aufnahme über die K38M-Mutante gemessen, so lag ein inverser kinetischer Isotopeneffekt vor. Dies deutet darauf hin, dass sich die Anzahl und/oder die Art der Protonierungsreaktionen in Wildtyp und K38M-Mutante deutlich unterscheiden.

An den stets höheren Plateaus in D₂O ist abzulesen, dass Deuteronen ein besseres Substrat für MCT1 darstellen als Protonen. Wie bereits in Abschnitt 1.3 erläutert, können Protonen und

Deuteronen aufgrund ihrer hohen Ladungsdichte nur an eine andere funktionelle Gruppe gebunden transportiert werden. Daher ist es wahrscheinlich, dass der bevorzugte Transport von Deuteronen durch eine stärkere Bindung an diese funktionelle Gruppe verursacht wird. Das Ausmaß, in dem Deuteronen mehr als Protonen transportiert werden, konnte in dieser Arbeit quantitativ bestimmt werden und ist in den Verhältnissen der Kapazitäten in Abbildung 4.32 A dargestellt. Aus diesem Wert kann jedoch nicht ohne weitere theoretische Überlegungen auf eine funktionelle Gruppe zurückgeschlossen werden.

Aus der Form der pH-abhängigen Transportrate und aus den Daten zum kinetischen Schwerwassereffekt geht hervor, dass sich die Protonierungsreaktionen im Transportmechanismus von MCT1 und MCT1 K38M unterscheiden.

5 | Diskussion

In dieser Arbeit wurden das humane MCT1 und das humane MCT12 in *S. cerevisiae* heterolog exprimiert. Für MCT1 konnten verschiedene Funktionsdaten aufgenommen werden. Aus diesen Daten können Rückschlüsse auf die Vorgänge innerhalb der Bindetasche gezogen werden. Die Expression von MCT12 in diesem Expressionssystem konnte im Rahmen dieser Arbeit gesteigert werden (siehe Kapitel 4.1).

5.1 Eignung von *S. cerevisiae* für die Charakterisierung von MCT1 und MCT12

Das Expressionssystem *S. cerevisiae* war für die gewählten Experimente sehr gut geeignet. Beide Transportproteine konnten exprimiert werden. Für MCT1 konnte Transport über die Zellmembran der Hefen nachgewiesen werden. Dabei sind es verschiedene Eigenschaften von *S. cerevisiae*, die die umfangreiche Charakterisierung von MCT1 ermöglicht haben.

S. cerevisiae war der erste eukaryotische Organismus, dessen Genom in den 1990er-Jahren vollständig sequenziert wurde [176]. Die Charakterisierung des Organismus ermöglichte es, Zelllinien mit *knock-outs* einzelner Gene zu generieren. In dieser Arbeit wurden Zellen gewählt, die die endogenen Monocarboxylattransporter *jen1* und *ady2* nicht exprimieren [152, 153]. Da diese Transporter in der Zellmembran fehlen, war die Aufnahme von L-Laktat, Acetat und Propionat, die nicht durch heterolog exprimierte Transporter vermittelt wurde, niedrig. Deswegen wurde *S. cerevisiae* in der Vergangenheit erfolgreich zur Charakterisierung des Transportes über FNT [55, 177], MCT1 [123] und Fusionsproteinen von MCT1 mit Basigin [60] eingesetzt. Insbesondere der Versuchsaufbau des ^{14}C -Substrat-Transportassays erlaubt vielfältige Variationen der Versuchsbedingungen, wie zum Beispiel der Temperatur, der Richtung des Substratgradienten und des pH-Wertes des Messpuffers.

Aufgrund der hohen Lipophilie von Essigsäure und Propionsäure können diese Moleküle die Zellmembran der Hefen auch ohne Transporter passieren [38]. Daher waren zuverlässige Messungen der Aufnahme von Acetat und Propionat nur im neutralen Milieu möglich. Im Gegensatz dazu war die Aufnahme von L-Milchsäure über die Membran niedrig. Ferner weist *S. cerevisiae* eine hohe pH-Toleranz auf [178]. Aus diesen beiden Gründen konnte die Aufnahme über MCT1 und verschiedene Mutanten bei einem extrazellulären pH-Bereich von 2,3 bis 8,3 bestimmt werden. Es ist davon auszugehen, dass der intrazelluläre pH-Wert der Hefe über den gesamten Messbereich hinweg deutlich höher ist als der des extrazellulären Puffers. Poznanski *et al.* (2013) führten eine pH-Titration des Zytosols von *S. cerevisiae* durch und bestimmten einen pK_S -Wert von $6,59 \pm 0,03$ und eine Pufferka-

5.1 Eignung von *S. cerevisiae* für die Charakterisierung von MCT1 und MCT12

pazität von (41 ± 2) mM. Diese Pufferkapazität liegt deutlich höher als die im Assay aufgenommenen Substratmengen. Die höchste gemessene Aufnahme in dieser Arbeit beträgt $2,96 \text{ nmol mg}^{-1}$ (MCT1 K38M; pD 3,8; 16 min, siehe Abbildung 4.31 A). Diese Aufnahme von L-Laktat und Protonen kann über die bestimmte Glycerolaufnahme von AQP9 in eine intrazelluläre Konzentration umgerechnet werden. Da die Glycerolaufnahme allein diffusionsgetrieben und damit äquilibrierend ist, kann aus den Daten aus Abbildung 4.13 B abgelesen werden, dass eine Aufnahme von $0,53 \text{ nmol mg}^{-1}$ einer intrazellulären Konzentration von 1 mM entspricht. Folglich betrug die höchste gemessene Aufnahme von L-Laktat und Protonen in dieser Arbeit ungefähr einer intrazellulären Konzentration von jeweils 5,6 mM. Damit ist die Pufferkapazität des Hefezytosols mehr als zehnmal größer als die maximal über Membranproteine aufgenommene Konzentration an Protonen.

Die Stabilität des pH-Wertes des Hefezytosols wurde darüber hinaus auch experimentell in weiteren Publikationen bestimmt und beschrieben. Bei einem extrazellulären pH-Wert von 3,5 bis 6,5 blieb der pH-Wert des Zytosols konstant zwischen pH 6 und 7 [150]. Auch im stark sauren Milieu bei pH 2 fiel der intrazelluläre pH-Wert nicht unter 5,8 [151]. Dies deutet darauf hin, dass die Abweichungen der intrazellulären Protonenkonzentration bei allen Messbedingungen in dieser Arbeit vernachlässigbar waren. Daher ist davon auszugehen, dass der intrazelluläre pH-Wert bei den durchgeführten Messungen ungefähr neutral war. Die durchgeführten Experimente lassen insgesamt konkrete Rückschlüsse auf den einwärts gerichteten Transportmechanismus zu. Die Stabilität des intrazellulären pH-Wertes bedeutet auch, dass der pH-Wert auf der intrazellulären Seite der Membran für eine Messung nicht gezielt verändert werden kann. Sollen, zum Beispiel für die Charakterisierung des Transportes in die andere Richtung, Messungen bei einem anderen intrazellulären pH-Wert durchgeführt werden, müsste hier auf ein anderes Messsystem wie Liposomen zurückgegriffen werden.

Die Bestimmung der Transportaktivität bei verschiedenen pH-Werten ist essentiell, um den Transportmechanismus eines Protonen-Cotransporters zu untersuchen. So konnte in dieser Arbeit der Einfluss des Protonierungsstatus der beiden Reaktionspartner auf den Transport untersucht werden: der Aminosäureseitenketten des untersuchten Proteins einerseits und der des Substrates andererseits. Die Messungen zur pH-Abhängigkeit des Transportes in dieser Arbeit zeichnen sich außerdem durch eine besonders hohe Auflösung aus. Diese hohe Dichte der Messwerte war notwendig, um die pH-Abhängigkeit zu beschreiben und die Anzahl an Protonenbindestellen zu identifizieren. Die publizierten Daten zu MCT1 im Expressionssystem *S. cerevisiae* haben dazu eine zu geringe Auflösung [133].

Da die bisher publizierten Messwerte zur pH-Abhängigkeit des Transportes über MCT auf den Bereich von pH 4 bis 8 beschränkt sind, können die Protonierungen von Carbonsäuren, die einen pH kleiner 4 erfordern, dort nicht abgebildet werden [66, 96, 126, 127, 131, 132]. Ferner wurden diese Messwerte ausschließlich in *Xenopus*-Oozyten aufgenommen, in denen MCT1 für das *trafficking* auf Basigin angewiesen ist [10]. Da die Assoziation von MCT1 mit Basigin auch in menschlichen Zellen nachgewiesen wurde, sind diese Daten zur pH-Abhängigkeit physiologisch relevant [159]. Die Asso-

ziation mit Basigin kann jedoch die Transporteigenschaften von MCT auch jenseits des *traffickings* verändern [60]. Nathan Epalle, wissenschaftlicher Mitarbeiter am Pharmazeutischen Institut der CAU Kiel, konnte insbesondere zeigen, dass die Fusion mit Basigin auch die pH-Abhängigkeit des durch MCT1 vermittelten Transportes verändert (unpublizierte Korrespondenz, siehe Abbildung 5.1). Bestimmt man die pH-Abhängigkeit des Transportes von einem Fusionsprotein aus MCT1 und Basigin Ig-I, so verschieben sich die Werte. Die Wendepunkte der beiden sigmoidalen Einzelkurven sind im Vergleich zu denen des Transporters alleine zu höheren pH-Werten hin verschoben. Die beiden Einzelkurven sind dadurch deutlich schwieriger zu erkennen. Wird also die pH-Abhängigkeit von MCT1 in Gegenwart von Basigin gemessen, erfordert dies eine besonders hohe Auflösung der Messwerte, damit die beiden Einzelkurven zu erkennen sind. Da die Auflösung der Messwerte, die in der Literatur zu finden sind, deutlich geringer ist, wurde hier meist von pH 5 bis pH 8 einfach sigmoidal [63, 66, 126, 127] oder exponentiell [131] gefittet oder aber die Messpunkte nur verbunden [96, 109, 132].

Die Kurve des MCT1 alleine erlaubt jedoch einen direkten Einblick in den Transportprozess, ohne dass zusätzliche Effekte des Basigins die Kurve überlagern. So konnten in dieser Arbeit die pH_{50} -Werte der Titrationskurve und damit auch die pK_S -Werte der protonierbaren Positionen in MCT1 bestimmt werden. In Gegenwart von Basigin sind diese Werte verschoben, was die Identifizierung der beiden Wendepunkte und die Zuordnung der verschobenen pK_S -Werte zu den funktionellen Gruppen erschwert. Um den Mechanismus zu untersuchen, der innerhalb von MCT1 abläuft, ist daher die Expression ohne Basigin vorzuziehen.

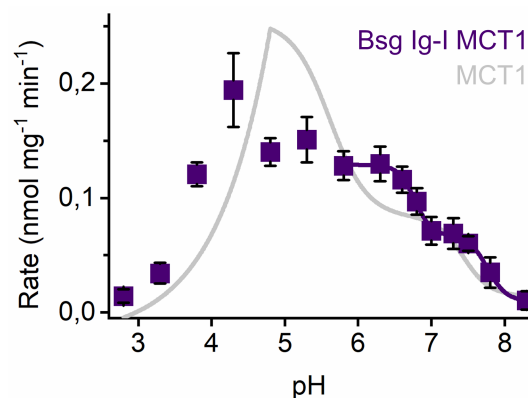


Abbildung 5.1: **pH-Abhängigkeit des Fusionsproteins aus Basigin Ig-I und MCT1, gemessen von Nathan Epalle.** Die pH-Abhängigkeit des Fusionsproduktes ist in Violett angegeben. Der Kurvenfit des Transporters alleine ist zum Vergleich als graue Linie eingezeichnet. Die Fusion mit Basigin verschiebt die pH-Abhängigkeit des Transportes. Die beiden Wendepunkte der sigmoidalen Einzelkurven liegen dadurch dichter zusammen und sind schwerer aufzulösen. Die L-Laktatkonzentration betrug 1 mM, die Aufnahmezeit 2 min. Fehler stellen S.E.M. dar (N = 4).

Im Gegensatz zu den genannten Beispielen konnte in dieser Arbeit für MCT12 keine Aktivität gemessen werden. Da Takahashi *et al.* (2020) zwar keinen Influx, dafür aber Efflux über diesen Transporter messen konnten, wurde auch in dieser Arbeit zusätzlich der Efflux über MCT12 gemessen [115]. Im Aufnahmeassay mit Radiolabel konnte in dieser Arbeit kein Unterschied zwischen

5.2 Eignung von *S. cerevisiae* für die Charakterisierung von MCT1 und MCT12

exprimierenden und nicht-exprimierenden Zellen beobachtet werden. Für diese Beobachtung sind mindestens zwei verschiedene Ursachen denkbar:

Zum Einen erfordert eine Messung des Effluxes eine ausreichende Beladung der Zellen. Da MCT12 in diesem Expressionssystem keinen Influx vermittelte und die Hintergrund-Aufnahme der Zellen gering war, könnte die Beladung der Zellen nicht groß genug gewesen sein, um einen messbaren Unterschied zwischen Hintergrund und Transporter zu provozieren. Hier könnte eine Co-Expression mit einem weiteren Kreatin-Transporter, wie dem *creatine transporter 1* (CRT1), der in Takahashi *et al.* 2020 verwendet wurde, die Kreatin-Menge in den Zellen ausreichend erhöhen und so den Efflux messbar machen.

Zum Anderen könnte das Protein nicht vollständig synthetisiert und in die Membran integriert worden sein. Dafür spricht, dass im Western Blot keine Signale mit dem Anti-His₅-Primärantikörper detektiert wurden. Da sich der His-tag am C-terminalen Ende des Proteins befindet, ist dies ein Hinweis auf eine unvollständige Transkription oder Translation des Proteins. In dieser Arbeit konnte die Expression von MCT12 durch die Optimierung eines Teils der DNA-Sequenz und durch die Variation der Kulturbedingungen gesteigert werden. Dies weist ebenfalls darauf hin, dass sich gerade hier in der Expression der limitierende Schritt befindet.

Der Anti-HA-Primärantikörper ist gegen einen tag gerichtet, der sich am N-Terminus des Proteins befindet. Mit diesem wurden Signale für MCT12 detektiert. Diese waren jedoch auf viele verschiedene Proteingrößen verteilt, die meist deutlich kleiner waren, als für das vollständige Protein zu erwarten war. Es wurde gezeigt, dass diese kleineren Proteinfragmente nicht durch Proteasen der Hefezellen während des Zellaufschlusses verursacht werden und dass es sich nicht um unspezifische Banden handelt. Im Gegensatz zu MCT12 zeigt das funktionale MCT1 typischerweise nur eine einzige Fragmentbande im Western Blot. Die Größe dieses MCT1-Fragmentes von 25 kDa und die Sichtbarkeit dieses Fragments mit dem Anti-His₅-Antikörper deuten darauf hin, dass es der große intrazelluläre loop zwischen den TM 6 und 7 ist, an dem MCT1 nach der Translation in zwei Teile zerfällt. Zusammengefasst deuten die Daten aus dem Western Blot darauf hin, dass es im MCT12 im Gegensatz zum MCT1 mehrere Positionen gibt, die die Transkription oder Translation frühzeitig beenden.

Für MCT1 und MCT12 wurden für die Expression in *S. cerevisiae* die menschlichen DNA-Sequenzen verwendet. Diese könnten für die Expression in der Hefe jedoch nicht gut geeignet sein. Im Falle von MCT1 ist die Produktion von funktionellem Protein zwar ausreichend, die Sequenz von MCT12 enthält aber zu viele ungünstige Merkmale und erlaubt nicht die Expression von funktionellem Protein. Hier könnte eine Anpassung auf den Hefeorganismus, zum Beispiel hinsichtlich der verwendeten Codons, und die weitere Optimierung der Kulturbedingungen die Expression erhöhen und so MCT12 einer Charakterisierung im Hefesystem zugänglich machen.

5.2 Der Transportmechanismus erfordert Beweglichkeit des Proteins

Dass die Translokation von MCT1 nach einem *rocker-switch*-Mechanismus abläuft, wurde aufgrund der Verwandtschaft zu anderen Proteinen der MFS schon lange vermutet [95]. Die publizierten Strukturen von MCT1 in der *inward*- und *outward-open*-Konformation unterstützen diese Annahme [62]. Die beiden Hälften des Proteins, TM 1-6 und TM 7-12, müssen folglich eine Kippbewegung durchführen können, um die Substratbindestelle alternierend auf beiden Seiten der Membran zugänglich zu machen. Cystein 159 befindet sich dabei in der *outward-open*-Konformation zwischen den beiden Proteinhälften an einer Engstelle (siehe auch Abbildung 5.2, die Oberflächen von TM 1-6 sind grün, von TM 7-12 türkis eingefärbt; die Oberfläche von Cystein 159 ist in Orange dargestellt).

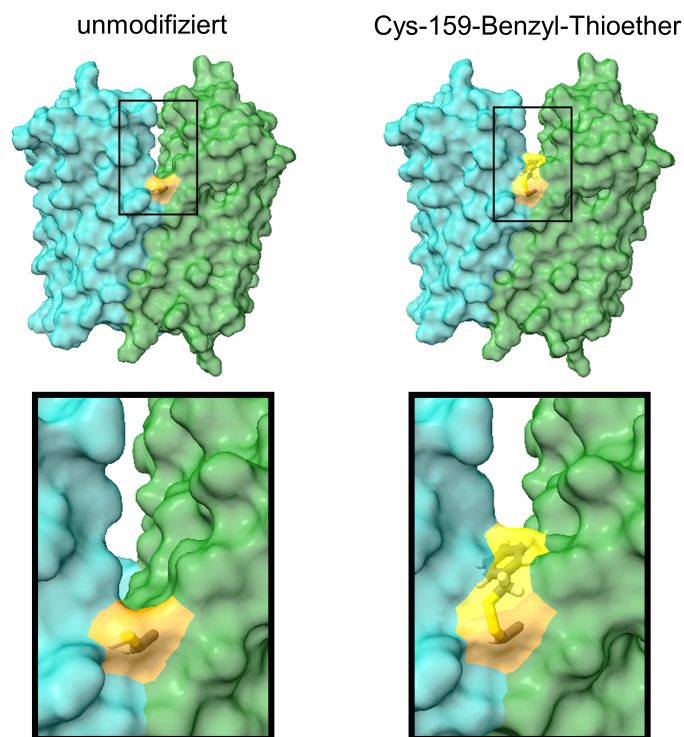


Abbildung 5.2: **BMTS überträgt einen Benzyl-Thioether auf Cystein 159 und schränkt so die Beweglichkeit der beiden Transporterhälften ein.** In die Struktur von MCT1 (PDB ID #6LZ0) wurde im rechten Bild mithilfe von ChimeraX der Benzyl-Thioether an Cystein 159 angefügt, sodass keine Kollisionen mit anderen Atomen der Struktur detektiert wurden. Die Oberfläche der TM 1-6 sind Grün, die von TM 7-12 in Türkis und die von Cystein 159 in Orange eingefärbt. Die zusätzliche Oberfläche durch die übertragene Gruppe ist in Gelb eingezeichnet und verringert deutlich den Platz in der Engstelle zwischen den Proteinhälften.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Modifikation mit einem Propyl- oder Benzyl-Thioether an diesem Cystein 159 den Transport hemmt. Diese Hemmung beruht wahrscheinlich darauf, dass die Beweglichkeit der beiden Proteinhälften in dieser Engstelle eingeschränkt wird. Dabei liegt die auf den Cysteinrest übertragene Gruppe wie ein Keil zwischen den beiden Transporterhälften (siehe

5.2 Der Transportmechanismus erfordert Beweglichkeit des Proteins

Abbildung 5.2 in Gelb für den Benzyl-Thioether). Dieser Keil beeinträchtigt die Kippbewegung der Proteinhälften, erschwert die Translokation und hemmt so den Transport. Somit deutet auch die Inhibition durch Cysteinmodifikatoren auf eine Translokation nach dem *rocker-switch*-Mechanismus hin.

Die Inhibition durch PMTS und BMTS beruht dabei nicht allein auf der Wirkung an Cystein 159, sondern es sind wahrscheinlich weitere Cysteine an der Hemmung beteiligt (siehe Abbildung 4.12). Dass die Selektivität für Cystein 159 sich zwischen den beiden Inhibitoren nicht unterscheidet, deutet darauf hin, dass diese Cysteine für beide Moleküle gut zugänglich sind. Die starke Inhibition von MCT1 durch *p*CMBS erfolgt ausschließlich über die Bindung an Cystein 159 [123]. Das kleinere MMTS hingegen kann zwar den Transport nicht vollständig hemmen, entfaltet seine Wirkung jedoch auch über die Modifikation weiterer Cysteine im Protein [123]. Diese weiteren Cysteine sind wahrscheinlich auch für PMTS und BMTS zugänglich, schließen aber *p*CMBS aus.

Ein weiterer Hinweis darauf, dass die Translokation mit großen Konformationsänderungen einhergeht, ist der biphasische Verlauf der Aktivierungsenergie im Arrhenius-Plot (siehe Kapitel 4.5 und Abbildung 4.20). Ein derartiger Verlauf wurde bereits für MCT1 und auch für andere Transportproteine beschrieben [163, 164, 165]. Die Temperatur, oberhalb derer sich die Aktivierungsenergie verringert, wird dabei für MCT1 mit 19 °C angegeben [163, 164]. Da in dieser Arbeit die Werte nur bis 24,5 °C bestimmt wurden, kann hier kein Schnittpunkt der Geraden interpoliert werden. Basierend auf den Messwerten liegt dieser Schnittpunkt jedoch auch im verwendeten Expressionssystem nahe bei 19 °C. Dass sich die Aktivierungsenergie bei höheren Temperaturen verringert kann durch verschiedene Mechanismen bedingt sein, wie eine temperaturabhängige Veränderung des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes, eine temperaturabhängige Substrataffinität oder der Einfluss von Phasenübergängen der Lipide in der Membran [164, 165].

Der in dieser Arbeit bestimmte Wert für die Aktivierungsenergie von $(126 \pm 5) \text{ kJ mol}^{-1}$ für MCT1 liegt im Bereich der Literaturangaben ([163]: 159 kJ mol^{-1} ; [164]: $109,2 \text{ kJ mol}^{-1}$). Die Aktivierungsenergie von MCT1 vermitteltem Transport sinkt oberhalb von 19 °C auf 92 kJ mol^{-1} [163] beziehungsweise 60 kJ mol^{-1} [164]. Damit ist die Aktivierungsenergie von MCT1 vermitteltem Transport bei höheren Temperaturen erwartungsgemäß niedriger als die der Permeation von Ionen durch die Membran (ungefähr 250 kJ mol^{-1} [161]) und höher als die Aktivierungsenergie der Aufnahme von Ionen durch einen Kanal (ungefähr 20 kJ mol^{-1} [161]). Die besonders hohe Aktivierungsenergie bei niedrigen Temperaturen deutet darauf hin, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt mit großen Konformationsänderungen einhergeht [165].

Zusammengefasst deuten die für die Aktivierungsenergie beobachteten Phänomene darauf hin, dass die Translokation mit einer großen Bewegung innerhalb des Transporters einhergeht, wie er für *rocker-switch*-Mechanismen typisch ist. Auch die Beobachtung, dass eine Modifizierung der Scharnierregion um Cystein 159 den Transport hemmt, spricht für einen derartigen Mechanismus.

5.3 MCT1 selektiert Substrate auf De-/Protonierbarkeit

Die Messwerte, die in dieser Arbeit erhoben wurden, lassen nicht nur Rückschlüsse auf den globalen Translokationsmechanismus zu, sondern auch auf die Vorgänge innerhalb der Bindetasche. Dort selektieren MCT1 und auch die K38M-Mutante das Substrat auf die De- beziehungsweise Protonierbarkeit. Dies geht aus den Messungen des zeitabhängigen Transportes und dem Substratspektrum hervor.

5.3.1 Direktionalität des Transportes

Aquaporine sind Kanäle und ermöglichen damit die Substratbewegung nur entlang eines Konzentrationsgradienten. Je nach Ausrichtung des Konzentrationsgradienten können sich die Moleküle in beiden Richtungen durch das Protein bewegen [179], [180]. Für die Aufnahmekurve bedeutet dies, dass sie einem exponentiellen Verlauf zu einem Maximum hin folgt: Bei Zugabe des Substrates zeigt der Konzentrationsgradient der Moleküle steil ins Zellinnere. Dieser Gradient verringert sich jedoch über die Aufnahmezeit, da sich die Konzentrationen angleichen. Im Äquilibrium ist die Konzentration an Substratmolekülen auf beiden Seiten der Membran identisch und es liegt kein Gradient mehr vor. Die Substratbewegung über den Kanal findet hier immer noch statt, jedoch in beide Richtungen mit der gleichen Geschwindigkeit. Der Aufnahmemechanismus ist äquilibrierend. Die Veränderung des Transportflusses über die Zeit ist in Abbildung 5.3 links dargestellt.

In dieser Arbeit wurde die zeitabhängige Glycerolaufnahme betrachtet. Bei Glycerol handelt es sich um ein Neutralteilchen, das ungeladen und nicht protonierbar oder deprotonierbar ist. Die Aufnahme folgte dem erwarteten Verlauf und war weitgehend pH-unabhängig. Da die Glycerolaufnahme über AQP9 äquilibrierend ist, wurde so außerdem die Aufnahme bestimmt, die einer intrazellulären Konzentration von 1 mM Substrat entsprach.

Die zeitabhängige Aufnahme von L-Milchsäure über AQP9 folgte nicht der Kurvenform, sondern einem linearen Verlauf. Für die Messung wurde extrazellulär ein pH-Wert bis zu 3,8 eingestellt. Wie erläutert ist davon auszugehen, dass der pH-Wert innerhalb der Hefezelle zwischen pH 6 und 7 und neutral blieb. Die über AQP9 aufgenommene L-Milchsäure dissoziiert daher sofort beim Eintritt in das Hefe-Zytosol zu Protonen und L-Laktat. Da L-Laktat kein Substrat für AQP9 darstellt und die Protonen im zytosolischen Puffer gebunden werden, bleibt der Gradient an L-Milchsäure über die gesamte Messzeit von 16 min identisch hoch und die resultierende zeitabhängige Aufnahme entspricht einer Geraden (siehe auch in Abbildung 5.3 rechts). Dabei kommt es zu einer Akkumulation von bis zu 5 mM L-Laktat in der Zelle (Aufnahme 2,5 nmol mg⁻¹; pH 3,8; 16 min, siehe Abbildung 4.14). Dass die Hefezellen einen derartigen Einstrom von L-Laktat und Protonen tolerieren und die Messwerte hier auch am Ende der Messzeit noch dem theoretischen Verlauf sehr gut folgen ($R^2 = 0,998$ für den Fit über die gesamte Messzeit), deutet wieder auf die außerordentliche Robustheit des Messsystems hin.

5.3 MCT1 selektiert Substrate auf De-/Protonierbarkeit

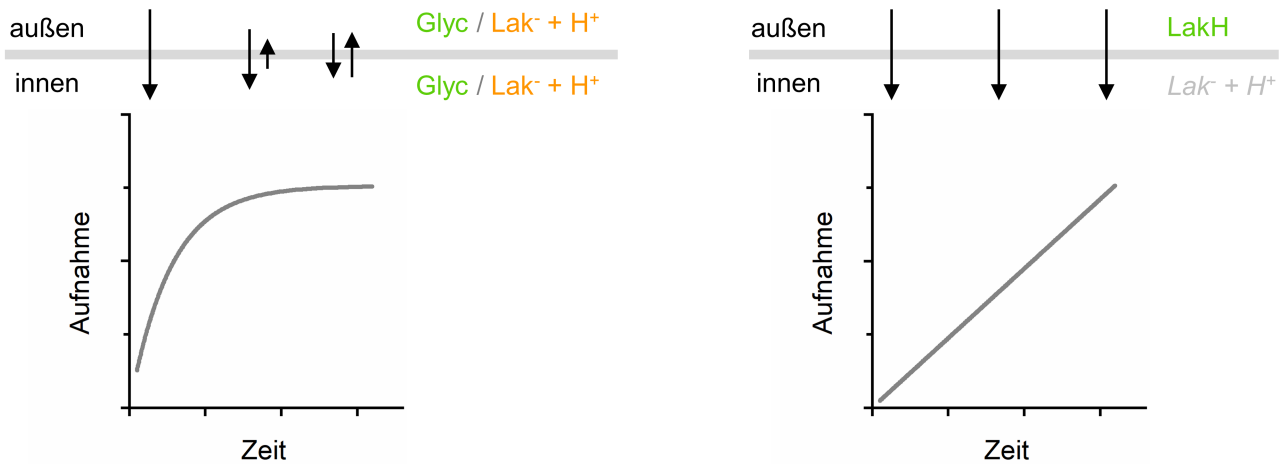


Abbildung 5.3: **Schematische Darstellung der Gradienten bei der Aufnahme von Glycerol, Milchsäure und beim Cotransport von Laktat und Proton.** Die zeitabhängige Aufnahme ist jeweils schematisch dargestellt (grauer Graph). Die vorherrschenden Substratgradienten sind als Pfeile dargestellt. Die Länge des Pfeils symbolisiert dabei die Größe des Gradienten und der graue horizontale Balken die Zellmembran. Da sich die Gradienten bei der Aufnahme von Glycerol und dem Cotransport von L-Laktat und Proton über die Zeit angleichen, verläuft die Kurve exponentiell zu einem Maximum hin. Da die L-Milchsäure (LakH) unter den Messbedingungen nur extrazellulär vorliegt, bleibt der Gradient über die Messzeit gleich hoch und die Aufnahme verläuft linear.

Bei der Aufnahme von L-Milchsäure über AQP9 wird das L-Laktat wie in einer Ionenfalle in der Zelle gefangen und angereichert. Diese Anreicherung erfolgt analog dem Prinzip der *pH-partition hypothesis*. Diese betrachtet streng genommen die Bewegung von Neutralteilchen direkt durch die lipophile Membran hinweg und nicht durch einen Kanal, der ausschließlich von Neutralteilchen passiert werden kann [181]. Die Konsequenzen des pH-Unterschiedes und der selektiven Permeabilität der Membran beziehungsweise des Kanals sind jedoch vergleichbar.

5.3.2 Transport über MCT1 K38M: Säure oder Anion und Proton?

Da die Aufnahme über MCT1 K38M nur bei einem pH-Wert von 4 und niedriger messbar war, könnte es sich bei der Mutante um einen L-Milchsäure-Uniporter handeln. In diesem Fall müsste auch hier das Prinzip der Ionenfalle anwendbar sein und die Aufnahme linear über die Zeit ansteigen. Die Messwerte der zeitabhängigen Aufnahme widersprechen dem jedoch direkt: sowohl über MCT1 als auch über MCT1 K38M folgte die Kurve einem exponentiellen Anstieg auf ein Maximum (siehe Abschnitt 4.4.3). Dies bedeutet, dass der Transport über die beiden untersuchten Transporter bidirektional ist (siehe auch Abbildung 5.3 links). Daher muss es sich auch bei MCT1 K38M um einen L-Laktat-Protonen-Cotransporter handeln, der beide Teilchen separat bindet.

Für die K38M-Mutante konnte außerdem ein Efflux unter den Bedingungen gemessen werden, unter denen ein Influx über den Transporter nicht messbar war (siehe Abbildung 4.18). Dass der Transporter den Efflux aus Hefezellen mit einem pH-Wert zwischen 6 und 7 in ein extrazelluläres Medium mit dem pH-Wert von 6,8 vermittelte, lässt sich mit dem Transport von L-Milchsäure nicht

erklären. Um dieses Phänomen näher zu untersuchen, sollte der Efflux aus den Zellen bei verschiedenen extrazellulären pH-Werten charakterisiert werden. In einem Expressionssystem, das einen sauren intrazellulären pH-Wert zulässt, könnte auch der Einfluss eines auswärts gerichteten Protonengradienten untersucht werden. Diese Experimente könnten so aufklären, ob der Transportmechanismus der K38M-Mutante sich zwischen den beiden Transportrichtungen unterscheidet.

5.3.3 Substratspektrum von MCT1 und MCT1 K38M

In dieser Arbeit wurde der Lichtstreuungsassay von Kanälen auf den Transporter MCT1 übertragen. Außerdem wurden erfolgreich Konkurrenzexperimente im Radioassay durchgeführt. In beiden Assays konnten potenzielle Substrate auch unmarkiert untersucht werden. Während die Konkurrenz nur indirekt auf einen Transport des zugesetzten Moleküls hindeutet, stellt der Lichtstreuungsassay ein direktes Messverfahren dar. Das Signal in Phase 2 der Lichtstreuungskurve unter hypertonen Bedingungen, im Zeitraum ab 20 s innerhalb der Messung, lässt sich direkt auf die Substratmoleküle zurückführen. Während für die getesteten anionischen Verbindungen (Chloracetat, Ethansulfonat) Hinweise auf einen Transport gemessen wurden, werden ungeladene, strukturähnliche Moleküle wahrscheinlich nicht als Substrat akzeptiert (L-Laktamid, Glycerol).

Die Messungen im Lichtstreuungsassay und im Konkurrenzassay zeigen konkret, dass es sich bei Chloracetat um ein Substrat handelt (siehe Abschnitt 4.6). Diese Angabe aus der Literatur konnte in beiden Assays bestätigt werden [164]. Für Ethansulfonat liegen in dieser Arbeit sowohl Argumente für als auch gegen einen Transport über MCT1 vor. Der sehr niedrige pK_S -Wert der Sulfonsäure könnte für die niedrigen Signale und die uneindeutigen Messergebnisse verantwortlich sein. Daher könnte mit Ethansulfonat eine Wiederholung der Messungen bei niedrigeren pH-Werten angebracht sein.

Sowohl bei Glycerol als auch bei L-Laktamid handelt es sich nach den Daten aus dem Lichtstreuungsassay wahrscheinlich nicht um Substrate für MCT1. Für L-Laktamid wurde außerdem gezeigt, dass es die L-Laktat-Aufnahme über MCT1 im radiomarkierten Aufnahmeassay nicht kompetitiv inhibiert. Auch bei einem pH-Wert von 3,8, bei dem L-Laktat und L-Milchsäure zu gleichen Teilen vorliegen, führte der Zusatz von L-Laktamid nicht zu einer kompetitiven Inhibition der L-Laktat-Aufnahme. Da L-Laktamid der L-Milchsäure strukturell sehr ähnlich ist und dabei keinen Einfluss auf den Transport hat, deuten die Messungen insgesamt darauf hin, dass sowohl MCT1 als auch MCT1 K38M lediglich das L-Laktat binden können, nicht die L-Milchsäure. Außerdem scheinen nur einfach negativ geladene und dabei protonierbare Moleküle, wie Chloracetat und Ethansulfonat, transportiert zu werden. Das zwitterionische Prolin und die Neutralteilchen Glycerol und L-Laktamid waren hier vom Transport ausgeschlossen.

Zusammengefasst transportieren sowohl MCT1 als auch MCT1 K38M ausschließlich anionische, protonierbare Substrate. Der Transport ist unter allen getesteten Bedingungen bidirektional.

5.4 Das Anion bindet zwischen Lysin 38 und Arginin 313

Die Position, an der das anionische Substrat innerhalb der Bindetasche des Transporters bindet, kann mithilfe der Messwerte zur Substrataffinität und der pH-Abhängigkeit des Transportes identifiziert werden.

5.4.1 Die Funktion von Arginin 313

Im ^{14}C -Substrat-Aufnahmeassay konnte die Affinität des Substrates unter verschiedenen Messbedingungen bestimmt werden (siehe Abschnitt 4.6.2). Die Substrat-Affinität war unabhängig vom verwendeten Substrat (Acetat, L-Laktat, Propionat) und im Bereich von pH 6,8 und pH 4,8 unabhängig von der Protonenkonzentration. Die Affinität des Substrates für die K38M-Mutante war, gemessen bei einem pH-Wert von 3,8, vergleichbar mit der Affinität des Substrates für den Wildtyp im Neutralen. Daher ist Lysin 38 nicht die einzige Position im Transporter, die das Substratmolekül bindet.

Da es sich bei den Substraten von MCT1 um Anionen handelt (siehe Abschnitt 1.2.1 und Kapitel 5.3), ist es plausibel, dass eine positiv geladene Position innerhalb der Bindetasche das Substrat anzieht. Die einzige weitere positive Ladung in der Bindetasche stellt die Seitenkette des Arginins 313 dar. Diese liegt in einem weiten pH-Bereich stets protoniert und positiv geladen vor, auch wenn diese positive Ladung durch das benachbarte, negativ geladene Aspartat 309 wahrscheinlich teilweise abgeschirmt ist. Arginin 313 stellt die einzige mögliche positive Ladung beziehungsweise Teilladung innerhalb von MCT1 und der K38M-Mutanten dar.

In Mutagenese-Experimenten führte der Austausch von Arginin 313 im MCT1 zu Alanin, Glutamin und Threonin zu einer deutlich verminderten Transportaktivität oder zu einem vollständigen Funktionsverlust [62, 134, 135]. Daher wird Arginin 313 als eine mögliche Substratbindestelle diskutiert [62, 94]. Zusammengefasst mit den Daten zur Substrataffinität aus dieser Arbeit gibt es Hinweise darauf, dass Arginin 313 an der Substratbindung beteiligt ist.

5.4.2 Die Funktion von Lysin 38

Der $K_{m, app}$ -Wert von L-Laktat für MCT1 steigt oberhalb von pH 6,8 deutlich an, das heißt die Affinität nimmt in diesem pH-Bereich stark ab. Die Ursache für die Abnahme der Affinität könnte die Deprotonierung von Lysin 38 zum Alkalischen hin darstellen. Der berechnete pK_S -Wert des Lysins an Position 38 liegt bei 9,3 in der *outward-open*- und bei 6,5 in der *inward-open*-Konformation (berechnet anhand der Strukturen mit PDB-ID #6LZ0 und #7DA5). Der pK_S -Wert dieser Position über den ganzen Translokationszyklus gemittelt liegt wahrscheinlich zwischen diesen beiden Extremwerten. Dies ist der pH-Bereich, in dem auch die Affinität des Substrates für das Wildtyp-Protein abnimmt. Diese Verringerung der Substrataffinität oberhalb von pH 6,8 wurde von Bruijne

et al. (1983) für den L-Laktat-Influx in humane Erythrozyten beobachtet [124]. Dieser Transport wird MCT1 zugeschrieben [10]. In dieser Arbeit konnte die Abnahme der Affinität oberhalb von pH 6,8 auch in einem heterologen Expressionssystem beobachtet werden.

Ein protoniertes Lysin am oberen Ende der Bindetasche könnte im Wildtyp von MCT1 das L-Laktat-Anion in die Bindetasche hinein anziehen. Fehlt diese Ladung, so verringert sich die Affinität. Dieser Mechanismus ähnelt der Substratanziehung über einen Cluster positiv geladener Aminosäuren in der Ig-I Domäne des Basigins [60] (siehe auch Kapitel 4.2). Die angezogenen Ionen könnten über die positive Ladung des Lysins 38 tief in die Bindetasche hinein angezogen werden, wo sie dann an Arginin 313 binden.

Es ist an dieser Stelle auffallend, dass L-Laktat für den MCT1 Wildtyp einen vergleichbaren $K_{m, app}$ -Wert aufweist wie für die K38M-Mutante, obwohl die positive Ladung zur Anziehung des Anions fehlt. Dass die Affinität dadurch unverändert ist, zeigt, dass die positive Ladung von Lysin 38 für den Transport und die Substratbindung nicht zwingend notwendig ist. Die Ladung verschiebt jedoch den pH-Bereich, in dem transportiert werden kann, ins Neutrale. Fehlt die Ladung an Position 38, so ist eine tausendfach höhere Protonenkonzentration notwendig für einen messbaren Transport.

Die positive Ladung an Position 38 geht außerdem mit einer Beeinträchtigung des Transportes einher. Vergleicht man die Aktivierungsenergie von MCT1 und MCT1 K38M, so ist die des mutierten Transporters ohne Ladung um 30 % niedriger (siehe Kapitel 4.5). Da der Teil des Proteins, der sich innerhalb der lipophilen Membran befindet, überwiegend ungeladen ist, wird das Lysin 38 in der *inward-open*-Konformation in eine vergleichsweise lipophile Umgebung eingebettet. Diese Veränderung der Umgebung wird auch an den deutlich verschiedenen berechneten pK_S -Werten (*outward-open*: 9,3, *inward-open*: 6,5) des Lysins in den beiden Konformationen deutlich. Die Ladung erhöht also die Energiebarriere, die bei der Translokation überwunden werden muss.

Wird im Wildtyp-Protein die Ladung des Lysins 38 entfernt, indem ein Messpuffer mit einem höheren pH-Wert gewählt wird, sinkt wie oben erläutert die Substrataffinität. Gleichzeitig steigt jedoch auch die maximale Transportgeschwindigkeit auf das 7,5-fache an (siehe Abschnitt 4.6.2). Es werden folglich zur Sättigung des Transporters höhere Substratkonzentrationen benötigt, dafür können insgesamt deutlich mehr Substratmoleküle bewegt werden. Dies deutet ebenfalls darauf hin, dass die positive Ladung in der Bindetasche den Transport hemmt.

Zusammengefasst ist Lysin 38 essenziell für die Aktivität von MCT1 im physiologischen pH-Bereich. Der pH-Wert von arteriellem Blut liegt bei 7,40, der intrazelluläre pH-Wert gesunder Zellen liegt zwischen 6,8 und 7,3, abhängig von der durchlaufenen Phase im Zellzyklus [182, 183]. Lysin 38 kann im MCT1 durch keine andere Aminosäure ersetzt werden, ohne dass die Funktionalität in diesem pH-Bereich verloren geht (siehe Abschnitt 4.4.3 und [96]). Dies geht mit einer Beeinträchtigung des Transportes einher, die jedoch durch den Transporter zugunsten des verschobenen pH-Optimums toleriert wird.

5.4.3 Die Bindestelle von Laktat im MCT1

Die Messwerte der Substrataffinität deuten darauf hin, dass das Arginin 313 im MCT1 an der Substratbindung beteiligt ist. Gleiches gilt für die positive Ladung von Lysin 38, jedoch ist diese nicht zwingend notwendig für die Funktion des Transporters. Betrachtet man darüber hinaus die Struktur von MCT1, so bindet L-Laktat wahrscheinlich zwischen Lysin 38 und Arginin 313 und überbrückt die beiden Positionen. In einer ähnlichen Position hatten bereits Wang *et al.* (2021) eine Elektronendichte in der Struktur aufgelöst [62]. Verschiebt und dreht man diese L-Laktat-Struktur in der Bindetasche (in Abbildung 5.4 grün hervorgehoben), so können vom negativ geladenen Carboxylat des L-Laktats aus Wechselwirkungen zu den positiv geladenen Gruppen von Lysin 38 und Arginin 313 ausgebildet werden. Das Arginin kann wiederum über zwei Kontaktpunkte mit dem anionischen Aspartat 309 in Wechselwirkung treten [62]. In dieser Position kann die Hydroxylgruppe des L-Laktats, die in dieser Darstellung nach hinten gedreht ist, eine Wasserstoffbrückenbindung zur Hydroxylgruppe von Serin 154 ausbilden (eingefärbt in dunklem Türkis). Der Abstand der Atome der Bindungspartner liegt dabei im erwarteten Bereich für eine Wasserstoffbrückenbindung [184]. Daher könnte die Carboxylgruppe des L-Laktats hier einen Protonentransfer von Lysin 38 aus bis tief in die Bindetasche hinein vermitteln.

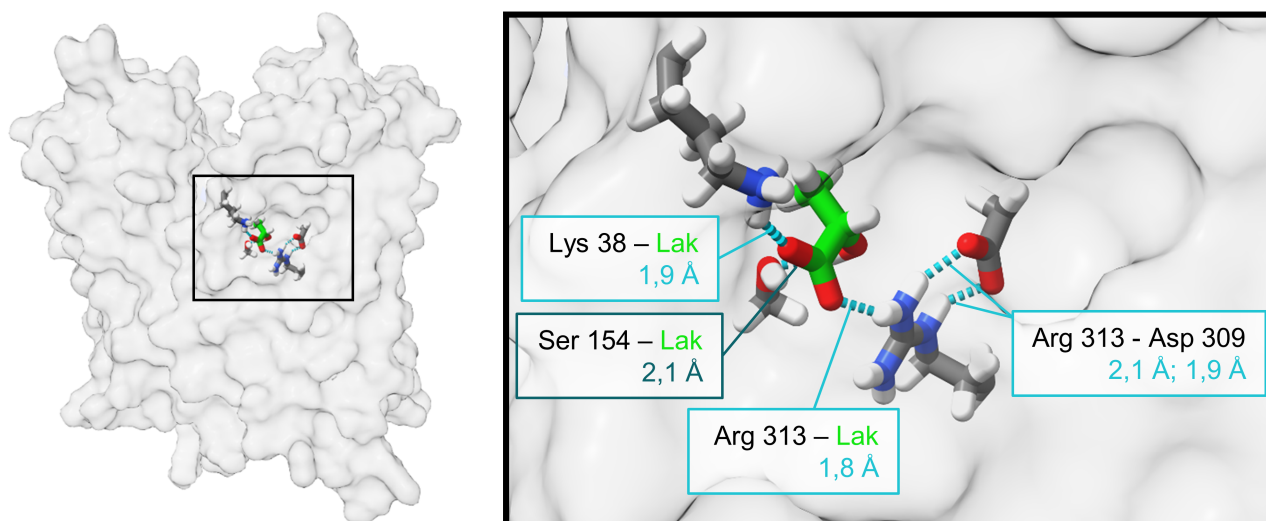


Abbildung 5.4: **Postulierte Bindestelle von Laktat in der Bindetasche von MCT1.** Die Struktur von MCT1 (PDB ID #6LZ0) wurde in ChimeraX geöffnet, fehlende Wasserstoffe wurden ergänzt und das dort enthaltene L-Laktat wurde ausgeblendet. Dann wurde eine L-Laktat-Struktur importiert (Pubchem ID #5460161), und manuell verschoben, sodass keine Kollisionen mit anderen Atomen mehr detektiert wurden. Mögliche Wasserstoffbrückenbindungen, die von ChimeraX detektiert wurden, sind türkisfarben eingezeichnet. Die beteiligten Reste und die Entfernung zwischen dem Wasserstoffatom und dem Wasserstoffbrücken-Akzeptor in Ångström sind angegeben. Arginin 313 und Aspartat 309 bilden wahrscheinlich eine ionische Bindung aus, die hier über zwei Wasserstoffbrückenbindungen dargestellt ist (siehe Abschnitt 1.3). L-Laktat kann über die Carboxyl-Gruppe jeweils mit Lysin 38 und Arginin 313 in Wechselwirkung treten. Über die Hydroxylgruppe ist eine Wasserstoffbrückenbindung zu Serin 154 möglich (dunkles Türkis).

Ein Inhibitor, der in der Bindetasche von MCT1 binden soll, sollte eine ähnliche funktionelle

5.4 Das Anion bindet zwischen Lysin 38 und Arginin 313

Gruppe aufweisen, wie die Carbonsäure. Die gewählte funktionelle Gruppe sollte die beiden positiven Ladungen an Lysin 38 und Arginin 313 ähnlich überbrücken, um eine hohe Affinität zum Transporter ausbilden zu können.

5.5 Die Translokation des Protons führt über das Anion

Nach der Identifizierung von anionischen Substraten und ihrer Bindestelle im Transporter wird im Folgenden auch der Weg des Protons durch den Transporter hindurch untersucht.

5.5.1 Zuordnung der Protonenbindestellen

In dieser Arbeit wurde die initiale Aufnahme rate über einen pH-Bereich von 2,3 bis 8,3 bestimmt (siehe Abschnitt 4.7.1). Durch die Auftragung der Rate über den pH-Wert und einen geeigneten Fit der Messwerte wurden die pH_{50} -Werte der pH-abhängigen Transportrate bestimmt. Diese Werte entsprechen wahrscheinlich direkt den pK_S -Werten der Protonenbindestellen, die einen Einfluss auf die Transportgeschwindigkeit ausüben, bestimmt werden. Diese Protonenbindestellen können dabei auch ein System aus mehreren einzelnen funktionellen Gruppen darstellen, die miteinander wechselwirken. Die Fits der Messwerte von MCT1 und MCT1 K38M sind in Abbildung 5.5 dargestellt.

In Bereich I. in Abbildung 5.5 steigt die Aufnahme über MCT1 einfach sigmoidal an, während MCT1 K38M in diesem Bereich nicht aktiv ist. Der abgelesene pK_S -Wert beträgt $7,43 \pm 0,07$. Dies deutet darauf hin, dass an dieser Protonenbindestelle das Lysin 38 beteiligt ist. Innerhalb der Bindetasche liegen keine weiteren Positionen vor, deren funktionelle Gruppen einen vergleichbaren pK_S -Wert aufweisen könnten. Die pH-Abhängigkeit liefert also Hinweise darauf, dass Lysin 38 einen der Protonenüberträger darstellt.

Im Bereich II. in Abbildung 5.5 transportiert ebenfalls nur MCT1. Der Anstieg der Kurve ist auch hier sigmoidal mit einem pK_S -Wert von $5,61 \pm 0,05$. Während der Verlauf dieser Kurve im Bereich I. bei verschiedenen L-Laktatkonzentrationen identisch war (siehe Abschnitt 4.7.2), veränderte sich die Kurvenform bei der Erhöhung der L-Laktatkonzentration und verschob sich zu höheren pH-Werten. Dies deutet darauf hin, dass L-Laktat einen direkten Einfluss auf diese Protonenbindestelle hat. Dass dieser Anstieg nur im Wildtyp beobachtet wird, ist ein weiteres Indiz dafür, dass es sich bei dieser Protonenbindestelle um das L-Laktat selbst handelt, das zwischen Lysin 38 und Arginin 313 gebunden ist.

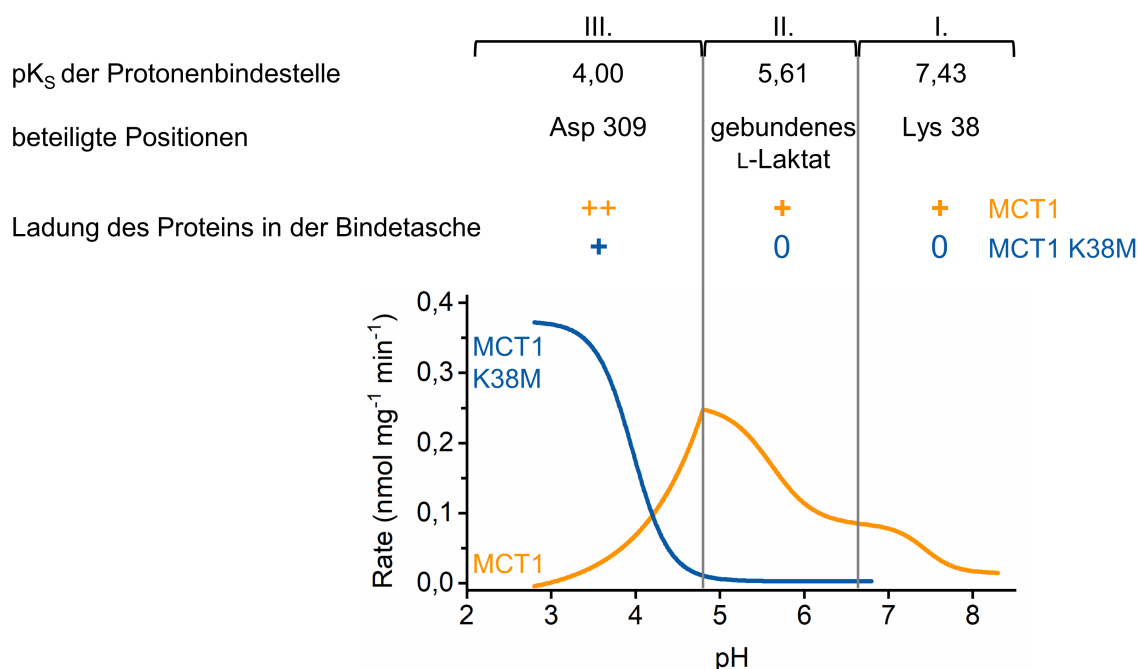


Abbildung 5.5: **Kurvenfits der pH-abhängigen Transportrate und Zuordnung von Positionen, die wahrscheinlich an den Protonenbindestellen beteiligt sind.** Die Kurvenfits wurden aus Abbildung 4.26 übernommen und Angaben zum bestimmten pK_S-Wert, den wahrscheinlich beteiligten einzelnen Positionen und zur Ladung des Proteins in der Bindetasche ergänzt. 0: nicht geladen, +: einfach positiv geladen, ++: zweifach positiv geladen.

Während die Aktivität der K38M-Mutante in Bereich III. einfach sigmoidal mit einem pK_S-Wert von $4,00 \pm 0,02$ ansteigt, nimmt hier der Transport über MCT1 spiegelbildlich dazu ab. Daher ist es wahrscheinlich dieselbe Protonierungsreaktion, die im einen Protein eine Zunahme und im anderen eine Abnahme der Funktion bewirkt. Innerhalb der Bindetasche ist Aspartat 309 die letzte noch nicht zugeordnete protonierbare Position und damit wahrscheinlich für den beobachteten Effekt im stark sauren Milieu verantwortlich.

Der berechnete pK_S-Wert von Aspartat 309 in der *outward-open*-Konformation beträgt 5,66 (berechnet mit der Struktur mit PDB ID#6LZ0). Basierend auf diesem Wert könnte Aspartat 309 auch an der protonierbaren Position im Bereich II. beteiligt sein. Die Struktur der D309N-Mutante wurde in der *inward-open*-Konformation aufgelöst [62]. Gleichzeitig zeigt die D309N-Mutante keinen Transport (siehe Abschnitt 4.4.4 und [62, 128, 134]). Dies deutet zusammen darauf hin, dass die permanente Protonierung von Aspartat 309 im Wildtyp zu einem Funktionsverlust führt, da der Transporter in einer Konformation gefangen ist. Die Abnahme der Transportaktivität in Abbildung 5.5 in Bereich III. für den Wildtyp könnte genau diese Protonierungsreaktion abbilden. Damit ist wahrscheinlich das Aspartat 309 für die Protonierungsreaktion in diesem pH-Bereich verantwortlich. Es ist interessant, dass diese Protonierungsreaktion, die im Wildtyp wahrscheinlich den Funktionsverlust verursacht, für die Transportaktivität der Mutanten mit einer neutralen Seitenkette an Position 38 notwendig ist. Dies könnte an der Oberflächenladung des Proteins innerhalb der Bindetasche begründet sein.

5.5 Die Translokation des Protons führt über das Anion

Betrachtet man diese Ladungsverhältnisse des Transportpfades, so ist es auffällig, dass die Transporter nur dann funktionell sind, wenn sie dort in Summe einfach positiv geladen sind. Dies trifft für MCT1 bei einem pH von 4,8 und höher zu, für die K38M-Mutante aber nur unterhalb von pH 4,8. Die einfach positive Ladung in diesem Bereich könnte für die Anziehung des L-Laktats und die Translokation von entscheidender Bedeutung sein.

Der Funktionsverlust der D309N-Mutante konnte durch die Einführung einer weiteren Mutation nicht wiederhergestellt werden (siehe Abschnitt 4.4.4). Die Entfernung der negativen Ladung an Position 309 konnte durch das zusätzliche Entfernen der positiven Ladung von Position 38 nicht kompensiert werden. Dies deutet darauf hin, dass dem Aspartat 309 eine wesentliche Funktion im Transportmechanismus zukommt.

Aufgrund der Basizität von Lysin, den unterschiedlichen pK_S -Werten in den beiden Konformationen und der Lage der Seitenkette innerhalb der Bindetasche wurde bereits vermutet, dass es sich um eine Protonenbindestelle handelt [95, 96]. Dabei betreibt Lysin 38 jedoch wahrscheinlich kein pH-abhängiges *gating*, sondern ist ein Überträger des Protons. Beides wurde bisher diskutiert [95, 96]. Wilson *et al.* (2009) hatten außerdem vermutet, dass während des Transportmechanismus intermediär L-Milchsäure gebildet wird [95]. Diese Theorie wurde in den darauffolgenden Jahren jedoch nicht weiter verfolgt oder aufgegriffen.

Dass es sich bei der Protonenbindestelle in Bereich II. um eine Carbonsäure handelt, geht auch aus den Daten zum Isotopeneffekt hervor (siehe Abschnitt 4.7.4). Hier wurde beobachtet, dass das Äquilibrium in schwerem Wasser stets höher war als in leichtem Wasser, obwohl unter beiden Bedingungen die Konzentrationen an L-Laktat und Protonen beziehungsweise Deuteronen identisch waren. Daher lässt sich der bevorzugte Transport in schwerem Wasser wahrscheinlich allein darauf zurückführen, dass Deuteronen gegenüber Protonen bevorzugt an den Transporter binden und so scheinbar die Substratkonzentration erhöhen. Verschiedene funktionelle Gruppen binden in unterschiedlichem Ausmaß bevorzugt entweder Deuteronen oder Protonen. Über dieses Ausmaß kann hier auf die Identität der funktionellen Gruppe rückgeschlossen werden. Es ist ein ähnliches Vorgehen für Enzyme beschrieben [167]. Hier deutet ein Isotopeneffekt des Äquilibriums darauf hin, dass ein Gleichgewichtszustand dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt vorausgeht. Dieser Gleichgewichtszustand kann dort zum Beispiel die Entstehung des reaktiven Thiolates aus einem Cystein darstellen oder aber die Bildung eines Intermediates [167]. Für den Transport über ein Protein stellt die Bindung der Substrate an das Protein einen Gleichgewichtszustand dar, der dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt (der Translokation) vorausgeht.

Aus der Titrationskurve in leichtem Wasser ist bekannt, dass der pK_S -Wert hier bei 5,61 liegt. In Abbildung 5.6 A ist die theoretische Titrationskurve einer Säure mit einem pK_S -Wert von 5,61 aufgetragen. Da dieser höhere Transport wahrscheinlich auf die bevorzugte Bindung von Deuterium zurückzuführen ist, wurde aus dem Isotopeneffekt des Äquilibriums der jeweils höhere gebundene beziehungsweise deuterierte Anteil in D₂O berechnet.

$$\text{Isotopeneffekt des Äquilibrium} = \frac{\text{Aufnahme in } H_2O}{\text{Aufnahme in } D_2O} = \frac{\text{protonierter Anteil in } H_2O}{\text{deuterierter Anteil in } D_2O} \quad (5.1)$$

Durch diese Werte in D_2O wurde dann eine einfach sigmoidale Titrationskurve durch das Verschieben des pK_S -Wertes gefittet (siehe Abbildung 5.6 B). Um auf diese Art den bestmöglichen Fit zu erhalten, wurde die Veränderung des pK_S -Wertes durch das *solver add-in* für Excel durchgeführt.

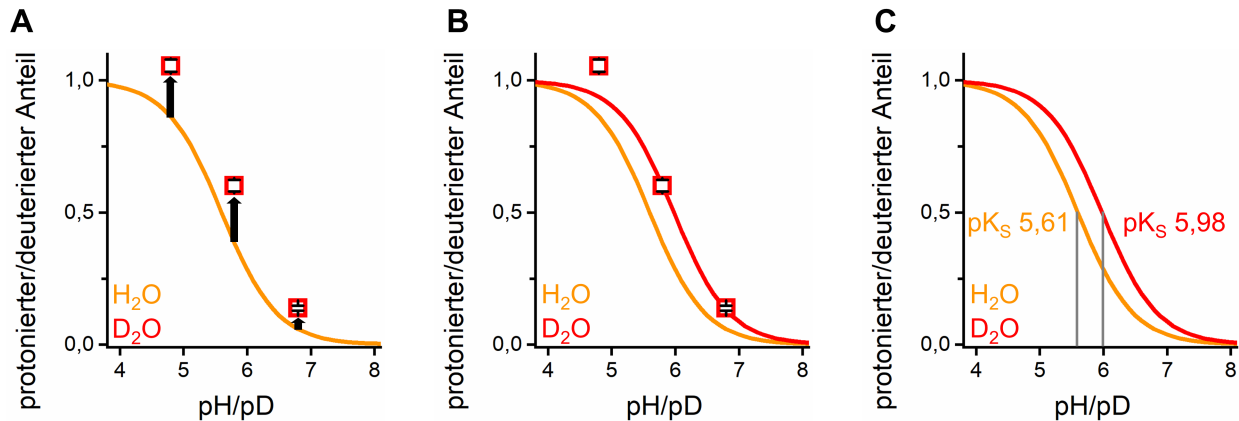


Abbildung 5.6: **Schematische Darstellung des Vorgehens bei der Bestimmung des pK_S -Wertes in schwerem Wasser.** A: Aufgetragen ist eine Titrationskurve einer Säure mit einem pK_S -Wert von 5,61 (orange) und der Anteil an Substrat, der in D_2O im Vergleich zu H_2O protoniert, also hier an den Transporter gebunden, vorliegt (rot). Diese Werte sind nach oben hin verschoben. B: Die Werte, die für den gebundenen Anteil in D_2O bestimmt wurden, werden über eine Titrationskurve mit einem anderen pK_S -Wert gefittet (rot). C: Der bestimmte pK_S -Wert in D_2O liegt bei 5,98.

Dazu wurde in Excel zu bestimmten pH-Werten und je einem definierten pK_S -Wert der Anteil an protonierter Säure berechnet. Der erste dieser pK_S -Werte war 5,61, der in leichtem Wasser bestimmt wurde. Der zweite zu bestimmende Wert ist dementsprechend der pK_S -Wert derselben funktionellen Gruppe in schwerem Wasser. Die veränderbare Zielzelle des *solvers* war der pK_S -Wert in schwerem Wasser. Das Kriterium war, dass die Differenz zwischen dem berechneten Anteil in D_2O und der gefitteten Titrationskurve minimal sein sollte. Der so bestimmte pK_S -Wert in schwerem Wasser beträgt 5,98, der Wert ist also in schwerem Wasser um 0,37 Einheiten höher als in leichtem Wasser (siehe Abbildung 5.6 C). Eine Verschiebung um ungefähr 0,4 Einheiten findet man insbesondere bei Carbonsäuren. So wurden zum Beispiel für Formiat in verschiedenen Publikationen Verschiebungen der pK_S -Werte von 0,396 oder 0,46 beobachtet [175, 185].

Somit konnten in MCT1 drei Protonenbindestellen detektiert und zugeordnet werden, während in der K38M-Mutante nur eine Protonenbindestelle für den Transport existiert. Im Wildtyp von MCT1 binden während des Transportvorganges wahrscheinlich sowohl Lysin 38, das anionische Substrat und Aspartat 309 das Anion. In der K38M-Mutante bindet nur Aspartat 309 das Proton.

5.5.2 Protonierungsreaktionen im Transportmechanismus

Da die Identität der an der Protonenbindung beteiligten Gruppen und ihre Lage im Transporter bekannt sind, kann ein Modell für die Übertragung der Protonen im Transportmechanismus ausgehend vom gebundenen L-Laktat (siehe Abbildung 5.7) formuliert werden.

Das positiv geladene Lysin 38 überträgt zunächst ein Proton auf das benachbarte, negativ geladene L-Laktat (siehe Abbildung 5.7, Schritt 1). So entsteht intermediär in der Bindetasche L-Milchsäure. Das Proton ist über die Carboxylgruppe der L-Milchsäure delokalisiert und kann so mit dem negativ geladenen Aspartat 309 in Wechselwirkung treten (siehe Abbildung 5.7, Schritt 2). Dadurch werden Proton und die negative Ladung über beide Carboxylgruppen delokalisiert (siehe Abbildung 5.7, Schritt 3). Die Delokalisierung der negativen Ladung verringert die Ladungsdichte an Aspartat 309. Diese verringerte Ladungsdichte schwächt die ionische Bindung des Aspartats 309 zum Arginin 313, was die Translokation des Proteins auslöst.

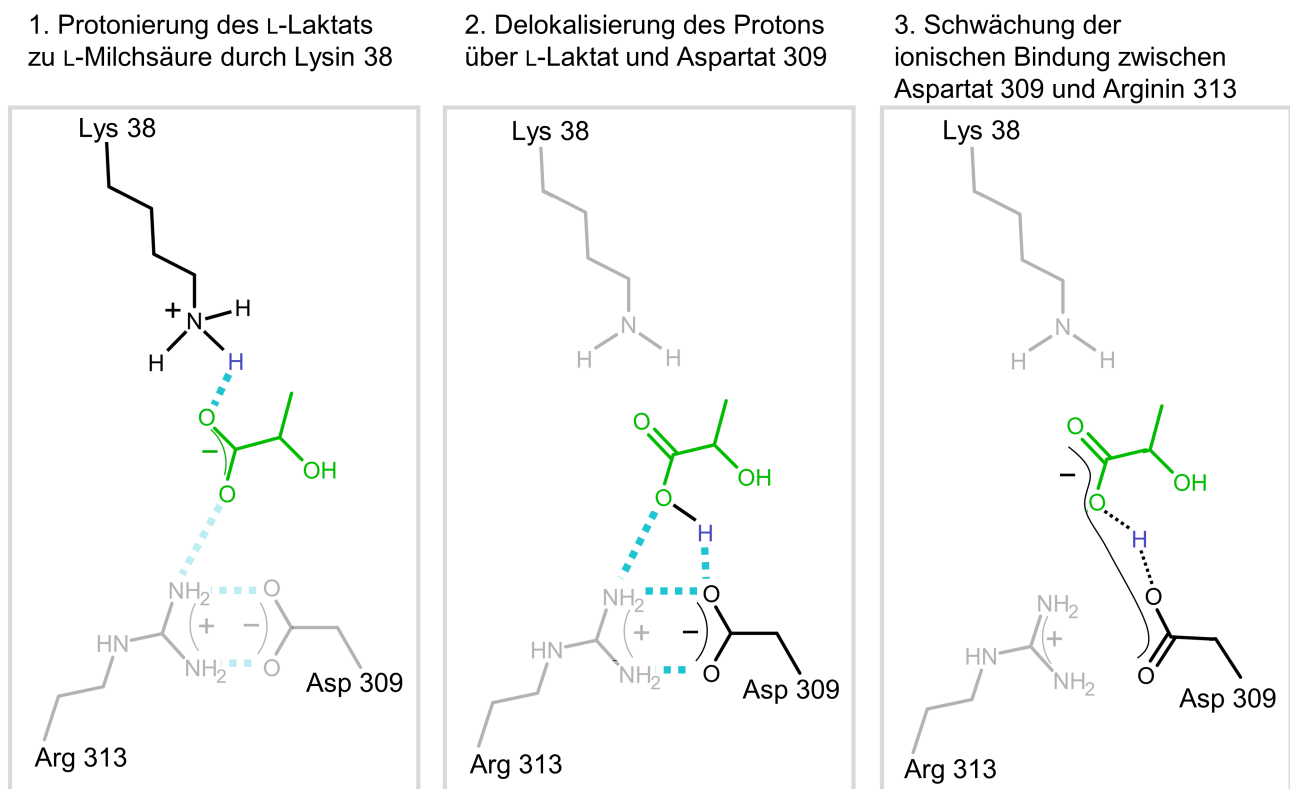


Abbildung 5.7: Im MCT1 wird das Proton von Lysin 38 über das gebundene Carboxylat auf Aspartat 309 übertragen.

Ist das Aspartat 309 durch die Mutation zu einem Asparagin permanent protoniert, wird so ein Übergangszustand des Transporters imitiert und das Protein verharrt in der *inward-open*-Konformation [62]. Dass der berechnete pK_S -Wert des Aspartats 309 bei 5,66 liegt, deutet darauf hin, dass diese funktionelle Gruppe bei einem pH unter 4 aus dem Lösungsmittel protoniert werden kann. Dann könnte die Protonenübertragung von Lysin 38 über L-Laktat bis zum Aspartat 309 nicht vollständig

ablaufen. Ein permanent neutrales Substrat wie das L-Laktamid kann wegen der fehlenden Ladung nicht ausreichend stark an das Arginin 313 binden. Außerdem kann es wegen der deutlich stärkeren N-H-Bindung im Vergleich zur O-H-Bindung das Proton nicht partiell auf Aspartat 309 übertragen.

Ein Inhibitor könnte den durch MCT1 vermittelten Transport auf zwei Wegen verhindern: Ein derartiges Molekül könnte entweder spezifisch zwischen Lysin 38 und Arginin 313 binden und dann Aspartat 309 kovalent modifizieren. Über eine chemische Modifikation der Carboxylgruppe könnte die Basizität verringert werden, was den modifizierten Transporter analog zur D309N-Mutante in der *inward-open*-Konformation gefangen hält. Die zweite Möglichkeit besteht darin, dass der Inhibitor zwischen Lysin 38 und Arginin 313 bindet und dem Aspartat 309 ein Proton anbietet, dieses Proton jedoch wegen einer zu geringen Azidität des Inhibitors nicht vollständig delokalisieren kann, analog zum L-Laktamid. Dieses Molekül kann jedoch, basierend auf den Kompetitionsassays, nicht stark genug an den Transporter binden, um Transport zu verhindern. Basierend auf L-Laktamid müssten funktionelle Gruppen in dieses Molekül eingeführt werden, die die Bindung zu Lysin 38 und Arginin 313 verstärkt. Dazu wäre hier eine negativ geladene funktionelle Gruppe von Vorteil.

Bindet das L-Laktat in der Bindetasche der K38M-Mutante an das Arginin 313, so wird die Protonierung hier nicht durch eine darüber liegende Ladung erleichtert. Daher muss hier das Proton wahrscheinlich direkt aus dem Bulkwasser auf das an Arginin 313 gebundene L-Laktat übertragen werden. Schritt 2 und 3 laufen dann analog zum Wildtyp ab: Das Proton ist wie oben beschrieben über die beiden Carboxylgruppen von Aspartat 309 und L-Laktat delokalisiert, was die Bindung zwischen Aspartat 309 und Arginin 313 schwächt und auch hier die Translokation auslöst. Ist die Protonenkonzentration in der Lösung nicht hoch genug, um L-Laktat und Aspartat 309 intermediär zu protonieren, ist der Transporter in der *outward-open*-Konformation fixiert. Nur wenn alle Protonierungsreaktionen reversibel ablaufen, bleibt die Funktion des Transporters erhalten.

Dass die Protonen-Übertragungsketten in MCT1 und in MCT1 K38M unterschiedlich ausgeprägt sind, lässt sich auch an den Messwerten zum kinetischen Isotopeneffekt ablesen (siehe Abbildung 4.32 B). Da in schwerem Wasser ganze zeitabhängige Aufnahmekurven bis ins Äquilibrium aufgenommen wurden, konnte auch die Ratenkonstante des Transportes in beiden Lösungsmitteln bestimmt werden. Die Ratenkonstante eines Kurvenfits beschreibt, wie schnell eine Kurve das Plateau erreicht, unabhängig von der Höhe dieses Plateaus (siehe auch Gleichung 3.6).

Kinetische Isotopeneffekte deuten drauf hin, dass die Bindungen zu Protonen beziehungsweise Deuteronen am geschwindigkeitsbestimmenden Schritt einer Reaktion beteiligt sind [167]. Dieser Schritt stellt für Transportproteine die Translokation dar. Das Ausmaß des kinetischen Isotopeneffektes kann dabei Rückschlüsse auf die Anzahl der Protonen- beziehungsweise Deuteronenübertragungen und die beteiligten Gruppen zulassen [168]. Für MCT1 wurde in schwerem Wasser ein normaler Isotopeneffekt (eine höhere Ratenkonstante in leichtem Wasser) beobachtet, für die MCT1 K38M-Mutante jedoch ein inverser Isotopeneffekt (eine niedrigere Ratenkonstante in leichtem Wasser). Dass der kinetische Isotopeneffekt sich in beiden Proteinen deutlich unterscheidet, deutet darauf

5.5 Die Translokation des Protons führt über das Anion

hin, dass hier der Protonen- beziehungsweise Deuteronentransfer in beiden Proteinen unterschiedlich verläuft.

Die Stickstoffe der Seitenketten von Arginin 313 und Lysin 38 sind auch in der *inward-open*-Konformation für das Substrat zugänglich. Diese Stickstoffe sind in Abbildung 5.8 in der Struktur der MCT1-D309N-Mutanten (PDB ID #7DA5) eingefärbt. Position 309 ist hier tiefer im Protein verborgen. Aufgrund der Zugänglichkeit von Lysin 38 und Arginin 313 ist es denkbar, dass der Translokationsmechanismus in beide Richtungen gleich abläuft. Die Beobachtung, dass die K38M-Mutante bei einem extrazellulären pH von 6,8 einen messbaren Efflux vermittelt, deutet jedoch darauf hin, dass für den Export zusätzlich andere Effekte greifen (siehe Abbildung 4.18). Daher sollte diese Transportrichtung in Zukunft stärker beleuchtet werden, zum Beispiel auf die pH-Abhängigkeit und die Substrataffinität hin.

Es ist auch denkbar, dass die K38M-Mutanten auf der extrazellulären Seite nur L-Milchsäure und auf der intrazellulären Seite nur L-Laktat und Protonen akzeptiert. Dies würde erklären, warum die zeitabhängige Aufnahme einem exponentiellen Verlauf auf ein Maximum hin folgt, aber bei einem extrazellulären pH-Wert von 6,8 trotzdem Efflux messbar ist (siehe Abschnitt 4.4.3). Gleichzeitig scheint jedoch das L-Laktamid, ein Strukturanalogon zur L-Milchsäure, die Aufnahme über MCT1 K38M nicht kompetitiv zu inhibieren (siehe Abschnitt 4.6.1). Über eine Charakterisierung des Effluxes bei verschiedenen pH-Werten jeweils auf der intra- und auf der extrazellulären Seite könnte diese Asymmetrie im Substratspektrum überprüft werden.

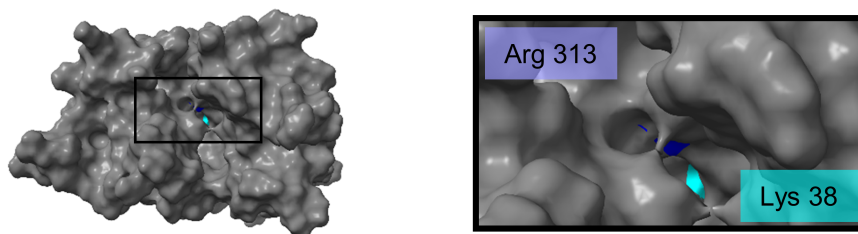


Abbildung 5.8: **Die terminalen Stickstoffe von Lysin 38 und Arginin 313 sind auch in der *inward-open*-Konformation vom Zytosol her zugänglich.** Die Abbildung basiert auf der kryoelektronenmikroskopischen Struktur von MCT1 D309N (PDB ID #7DA5). Die Oberfläche der Stickstoffe und Protonen des Arginins sind in blau, die des Lysins in Türkis eingefärbt. Die Blickrichtung geht vom Zellinneren in Richtung der geöffneten Bindetasche.

Beim vorgeschlagenen Mechanismus handelt es sich um einen *ordered-binding*-Mechanismus, bei dem die Cosubstrate L-Laktat und Proton in einer festgelegten Reihenfolge an den Transporter binden. Dabei bindet das Proton zuerst an das Lysin 38. Die dabei entstehende Ladung zieht dann L-Laktat in die Bindetasche des Transporters. Ein derartiger Mechanismus wurde lange postuliert und diskutiert [95, 124]. Die Auswirkungen dieses Mechanismus auf die Kinetik, wie zum Beispiel ein pH-abhängiger $K_{m,app}$ -Wert von L-Laktat, werden jedoch nur bei höheren pH-Werten um 7,8 beobachtet. Bei niedrigeren pH-Werten bindet das Proton schnell und in einem so großen Ausmaß an Lysin, dass Unterschiede in der Kinetik hier nicht mehr aufgelöst werden können. Dies verdeutlicht,

wie wichtig die Charakterisierung des Transportes über einen breiten pH-Bereich hinweg ist.

Wilson *et al.* (2009) postulierten nicht nur die Entstehung von L-Milchsäure in der Bindetasche von MCT1, sondern auch, dass das Molekül an das Ionenpaar aus Arginin 313 und Aspartat 309 weitergereicht wird. Ihre Aussagen stützten sich dabei allein auf Beobachtungen aus Mutagenese-Experimenten. In diesen konnte keine der drei Positionen gegen eine andere Aminosäure ausgetauscht werden, ohne dass der Transport verloren ging.

Es gibt Hinweise auf die Protonierung von Aspartat 309 im Rahmen des Translokationszyklus in den pH-Kurven von MCT1 und der MCT1 K38M-Mutante. Dass eine Protonierung an dieser Position die Translokation auslöst, wurde bereits im Rahmen der Strukturaufklärung der MCT1 D309N Mutante und von MCT2 postuliert und ist ein typisches Merkmal für Transporter der *Major Facilitator Superfamily* [62, 69, 122].

5.5.3 Fazit zum Transportmechanismus

In dieser Arbeit wurden umfangreiche, funktionelle Daten erhoben, aus denen ein konkreter Transportmechanismus abgeleitet wurde. So wurden unter anderem die pK_S -Werte der am Protonentransfer beteiligten Gruppen bestimmt und die pH-Abhängigkeit der Substrataffinität charakterisiert. Außerdem wurde der Isotopeneffekt auf die Kinetik und das Äquilibrium der Substrataufnahme bestimmt. Das gewählte Expressionssystem ermöglichte dabei die isolierte Betrachtung des Transportverhaltens von MCT1 unter Bedingungen, die der bisherigen funktionellen Testung nicht zugänglich waren. Insgesamt wurden in dieser Arbeit Daten gesammelt, die eine hohe Aussagekraft haben. Diese funktionellen Daten liefern starke Hinweise auf den oben dargestellten Mechanismus.

5.6 Ausblick: Übertragbarkeit des Mechanismus auf andere MCT

Diese Arbeit zeigt, dass drei geladene Aminosäuren das Herzstück des Transportmechanismus im MCT1 bilden: Lysin 38 überträgt ein Proton auf das gebundene anionische Substrat, Aspartat 309 ist der Akzeptor des Protons und Arginin 313 stellt eine Bindestelle für das anionische Substrat dar. Die voluminöse Seitenkette des Phenylalanin 367 begrenzt die Bindetasche und bestimmt so die Substratgröße [134]. Wegen der engen Verwandtschaft der MCT untereinander ist es naheliegend, dass diese Transporter funktionelle Eigenschaften, wie zum Beispiel den Mechanismus der Substrattranslokation, teilen. Im folgenden Ausblick soll überprüft werden, ob auch der Transport über andere Mitglieder der Proteinfamilie dem beschriebenen Transportmechanismus folgen könnte. Voraussetzung dafür ist, dass die Proteine die drei geladenen Aminosäuren oder vergleichbare funktionelle Gruppen in einer ähnlichen räumlichen Anordnung vorweisen.

Das Alignment der Proteine zeigt, dass die drei geladenen Aminosäuren und die aromatische Seitenkette an Position 367 in den humanen MCT1, MCT2, MCT3 und MCT4 konserviert sind (siehe Abbildung 5.9). Die drei konservierten Aminosäuren stellen jeweils die einzigen geladenen Aminosäuren innerhalb der Bindetasche dar. Die Nettoladung innerhalb der Bindetasche beträgt für alle gezeigten Proteine also jeweils insgesamt +1. Es gibt Hinweise darauf, dass die konservierten Aminosäuren in diesen MCT ähnlich relevant sind. Für MCT2 und MCT4 wurde bereits gezeigt, dass das Arginin (Position 297 für MCT2 und Position 278 für MCT4, entsprechend Arginin 313 in MCT1) für die Funktion zwingend notwendig ist [69, 131]. Anhand von MCT2 wurde gezeigt, dass auch Lysin 38 für den Transport essentiell ist [69]. Auch für das Aspartat 293 in MCT2 (entsprechend 309 in MCT1) wurde gezeigt, dass die Mutation zum ungeladenen Asparagin an dieser Position den Transport verändert, auch wenn die Messwerte hier nicht so eindeutig waren wie für Lysin und Arginin [69].

	H ⁺ -Donator		H ⁺ -Akzeptor		Anionen-Bindestelle		Filter	
MCT1	K	38	D	309	R	313	F	367
MCT2	K	38	D	293	R	297	F	351
MCT3	K	37	D	299	R	303	Y	357
MCT4	K	40	D	274	R	278	Y	332

Abbildung 5.9: **Die funktionell wichtigen Aminosäuren von MCT1 können in MCT2, MCT3 und MCT4 an den identischen Positionen wiedergefunden werden.** Lysin 38, Aspartat 309 und Arginin 313 im MCT1 üben im Transportmechanismus wesentliche Funktionen aus. In MCT2, MCT3 und MCT4 sind an derselben Position in einem Alignment der Primärsequenz dieselben Aminosäuren anzutreffen. Aufgrund von funktionellen Daten ist es wahrscheinlich, dass diese Positionen auch hier ähnliche Funktionen im Transportmechanismus haben.

Betrachtet man die aufgeklärte Struktur von MCT2 in der *inward-open*-Konformation, so weisen

5.6 Ausblick: Übertragbarkeit des Mechanismus auf andere MCT

diese Aminosäuren außerdem eine vergleichbare Position und Ausrichtung auf (siehe Abbildung 5.10, zur besseren Vergleichbarkeit wird die Struktur der MCT1-D309N-Mutante gezeigt, da diese genau wie MCT2 in der *inward-open*-Konformation aufgelöst wurde). Eine ähnliche räumliche Ausrichtung und Position der Seitenketten zusammen mit dem ähnlichen Substratspektrum deuten darauf hin, dass auch der Mechanismus der Substratübertragung und Translokation konserviert ist. Damit kann der Mechanismus, der für MCT1 beschrieben wurde, wahrscheinlich direkt auf MCT2, MCT3 und MCT4 übertragen werden.

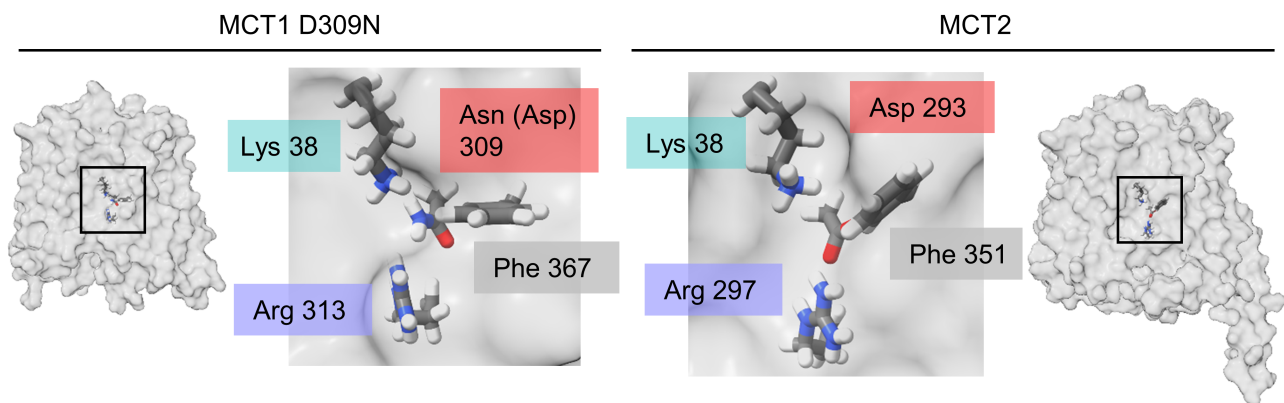


Abbildung 5.10: **Die Bindetasche von MCT1 und MCT2 ist ähnlich aufgebaut.** Beide dargestellten Proteine befinden sich in der *inward-open*-Konformation. Da für MCT1 die Struktur der Punktmutante zugrunde gelegt wurde, ist hier ein Asparagin statt eines Aspartats dargestellt. Gezeigt sind die Oberflächen von MCT1 D309N (PDB ID #7DA5) und MCT2 (PDB ID #7BP3, Kette A der Struktur wurde verwendet) und die Seitenketten der benannten Positionen. Die Bindetasche wird jeweils von identischen Aminosäuren ausgekleidet, die sich an denselben Positionen innerhalb der jeweiligen Struktur befinden.

Das bakterielle Homolog aus *Syntrophobacter fumaroxidans*, SfMCT, war das erste MCT, für das eine Struktur aufgelöst wurde [94]. Dabei handelt es sich ebenfalls um einen L-Laktat-Protonen-Cotransporter, der im neutralen pH-Bereich aktiv ist. Interessanterweise werden hier viele der Positionen, die in humanen MCT streng konserviert sind, durch andere, ungeladene Aminosäuren besetzt (siehe Abbildung 5.11). Lediglich das Arginin an Position 280 (entsprechend 313 im MCT1) kann hier wiedergefunden werden und ist kritisch für die Funktion [94]. Die Summe an Ladungen in der Bindetasche ist auch hier +1. Während im MCT1 die Mutation von Aspartat 309 zu einem Asparagin den Transporter in der *inward-open*-Konformation gefangen hält, ist hier das Asparagin zwingend notwendig für den Transport [94].

Da es hier keine zum Lysin 38 korrespondierende Position gibt, wurden weiter außen gelegene geladene Cluster als Protonenbindestelle postuliert [94]. SfMCT könnte so die Konzentration an Protonen in der Bindetasche erhöhen, um die Protonierung von Laktat zu erleichtern und so die Aktivität im neutralen Milieu zu gewährleisten. Für MCT1, MCT2 und MCT4 wurden je ein Aspartat und für MCT4 ein weiteres Histidin auf der extrazellulären Seite weit oberhalb des Transportpfades gefunden, die das Anion und Protonen über einen vergleichbaren Mechanismus wie im SfMCT anziehen könnten [120, 186].

5.6 Ausblick: Übertragbarkeit des Mechanismus auf andere MCT

Das SfMCT weist an diesen konservierten Positionen Ähnlichkeiten mit dem Anionen-Protonen Cotransporter MCT6 auf (siehe Abbildung 5.11). Beide tragen eine Aminosäure mit Hydroxylgruppe an der Position korrespondierend zu Position 38 im MCT1, ein Asparagin an Position 309 und das konservierte Arginin. Auch abseits der konservierten Positionen konnten keine vergleichbaren funktionellen Gruppen in der Bindetasche identifiziert werden. Die enge Verwandtschaft der MCT deutet zunächst auf einen ähnlichen Transportmechanismus hin. Falls das SfMCT und MCT6 einen ähnlichen Transportmechanismus von MCT1 aufweisen, so können hier wesentliche Wechselwirkungen, wie die Erleichterung der Protonierung und der Abschluss der Bindetasche zum Intrazellulären hin, nicht durch ionische Interaktionen gebildet werden, sondern müssten durch andere Bindungsarten, wie zum Beispiel Wasserstoffbrückenbindungen, gebildet werden. Dass in der Bindetasche dieser Transporter die Bindung der Protonen wahrscheinlich nicht durch geladene Aminosäuren vermittelt wird, weist eine Ähnlichkeit zu den Formiat-Nitrit-Transportern (FNT) dar. In den FNT wird die Basizität des anionischen L-Laktats durch die hydrophobe Proteinumgebung erhöht, sodass L-Laktat und Proton gemeinsam transportiert werden [177]. Im MCT6 und SfMCT könnte die Protonierung durch einen ähnlichen Mechanismus erleichtert werden, auch wenn in den MCT die Bindetasche in der *outward-open*-Konformation deutlich voluminöser und damit weniger hydrophob ist als der enge Transportpfad der FNT.

Die von MCT6 transportierten anionischen Moleküle sind meist deutlich größer als die Substrate von MCT1-4 und SfMCT [45, 94]. Während die Anionentransporter MCT1-4 und SfMCT an Position 367 voluminöse, aromatische Aminosäuren tragen, befindet sich hier im MCT6 ein geradliniges Methionin. Dies deutet darauf hin, dass diese Position auch in anderen Anionentransportern die Größe der Bindetasche festlegt.

	38	309	313	367
MCT1	K	D	R	F
MCT2	K	D	R	F
MCT3	K	D	R	Y
MCT4	K	D	R	Y
SfMCT	Y	N	R	Y
MCT6	T	N	R	M
			288	

Abbildung 5.11: **Das Arginin ist in allen Anionentransportern konserviert, Lysin und Aspartat werden jedoch in SfMCT und MCT6 nicht wiedergefunden.** Das Arginin innerhalb der Bindetasche ist in allen genannten Transportern vorhanden und befindet sich an der identischen Position in der Primärsequenz der Transporter. Für Aspartat und Lysin konnten jedoch in SfMCT und MCT6 keine korrespondierenden Positionen identifiziert werden. An den zwischen MCT1-4 konservierten Positionen werden ungeladene Aminosäuren gefunden. Das Volumen des Größenfilters in MCT6 ist mit einem Methionin deutlich geringer, was mit größeren Substraten korreliert.

Zusätzlich zu den Anionen-Protonen-Cotransportern werden im Folgenden auch die Zwitterionen-

5.6 Ausblick: Übertragbarkeit des Mechanismus auf andere MCT

Transporter betrachtet. Die dreidimensionale Anordnung der Aminosäuren, die die Bindetasche bilden, lässt sich für MCT8 in einem Modell darstellen (siehe Abbildung 5.12). Auch hier befindet sich ein Arginin am unteren Ende der Bindetasche (Arg 445) und in direkter Nachbarschaft zu einem Aspartat (Asp 498). Außerdem liegt direkt daneben ein Serin (Ser 441). Zum oberen Ende des Transportpfades hin ragt jedoch kein Lysin in die Bindetasche hinein, sondern zwei Histidine (His 192, His 415).

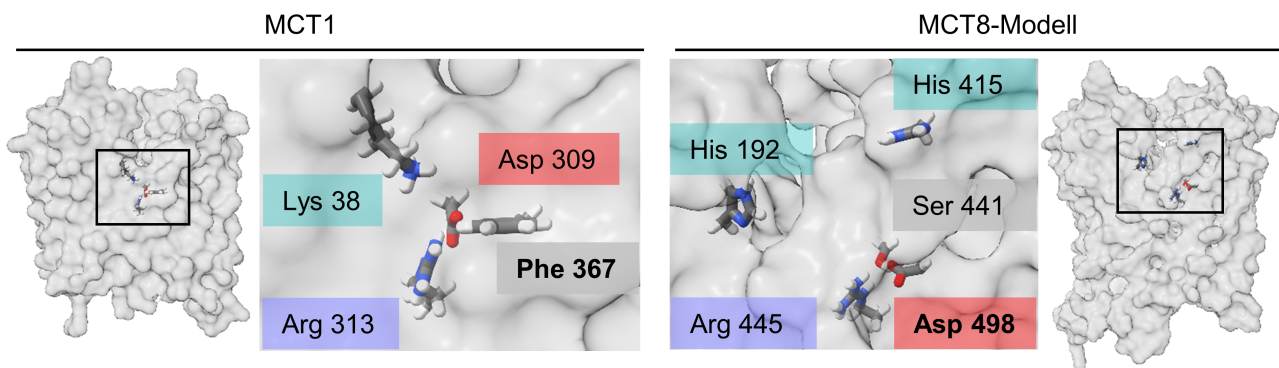


Abbildung 5.12: **Die Bindetasche von MCT8 könnte sehr ähnlich zu der von MCT1 aufgebaut sein.** Dargestellt sind die Oberflächen von MCT1 in der *outward-open*-Konformation (PDB ID #6LZ0) und ein Modell der Sequenz von MCT8 basierend auf eben jener Struktur. Die Seitenketten der benannten Positionen sind eingezeichnet. Im MCT1 und im MCT8 wird das untere Ende der Bindetasche von einem Arginin und einem Aspartat ausgekleidet. Am oberen Ende des Transportpfades ragen zwei Histidine in den Transportpfad, ähnlich dem Lysin 38 im MCT1.

Im Alignment der Zwitterionentransporter und der Anionentransporter MCT1-4 ist erkennbar, dass sich das Arginin im MCT8 und MCT10 an der konservierten Position befindet (siehe Abbildung 5.13, MCT8: Arg 445). Für MCT8 konnte bereits gezeigt werden, dass es für die Funktion notwendig ist [121]. Das zum Arginin benachbarte Aspartat (siehe Abbildung 5.13, MCT8: Asp 498), das wahrscheinlich ein Ionenpaar mit dem Arginin bildet, befindet sich in der Primärsequenz jedoch an der Position, an der sich in den Anionentransportern der Größenfilter befindet [121]. Dies zeigt, dass die zugrunde liegenden Mechanismen der Translokation wahrscheinlich ähnlich sind, die Position dieses Restes sich jedoch im Laufe der Evolution verschoben hat. An die Position des Aspartats 309 tritt in MCT8 und MCT10 ein Serin (siehe Abbildung 5.13). Aus Funktionsdaten geht hervor, dass die Substratanziehung wahrscheinlich durch die beiden Histidine an Position 192 und 415 vermittelt wird [187]. Die berechneten pK_s -Werte für diese Positionen betragen 5,7 und 5,1. Daher liegen diese Histidine wahrscheinlich ungeladen vor und die Bindetasche ist nicht geladen. Da die Substrate von MCT8 und MCT10 bereits als Zwitterionen vorliegen, muss vielleicht im Transportpfad das Proton nicht erst auf das Substrat übertragen werden, sondern die positiv geladene funktionelle Gruppe im Substrat könnte direkt mit dem Aspartat interagieren. Damit ist hier kein Protonen-Donator im Transportmechanismus notwendig, sondern die Positionen haben alleine die Funktion der Substratanziehung.

5.6 Ausblick: Übertragbarkeit des Mechanismus auf andere MCT

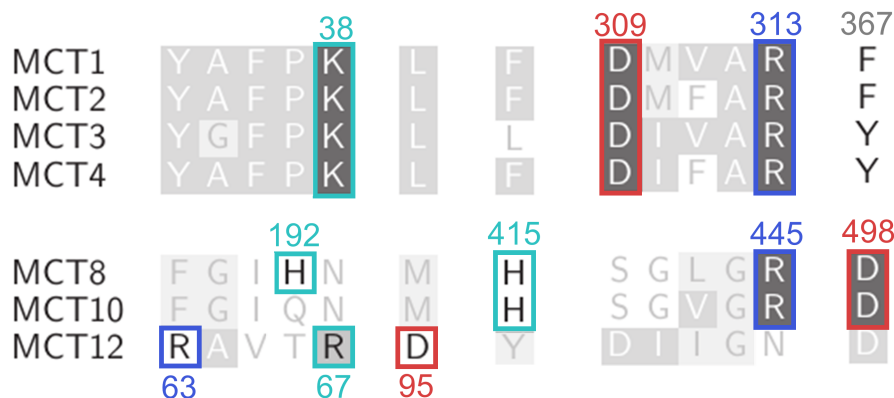


Abbildung 5.13: **Die funktionell relevanten Aminosäuren finden sich auch in den Zwitterionentransportern, wenn auch an anderen Positionen in der Primärsequenz.** Während Lysin 38 in den Anionentransportern der MCT-Familie die Protonierung des Substrates vermittelt, dienen die korrespondierenden Positionen in den Zwitterionentransportern der MCT-Familie der Anziehung der bereits protonierten Substrate. Das Arginin ist in MCT8 und MCT10 und den Anionentransportern konserviert, in MCT12 befindet sich die korrespondierende Position wahrscheinlich deutlich weiter vorne in der Primärsequenz, an Position 63. Das anionische Aspartat befindet sich in MCT8 und 10 in der Region des Substratfilters, im MCT12 deutlich weiter N-terminal an Position 95. Die Substratanziehung wird in MCT8 über zwei Histidine vermittelt (His 192, His 415), von denen eines auch im MCT10 konserviert ist. Diese substratanziehende Position ist im MCT12 (Position 67) und den Anionentransportern (Position 38 für MCT1) wahrscheinlich konserviert.

Für MCT12 liegen deutlich weniger Funktionsdaten vor. Betrachtet man das Modell von MCT12, so fällt auch hier ein Arginin am unteren Ende der Bindetasche auf (siehe Abbildung 5.14). Dieses ist von mehreren Aspartaten umgeben. Aufgrund der modellierten Oberfläche des Proteins und weil die berechneten pK_S -Werte der drei Aspartate auf der linken Seite in Abbildung 5.14 vergleichbar hoch sind (zwischen 6,3 und 7,5), befinden sich diese Positionen wahrscheinlich innerhalb der hydrophoben Proteinumgebung. Damit haben sie keinen Kontakt zur Oberfläche der Bindetasche und können wahrscheinlich nicht mit dem Substrat interagieren. Das Aspartat 95 stellt wahrscheinlich den Bindedepartner des Arginins dar, da der berechnete pK_S -Wert bei 4,8 liegt und beobachtet wurde, dass es für den Transport kritisch ist [115]. Das Aspartat 387 befindet sich an derselben Position wie das negativ geladene Aspartat in MCT8 und MCT10. Damit ist das Aspartat an Position 387 unter den Zwitterionen konserviert. In MCT12 trägt es jedoch, basierend auf Funktionsdaten, wahrscheinlich nicht zum Transport bei [115]. Anstelle eines Lysins ragt die Seitenkette eines permanent positiv geladenen Arginins in den Transportpfad hinein. Aufgrund der hohen Basizität kann das Arginin, genau wie die Histidine in MCT8 und MCT10, keinen Protonendonator darstellen. Da auch die Substrate von MCT12 Zwitterionen sind, gelangen auch sie bereits in protonierter Form in den Transportpfad. Die positive Ladung könnte die negativ geladene funktionelle Gruppe des zwitterionischen Substrates anziehen und so das Molekül in die Bindetasche hineinziehen, analog zum Lysin 38 und dem negativ geladenen L-Laktat. Wie in den Anionentransportern ist hier die Bindetasche einfach positiv geladen.

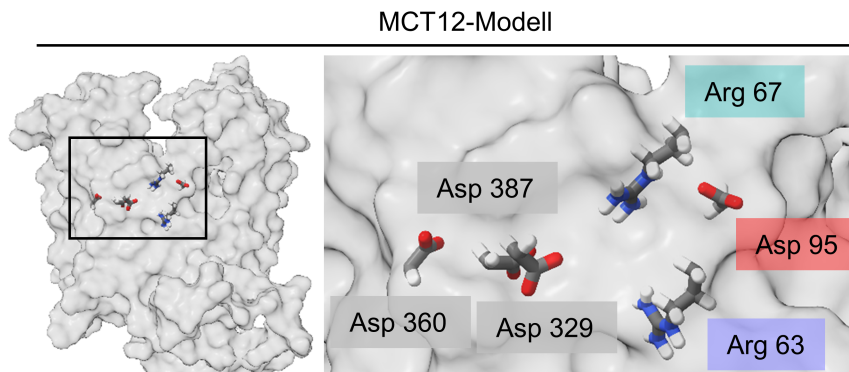


Abbildung 5.14: **Die Bindetasche von MCT12 wird wahrscheinlich ebenfalls von einem Arginin, einem Aspartat und einer weiteren positiven Ladung ausgekleidet.** Dargestellt sind die Oberfläche des Modells von MCT12 basierend auf der Struktur von MCT1 (PDB ID #6LZ0) und die Seitenketten der angegebenen Positionen. Aspartat 329, 360 und 387 sind wahrscheinlich innerhalb der hydrophoben Proteinumgebung eingebettet und daher nicht geladen. Arginin 67, Aspartat 95 und Arginin 63 könnten die Bindetasche ausbilden und funktionell relevant sein.

Im gewählten Modell ist die Entfernung zwischen Arginin 63 und Aspartat 95 zu groß für eine ionische Bindung. Da es sich hier um ein Modell handelt, könnten die Positionen der Seitenketten nur ungenau dargestellt sein. Um zu beurteilen, ob sich der Mechanismus auf MCT12 übertragen lässt, sind aussagekräftige Struktur- und Funktionsdaten notwendig. Von besonderem Interesse sind dabei Aspartat 95 und die Arginine an Position 63 und 67.

Zusammengefasst lassen sich in den Zwitterionentransportern die drei mechanistisch relevanten Aminosäuren wiederfinden. Diese befinden sich jedoch im Vergleich zu MCT1 an anderen Positionen in der Primärsequenz und das Lysin 38 wird durch andere Aminosäuren ersetzt, da im Transportpfad wahrscheinlich keine Protonierung vermittelt wird.

Für MCT7 und MCT9, die Vertreter der dritten Untergruppe in der MCT-Familie, liegen wenig Daten zur Funktion und zu Substraten vor. In einem Modell von MCT7 befinden sich in der Mitte des Proteins drei mögliche Positionen für negative Ladungen (siehe Abbildung 5.15 links). Die Seitenketten von Glutamat 340 und Glutamat 35 scheinen jedoch keinen Kontakt zur Proteinoberfläche innerhalb der Bindetasche zu haben und weisen stark erhöhte berechnete pK_S -Werte auf (6,8 und 6,5). Daher sind sie wahrscheinlich für Lösungsmittel und Substrat nicht zugänglich. Glutamat 159 hingegen ist basierend auf dem Modell und den daraus berechneten pK_S -Werten zugänglich und stellt wahrscheinlich eine negative Ladung in der Bindetasche dar. Außerdem befinden sich in der Bindetasche zwei positiv geladene Aminosäuren: Die Lage von Lysin 43 und Arginin 344 entsprechen den jeweils konservierten Positionen im MCT1. Damit ist die Bindetasche von MCT7 sehr ähnlich zu der von MCT1 und ebenfalls einfach positiv geladen.

Die Bindetasche von MCT9 enthält im Gegensatz dazu keine der konservierten Positionen (siehe Abbildung 5.15 rechts). Anstelle des konservierten Arginins steht hier ein Lysin, welches jedoch keinen Kontakt zur Oberfläche der Bindetasche hat. Zusätzlich befindet sich hier nur eine mögliche negativ geladene Position, Glutamat 317, welche ebenfalls wahrscheinlich keinen Kontakt zum

5.6 Ausblick: Übertragbarkeit des Mechanismus auf andere MCT

Lösungsmittel hat. Der Transportmechanismus von MCT9 läuft wahrscheinlich nicht über die Interaktion mit geladenen Positionen im Transporter ab, sondern über einen anderen Mechanismus. Hier könnten Wasserstoffbrückenbindungen die Konformationen des Transporters stabilisieren und die Substratbindung erkennen. Damit hat MCT9 eine deutlich stärkere Ähnlichkeit mit SfMCT und MCT6. Jedoch bleibt es der einzige charakterisierte Vertreter der MCT ohne ein zentrales Arginin.

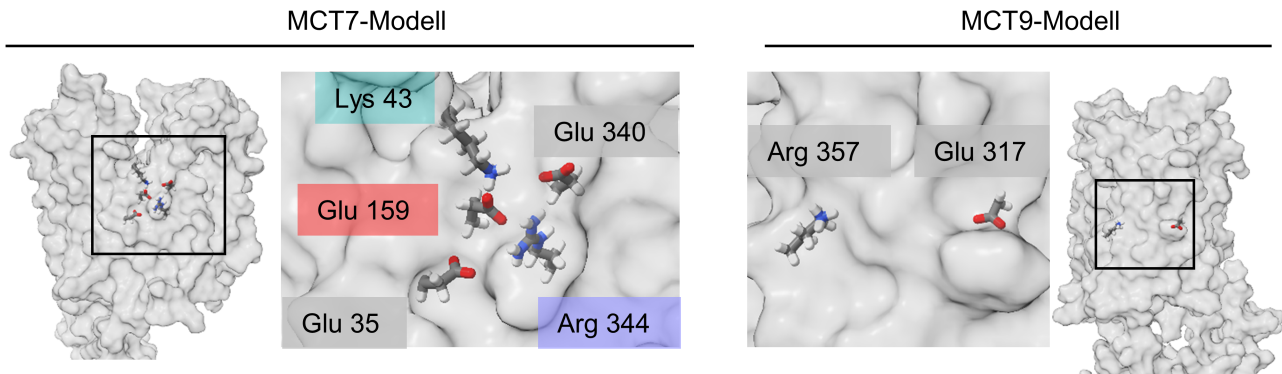


Abbildung 5.15: Die Bindetasche von MCT7 weist im räumlichen Aufbau große Ähnlichkeit zu MCT1 auf, im Gegensatz dazu befinden sich im MCT9 keine geladenen Aminosäuren innerhalb der Bindetasche. Die Modelle von MCT7 und MCT9 basieren auf einer MCT1 Struktur (PDB ID #6LZ0). Dargestellt sind die Oberfläche der Proteine und die Seitenketten der benannten Positionen. MCT9 ist dabei in einer Seitenansicht dargestellt, um die Lage der Aminosäuren innerhalb des Modells zu verdeutlichen.

Auch in der Primärsequenz hat MCT7 eine deutliche Ähnlichkeit zu MCT1-4, wie im Alignment deutlich wird (siehe Abbildung 5.16). Die Positionen von Lysin und Arginin sind konserviert (MCT7: Lys 43, Arg 344), lediglich die negative Ladung befindet sich im MCT7 an einer anderen Position (Glu 159). Anstelle des konservierten Arginins tritt im MCT9 ein Lysin. Dieses hat jedoch wahrscheinlich keinen Zugang zur Bindetasche.

	38		309	313
MCT1	K	S	D	R
MCT2	K	S	D	R
MCT3	K	S	D	R
MCT4	K	S	D	R
MCT7	43 K	159 E	E	344 R
MCT9	L	S	T	K

Abbildung 5.16: Die geladenen Aminosäuren von MCT7 befinden sich im Alignment teilweise an der selben Position wie im MCT1. MCT9 trägt an diesen Positionen wahrscheinlich keine geladenen Aminosäuren. MCT7 trägt in der Bindetasche zwei positive Ladungen (Lys 43, Arg 344) und eine negative Ladung (Glu 159). Im Gegensatz dazu können im Modell von MCT9 keine geladenen Aminosäuren in der Bindetasche identifiziert werden.

Basierend auf den Proteinstrukturen und -modellen lässt sich der beschriebene Transportmechanismus wahrscheinlich gut auf den Anionen-Protonen-Cotransport über MCT2, MCT3, MCT4 und

MCT7 übertragen. Die hohe strukturelle Ähnlichkeit der Bindetaschen der Zwitterionentransporter MCT8, MCT10 und MCT12 zu der von MCT1 lässt auch hier auf Gemeinsamkeiten im Transportmechanismus schließen. Da die Substrate der Zwitterionentransporter bereits protoniert vorliegen, entfällt hier wahrscheinlich der Protonentransfer und das Lysin wird durch andere Aminosäuren ersetzt. Die Transportpfade von SfMCT, MCT6 und MCT9 sind von deutlich weniger geladenen Aminosäuren flankiert. Daher müssen hier die Substratbindung und Translokation wahrscheinlich über andere Wechselwirkungen vermittelt werden, die durch funktionelle Gruppen an ähnlichen Positionen im Transporter ausgebildet werden könnten. Zur Beurteilung, ob der Mechanismus auch in anderen MCT ähnlich abläuft, fehlen aussagekräftige Daten zu Funktion und experimentell aufgeklärte Strukturen der Proteine.

Diese Arbeit ebnet den Weg für die umfangreiche Charakterisierung der MCT-Familie. Der hier beschriebene Transportmechanismus zeigt die relevanten Positionen im MCT1 auf und stellt diese in einen mechanistischen Zusammenhang. Die Untersuchung der korrespondierenden Positionen in weiteren MCT stellt damit einen idealen Startpunkt dar, von dem aus dieser Mechanismus auf weitere Transporter der SLC16A-Familie übertragen oder modifiziert werden kann.

Literaturverzeichnis

- [1] N. Psychogios, D. D. Hau, J. Peng, A. C. Guo, R. Mandal, S. Bouatra, I. Sinelnikov, R. Krishnamurthy, R. Eisner, B. Gautam *et al.* „The human serum metabolome“. In: *PLoS One* 6.2 (2011), e16957.
- [2] J. Wahren, P. Felig, G. Ahlborg und L. Jorfeldt. „Glucose metabolism during leg exercise in man“. In: *J Clin Invest* 50.12 (1971), S. 2715–2725.
- [3] L. Jorfeldt und J. Wahren. „Human forearm muscle metabolism during exercise. V. Quantitative aspects of glucose uptake and lactate production during prolonged exercise“. In: *Scand J Clin Lab Invest* 26.1 (1970), S. 73–81.
- [4] R. D. Cohen und R. Simpson. „Lactate metabolism“. In: *Anesthesiology* 43.6 (1975), S. 661–673.
- [5] A. V. Hill. „Muscular activity and carbohydrate metabolism“. In: *Science* 60.1562 (1924), S. 505–514.
- [6] J. D. Rabinowitz und S. Enerbäck. „Lactate: the ugly duckling of energy metabolism“. In: *Nat Metab* 2.7 (2020), S. 566–571.
- [7] S. Hui, J. M. Ghergurovich, R. J. Morscher, C. Jang, X. Teng, W. Lu, L. A. Esparza, T. Reya, Le Zhan, J. Yanxiang Guo *et al.* „Glucose feeds the TCA cycle via circulating lactate“. In: *Nature* 551.7678 (2017), S. 115–118.
- [8] J. M. Berg, J. L. Tymoczko und L. Stryer. *Biochemie*. 7. Aufl., korr. Nachdr. Lehrbuch. Berlin und Heidelberg: Springer Spektrum, 2014.
- [9] M. G. Vander Heiden, L. C. Cantley und C. B. Thompson. „Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation“. In: *Science* 324.5930 (2009), S. 1029–1033.
- [10] A. P. Halestrap und D. Meredith. „The SLC16 gene family-from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond“. In: *Pflugers Arch* 447.5 (2004), S. 619–628.
- [11] V. Pucino, M. Bombardieri, C. Pitzalis und C. Mauro. „Lactate at the crossroads of metabolism, inflammation, and autoimmunity“. In: *Eur J Immunol* 47.1 (2017), S. 14–21.

- [12] V. Pucino, M. Certo, V. Bulusu, D. Cucchi, K. Goldmann, E. Pontarini, R. Haas, J. Smith, S. E. Headland, K. Blighe *et al.* „Lactate Buildup at the Site of Chronic Inflammation Promotes Disease by Inducing CD4⁺ T Cell Metabolic Rewiring“. In: *Cell Metab* 30.6 (2019), 1055–1074.e8.
- [13] K. Fischer, P. Hoffmann, S. Voelkl, N. Meidenbauer, J. Ammer, M. Edinger, E. Gottfried, S. Schwarz, G. Rothe, S. Hoves *et al.* „Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells“. In: *Blood* 109.9 (2007), S. 3812–3819.
- [14] Z. Husain, Y. Huang, P. Seth und V. P. Sukhatme. „Tumor-derived lactate modifies antitumor immune response: effect on myeloid-derived suppressor cells and NK cells“. In: *J Immunol* 191.3 (2013), S. 1486–1495.
- [15] A. Brand, K. Singer, G. E. Koehl, M. Kolitzus, G. Schoenhammer, A. Thiel, C. Matos, C. Bruss, S. Klobuch, K. Peter *et al.* „LDHA-associated lactic acid production blunts tumor immunosurveillance by T and NK cells“. In: *Cell Metab* 24.5 (2016), S. 657–671.
- [16] P. Sonveaux, F. Végran, T. Schroeder, M. C. Wergin, J. Verrax, Z. N. Rabbani, C. J. de Saedeleer, K. M. Kennedy, C. Diepart, B. F. Jordan *et al.* „Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice“. In: *J Clin Investig* 118.12 (2008), S. 3930–3942.
- [17] O. Warburg, K. Posener und E. Negelein. „Über den stoffwechsel der carcinomzelle.“ In: *Naturwissenschaften* 12.50 (1924), S. 1131–1137.
- [18] O. Warburg. „On the origin of cancer cells“. In: *Science* 123.3191 (1956), S. 309–314.
- [19] R. J. DeBerardinis, J. J. Lum, G. Hatzivassiliou und C. B. Thompson. „The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation“. In: *Cell Metab* 7.1 (2008), S. 11–20.
- [20] D. C. Wallace. „Mitochondria and cancer“. In: *Nat Rev Cancer* 12.10 (2012), S. 685–698.
- [21] P. Vaupel und A. Mayer. „Availability, not respiratory capacity governs oxygen consumption of solid tumors“. In: *Int J Biochem Cell Biol* 44.9 (2012), S. 1477–1481.
- [22] T. M. Ashton, W. G. McKenna, L. A. Kunz-Schughart und G. S. Higgins. „Oxidative phosphorylation as an emerging target in cancer therapy“. In: *Clin Cancer Res* 24.11 (2018), S. 2482–2490.
- [23] B. Faubert, K. Y. Li, L. Cai, C. T. Hensley, J. Kim, L. G. Zacharias, C. Yang, Q. N. Do, S. Doucette, D. Burguete *et al.* „Lactate metabolism in human lung tumors“. In: *Cell* 171.2 (2017), 358–371.e9.
- [24] S. Pavlides, D. Whitaker-Menezes, R. Castello-Cros, N. Flomenberg, A. K. Witkiewicz, P. G. Frank, M. C. Casimiro, C. Wang, P. Fortina, S. Addya *et al.* „The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma“. In: *Cell Cycle* 8.23 (2009), S. 3984–4001.

- [25] E. Allen, P. Miéville, C. M. Warren, S. Saghafeinia, L. Li, M.-W. Peng und D. Hanahan. „Metabolic symbiosis enables adaptive resistance to anti-angiogenic therapy that is dependent on mTOR signaling“. In: *Cell Rep* 15.6 (2016), S. 1144–1160.
- [26] G. Schwickert, S. Walenta, K. Sundfjør, E. K. Rofstad und W. Mueller-Klieser. „Correlation of high lactate levels in human cervical cancer with incidence of metastasis“. In: *Cancer Res* 55.21 (1995), S. 4757–4759.
- [27] S. Walenta, M. Wetterling, M. Lehrke, G. Schwickert, K. Sundfjør, E. K. Rofstad und W. Mueller-Klieser. „High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers“. In: *Cancer Res* 60.4 (2000), S. 916–921.
- [28] S. Walenta, S. Snyder, Z. A. Haroon, R. D. Braun, K. Amin, D. Brizel, W. Mueller-Klieser, B. Chance und M. W. Dewhirst. „Tissue gradients of energy metabolites mirror oxygen tension gradients in a rat mammary carcinoma model“. In: *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 51.3 (2001), S. 840–848.
- [29] D. M. Brizel, T. Schroeder, R. L. Scher, S. Walenta, R. W. Clough, M. W. Dewhirst und W. Mueller-Klieser. „Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer“. In: *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 51.2 (2001), S. 349–353.
- [30] V. L. Payen, E. Mina, V. F. van Hée, P. E. Porporato und P. Sonveaux. „Monocarboxylate transporters in cancer“. In: *Mol Metab* 33 (2020), S. 48–66.
- [31] V. Gold. *The IUPAC Compendium of Chemical Terminology*. Research Triangle Park, NC: International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), 2019.
- [32] S. Chakravarty und R. Varadarajan. „Residue depth: a novel parameter for the analysis of protein structure and stability“. In: *Structure* 7.7 (1999), S. 723–732.
- [33] Q. Yang, Y. Li, J.-D. Yang, Y. Liu, L. Zhang, S. Luo und J.-P. Cheng. „Holistic prediction of the pKa in diverse solvents based on a machine-learning approach“. In: *Angew Chem Int Ed Engl* 59.43 (2020), S. 19282–19291.
- [34] J. D. R. Schmidt, P. Walloch, B. Höger und E. Beitz. „Aquaporins with lactate/lactic acid permeability at physiological pH conditions“. In: *Biochimie* 188 (2021), S. 7–11.
- [35] W. Shinoda. „Permeability across lipid membranes“. In: *Biochim Biophys Acta* 1858.10 (2016), S. 2254–2265.
- [36] R. J. Lambert und M. Stratford. „Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response“. In: *J Appl Microbiol* 86.1 (1999), S. 157–164.
- [37] N. P. Mira, M. C. Teixeira und I. Sá-Correia. „Adaptive response and tolerance to weak acids in *Saccharomyces cerevisiae*: a genome-wide view“. In: *OMICS* 14.5 (2010), S. 525–540.

- [38] C. Hanneschlaeger, A. Horner und P. Pohl. „Intrinsic membrane permeability to small molecules“. In: *Chem Rev* 119.9 (2019), S. 5922–5953.
- [39] M. Rothert, D. Rönfeldt und E. Beitz. „Electrostatic attraction of weak monoacid anions increases probability for protonation and passage through aquaporins“. In: *J Biol Chem* 292.22 (2017), S. 9358–9364.
- [40] B. Wu und E. Beitz. „Aquaporins with selectivity for unconventional permeants“. In: *Cell Mol Life Sci* 64.18 (2007), S. 2413–2421.
- [41] B. Roux. „Ion channels and ion selectivity“. In: *Essays Biochem* 61.2 (2017), S. 201–209.
- [42] M. S. Sansom. „Ion-channel gating: twist to open“. In: *Curr Biol* 5.4 (1995), S. 373–375.
- [43] A. M. Kariev und M. E. Green. „Voltage gated ion channel function: gating, conduction, and the role of water and protons“. In: *Int J Mol Sci* 13.2 (2012), S. 1680–1709.
- [44] T. Sotelo-Hitschfeld, M. I. Niemeyer, P. Mächler, I. Ruminot, R. Lerchundi, M. T. Wyss, J. Stobart, I. Fernández-Moncada, R. Valdebenito, P. Garrido-Gerter *et al.* „Channel-mediated lactate release by K⁺-stimulated astrocytes“. In: *J Neurosci* 35.10 (2015), S. 4168–4178.
- [45] M. A. Felmler, R. S. Jones, V. Rodriguez-Cruz, K. E. Follman und M. E. Morris. „Monocarboxylate Transporters (SLC16): Function, Regulation, and Role in Health and Disease“. In: *Pharmacol Rev* 72.2 (2020), S. 466–485.
- [46] G. Gyimesi, J. Pujol-Giménez, Y. Kanai und M. A. Hediger. „Sodium-coupled glucose transport, the SLC5 family, and therapeutically relevant inhibitors: from molecular discovery to clinical application“. In: *Pflugers Arch* 472.9 (2020), S. 1177–1206.
- [47] C. J. Law, P. C. Maloney und D.-N. Wang. „Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters“. In: *Annu Rev Microbiol* 62 (2008), S. 289–305.
- [48] S. Miyauchi, E. Gopal, Y.-J. Fei und V. Ganapathy. „Functional identification of SLC5A8, a tumor suppressor down-regulated in colon cancer, as a Na(+)-coupled transporter for short-chain fatty acids“. In: *J Biol Chem* 279.14 (2004), S. 13293–13296.
- [49] M. J. Coady, M.-H. Chang, F. M. Charron, C. Plata, B. Wallendorff, J. F. Sah, S. D. Markowitz, M. F. Romero und J.-Y. Lapointe. „The human tumour suppressor gene SLC5A8 expresses a Na⁺-monocarboxylate cotransporter“. In: *J Physiol* 557.Pt 3 (2004), S. 719–731.
- [50] E. Gopal, N. S. Umapathy, P. M. Martin, S. Ananth, J. P. Gnana-Prakasam, H. Becker, C. A. Wagner, V. Ganapathy und P. D. Prasad. „Cloning and functional characterization of human SMCT2 (SLC5A12) and expression pattern of the transporter in kidney“. In: *Biochim Biophys Acta* 1768.11 (2007), S. 2690–2697.

- [51] L. Han, Q. Qu, D. Aydin, O. Panova, M. J. Robertson, Y. Xu, R. O. Dror, G. Skiniotis und L. Feng. „Structure and mechanism of the SGLT family of glucose transporters“. In: *Nature* 601.7892 (2022), S. 274–279.
- [52] M. Thangaraju, S. Ananth, P. M. Martin, P. Roon, S. B. Smith, E. Sterneck, P. D. Prasad und V. Ganapathy. „c/ebpdelta Null mouse as a model for the double knock-out of slc5a8 and slc5a12 in kidney“. In: *J Biol Chem* 281.37 (2006), S. 26769–26773.
- [53] D. D. F. Loo, X. Jiang, E. Gorraitz, B. A. Hirayama und E. M. Wright. „Functional identification and characterization of sodium binding sites in Na symporters“. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 110.47 (2013), E4557–66.
- [54] P. J. Höglund, K. J. V. Nordström, H. B. Schiöth und R. Fredriksson. „The solute carrier families have a remarkably long evolutionary history with the majority of the human families present before divergence of Bilaterian species“. In: *Mol Biol Evol* 28.4 (2011), S. 1531–1541.
- [55] B. Wu, J. Rambow, S. Bock, J. Holm-Bertelsen, M. Wiechert, A. B. Soares, T. Spielmann und E. Beitz. „Identity of a Plasmodium lactate/H(+) symporter structurally unrelated to human transporters“. In: *Nat Commun* 6 (2015), S. 6284.
- [56] M. Wiechert, H. Erler, A. Gollack und E. Beitz. „A widened substrate selectivity filter of eukaryotic formate-nitrite transporters enables high-level lactate conductance“. In: *FEBS J* 284.16 (2017), S. 2663–2673.
- [57] F. Helmstetter, P. Arnold, B. Höger, L. M. Petersen und E. Beitz. „Formate-nitrite transporters carrying nonprotonatable amide amino acids instead of a central histidine maintain pH-dependent transport“. In: *J Biol Chem* 294.2 (2019), S. 623–631.
- [58] J. D. R. Schmidt und E. Beitz. „Mutational widening of constrictions in a formate-nitrite/H+ transporter enables aquaporin-like water permeability and proton conductance“. In: *J Biol Chem* 298.1 (2022), S. 101513.
- [59] A. P. Halestrap. „The SLC16 gene family - structure, role and regulation in health and disease“. In: *Mol Aspects Med* 34.2-3 (2013), S. 337–349.
- [60] A.-L. Köpnick, A. Jansen, K. Geistlinger, N. H. Epalle und E. Beitz. „Basigin drives intracellular accumulation of l-lactate by harvesting protons and substrate anions“. In: *PLoS One* 16.3 (2021), e0249110.
- [61] L. S. Forero-Quintero, S. Ames, H.-P. Schneider, A. Thyssen, C. D. Boone, J. T. Andring, R. McKenna, J. R. Casey, J. W. Deitmer und H. M. Becker. „Membrane-anchored carbonic anhydrase IV interacts with monocarboxylate transporters via their chaperones CD147 and GP70“. In: *J Biol Chem* 294.2 (2019), S. 593–607.

- [62] N. Wang, X. Jiang, S. Zhang, A. Zhu, Y. Yuan, H. Xu, J. Lei und C. Yan. „Structural basis of human monocarboxylate transporter 1 inhibition by anti-cancer drug candidates“. In: *Cell* 184.2 (2021), 370–383.e13.
- [63] S. Sasaki, Y. Futagi, M. Kobayashi, J. Ogura und K. Iseki. „Functional characterization of 5-oxoproline transport via SLC16A1/MCT1“. In: *J Biol Chem* 290.4 (2015), S. 2303–2311.
- [64] Q. Wang, Y. Lu und M. E. Morris. „Monocarboxylate transporter (MCT) mediates the transport of gamma-hydroxybutyrate in human kidney HK-2 cells“. In: *Pharm Res* 24.6 (2007), S. 1067–1078.
- [65] G. C. Churchill, M. Strupp, C. Factor, T. Bremova-Ertl, M. Factor, M. C. Patterson, F. M. Platt und A. Galione. „Acetylation turns leucine into a drug by membrane transporter switching“. In: *Sci Rep* 11.1 (2021), S. 15812.
- [66] S. Bröer, H. P. Schneider, A. Bröer, B. Rahman, B. Hamprecht und J. W. Deitmer. „Characterization of the monocarboxylate transporter 1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes by changes in cytosolic pH“. In: *Biochem J* 333 (Pt 1) (1998), S. 167–174.
- [67] A. Reddy, L. H. M. Bozi, O. K. Yaghi, E. L. Mills, H. Xiao, H. E. Nicholson, M. Paschini, J. A. Paulo, R. Garrity, D. Laznik-Bogoslavski *et al.* „pH-gated succinate secretion regulates muscle remodeling in response to exercise“. In: *Cell* 183.1 (2020), 62–75.e17.
- [68] S. Bröer, A. Bröer, H.-P. Schneider, C. Stegen, A. P. Halestrap und J. W. Deitmer. „Characterization of the high-affinity monocarboxylate transporter MCT2 in *Xenopus laevis* oocytes“. In: *Biochem J* 341.3 (1999), S. 529–535.
- [69] B. Zhang, Q. Jin, L. Xu, N. Li, Y. Meng, S. Chang, X. Zheng, J. Wang, Y. Chen, D. Neculai *et al.* „Cooperative transport mechanism of human monocarboxylate transporter 2“. In: *Nat Commun* 11.1 (2020), S. 2429.
- [70] W. E. Visser, N. J. Philp, T. B. van Dijk, W. Klootwijk, E. C. H. Friesema, J. Jansen, P. W. Beesley, A. G. Ianculescu und T. J. Visser. „Evidence for a homodimeric structure of human monocarboxylate transporter 8“. In: *Endocrinology* 150.11 (2009), S. 5163–5170.
- [71] J. E. Manning Fox, D. Meredith und A. P. Halestrap. „Characterisation of human monocarboxylate transporter 4 substantiates its role in lactic acid efflux from skeletal muscle“. In: *J Physiol* 529 Pt 2 (2000), S. 285–293.
- [72] K. S. Dimmer, B. Friedrich, F. Lang, J. W. Deitmer und S. Bröer. „The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells“. In: *Biochem J* 350 Pt 1 (2000), S. 219–227.

- [73] Y. Contreras-Baeza, P. Y. Sandoval, R. Alarcón, A. Galaz, F. Cortés-Molina, K. Alegría, F. Baeza-Lehnert, R. Arce-Molina, A. Guequén, C. A. Flores *et al.* „Monocarboxylate transporter 4 (MCT4) is a high affinity transporter capable of exporting lactate in high-lactate microenvironments“. In: *J Biol Chem* 294.52 (2019), S. 20135–20147.
- [74] M. Quanz, E. Bender, C. Kopitz, S. Grünewald, A. Schlicker, W. Schwede, A. Eheim, L. Toschi, R. Neuhaus, C. Richter *et al.* „Preclinical efficacy of the novel monocarboxylate transporter 1 inhibitor BAY-8002 and associated markers of resistance“. In: *Mol Cancer Ther* 17.11 (2018), S. 2285–2296.
- [75] Y. Fang, W. Liu, Z. Tang, X. Ji, Y. Zhou, S. Song, M. Tian, C. Tao, R. Huang, G. Zhu *et al.* „Monocarboxylate transporter 4 inhibition potentiates hepatocellular carcinoma immunotherapy through enhancing T cell infiltration and immune attack“. In: *Hepatology* (2022).
- [76] W. F. Michne, J. D. Schroeder, J. W. Guiles, A. M. Treasurywala, C. A. Weigelt, M. F. Stansberry, E. McAvoy, C. R. Shah, Y. Baine und D. G. Sawutz. „Novel inhibitors of the nuclear factor of activated T cells (NFAT)-mediated transcription of beta-galactosidase: potential immunosuppressive and antiinflammatory agents“. In: *J Med Chem* 38.14 (1995), S. 2557–2569.
- [77] C. M. Murray, R. Hutchinson, J. R. Bantick, G. P. Belfield, A. D. Benjamin, D. Brazma, R. V. Bundick, I. D. Cook, R. I. Craggs, S. Edwards *et al.* „Monocarboxylate transporter MCT1 is a target for immunosuppression“. In: *Nat Chem Biol* 1.7 (2005), S. 371–376.
- [78] M. J. Ovens, A. J. Davies, M. C. Wilson, C. M. Murray und A. P. Halestrap. „AR-C155858 is a potent inhibitor of monocarboxylate transporters MCT1 and MCT2 that binds to an intracellular site involving transmembrane helices 7-10“. In: *Biochem J* 425.3 (2010), S. 523–530.
- [79] B. M. Bola, A. L. Chadwick, F. Michopoulos, K. G. Blount, B. A. Telfer, K. J. Williams, P. D. Smith, S. E. Critchlow und I. J. Stratford. „Inhibition of monocarboxylate transporter-1 (MCT1) by AZD3965 enhances radiosensitivity by reducing lactate transport“. In: *Mol Cancer Ther* 13.12 (2014), S. 2805–2816.
- [80] N. J. Curtis, L. Mooney, L. Hopcroft, F. Michopoulos, N. Whalley, H. Zhong, C. Murray, A. Logie, M. Revill, K. F. Byth *et al.* „Pre-clinical pharmacology of AZD3965, a selective inhibitor of MCT1: DLBCL, NHL and Burkitt's lymphoma anti-tumor activity“. In: *Oncotarget* 8.41 (2017), S. 69219–69236.
- [81] Cancer Research UK und AstraZeneca. *A cancer research UK Phase I Trial of AZD3965, a monocarboxylate transporter 1 inhibitor (MCT1) in patients with advanced cancer: NCT01791595, CRUKD/12/004*. Hrsg. von ClinicalTrials.gov. 11.04.2022.

- [82] R. Polański, C. L. Hodgkinson, A. Fusi, D. Nonaka, L. Priest, P. Kelly, F. Trapani, P. W. Bishop, A. White, S. E. Critchlow *et al.* „Activity of the monocarboxylate transporter 1 inhibitor AZD3965 in small cell lung cancer“. In: *Clin Cancer Res* 20.4 (2014), S. 926–937.
- [83] A. A. Cluntun, R. Badolia, S. Lettlova, K. M. Parnell, T. S. Shankar, N. A. Diakos, K. A. Olson, I. Taleb, S. M. Tatum, J. A. Berg *et al.* „The pyruvate-lactate axis modulates cardiac hypertrophy and heart failure“. In: *Cell Metab* 33.3 (2021), 629–648.e10.
- [84] S. Jonnalagadda, S. K. Jonnalagadda, C. T. Ronayne, G. L. Nelson, L. N. Solano, J. Rumbley, J. Holy, V. R. Mereddy und L. R. Drewes. „Novel N,N-dialkyl cyanocinnamic acids as monocarboxylate transporter 1 and 4 inhibitors“. In: *Oncotarget* 10.24 (2019), S. 2355–2368.
- [85] N. Draoui, O. Schicke, A. Fernandes, X. Drozak, F. Nahra, A. Dumont, J. Douxfils, E. Hermans, J.-M. Dogné, R. Corbau *et al.* „Synthesis and pharmacological evaluation of carboxycoumarins as a new antitumor treatment targeting lactate transport in cancer cells“. In: *Bioorg Med Chem* 21.22 (2013), S. 7107–7117.
- [86] W. T. Hodges, C. Jarasvaraparn, D. Ferguson, K. Griffett, L. E. Gill, Y. Chen, M. X. G. Ilagan, L. Hegazy, B. Elgendy, K. Cho *et al.* „Mitochondrial pyruvate carrier inhibitors improve metabolic parameters in diet-induced obese mice“. In: *J Biol Chem* 298.2 (2022), S. 101554.
- [87] C. Corbet, E. Bastien, N. Draoui, B. Doix, L. Mignon, B. F. Jordan, A. Marchand, J.-C. Vanherck, P. Chaltin, O. Schakman *et al.* „Interruption of lactate uptake by inhibiting mitochondrial pyruvate transport unravels direct antitumor and radiosensitizing effects“. In: *Nat Commun* 9.1 (2018), S. 1208.
- [88] H. Kubinyi. „Chance favors the prepared mind—from serendipity to rational drug design“. In: *J Recept Signal Transduct Res* 19.1-4 (1999), S. 15–39.
- [89] N. Kurt Yilmaz, R. Swanstrom und C. A. Schiffer. „Improving viral protease inhibitors to counter drug resistance“. In: *Trends Microbiol* 24.7 (2016), S. 547–557.
- [90] G. B. Evans, V. L. Schramm und P. C. Tyler. „The transition to magic bullets - transition state analogue drug design“. In: *Med Chem Comm* 9.12 (2018), S. 1983–1993.
- [91] S. Muzammil, P. Ross und E. Freire. „A major role for a set of non-active site mutations in the development of HIV-1 protease drug resistance“. In: *Biochemistry* 42.3 (2003), S. 631–638.
- [92] A. N. Matthew, F. Leidner, G. J. Lockbaum, M. Henes, J. Zephyr, S. Hou, D. N. Rao, J. Timm, L. N. Rusere, D. A. Ragland *et al.* „Drug design strategies to avoid resistance in direct-acting antivirals and beyond“. In: *Chem Rev* 121.6 (2021), S. 3238–3270.
- [93] C.-L. Hung und C.-C. Chen. „Computational approaches for drug discovery“. In: *Drug Dev Res* 75.6 (2014), S. 412–418.

- [94] P. D. Bosshart, D. Kalbermatter, S. Bonetti und D. Fotiadis. „Mechanistic basis of L-lactate transport in the SLC16 solute carrier family“. In: *Nat Commun* 10.1 (2019), S. 2649.
- [95] M. C. Wilson, D. Meredith, C. Bunnun, R. B. Sessions und A. P. Halestrap. „Studies on the DIDS-binding site of monocarboxylate transporter 1 suggest a homology model of the open conformation and a plausible translocation cycle“. In: *J Biol Chem* 284.30 (2009), S. 20011–20021.
- [96] A. Yamaguchi, Y. Futagi, M. Kobayashi, K. Narumi, A. Furugen und K. Iseki. „Extracellular lysine 38 plays a crucial role in pH-dependent transport via human monocarboxylate transporter 1“. In: *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1862.2 (2020), S. 183068.
- [97] N. Philp, P. Chu, T. C. Pan, R. Z. Zhang, M. L. Chu, K. Stark, D. Boettiger, H. Yoon und T. Kieber-Emmons. „Developmental expression and molecular cloning of REMP, a novel retinal epithelial membrane protein“. In: *Exp Cell Res* 219.1 (1995), S. 64–73.
- [98] H. Yoon, A. Fanelli, E. F. Grollman und N. J. Philp. „Identification of a unique monocarboxylate transporter (MCT3) in retinal pigment epithelium“. In: *Biochem Biophys Res Commun* 234.1 (1997), S. 90–94.
- [99] N. J. Philp, D. Wang, H. Yoon und L. M. Hjelmeland. „Polarized expression of monocarboxylate transporters in human retinal pigment epithelium and ARPE-19 cells“. In: *Investig Ophthalmol Vis Sci* 44.4 (2003), S. 1716–1721.
- [100] Y. Murakami, N. Kohyama, Y. Kobayashi, M. Ohbayashi, H. Ohtani, Y. Sawada und T. Yamamoto. „Functional characterization of human monocarboxylate transporter 6 (SLC16A5)“. In: *Drug Metab Dispos* 33.12 (2005), S. 1845–1851.
- [101] N. Kohyama, H. Shiokawa, M. Ohbayashi, Y. Kobayashi und T. Yamamoto. „Characterization of monocarboxylate transporter 6: expression in human intestine and transport of the antidiabetic drug nateglinide“. In: *Drug Metab Dispos* 41.11 (2013), S. 1883–1887.
- [102] R. S. Jones, D. Ruszaj, M. D. Parker und M. E. Morris. „Contribution of Monocarboxylate Transporter 6 to the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Bumetanide in Mice“. In: *Drug Metab Dispos* 48.9 (2020), S. 788–795.
- [103] T. Ren, R. S. Jones und M. E. Morris. „Untargeted metabolomics identifies the potential role of monocarboxylate transporter 6 (MCT6/SLC16A5) in lipid and amino acid metabolism pathways“. In: *Pharmacol Res Perspect* 10.3 (2022), e00944.
- [104] E. C. H. Friesema, S. Ganguly, A. Abdalla, J. E. Manning Fox, A. P. Halestrap und T. J. Visser. „Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter“. In: *J Biol Chem* 278.41 (2003), S. 40128–40135.

- [105] E. C. H. Friesema, J. Jansen, J.-W. Jachtenberg, W. E. Visser, M. H. A. Kester und T. J. Visser. „Effective cellular uptake and efflux of thyroid hormone by human monocarboxylate transporter 10“. In: *Mol Endocrinol* 22.6 (2008), S. 1357–1369.
- [106] D. K. Kim, Y. Kanai, A. Chairoungdua, H. Matsuo, S. H. Cha und H. Endou. „Expression cloning of a Na⁺-independent aromatic amino acid transporter with structural similarity to H⁺/monocarboxylate transporters“. In: *J Biol Chem* 276.20 (2001), S. 17221–17228.
- [107] D. Braun, U. Reuter und U. Schweizer. „Modeling the biochemical phenotype of MCT8 mutations in vitro: resolving a troubling inconsistency“. In: *Endocrinology* 160.6 (2019), S. 1536–1546.
- [108] A. M. Dumitrescu, X.-H. Liao, T. B. Best, K. Brockmann und S. Refetoff. „A novel syndrome combining thyroid and neurological abnormalities is associated with mutations in a monocarboxylate transporter gene“. In: *Am J Hum Genet* 74.1 (2004), S. 168–175.
- [109] Y. Futagi, K. Narumi, A. Furugen, M. Kobayashi und K. Iseki. „Molecular characterization of the orphan transporter SLC16A9, an extracellular pH- and Na⁺-sensitive creatine transporter“. In: *Biochem Biophys Res Commun* 522.2 (2020), S. 539–544.
- [110] R. Jomura, Y. Tanno, S.-I. Akanuma, Y. Kubo, M. Tachikawa und K.-I. Hosoya. „Contribution of monocarboxylate transporter 12 to blood supply of creatine on the sinusoidal membrane of the hepatocytes“. In: *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 321.2 (2021), G113–G122.
- [111] J. Abplanalp, E. Laczko, N. J. Philp, J. Neidhardt, J. Zuercher, P. Braun, D. F. Schorderet, F. L. Munier, F. Verrey, W. Berger *et al.* „The cataract and glucosuria associated monocarboxylate transporter MCT12 is a new creatine transporter“. In: *Hum Mol Genet* 22.16 (2013), S. 3218–3226.
- [112] B. Kloeckener-Gruissem, K. Vandekerckhove, G. Nürnberg, J. Neidhardt, C. Zeitz, P. Nürnberg, I. Schipper und W. Berger. „Mutation of solute carrier SLC16A12 associates with a syndrome combining juvenile cataract with microcornea and renal glucosuria“. In: *Am J Hum Genet* 82.3 (2008), S. 772–779.
- [113] N. Dhayat, A. Simonin, M. Anderegg, G. Pathare, B. P. Lüscher, C. Deisl, G. Albano, D. Mordasini, M. A. Hediger, D. V. Surbek *et al.* „Mutation in the monocarboxylate transporter 12 gene affects guanidinoacetate excretion but does not cause glucosuria“. In: *J Am Soc Nephrol* 27.5 (2016), S. 1426–1436.
- [114] R. Jomura, Y. Tanno, S.-I. Akanuma, Y. Kubo, M. Tachikawa und K.-I. Hosoya. „Monocarboxylate transporter 12 as a guanidinoacetate efflux transporter in renal proximal tubular epithelial cells“. In: *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1862.11 (2020), S. 183434.

- [115] M. Takahashi, H. Kishimoto, Y. Shirasaka und K. Inoue. „Functional characterization of monocarboxylate transporter 12 (SLC16A12/MCT12) as a facilitative creatine transporter“. In: *Drug Metab Pharmacokinet* 35.3 (2020), S. 281–287.
- [116] S. E. Hugo, L. Cruz-Garcia, S. Karanth, R. M. Anderson, D. Y. R. Stainier und A. Schlegel. „A monocarboxylate transporter required for hepatocyte secretion of ketone bodies during fasting“. In: *Genes Dev* 26.3 (2012), S. 282–293.
- [117] K. Higuchi, K. Sugiyama, R. Tomabechi, H. Kishimoto und K. Inoue. „Mammalian monocarboxylate transporter 7 (MCT7/Slc16a6) is a novel facilitative taurine transporter“. In: *J Biol Chem* 298.4 (2022), S. 101800.
- [118] N. Otani, Y. Kurata, N. Maharani, M. Kuwabara, N. Ikeda, T. Notsu, P. Li, J. Miake, A. Yoshida, H. Sakaguchi *et al.* „Evidence for urate uptake through monocarboxylate transporter 9 expressed in mammalian cells and its enhancement by heat shock“. In: *Circ Rep* 2.8 (2020), S. 425–432.
- [119] K. Suhre, S.-Y. Shin, A.-K. Petersen, R. P. Mohn, D. Meredith, B. Wägele, E. Altmaier, P. Deloukas, J. Erdmann, E. Grundberg *et al.* „Human metabolic individuality in biomedical and pharmaceutical research“. In: *Nature* 477.7362 (2011), S. 54–60.
- [120] S. Sasaki, M. Kobayashi, Y. Futagi, J. Ogura, H. Yamaguchi und K. Iseki. „Involvement of histidine residue His382 in pH regulation of MCT4 activity“. In: *PLoS One* 10.4 (2014), e0122738.
- [121] S. Groeneweg, E. C. H. Friesema, S. Kersseboom, W. Klootwijk, W. E. Visser, R. P. Peeters und T. J. Visser. „The role of Arg445 and Asp498 in the human thyroid hormone transporter MCT8“. In: *Endocrinology* 155.2 (2014), S. 618–626.
- [122] D. Drew und O. Boudker. „Shared molecular mechanisms of membrane transporters“. In: *Annu Rev Biochem* 85 (2016), S. 543–572.
- [123] A.-L. Köpnick, K. Geistlinger und E. Beitz. „Cysteine 159 delineates a hinge region of the alternating access monocarboxylate transporter 1 and is targeted by cysteine-modifying inhibitors“. In: *FEBS J* 288.20 (2021), S. 6052–6062.
- [124] A. W. de Bruijne, H. Vreeburg und J. van Steveninck. „Kinetic analysis of l-lactate transport in human erythrocytes via the monocarboxylate-specific carrier system“. In: *Biochim Biophys Acta Biomembr* 732.3 (1983), S. 562–568.
- [125] J. S. Lolkema und D.-J. Slotboom. „The Hill analysis and co-ion-driven transporter kinetics“. In: *J Gen Physiol* 145.6 (2015), S. 565–574.

- [126] S. Bröer, B. Rahman, G. Pellegrini, L. Pellerin, J. L. Martin, S. Verleystonk, B. Hamprecht und P. J. Magistretti. „Comparison of lactate transport in astroglial cells and monocarboxylate transporter 1 (MCT 1) expressing *Xenopus laevis* oocytes. Expression of two different monocarboxylate transporters in astroglial cells and neurons“. In: *J Biol Chem* 272.48 (1997), S. 30096–30102.
- [127] S. Galić, H.-P. Schneider, A. Bröer, J. W. Deitmer und S. Bröer. „The loop between helix 4 and helix 5 in the monocarboxylate transporter MCT1 is important for substrate selection and protein stability“. In: *Biochem J* 376.Pt 2 (2003), S. 413–422.
- [128] C. Manoharan, M. C. Wilson, R. B. Sessions und A. P. Halestrap. „The role of charged residues in the transmembrane helices of monocarboxylate transporter 1 and its ancillary protein basigin in determining plasma membrane expression and catalytic activity“. In: *Mol Membr Biol* 23.6 (2006), S. 486–498.
- [129] A. W. de Bruijne, H. Vreeburg und J. van Steveninck. „Alternative-substrate inhibition of L-lactate transport via the monocarboxylate-specific carrier system in human erythrocytes“. In: *Biochim Biophys Acta Biomembr* 812.3 (1985), S. 841–844.
- [130] K. C. Vinnakota und D. A. Beard. „Kinetic analysis and design of experiments to identify the catalytic mechanism of the monocarboxylate transporter isoforms 4 and 1“. In: *Biophys J* 100.2 (2011), S. 369–380.
- [131] S. Sasaki, M. Kobayashi, Y. Futagi, J. Ogura, H. Yamaguchi, N. Takahashi und K. Iseki. „Crucial residue involved in L-lactate recognition by human monocarboxylate transporter 4 (hMCT4)“. In: *PLoS One* 8.7 (2013), e67690.
- [132] Y. Futagi, S. Sasaki, M. Kobayashi, K. Narumi, A. Furugen und K. Iseki. „The flexible cytoplasmic loop 3 contributes to the substrate affinity of human monocarboxylate transporters“. In: *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1859.10 (2017), S. 1790–1795.
- [133] A. Bader und E. Beitz. „Transmembrane facilitation of lactate/H⁺ Instead of lactic acid is not a question of semantics but of cell viability“. In: *Membranes* 10.9 (2020), S. 236.
- [134] B. Rahman, H. P. Schneider, A. Bröer, J. W. Deitmer und S. Bröer. „Helix 8 and helix 10 are involved in substrate recognition in the rat monocarboxylate transporter MCT1“. In: *Biochemistry* 38.35 (1999), S. 11577–11584.
- [135] Y. Futagi, M. Kobayashi, K. Narumi, A. Furugen und K. Iseki. „Homology modeling and site-directed mutagenesis identify amino acid residues underlying the substrate selection mechanism of human monocarboxylate transporters 1 (hMCT1) and 4 (hMCT4)“. In: *Cell Mol Life Sci* 76.24 (2019), S. 4905–4921.

- [136] I. Soares-Silva, S. Paiva, G. Diallinas und M. Casal. „The conserved sequence NXXS/THXS/TQ-DXXXT of the lactate/pyruvate:H(+) symporter subfamily defines the function of the substrate translocation pathway“. In: *Mol Membr Biol* 24.5-6 (2007), S. 464–474.
- [137] T. C. McIlvaine. „A buffer solution for colorimetric comparison“. In: *J Biol Chem* 49.1 (1921), S. 183–186.
- [138] R. G. Bates. „Standardization of Acidity Measurements Extension of the pH Concept to Mixed Solvents and Heavy Water“. In: *Anal Chem* 40.6 (1968), 28A–38A.
- [139] T. D. Goddard, C. C. Huang, E. C. Meng, E. F. Pettersen, G. S. Couch, J. H. Morris und T. E. Ferrin. „UCSF ChimeraX: Meeting modern challenges in visualization and analysis“. In: *Protein Sci* 27.1 (2018), S. 14–25.
- [140] C. A. Schneider, W. S. Rasband und K. W. Eliceiri. „NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis“. In: *Nat Methods* 9.7 (2012), S. 671–675.
- [141] E. W. Sayers, E. E. Bolton, J. R. Brister, K. Canese, J. Chan, D. C. Comeau, R. Connor, K. Funk, C. Kelly, S. Kim *et al.* „Database resources of the national center for biotechnology information“. In: *Nucleic Acids Res* 50.D1 (2022), S. D20–D26.
- [142] K. P. Tan, T. B. Nguyen, S. Patel, R. Varadarajan und M. S. Madhusudhan. „Depth: a web server to compute depth, cavity sizes, detect potential small-molecule ligand-binding cavities and predict the pKa of ionizable residues in proteins“. In: *Nucleic Acids Res* 41.Web Server issue (2013), W314–21.
- [143] A. Waterhouse, M. Bertoni, S. Bienert, G. Studer, G. Tauriello, R. Gumienny, F. T. Heer, T. A. P. de Beer, C. Rempfer, L. Bordoli *et al.* „SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes“. In: *Nucleic Acids Res* 46.W1 (2018), W296–W303.
- [144] E. Beitz. „TEXshade: shading and labeling of multiple sequence alignments using LATEX2 epsilon“. In: *Bioinformatics* 16.2 (2000), S. 135–139.
- [145] K. S. Koutmou, A. P. Schuller, J. L. Brunelle, A. Radhakrishnan, S. Djuranovic und R. Green. „Ribosomes slide on lysine-encoding homopolymeric A stretches“. In: *Elife* 4 (2015).
- [146] R. D. Gietz. „Yeast transformation by the LiAc/SS carrier DNA/PEG method“. In: *Methods Mol Biol* 1163 (2014), S. 33–44.
- [147] L. Michaelis und M. L. Menten. „Die kinetik der invertinwirkung“. In: *Biochem Z* 49.333-369 (1913), S. 352.
- [148] D. G. Higgins, A. J. Bleasby und R. Fuchs. „CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment“. In: *Comput Appl Biosci* 8.2 (1992), S. 189–191.
- [149] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov und P. E. Bourne. „The Protein Data Bank“. In: *Nucleic Acids Res* 28.1 (2000), S. 235–242.

- [150] V. Carmelo, H. Santos und I. Sá-Correia. „Effect of extracellular acidification on the activity of plasma membrane ATPase and on the cytosolic and vacuolar pH of *Saccharomyces cerevisiae*“. In: *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1325.1 (1997), S. 63–70.
- [151] A. Kotyk. „Intracellular pH of baker's yeast“. In: *Folia Microbiol* 8 (1963), S. 27–31.
- [152] M. Casal, S. Paiva, R. P. Andrade, C. Gancedo und C. Leão. „The lactate-proton symport of *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by JEN1“. In: *J Bacteriol* 181.8 (1999), S. 2620–2623.
- [153] S. Paiva, F. Devaux, S. Barbosa, C. Jacq und M. Casal. „Ady2p is essential for the acetate permease activity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*“. In: *Yeast* 21.3 (2004), S. 201–210.
- [154] J. J. Castorino, S. M. Gallagher-Colombo, A. V. Levin, P. G. Fitzgerald, J. Polishook, B. Kloeckener-Gruissem, E. Ostertag und N. J. Philp. „Juvenile cataract-associated mutation of solute carrier SLC16A12 impairs trafficking of the protein to the plasma membrane“. In: *Investig Ophthalmol Vis Sci* 52.9 (2011), S. 6774–6784.
- [155] R. C. Boswell-Casteel, J. M. Johnson, R. M. Stroud und F. A. Hays. „Integral membrane protein expression in *Saccharomyces cerevisiae*“. In: *Methods Mol Biol* 1432 (2016), S. 163–186.
- [156] R. A. Figler, H. Omote, R. K. Nakamoto und M. K. Al-Shawi. „Use of chemical chaperones in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to enhance heterologous membrane protein expression: high-yield expression and purification of human P-glycoprotein“. In: *Arch Biochem Biophys* 376.1 (2000), S. 34–46.
- [157] N. André, N. Cherouati, C. Prual, T. Steffan, G. Zeder-Lutz, T. Magnin, F. Pattus, H. Michel, R. Wagner und C. Reinhart. „Enhancing functional production of G protein-coupled receptors in *Pichia pastoris* to levels required for structural studies via a single expression screen“. In: *Protein Sci* 15.5 (2006), S. 1115–1126.
- [158] R. Cohen und D. Engelberg. „Commonly used *Saccharomyces cerevisiae* strains (e.g. BY4741, W303) are growth sensitive on synthetic complete medium due to poor leucine uptake“. In: *FEMS Microbiol Lett* 273.2 (2007), S. 239–243.
- [159] P. Kirk, M. C. Wilson, C. Heddle, M. H. Brown, A. N. Barclay und A. P. Halestrap. „CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression“. In: *EMBO J* 19.15 (2000), S. 3896–3904.
- [160] A. P. Halestrap und M. C. Wilson. „The monocarboxylate transporter family—role and regulation“. In: *IUBMB Life* 64.2 (2012), S. 109–119.
- [161] R. Latorre und C. Miller. „Conduction and selectivity in potassium channels“. In: *J Membr Biol* 71 (1983), S. 11–30.

- [162] G. Liu, B. Hinch, H. Davatol-Hag, Y. Lu, M. Powers und A. D. Beavis. „Temperature dependence of the mitochondrial inner membrane anion channel. The relationship between temperature and inhibition by protons“. In: *J Biol Chem* 271.33 (1996), S. 19717–19723.
- [163] B. Deuticke. „Monocarboxylate transport in erythrocytes“. In: *J Membr Biol* 70.2 (1982), S. 89–103.
- [164] L. Carpenter und A. P. Halestrap. „The kinetics, substrate and inhibitor specificity of the lactate transporter of Ehrlich-Lettre tumour cells studied with the intracellular pH indicator BCECF“. In: *Biochem J* 304 (Pt 3) (1994), S. 751–760.
- [165] C. Bock, T. Zollmann, K.-A. Lindt, R. Tampé und R. Abele. „Peptide translocation by the lysosomal ABC transporter TAPL is regulated by coupling efficiency and activation energy“. In: *Sci Rep* 9.1 (2019), S. 11884.
- [166] W. Quick und J. D. Mills. „Changes in the apparent Michaelis constant for ADP during photophosphorylation are consistent with delocalised chemiosmotic energy coupling“. In: *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 893.2 (1987), S. 197–207.
- [167] P. L. Fernandez und A. S. Murkin. „Inverse solvent isotope effects in enzyme-catalyzed reactions“. In: *Molecules* 25.8 (2020), S. 1933.
- [168] T. E. DeCoursey und V. V. Cherny. „Deuterium isotope effects on permeation and gating of proton channels in rat alveolar epithelium“. In: *J Gen Physiol* 109.4 (1997), S. 415–434.
- [169] R. J. Naftalin und R. J. Rist. „3-O-methyl-d-glucose transport in rat red cells: effects of heavy water“. In: *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1064.1 (1991), S. 37–48.
- [170] A. K. Covington, M. Paabo, R. A. Robinson und R. G. Bates. „Use of the glass electrode in deuterium oxide and the relation between the standardized pD (paD) scale and the operational pH in heavy water“. In: *Anal Chem* 40.4 (1968), S. 700–706.
- [171] P. K. Glasoe und F. A. Long. „Use of glass electrodes to measure acidities in deuterium oxide“. In: *J Phys Chem* 64.1 (1960), S. 188–190.
- [172] F. G. K. Baucke. „Further insight into the dissociation mechanism of glass electrodes. The response in heavy water“. In: *J Phys Chem B* 102.24 (1998), S. 4835–4841.
- [173] F. Dumas, R. Koebnik, M. Winterhalter und P. van Gelder. „Sugar transport through maltoporin of Escherichia coli. Role of polar tracks“. In: *J Biol Chem* 275.26 (2000), S. 19747–19751.
- [174] K. Inoue, S. Tahara, Y. Kato, S. Takeuchi, T. Tahara und H. Kandori. „Spectroscopic study of proton-transfer mechanism of inward proton-pump rhodopsin, parvularcula oceani xenorhodopsin“. In: *J Phys Chem B* 122.25 (2018), S. 6453–6461.

- [175] R. P. Bell und A. T. Kuhn. „Dissociation constants of some acids in deuterium oxide“. In: *Trans Faraday Soc* 59 (1963), S. 1789.
- [176] A. Goffeau, B. G. Barrell, H. Bussey, R. W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J. D. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston *et al.* „Life with 6000 genes“. In: *Science* 274.5287 (1996), S. 546, 563–7.
- [177] M. Wiechert und E. Beitz. „Mechanism of formate-nitrite transporters by dielectric shift of substrate acidity“. In: *EMBO J* 36.7 (2017), S. 949–958.
- [178] V. Volkov. „Quantitative description of ion transport via plasma membrane of yeast and small cells“. In: *Front Plant Sci* 6 (2015), S. 425.
- [179] A. K. Meinild, D. A. Klaerke und T. Zeuthen. „Bidirectional water fluxes and specificity for small hydrophilic molecules in aquaporins 0-5“. In: *J Biol Chem* 273.49 (1998), S. 32446–32451.
- [180] D. Krenc, B. Wu und E. Beitz. „Specific aquaporins increase the ammonia tolerance of a *Saccharomyces cerevisiae* mep1-3 fps1 deletion strain“. In: *Mol Membr Biol* 30.1 (2013), S. 43–51.
- [181] P. A. Shore, B. B. Brodie und C. A. M. Hogben. „The gastric secretion of drugs: a pH partition hypothesis“. In: *J Pharmacol Exp Ther* 119.3 (1957), S. 361–369.
- [182] W. Lang und R. Zander. „Physiological HEPES buffer proposed as a calibrator for pH measurement in human blood“. In: *Clin Chem Lab Med* 37.5 (1999), S. 563–571.
- [183] J. V. Da Moreira, M. Hamraz, M. Abolhassani, E. Bigan, S. Pérès, L. Paulevé, M. L. Nogueira, J.-M. Steyaert und L. Schwartz. „The redox status of cancer cells supports mechanisms behind the Warburg effect“. In: *Metabolites* 6.4 (2016), S. 33.
- [184] T. K. Harris und A. S. Mildvan. „High-precision measurement of hydrogen bond lengths in proteins by nuclear magnetic resonance Methods“. In: *Proteins Struct Funct Genet* 35.3 (1999), S. 275–282.
- [185] G. Schwarzenbach, A. Epprecht und H. Erlenmeyer. „Über Dissoziationskonstanten in Wasser und Deuteriumoxyd. Messungen mit der Deuteriumelektrode“. In: *Helv Chim Acta* 19.1 (1963), S. 1292–1304.
- [186] A. Yamaguchi, K. Narumi, A. Furugen, K. Iseki und M. Kobayashi. „Identification of the essential extracellular aspartic acids conserved in human monocarboxylate transporters 1, 2, and 4“. In: *Biochem Biophys Res Commun* 529.4 (2020), S. 1061–1065.
- [187] D. Braun, I. Lelios, G. Krause und U. Schweizer. „Histidines in potential substrate recognition sites affect thyroid hormone transport by monocarboxylate transporter 8 (MCT8)“. In: *Endocrinology* 154.7 (2013), S. 2553–2561.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass diese Abhandlung, abgesehen von der Beratung meines Betreuers, nach Inhalt und Form die eigene Arbeit und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln verfasst ist. Ich versichere außerdem, dass die Arbeit nach den Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden ist. Ich versichere des Weiteren, dass mir noch kein akademischer Grad entzogen wurde. Ich versichere, dass diese Arbeit noch nicht im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen hat.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

- Geistlinger, K., Schmidt, J.D.R., Beitz, E. (2022) Lactic acid permeability of aquaporin-9 enables cytoplasmic lactate accumulation via an ion trap. **Life** 12: 120.
- Köpnick, A.L., Geistlinger, K., Beitz, E. (2021) Cysteine 159 delineates a hinge region of the alternating access monocarboxylate transporter 1 and is targeted by cysteine-modifying inhibitors. **FEBS J.** 288:6052-6062.
- Köpnick, A.L., Jansen, A., Geistlinger, K., Epalle, N.H., Beitz, E. (2021) Basigin drives intracellular accumulation of L-lactate by harvesting protons and substrate anions. **PLoS One** 16: e0249110.

Teile dieser Arbeit wurden zur Veröffentlichung eingereicht und befinden sich derzeit in Revision:

- Geistlinger, K., Schmidt, J.D.R., Beitz, E., Human monocarboxylate transporters accept and relay protons via the bound substrate for selectivity and activity at physiological pH. Eingereicht bei **PNAS Nexus**

Katharina Geistlinger
Kiel, im Dezember 2022

Danksagung

Ich bedanke mich bei meinem Betreuer, Eric Beitz, für die offene Tür, den fachlichen Austausch und den Freiraum, Ideen stets folgen zu dürfen. Außerdem bedanke ich mich ganz herzlich bei Anna Fuchs und Björn Henke für die technische Unterstützung. Auch bei allen Hiwis und Wahlpflichtfach-Studierenden möchte ich mich für die Mitarbeit bedanken. Mein Dank gilt auch allen weiteren Mitarbeiter*innen am Institut, die mich am Institut begleitet haben, insbesondere Kalle für so manche Reparatur, Susanne für die Gespräche, Dirk für die handwerkliche Umsetzung von Ideen und bei der IT-Abteilung. Ich möchte mich auch beim Team der Sanger-Sequenzierung vom IKMB bedanken und bei Christine Desel für die Einführung zur Konfokalmikroskopie.

Ich bedanke mich außerdem bei allen Mitgliedern des Arbeitskreises für eure fachliche und moralische Unterstützung. Insbesondere möchte ich mich bei Anna-Lena Köpnick dafür bedanken, dass sie mich beim Einstieg in die Welt der MCT unterstützt hat. Des Weiteren möchte ich mich bei allen Korrekturleser*innen für ihr Feedback bedanken. Außerdem möchte ich mich bei Bastian Höger, Christian Hansen, Moira Möller und Marc Scherwing dafür bedanken, dass wir uns in der Lehre stets aufeinander verlassen können. Ein besonderer Dank geht an Philipp Walloch, der mich hervorragend eingearbeitet hat, und an Lea Petersen. Ihr wart mir stets ein Vorbild. A special thanks goes out to Nathan Epalle, with whom I always had the most insightful discussions about my scientific theories and the world altogether. Liebe Jana Schmidt, danke dafür, dass du immer bereit warst, meine Ideen zu diskutieren und ganz tief durchzusteigen. Danke für deine innere Ruhe, die mir in den letzten Monaten unglaublich geholfen hat.

Danke an all die lieben Menschen in meinem Leben.

Außerdem möchte ich mich an dieser Stelle ganz herzlich bei meinen Eltern, bei Lenchen und bei Holger bedanken. Danke, dass ihr mich unterstützt und mich in meinem Leben begleitet.

