

### Abteilungsdirektor/in | Head of Department

**Prof. Dr. med. Gerhard Burckhardt**

### Hochschullehrer/innen | Professors and Lecturers

*Telefon*

<b>Burckhardt, Birgitta C.</b>	PD Dr. phil. nat.	bcburckhardt@physiol.med.uni-goettingen.de	39-5880
<b>Burckhardt, Gerhard</b>	Prof. Dr. med.	gburckh@gwdg.de	39-5881
<b>Krick, Wolfgang</b>	PD Dr. rer. nat.	wkrick@gwdg.de	39-5907
<b>Wolff, Natascha A.</b> (bis 2/2005)	PD Dr. rer. nat.	-	-

### Weitere Arbeitsgruppenleiter/innen | Other Group Leaders

<b>Bahn, Andrew</b>	Dr. rer. nat.	abahn@physiol.med.uni-goettingen.de	39-5894
<b>Di Sole</b> (bis 6/2003)	Dr. rer. nat.	-	-
<b>Hagos, Yohannes</b>	Dr. rer. nat.	Hagos@physiol.med.uni-goettingen.de	39-5894

#### Forschungsschwerpunkte

- ▶ Regulation des renalen Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauschers 3 (NHE3)
- ▶ Charakterisierung des Organische-Anionen-Transporters 1 (OAT1)
- ▶ Charakterisierung des Organische-Anionen-Transporters 3 (OAT3)
- ▶ Charakterisierung des Natrium-Dicarboxylat-Kotransporters 3 (NaDC-3)

#### Research Foci

- ▶ Regulation of the Renal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchangers 3 (NHE3)
- ▶ Characterization of the Organic Anion Transporter 1 (OAT1)
- ▶ Characterization of the Organic Anion Transporter 3 (OAT3)
- ▶ Characterization of the Sodium-Dicarboxylate Cotransporter 3 (NaDC-3)

## Einleitung

Viele organische Anionen (OA), zu denen zahlreiche Pharmaka wie z. B.  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, Angiotensin-converting-Enzym-Inhibitoren, Diuretika, Urikosurika und Virostatika gehören, werden in den proximalen Nierentubuli sezerniert und auf diese Weise effektiv mit dem Urin ausgeschieden. Wir untersuchen, wie diese Stoffe aus dem Blut durch die basolaterale Membran in die Zellen der proximalen Tubuli aufgenommen werden. Dieser erste Schritt der Sekretion (der zweite Schritt ist die Abgabe durch die apikale Membran in den Harn) beruht aufgrund unserer früheren Befunde auf dem Zusammenwirken dreier Transportsysteme: der  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, dem  $\text{Na}^+$ -Dicarboxylat-Kotransporter und einem oder mehreren OA/ $\alpha$ -Ketoglutarat-Austauschern. Der  $\text{Na}^+$ -Dicarboxylat-Kotransporter (NaDC-3) und zwei OA/ $\alpha$ -Ketoglutarataustauscher (OAT1, OAT3) liegen kloniert vor und können nach heterologer Expression funktionell untersucht werden. Ziele unserer Arbeiten sind Definition der Triebkräfte für den OA-Transport, Aufklärung der Substratspezifität und Nachweis von Regulationsvorgängen auf Expressions- und posttranslationaler Ebene. Damit wollen wir einen Beitrag liefern für das Verständnis der renalen Pharmakaausscheidung und der klinisch bedeutsamen Wechselwirkung zwischen Pharmaka, die um die Transporter konkurrieren.

## Preface

Many organic anions (OA), including endogenous waste products and various drugs, such as  $\beta$ -lactam antibiotics, ACE inhibitors, diuretics, uricosurics and antivirals, are secreted in renal proximal tubules and are thus efficiently disposed of with the urine. We are investigating how these compounds are taken up from the blood across the basolateral membrane into proximal tubule cells. This uptake constitutes the first step of secretion (the second step is the release of compounds across the apical membrane into the urine) and is the result of the cooperation of three transport processes: the  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, the  $\text{Na}^+$ -dicarboxylate cotransporter, and OA/ $\alpha$ -ketoglutarate exchangers. We perform functional tests on the cloned and heterologously expressed  $\text{Na}^+$ -dicarboxylate cotransporter, NaDC-3, and the OA/ $\alpha$ -ketoglutarate exchangers, OAT1 and OAT3. The goals of our studies are the definition of driving forces for OA secretion, the delineation of substrate specificities, and the description of regulation of transporter function by posttranslational modification. We wish to contribute to the knowledge on molecular mechanisms of renal drug excretion as well as on the clinically important interaction between drugs during secretion.

## 1. Regulation des renalen $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers 3 (NHE3)

Zwei Drittel des in den Nierenkörperchen filtrierten Kochsalzes und Wassers werden in den proximalen Nierentubuli resorbiert.

Der in der apikalen Membran proximaler Tubulusepithelzellen lokalisierte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher des Subtyps 3 (NHE3) ist maßgeblich an der  $\text{Na}^+$ -Resorption beteiligt. Eine gesteigerte Aktivität des NHE-3 führt zu vermehrter Salz- und Wasserresorption und kann damit eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer Hypertonie spielen. In dem mit dem Weggang von Frau Dr. Di Sole abgeschlossenen Projekt wurde die Wirkung von Adenosin auf die Aktivität des NHE-3 in Opossumnierenzellen (OK-Zellen) und A6-Zellen (Tubuluszellen des Krallenfroschs *Xenopus laevis*) untersucht. Adenosin stimulierte in niedrigen und hemmte in hohen Konzentrationen den NHE3 über A1-Adenosinrezeptoren. Als intrazelluläre Signalkaskaden waren cAMP,  $\text{Ca}^{2+}$  und die Proteinkinase C beteiligt. Letztere führte über eine Endozytose des NHE-3 zu einer verringerten Aktivität. Das calcineurin homologous protein (CHP) wurde als ein unter der Kontrolle von Adenosin stehendes Regulatorprotein des NHE-3 entdeckt. Die Aminosäurereste 462 bis 552 des NHE-3 binden CHP, und diese Bindung ist essentiell für die durch Adenosin ausgelöste Regulation des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers.

## 1. Regulation of the Renal $\text{Na}^+/\text{H}^+$ Exchanger

Two thirds of the filtrated NaCl and water are reabsorbed in renal proximal tubules. The  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger subtype 3 (NHE-3) at the apical membrane of proximal tubule cells plays a pivotal role in the  $\text{Na}^+$ -reabsorption. An increased activity of NHE-3 causes an increased salt and water retention and gives rise to an elevated blood pressure, finally leading to hypertension. In this project, we investigated the influence of adenosine on the activity of NHE-3 expressed either in opossum kidney (OK) cells or in A6 cells (derived from distal tubules of the clawed frog *Xenopus laevis*). At low concentrations, adenosine stimulated NHE-3 activity, whereas at higher concentrations an inhibition was observed. Both effects were mediated through A1 adenosine receptors and involved cAMP,  $\text{Ca}^{2+}$  and protein kinase C for intracellular signalling. The activation of protein kinase C led to an endocytic retrieval of NHE-3 from the membrane and thus to an inhibition of the exchanger's activity. We also detected the calcineurin homologous protein (CHP) as a regulator of NHE-3 activity. CHP binds to a stretch of amino acids (positions 462-552) at the C-terminal part of NHE-3, and this interaction is essential for the adenosine-mediated effects. The project was completed on Dr. Di Sole's departure from the department.

### Arbeitsgruppenleiter/innen | Group Leaders

Dr. rer. nat. Francesca Di Sole

### Kooperationen | Cooperations

Prof. Dr. Valeria Casavola, Department of General and Environmental Physiology, University of Bari, Italy

Prof. Dr. Corinna Helmle-Kolb, Managing Director, BCP Biotech Consulting Partners, Zürich

Prof. Dr. Orson Moe, Department of Internal Medicine, Div. Nephrology, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, USA

Prof. Dr. Heini Murer, Physiologisches Institut, Universität Zürich, Zürich, Schweiz

**Ausgewählte Publikationen | Selected Publications**

Di Sole F, Cerull R, Babich V, Quinones H, Gisler SM, Biber J, Murer H, Burckhardt G, Helmle-Kolb C, Moe OW (2004) Acute regulation of Na/H exchanger NHE3 by adenosine A(1) receptors is mediated by calcineurin homologous protein. *J BIOL CHEM*, 279(4): 2962-74.

Di Sole F, Cerull R, Petzke S, Casavola V, Burckhardt G, Helmle-Kolb C (2003) Bimodal acute effects of A1 adenosine receptor activation on Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 3 in opossum kidney cells. *J AM SOC NEPHROL*, 14(7): 1720-30.

**2. Charakterisierung des Organische-Anionen-Transporters 1 (OAT1)**

Der OAT1 gehört zu einer Genfamilie (SLC22) von Transportern mit einer ausgeprägt breiten Spezifität für organische Anionen und Kationen. Wir haben früher, z. T. in Kooperation, den OAT1 aus den Nieren von Flunder, Ratte, Kaninchen und Mensch kloniert und in seiner Aminosäuresequenz aufgeklärt. Der humane OAT1 kommt in vier Spleißvarianten vor, von denen zwei (OAT1-1 und OAT1-2) funktionell aktiv sind. Bei der Suche nach körpereigenen Substraten des OAT1 sind wir auf die anionischen Metabolite der Neurotransmitter Noradrenalin, Dopamin und Serotonin sowie auf neuroaktive Metabolite aus dem Tryptophanstoffwechsel gestoßen. Da der OAT1 nicht nur in der basolateralen Membran proximaler Nierentubuluszellen sondern auch in Neuronen des Gehirns von Maus und Mensch vorkommt, nehmen wir an, dass dieser Transporter für die Entfernung der Metabolite aus dem Gehirn und – über die Nieren – aus dem Körper verantwortlich ist. Ein weiteres endogenes Substrat könnte Cortisol sein, denn der OAT1 ist in den Zona fasciculata-Zellen der Nebennierenrinde der Ratte zu finden, wo seine Expression unter der Kontrolle von ACTH steht. Von den Pharmaka haben wir den Histaminrezeptorblocker Cimetidin näher untersucht, der in seiner ungeladenen, nicht aber in der kationischen Form vom OAT1 als Substrat akzeptiert wird. Der OAT1 transportiert auch Cystein-S-Konjugate organischer Substanzen. Damit trägt er zur Entfernung toxischer Verbindungen aus dem Organismus bei, schädigt aber gleichzeitig die Zellen der proximalen Tubuli, in denen diese Substanzen vor ihrer endgültigen Ausscheidung angereichert werden. Die physiologischen und pharmakologischen Funktionen des OAT1 werden durch seine Expression und Regulation entscheidend beeinflusst. Im Hinblick auf die Expression im proximalen Tubulus existieren klare Geschlechtsunterschiede: männliche Ratten exprimieren in den S2-Segmenten der proximalen Tubuli deutlich mehr OAT1 als weibliche Tiere, wobei unklar ist, ob es auch beim Menschen diese Unterschiede gibt. Weiterhin wird die Aktivität des OAT1 durch die Proteinkinase C gehemmt. Dieser Hemmung liegt eine Endozytose des OAT1 zugrunde, wobei die kanonischen Phosphorylierungsstellen des Transporters nicht involviert sind.

**2. Characterization of the Organic Anion Transporter 1 (OAT1)**

OAT1 belongs to a gene family (SLC22) of transporters with a particularly broad specificity for organic anions and organic

cations. Earlier, we have cloned, in part together with other groups, the OAT1 from flounder, rat, rabbit and human kidneys and determined their amino acid sequences. For human OAT1 four splice variants exist, two of them (OAT1-1 and OAT1-2) being functional. Looking for endogenous substrates, we found that the acidic metabolites of the neurotransmitters norepinephrine, dopamine and 5-hydroxytryptamine as well as the neuroactive metabolites of the tryptophan metabolism interact with OAT1. Since OAT1 is not only located in kidneys, but also in neurons in the brain, we assume that this transporter is responsible for the removal of metabolites from the brain and, through the kidneys, from the whole organism. In the rat, cortisol could be another endogenous substrate, because OAT1 is localized in the adrenal zona fasciculata cells, where its expression is under the control of ACTH. Among renally excreted drugs we found that the histamine receptor blocker cimetidine is transported by OAT1 in its neutral, but not in its positively charged form. OAT1 also translocates cysteine S-conjugates and thus helps to secrete toxic compounds. Unfortunately, at the same time proximal tubule cells may be damaged, because the toxic compounds are first accumulated intracellularly before they are released into the urine. The expression and functional state of OAT1 will undoubtedly influence its physiological and pharmacological functions. In rats, clear gender differences were observed: male rats express considerably more OAT1 in the S2 segments of proximal tubules than female rats. At present, it is not known whether similar gender differences exist in humans. In addition, the activity of OAT1 is down-regulated by protein kinase C. We demonstrated that protein kinase C causes an endocytic retrieval of OAT1 units from the membrane. The canonical protein kinase C phosphorylation sites of OAT1 were not involved in this regulatory process.

**Arbeitsgruppenleiter/innen | Group Leaders**

Dr. rer. nat. Andrew Bahn

PD Dr. Birgitta C. Burckhardt

Dr. Johannes Hagos

PD Dr. Natascha A. Wolff

**Kooperationen | Cooperations**

Prof. Dr. Lazlo Füzesi, Abteilung Gastroenteropathologie, Bereich Humanmedizin, Universität Göttingen

Prof. Dr. F. Lang, Physiologisches Institut, Universität Tübingen

MD PhD Ivan Sabolic, Institute for Medical Research and Occupational Health, Zagreb, Kroatien

PD Dr. Jürgen Steffgen, Abteilung Nephrologie und Rheumatologie, Bereich Humanmedizin, Universität Göttingen

PD Dr. Bernd Ugele, 1. Frauenklinik Innenstadt, München

Prof. Stephen H. Wright, Department of Physiology, School of Medicine, University of Arizona, Tucson, USA

**Drittmittelförderung | Funding**

DFG, Graduiertenkolleg 335, 03/1997 – 02/2006

**Ausgewählte Publikationen | Selected Publications**

Bahn A, Ljubojevic M, Lorenz H, Schultz C, Ghebremedhin E, Ugele B, Sabolic I, Burckhardt G, Hagos Y (2005) Murine renal organic anion transporters mOAT1 and mOAT3 facilitate the transport of neuroactive tryptophan metabolites. *AM J PHYSIOL-CELL PH*, 289(5): C1075-84.

Bahn A, Ebbinghaus C, Ebbinghaus D, Pomimaskin EG, Füzesi L, Burckhardt G, Hagos Y (2004) Expression studies and functional characterization of renal human organic anion transporter 1 isoforms. *DRUG METAB DISPOS*, 32(4): 424-30.

Ljubojevic M, Herak-Kramberger CM, Hagos Y, Bahn A, Endou H, Burckhardt G, Sabolic I (2004) Rat renal cortical OAT1 and OAT3 exhibit gender differences determined by both androgen stimulation and estrogen inhibition. *AM J PHYSIOL-RENAL*, 287(1): F124-38. Epub 2004 Mar 9.

Bahn A, Hagos Y, Burckhardt G (2003) Endogenous Substrates of the Organic Anion Transporter 1 (OAT 1) in Kidneys and Eyes: Anionic Metabolites of Neurotransmitters. *Nova Acta Leopoldina*, 329: 21-7.

Beery E, Middel P, Bahn A, Willenberg HS, Hagos Y, Koepsell H, Bornstein SR, Müller GA, Burckhardt G, Steffgen J (2003) Molecular evidence of organic ion transporters in the rat adrenal cortex with adrenocorticotropin-regulated zonal expression. *ENDOCRINOLOGY*, 144(10): 4519-26.

Burckhardt BC, Burckhardt G (2003) Transport of organic anions across the basolateral membrane of proximal tubule cells. *REV PHYSIOL BIOCH PHARMACOL*, 146(1): 95-158.

Burckhardt BC, Brai S, Wallis S, Krick W, Wolff NA, Burckhardt G (2003) Transport of cimetidine by flounder and human renal organic anion transporter 1. *AM J PHYSIOL-RENAL*, 284(3): F503-9.

Groves CE, Munoz L, Bahn A, Burckhardt G, Wright SH (2003) Interaction of cysteine conjugates with human and rabbit organic anion transporter 1. *J PHARMACOL EXP THER*, 304(2): 560-6.

Wolff NA, Thies K, Kuhnke N, Reid G, Friedrich B, Lang F, Burckhardt G (2003) Protein kinase C activation downregulates human organic anion transporter 1-mediated transport through carrier internalization. *J AM SOC NEPHROL*, 14(8): 1959-68.

### 3. Charakterisierung des Organische-Anionen-Transporters 3 (OAT3)

Der OAT3 besitzt wie der OAT1 eine breite Spezifität für organische Anionen. Im Unterschied zum OAT1 transportiert er jedoch auch Steroidhormon-Sulfate wie z.B. Östron-3-Sulfat und die Gallensäure Taurocholat. Zunächst wurde angenommen, dass OAT3 als Uniporter funktioniert. Wir konnten jedoch zeigen, dass OAT3 wie OAT1 organische Anionen gegen Dicarboxylate austauscht. Damit werden sowohl OAT1 als auch OAT3 durch den über den NaDC-3 (siehe Schwerpunkt 4) aufgebauten  $\alpha$ -Ketoglutarat-Konzentrationsunterschied (intrazellulär > extrazellulär) angetrieben. Beide Transporter nehmen folglich organische Anionen aus dem Blut in die Zellen auf und sind maßgeblich am Sekretionsprozess beteiligt. Immunhistologische Untersuchungen zeigten, dass OAT3 in Ratten- und Mausnieren nicht nur in den proximalen Tubuli, sondern auch in fast allen anderen Nephronabschnitten in der basolateralen Zellmembran vorkommt. Die physiologische Rolle des OAT3 jenseits der proximalen Tubuli ist nicht klar. Wie schon beim OAT1 waren Geschlechtsunterschiede zu beobachten. Männliche Ratten exprimierten mehr OAT3 in den proximalen Tubuli als weibliche Tiere. In allen anderen Nephronabschnitten war die Expression jedoch unabhängig vom Geschlecht der Tiere. Als endogene Substrate testeten wir die Metabolite des Tryptophanstoffwechsels und fanden, dass Kynurenin und Xanthurenin in mikromolaren Konzentrationen mit dem OAT3 der Maus interagieren. Das Anion der Harnsäure (Urat) stellte sich als weiteres endogenes Substrat des OAT3 heraus. Die Affinität des OAT3 zum Urat war deutlich höher als die von OAT1, so dass wir annehmen, dass vor allem OAT3 am renalen Urattransport beteiligt ist. Schließlich konnten wir nachweisen, dass OAT3 in kultivierten Nebennierenrindenzellen des Menschen vorkommt und Cortisol transportiert. Es ist anzunehmen, dass die Freisetzung von Cortisol aus der Nebenniere Transporter-vermittelt ist und hierbei der OAT3 eine wichtige Rolle spielt.

### 3. Characterization of the Organic Anion Transporter 3 (OAT3)

Similar to OAT1, OAT3 possesses a broad specificity for organic anions. Unlike to OAT1, OAT3 transports sulfated steroid hormones, e. g. estrone-3-sulfate, and the bile acid taurocholate. Previously it was suggested that OAT3 functions as a uniporter. However, we found that OAT3 exchanges organic anions against dicarboxylates. Thereby both OAT1 and OAT3 are driven by the intracellular over extracellular concentration difference of  $\alpha$ -ketoglutarate that is created and maintained by the sodium dicarboxylate cotransporter 3 (NaDC-3; see research focus 4). Given the same driving force, we conclude that OAT1 as well as OAT3 take up organic anion from the blood into proximal tubule cells and are, hence, instrumental for organic anion secretion. By immunohistochemistry we demonstrated that OAT3 occurs at the basolateral cell membrane in all nephron segments of rat and mouse kidneys. Presently, the physiological role of OAT3 expressed beyond the proximal tubule is not clear. In rats, gender differences were observed, but only for OAT3 in proximal tubules: males showed a higher OAT3 expression than did females. Searching for endogenous substrates, we found that the tryptophan metabolites kynurenin and xanthurenin interact with high affinity with murine OAT3. Urate, the anion of uric acid, turned out to be another endogenous substrate for OAT3. Since OAT3 had a considerably higher affinity for urate than OAT1, we believe that mainly OAT3 is involved in renal urate transport. Finally, we found OAT3 to be expressed in human adrenal cells and to translocate radioactively labelled cortisol. We suggest that cortisol release from adrenal cells is carrier-mediated and that OAT3 plays an important role in this process.

#### Arbeitsgruppenleiter/innen | Group Leaders

Dr. rer. nat. Andrew Bahn

Dr. Johannes Hagos

PD Dr. Wolfgang Krick

PD Dr. Natascha A. Wolff

#### Kooperationen | Cooperations

MD PhD Ivan Sabolic, Institute for Medical Research and Occupational Health, Zagreb, Kroatien

PD Dr. Jürgen Steffgen, Abteilung Nephrologie und Rheumatologie, Bereich Humanmedizin, Universität Göttingen

Prof. Stephen H. Wright, Department of Physiology, School of Medicine, University of Arizona, Tucson, USA

#### Drittmittelförderung | Funding

DFG, Graduiertenkolleg 335, 03/1997 – 02/2006

#### Ausgewählte Publikationen | Selected Publications

Asif AR, Steffgen J, Metten M, Grunewald RW, Müller GA, Bahn A, Burckhardt G, Hagos Y (2005) Presence of organic anion transporters 3 (OAT3) and 4 (OAT4) in human adrenocortical cells. *PFLUG ARCH EUR J PHY*, 450(2): 88-95.

Burckhardt G (2005) Polyspecific organic cation transport: insights into the substrate binding site. *MOL PHARMACOL*, 67(5): 1391-2.

Ljubojevic M, Herak-Kramberger CM, Hagos Y, Bahn A, Endou H, Burckhardt G, Sabolic I (2004) Rat renal cortical OAT1 and OAT3 exhibit gender differences determined by both androgen stimulation and estrogen inhibition. *AM J PHYSIOL-RENAL*, 287(1): F124-38. Epub 2004 Mar 9.

Zhang X, Groves CE, Bahn A, Barendt WM, Prado MD, Rödiger M, Chatsudhipong V, Burckhardt G, Wright SH (2004) Relative contribution of OAT and OCT transporters

to organic electrolyte transport in rabbit proximal tubule. *AM J PHYSIOL-RENAL*, 287(5): F999-1010.

Bakhiya A, Bahn A, Burckhardt G, Wolff N (2003) Human organic anion transporter 3 (hOAT3) can operate as an exchanger and mediate secretory urate flux. *CELL PHYSIOL BIOCHEM*, 13(5): 249-56.

#### 4. Charakterisierung des Natrium-Dicarboxylat-Kotransporters 3 (NaDC-3)

Die Epithelzellen der proximalen Nierentubuli nehmen Dicarboxylate sowohl aus dem Primärharn als auch aus dem Blut über Natrium-Dicarboxylat-Cotransporter (NaDC) auf. Der NaDC-1 ist in der apikalen (harnseitigen) Membran lokalisiert und hat eine relativ niedrige Affinität für Succinat. Der NaDC-3 in der basolateralen (blutseitigen) Membran besitzt eine hohe Affinität für Succinat und  $\alpha$ -Ketoglutarat. Zu Beginn der Berichtsperiode war die Lokalisation des NaDC-3 jedoch noch nicht experimentell gesichert. In Kooperation mit dem MPI für molekulare Physiologie in Dortmund konnten wir den von uns früher klonierten Flundernieren (f)-NaDC-3 in der Basolateralmembran der proximalen Tubulussegmente P2 immunhistologisch nachweisen. Damit ist der fNaDC-3 im gleichen Segment lokalisiert, in dem auch die Sekretion organischer Anionen stattfindet. Vermutlich spielt der fNaDC-3 bei der Energetisierung der Anionensekretion in der Flunderniere die gleiche Rolle wie bei den Säugernieren. Da der fNaDC-3 drei Natriumionen ( $\text{Na}^+$ ) mit einem Molekül Succinat ( $\text{Suc}^{2-}$ ) cotransportiert, fließt pro aufgenommenem Succinat eine positive Überschussladung in die Zelle. Diesen Strom haben wir mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Methode untersucht. Die Ströme zeigten eine sättigbare Abhängigkeit von der Succinat- oder  $\alpha$ -Ketoglutaratkonzentration. Die  $K_m$ -Werte waren dabei von der angelegten Klemmspannung unabhängig, während die Maximalströme ( $I_{\text{max}}$  oder  $V_{\text{max}}$ ) mit zunehmender Hyperpolarisation größer wurden. 2,3-disubstituierte Dicarboxylate wie das zur Schwermetallentgiftung klinisch eingesetzte 2,3-Dimercaptosuccinat (Succimer) zeigten dagegen eine von der Klemmspannung abhängige  $K_m$ , was auf eine zusätzliche spannungsabhängige Konformationsänderung bei der Bindung dieser Moleküle hinweist. Die Aktivierung der Proteinkinase C führte zur Hemmung des in *Xenopus laevis* exprimierten fNaDC-3. Wie schon beim OAT1 (siehe Projekt 2) induzierte die Proteinkinase C eine Endozytose und damit eine Verringerung der Zahl an NaDC-3-Transportern in der Zellmembran. Die gerichtete Mutation aller potentiellen Proteinkinase C-Phosphorylierungsstellen verhinderte nicht die Hemmung durch Endozytose. Vermutlich interagiert der fNaDC-3 mit einem Proteinkinase C-gesteuerten Regulatorprotein, dessen Identität allerdings noch unbekannt ist.

#### 4. Characterization of the Sodium-Dicarboxylate Cotransporter 3 (NaDC-3)

Proximal tubule cells take up dicarboxylates from both, the primary urine and the blood by sodium-dicarboxylate cotransporters (NaDC). The isoform NaDC-1 is located at the

apical membrane and shows a rather low affinity for succinate. NaDC-3 is located at the basolateral cell membrane of proximal tubule cells and possesses a high affinity for succinate and  $\alpha$ -ketoglutarate. At the beginning of this period, the localisation of NaDC-3, however, was not known with certainty. Together with H. Hentschel, MPI for Molecular Physiology, Dortmund, we immunolocalized the previously cloned flounder NaDC-3 (fNaDC-3) to the basolateral membrane of the proximal tubule segment P2. It is this segment that is involved in the secretion of organic anions in the flounder kidney. We conclude from this colocalization that NaDC-3 energizes organic anion secretion in flounder kidney as its does in the kidneys of mammalian species. Succinate uptake generates an inward current, because three sodium ions ( $\text{Na}^+$ ) are cotransported with one succinate ( $\text{suc}^{2-}$ ) molecule. We measured these currents using the two-electrode voltage-clamp method. At increasing concentrations, succinate and  $\alpha$ -ketoglutarate generated saturable inward currents. The  $K_m$  values were independent of the clamp voltage, whereas the maximal currents ( $I_{\text{max}}$  or  $V_{\text{max}}$ ) increased with increasing intracellular negativity. When 2,3-disubstituted dicarboxylates such as the heavy metal antidote 2,3-dimercaptosuccinate (DMSA, succimer) were tested, we found that the  $K_m$  was no longer independent of clamp voltage. It appears that the transporter requires an additional, voltage-sensitive, conformational step to accommodate the bulky 2,3-disubstituted compounds. fNaDC-3 expressed in *Xenopus laevis* oocytes was down-regulated by activation of the protein kinase C. Similar to OAT1 (see topic #2), this down-regulation involved an endocytic retrieval of NaDC-3 molecules from the membrane. Site-directed mutagenesis of all putative protein kinase C phosphorylation sites did not prevent down-regulation. Possibly, NaDC-3 interacts with a protein kinase C-sensitive regulator protein, the molecular nature of which is presently unknown.

#### Arbeitsgruppenleiter/innen | Group Leaders

PD Dr. Birgitta C. Burckhardt

Dr. Yohannes Hagos

PD Dr. Natascha A. Wolff

#### Kooperationen | Cooperations

Dr. Hartmut Hentschel, Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund

PD Dr. Jürgen Steffgen, Abteilung Nephrologie und Rheumatologie, Bereich Humanmedizin, Universität Göttingen

#### Drittmittelförderung | Funding

DFG, Normalverfahren, 1999-2006

#### Ausgewählte Publikationen | Selected Publications

Burckhardt BC, Lorenz J, Burckhardt G, Steffgen J (2004) Interactions of benzylpenicillin and non-steroidal anti-inflammatory drugs with the sodium-dependent dicarboxylate transporter NaDC-3. *CELL PHYSIOL BIOCHEM*, 14(4-6): 415-24.

Burckhardt BC, Lorenz J, Kobbe C, Burckhardt G (2004) Substrate specificity of the human renal sodium dicarboxylate cotransporter, hNaDC-3, under voltage clamp conditions. *AM J PHYSIOL-RENAL*, 288 (4): F792-9.

Hagos Y, Burckhardt BC, Larsen A, Mathys C, Gronow T, Bahn A, Wolff NA, Burckhardt G, Steffgen J (2004) Regulation of sodium-dicarboxylate cotransporter-3 from winter flounder kidney by protein kinase C. *AM J PHYSIOL-RENAL*, 286(1): F86-93.

Hentschel H, Burckhardt BC, Schölermann B, Kühne L, Burckhardt G, Steffgen J (2003) Basolateral localization of flounder  $\text{Na}^+$ -dicarboxylate cotransporter (fNaDC-3) in the kidney of *Pleuronectes americanus*. *PFLUG ARCH EUR J PHY*, 446(5): 578-84

## Anhang | Appendix

### Habilitationen

Wolff NRA, Molekulare Charakterisierung renaler Transporter für organische Anionen. Habilitation Universität Göttingen 2004.

### Medizinische Dissertationen (Dr. med.; Dr. med. dent.)

#### Doctorate Theses (Dr. med.; Dr. med. dent.)

Brai S, Dr. med., Interaktionen des Histamin-2-Rezeptorantagonisten Cimetidin mit dem renalen organischen Anionentransporter der Winterflunder (rOAT). Dissertation Universität Göttingen 2005.

Braun I, Dr. med., Transport organischer Anionen über die basolaterale Membran der proximalen Tubuli der Schweinenieren. Dissertation Universität Göttingen 2005.

Ebbinghaus D, Dr. med., Expression des humanen organischen Anionentransporter 1 (hOAT1) in vivo. Dissertation Universität Göttingen 2005.

König A, Dr. med., Elektrophysiologische Untersuchungen zur Translokation von Quecksilber- und Bleiionen sowie von meso-2,3-Dimercaptosuccinat über den hochaffinen Na<sup>+</sup>-abhängigen Dicarboxylattransporter (fNaDC-3) aus den Nieren der Winterflunder (*Pseudopleuronectes americanus*). Dissertation Universität Göttingen 2005.

Kuhnke N, Dr. med., Untersuchungen zur PKC-vermittelten Regulation des renalen Transporters für Organische Anionen 1 des Menschen (hOAT1). Dissertation Universität Göttingen 2005.

Lorenz H, Dr. med., Untersuchungen zur Interaktion von neuroaktiven Tryptophanmetaboliten mit den renalen organischen Anionentransportern 1 und 3. Dissertation Universität Göttingen 2005.

Lorenz J, Dr. med., Interaktionen von Nichtsteroidalen Antirheumatika, Benzylpenicillin und Folat mit dem Na<sup>+</sup>-abhängigen Dicarboxylat-Cotransporter (NaDC-3) aus den Nieren des Menschen und der Winterflunder – Vergleichende Untersuchungen nach Injektion von cRNA und Expressio. Dissertation Universität Göttingen 2005.

Mathys C, Dr. med., Regulation des basolateralen Natrium-Dicarboxylat-Cotransporters der Winterflunder-Niere (fNaDC-3) durch die Protein-Kinase C. Dissertation Universität Göttingen 2005.

Rödiger M, Dr. med. dent., Untersuchungen zur Spezifität der Triebkräfte des organischen Anionentransporters 1 des Kaninchens (rbOAT1) sowie Klonierung und vergleichende Untersuchungen am Orthologen des OAT3 (rbOAT3). Dissertation Universität Göttingen 2005.

Kühne L, Dr. med. dent., Elektrophysiologische Charakterisierung des Na<sup>+</sup>-abhängigen Dicarboxylattransporters (fNaDC-3) in der basolateralen Membran aus den Nieren der Winterflunder (*Pseudopleuronectes americanus*). Dissertation Universität Göttingen 2003.

Rudolph T, Dr. med., Mutationsanalysen am organischen Kationentransporter der Rattenniere (rOCT2). Dissertation Universität Göttingen 2003.

### Naturwissenschaftliche und andere Dissertationen (Dr. rer. nat. und andere) | Doctorate Theses (Dr. rer. nat. and others)

Asif AR, Dr. rer. nat., Role of transport systems in cortisol release from human adrenal cells. Dissertation Universität Göttingen 2004.

Bakhiya N, Dr. rer. nat., Functional characterization of the human renal organic anion transporter 3 (hOAT3) and comparison to hOAT1. Dissertation Universität Göttingen 2004.

### Wissenschaftliche Tagungen | Scientific Meetings

08.-09.11.2003, Göttinger Transporttage, B. C. Burckhardt, G. Burckhardt, Göttingen  
 06.-09.03.2005, 84. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, G. Burckhardt, Göttingen

20.-21.05.2005, 5th Transport Colloquium, Justus-Liebig-Universität Gießen, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt und Georg-August-Universität Göttingen, E. Pelzinger, R. Tampé, G. Burckhardt, Rauischholzhausen

03.-04.12.2005, Göttinger Transporttage, B. C. Burckhardt, G. Burckhardt, Göttingen

### Mitgliedschaften und Mitarbeit in wissenschaftlichen Gremien und Kommissionen | Memberships and Activities in Scientific Boards and Committees

#### PD Dr. Birgitta C. Burckhardt

Mitglied der Deutschen Physiologischen Gesellschaft  
 Mitglied der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie

#### Prof. Dr. G. Burckhardt

Sprecher des Graduiertenkollegs 335 "Klinische, zelluläre und molekulare Biologie innerer Organe"

Mitglied der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina

Mitglied der American Society of Nephrology

Mitglied der International Society of Nephrology

Mitglied der American Society of Physiology,

Mitglied der Deutschen Physiologischen Gesellschaft

Mitglied der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie

### Universitäre Gremien | University Boards

#### PD Dr. Birgitta C. Burckhardt

Mitglied der Habilitationskommission (seit 06/2003)

Mitglied der Bibliothekskommission (seit 06/2003)

Mitglied der Tierschutzkommission (seit 07/2005)

#### Prof. Dr. G. Burckhardt

Sprecher der Kommission zur Evaluation von Juniorprofessuren (seit 07/2005)

Mitglied der Studienkommission (seit 04/2005)

### Fachgutachtertätigkeit | Function as Expert Consultant

DFG, Schweizer Nationalfonds (unbefristet)

### Herausgebertätigkeit | Editorial Work

Mitglied des Editorial Boards von Pflügers Archiv – European Journal of Physiology (seit 01/2004)

### Internationale wissenschaftliche Kooperationen

#### International Scientific Cooperations

MD PhD Ivan Sabolic, Institute for Medical Research and Occupational Health, Zagreb, Kroatien

Prof. Stephen H. Wright, Department of Physiology, School of Medicine, University of Arizona, Tucson, USA

### Fakultätsinterne Förderung | Internal Faculty Funding

Frauenförderung, Forschungsförderungsprogramm 2004, "Interaktion von Nahrungsbestandteilen mit der Pharmaka-Ausscheidung"

### Stipendiaten/Stipendiatinnen | Scholarship Holders

Nadiya Bakhiya, GK 335, 06/2001–05/2004

Ashan Rizwan, GK 335, 03/2004–02/2007

Vladimir Shnitsar, GK 1034, 06/2005–05/2008

### Gastwissenschaftler/innen | Guest Scientists

Prof. Dr. Adriana Mónica Torres, Universidad Nacional de Rosario, Argentinien, 19.08.-25.09.2005 (CONICET/DAAD)

### Firmenkooperationen | Industrial Cooperations

Novartis AG, Basel, Schweiz