

**Identifizierung von Aminosäuren
als Teile der Substratbindungstasche des
Kationentransporters 1 der Ratte (rOCT1)
und Interaktion des rOCT2 mit der
schwachen Base Chinin**

**Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von

Christian Popp

aus Würzburg

Würzburg 2004

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG.....	1
1.1	TRANSPORTPROTEINE.....	1
1.1.1	<i>Oligospezifische Kationentransporter.....</i>	<i>1</i>
1.1.2	<i>Polyspezifische Kationentransporter.....</i>	<i>1</i>
1.2	TRANSPORT ORGANISCHER KATIONEN IN DER NIERE	2
1.3	TRANSPORT ORGANISCHER KATIONEN IN DER LEBER.....	3
1.4	DIE FAMILIE DER ORGANISCHEN KATIONEN TRANSPORTER	4
1.5	STRUKTUR UND FUNKTION VON TRANSPORTPROTEINEN	7
1.6	ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	9
2	MATERIAL UND METHODEN	10
2.1	MATERIAL	10
2.1.1	<i>Chemikalien.....</i>	<i>10</i>
2.1.2	<i>Radiochemikalien.....</i>	<i>12</i>
2.1.3	<i>Enzyme</i>	<i>12</i>
2.1.4	<i>Antikörper</i>	<i>12</i>
2.1.5	<i>Kits</i>	<i>13</i>
2.1.6	<i>Arbeitsmaterialien.....</i>	<i>13</i>
2.1.7	<i>Geräte.....</i>	<i>14</i>
2.1.8	<i>Computerprogramme</i>	<i>15</i>
2.1.9	<i>Plasmide.....</i>	<i>15</i>
2.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE UND MIKROBIOLOGISCHE METHODEN.....	15
2.2.1	<i>Mutations- PCR.....</i>	<i>15</i>
2.2.2	<i>Linearisierung von Plasmid-DNA.....</i>	<i>16</i>
2.2.3	<i>Photometrische DNA-Analyse.....</i>	<i>17</i>
2.2.4	<i>Agarose-Gelelektrophorese von DNA.....</i>	<i>17</i>
2.2.5	<i>cRNA Synthese</i>	<i>18</i>
2.2.6	<i>Lithiumchlorid Präzipitation.....</i>	<i>19</i>
2.2.7	<i>Agarose-Gelelektrophorese denaturierter RNA.....</i>	<i>19</i>
2.3	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	20
2.3.1	<i>Differenzielle Zentrifugation.....</i>	<i>20</i>
2.3.2	<i>Bestimmung der Proteinkonzentration.....</i>	<i>21</i>
	<i>Das SDS-Polyacrylamid Gel.....</i>	<i>21</i>
2.3.3	<i>Das „Semidry“ Blot Verfahren.....</i>	<i>22</i>
2.3.4	<i>Die Antikörperinkubation.....</i>	<i>23</i>
2.3.5	<i>Nachweis von Protein auf PVDF-Membranen mittels ECL-Reagenz.....</i>	<i>24</i>
2.4	DAS OOZYTENEXPRESSIONSSYSTEM.....	25
2.4.1	<i>Allgemeines.....</i>	<i>25</i>
2.4.2	<i>Oozyten Kulturmedien.....</i>	<i>25</i>
2.4.3	<i>Entnahme und Präparation der Oozyten</i>	<i>27</i>

Inhaltsverzeichnis

2.4.4	<i>Mikroinjektion und Lagerung der Oozyten</i>	30
2.4.5	<i>Transportmessungen mit radioaktiv markierten Substraten (Tracerflux Uptake)</i>	31
2.4.6	<i>Die Zwei-Elektroden Spannungsklemme</i>	32
2.4.7	<i>Datenauswertung</i>	34
2.4.8	<i>Statistik</i>	35
3	ERGEBNISSE	36
3.1	HELIKALE RÄDER ALLER 12 HYPOTHETISCHEN TMDs VON ROCT1	36
3.2	DIE 4. TRANSMEMBRANDOMÄNE	37
3.2.1	<i>Änderung der Substratselektivität bei Mutanten</i>	38
3.2.2	<i>Michaelis-Menten Konstanten</i>	43
3.2.3	<i>Maximale Transportraten</i>	46
3.2.4	<i>IC₅₀-Werte</i>	48
3.2.5	<i>MMTS – Steigerung der induzierten Ströme von rOCT1</i>	51
3.2.6	<i>TPeA Inhibierung der substratinduzierten Ströme bei Y222F</i>	54
3.2.7	<i>Anwesenheit nicht transportierender Mutanten in Membranvesikeln</i>	58
3.3	INTERAKTION VON ROCT2 MIT CHININ	61
3.3.1	<i>Aufnahme von Chinin in die Oozyte bei unterschiedlichem pH</i>	62
3.3.2	<i>Inhibition der TEA Aufnahme durch Chinin bei unterschiedlichem pH</i>	63
3.4	INTERAKTION VON ROCT2 MIT TBUA	65
4	DISKUSSION	67
4.1	DIE VIERTE TRANSMEMBRANDOMÄNE VON ROCT1	67
4.1.1	<i>Prinzip des „Helical Wheels“</i>	67
4.1.2	<i>Gemeinsamkeiten der vierten und elften Transmembrandomäne von rOCT1</i>	68
4.1.3	<i>Änderung der Substratselektivität und –affinität bei Mutanten der 4. TMD</i>	69
4.1.4	<i>Inhibition der Mutanten der Position Y222</i>	74
4.1.5	<i>Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme</i>	75
4.1.6	<i>Aromatische Aminosäuren können mit Kationen und geladenen Aminosäuren interagieren</i>	77
4.1.7	<i>Potentielle Beteiligung der konservierten Aminosäuren an der Substratbindungstasche</i>	79
4.2	CHININ HEMMT IN OozyTEN EXPRIMIERTES ROCT2 PROTEIN VON INNEN	81
5	ZUSAMMENFASSUNGEN	83
5.1	ZUSAMMENFASSUNG	83
5.2	SUMMARY	85
6	LITERATURVERZEICHNIS	86
7	ANHANG	100
7.1	PUNKTMUTATIONEN GELADENENER AMINOSÄUREN VON ROCT1	100
7.2	SELEKTIVITÄTEN DER MUTANTEN DER 4. TRANSMEMBRANDOMÄNE.....	108
7.3	INTERAKTION VON N-METHYLCHININ MIT ROCT1 UND ROCT2	111

Inhaltsverzeichnis

7.4	INTERAKTION VON ROCT1 MIT cGMP.....	112
7.5	ABKÜRZUNGEN UND EINHEITEN	115
7.6	AMINOSÄUREN	117
7.7	CHEMISCHE STRUKTURFORMELN	118
8	VERÖFFENTLICHUNGEN.....	120
9	CURRICULUM VITAE	121
10	DANKSAGUNG	122

1. Einleitung

1.1 Transportproteine

Transportproteine vermitteln neben Ionenkanälen, endo- und exozytotischen Vorgängen und Diffusion den Stoffaustausch zwischen einer Zelle und ihrer Umgebung. Krankheiten, die auf Grund defekter Transporter auftreten, machen die Relevanz dieser Proteine für den menschlichen Organismus deutlich. Es zeigte sich z.B. bei der Alzheimerschen Krankheit (Francis et al., 1999; Isacson et al., 2002), beim Down Syndrom (Isacson et al., 2002), und bei Schizophrenie (Hyde und Crook, 2001) ein veränderte neuronaler Transport von Cholin. Bei Untersuchungen zum Parkinson Syndrom, zeigte sich ein veränderter Dopaminspiegel im Hirn im Bereich des Striatum (Calabresi et al., 2000). Die vielen bisher gefundenen Transportproteine kann man nach der Spezifität in oligospezifische und polyspezifische Transporter einteilen.

1.1.1 Oligospezifische Kationentransporter

Für die oligospezifischen Transporter gilt, dass sie nur ein Hauptsubstrat besitzen, wobei kleine Abweichungen in dessen Molekülstruktur manchmal noch akzeptiert werden. Zu den oligospezifischen Transportproteinen gehören z.B. der Na^+ abhängige Kotransporter für den Monoaminneurotransmitter Serotonin (SERT) (Lesch et al., 1993) und der Kokain-sensitive Dopamin Transporter (DAT) (Giros et al., 1991)

1.1.2 Polyspezifische Kationentransporter

Im Gegensatz zu den oligospezifischen Transportproteinen akzeptieren polyspezifische eine größere Anzahl strukturell verschiedener Substanzen als Substrat. Hierzu gehören die Mitglieder der Familie der „Solute Carrier“ (SLC).

Die Transporter der Familie SLC22 gehören zu einer dieser Gruppen und haben bis auf die Ausnahme des natriumabhängigen Carnitintransporter 2 (OCTN2) (Tamai et al., 1998) und des Protonen/organische Kationenantipoters (OCTN1) (Tamai et al., 1997), soweit bekannt,

nur organische Anionen oder Kationen als Substrat. OCTN1 und OCTN2 transportieren die obengenannten anorganischen Kationen. Beide Familien spielen für die Exkretion und Reabsorption von endogenen wie auch exogenen Substanzen in Leber und Niere eine entscheidende Rolle.

1.2 Transport organischer Kationen in der Niere

In der Niere können organische Kationen von der Blutseite her über die basolaterale Membran der Nierentubuli eintreten und über die apikale (luminale) Bürstensaummembran, wieder in den Urin sezerniert werden (Pritchard und Miller, 1996; Ross und Holohan, 1983; Somogyi, 1987; Ullrich, 1994).

Die Exkretion endogener organischer Kationen, kationischer Medikamente und Xenobiotika wird sehr oft von der Niere vermittelt. Die Wirkstoffe Amantadin, Cimetidin und Chinidin (Koepsell et al., 1999) sind nur einige Beispiele für Substanzen, die über die Niere ausgeschieden werden. Außerdem können Substanzen, wie z.B. das Paraquat durch die transportervermittelte Aufnahme in die Nierenzellen nephrotoxisch wirken.

In den letzten Jahren wurden Mechanismen des renalen organischen Kationentransports erforscht (Pritchard und Miller, 1996; Koepsell, 1998; Koepsell et al., 1999). Es wurde herausgefunden, dass organische Kationentransporter in der Bürstensaummembran und in der basolateralen Membran der Nierenzellen des proximalen Tubulus vorkommen. In der basolateralen Membran werden die organischen Kationen vor allem entlang ihres elektrochemischen Gradienten in die Zelle transportiert, während sie die Zelle über die Bürstensaummembran auf verschiedener Weise wieder verlassen können (s.u.) (Koepsell, 1998; Koepsell et al., 1999). Diese beiden Systeme arbeiten so zusammen, dass sie einen netto Fluss von organischen Kationen erzeugen. Einige der hierfür verantwortlichen Transportsysteme sollen anhand der menschlichen Niere kurz beschrieben werden.

In Menschen ist die Aufnahme von organischen Kationen in der Niere fast ausschließlich OCT2 bzw. von der Splicevariante OCT2A (Urakami et al., 2002) vermittelt.

Die Sekretion über die sich apikal befindende Bürstensaummembran kann durch verschiedene Transportsysteme geschehen. Dazu gehören zwei Protonen-/organische Kationenaustauscher, wovon einer wahrscheinlich der neue organische Kationen Transporter 1 (OCTN1) ist (Yabuuchi et al., 1999). Die anderen beiden Proteine sind der Natrium/Carnitin Kotransporter

OCTN2, welcher durch die Ultrafiltration verlorengangenes Carnitin reabsorbiert (Tamai et al., 2001) und das Multidrug Resistance Protein 1, welches zu der Familie der „ATP-Binde-Cassette-Transporter“ (ABC) gehört.

Der Protonengradient, welcher zum Ausschleusen der Kationen genutzt wird, wird durch einen Natrium/Protonen Austauscher aufrecht gehalten (Biemesderfer et al., 1993). Der Natriumgradient wiederum entsteht durch die Natrium/Kalium ATPase, welche Natrium im Austausch zu Kalium aus der Zelle hinaus transportiert (Ashton und Koepsell, 1976).

1.3 Transport organischer Kationen in der Leber

Organische Kationen, welche über den Dünndarm aufgenommen werden, erreichen die Leber direkt über die Portalvene. Hier geschieht die Aufnahme in die Hepatozyte über eine Reihe von basolateral lokalisierten, natriumunabhängigen Transportproteinen der OATP Familie (SLC21), aber insbesondere von OCT1, einem Mitglied der SLC22-Familie (Koepsell et al., 2001).

Innerhalb der Hepatozyte kann es zur Verstoffwechslung der aufgenommen Substanzen kommen. Hierbei spielen die Cytochrom P450 Enzyme eine große Rolle (Denison und Whitlock, 1995). Die Exkretion der verstoffwechselten oder ursprünglichen Substanzen geschieht über die apikale kanalikuläre Membran in die Galle. Hier sind zwei Transportsysteme, MDR1 und ein Protonen/organische Kationenantiporter System beschrieben worden (Moseley et al., 1992).

1.4 Die Familie der organischen Kationen Transporter

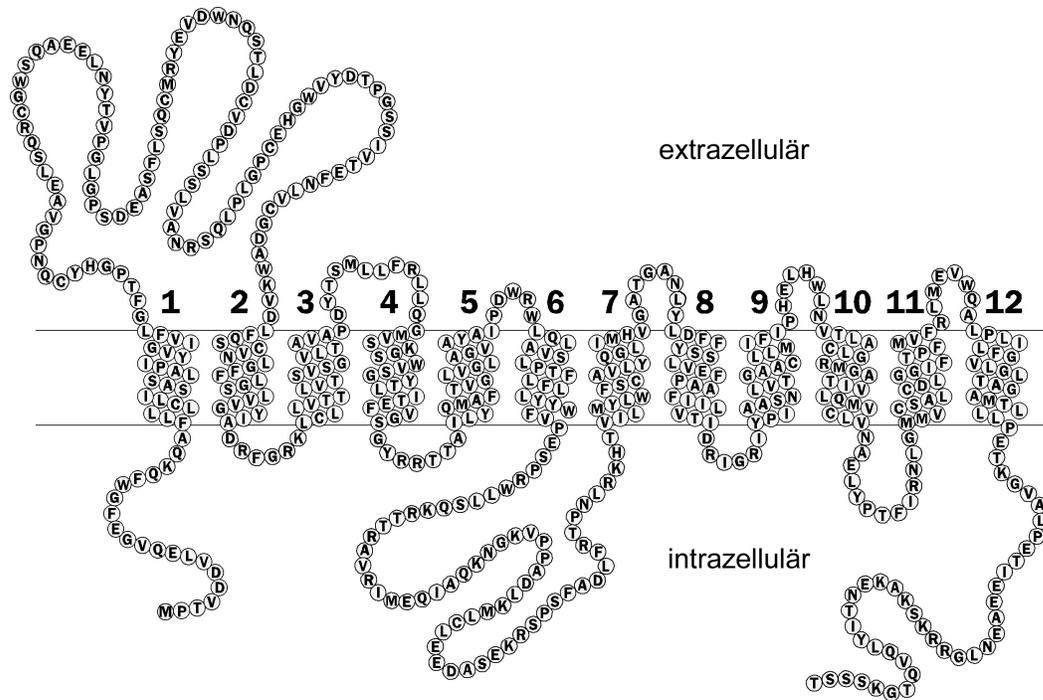


Abb. 1: *hypothetisches Modell von rOCT1*

Mitglieder der Familie der organischen Kationen Transporter sind, wie in den vorherigen Kapiteln zu erkennen, häufig an den Transportgeschehnissen in Leber und Niere beteiligt. Sie sollen an dieser Stelle auch deswegen näher betrachtet werden, da eines ihrer Mitglieder, rOCT1 das Objekt der vorliegenden Dissertation war. Abb. 1, zeigt das hypothetische Modell des Transporters rOCT1, wie es bei seiner Entdeckung 1994 aufgestellt wurde (Gründemann et al., 1994).

rOCT1 war das erste Mitglied der SLC22-Transporterfamilie und wurde aus einer Ratten cDNA-Bibliothek kloniert (Gründemann et al., 1994). Es zeigte sich, dass rOCT1 aus 556 Aminosäuren besteht und ein potentialabhängiges, pH-insensitives und organische Kationen transportierendes Membranprotein ist. In einer Mutationsanalyse wurde es im Rahmen dieser Dissertation detailliert untersucht.

Im Laufe der Zeit kamen weitere Mitglieder der SLC22-Familie hinzu. So wurden Orthologe des rOCT1 Proteins aus verschiedenen Spezies kloniert, z.B. aus der Niere (Gorboulev et al.,

1997) und der Leber (Zhang et al., 1997) des Menschen, aus der Kaninchenniere (Terashita et al., 1998) und aus der Maus (Schweifer und Barlow, 1996). Eine zweite Isoform von OCT1 konnte durch Homologieklonierung in der Ratte gefunden werden. Sie wurde rOCT2 genannt (Okuda et al., 1996). Auch hier wurden verschiedene Orthologe kloniert, hOCT2 aus dem Menschen (Gorboulev et al., 1997), mOCT2 aus der Maus (Mooslehner und Allen, 1999), pOCT2 vom Schwein (Gründemann et al., 1997) und im Jahre 2002 rbOCT2 aus dem Kaninchen (Zhang et al., 2002). OCT3 wurde als weitere Isoform in der Ratte entdeckt (Kekuda et al., 1998). Es folgten schon bald die Orthologe aus dem Menschen, hOCT3, und der Maus, mOCT3 (Verhaagh et al., 1999).

Zur Verteilung der drei OCT-Subtypen ist folgendes bekannt: rOCT1 wird am stärksten in der Niere exprimiert, weniger in der Leber und in ganz geringem Maße im Dünndarm (Gründemann et al., 1994). Interessant ist hierbei, dass die Menge an rOCT1 mRNA in der Niere bei männlichen Ratten viermal höher ist als bei weiblichen (Slitt et al., 2002). Die mRNA von rOCT2 wurde hauptsächlich in der Niere detektiert und nur in geringem Maße in anderen Organen. Immunhistochemische Experimente zeigten rOCT1 im S1 und S2, rOCT2 eher im S2 und S3 Segment des proximalen Tubulus der Niere (Karbach et al., 2000; Urakami et al., 1998). Hier wurden rOCT1 und rOCT2 (Gorboulev et al., 1997; Karbach et al., 2000; Sweet et al., 2000) basolateral lokalisiert, in der Leber wurde rOCT1 in der sinusoidalen Membran, also ebenfalls basolateral gefunden (Meyer-Wentrup et al., 1998). rOCT3 wurde in Plazenta, Dünndarm, Herz und Hirn, und im geringen Maße in Niere, Thymus, Blutgefäßen und Haut entdeckt (Kekuda et al., 1998).

Die menschliche Isoform hOCT1, wird am stärksten in der Leber exprimiert, kaum in der Niere und nicht im Darm (Gorboulev et al., 1997; Zhang et al., 1997). hOCT2 wurde in Nieren und in Neuronen nachgewiesen (Busch et al., 1998; Okuda et al., 1996). Im Menschen wurde zumindest für hOCT2 die basolaterale Lokalisation in der Niere nachgewiesen (Motohashi et al., 2002).

hOCT3 zeigt eine recht breite Verteilung. Im Menschen findet sich mRNA von OCT3 am häufigsten in Skelettmuskel, Leber, Plazenta, Niere und Herz, seltener im Hirn (Gründemann et al., 1998; Wu et al., 2000b). Die subzelluläre Lokalisation ist für OCT3 noch nicht geklärt. OCT1 bis OCT3 bilden eine Subfamilie der SLC22 Transporterfamilie.

Eine weitere Subfamilie der SLC22-Transporter sind die „neuen“ organischen Kationentransporter (OCTN).

Das erste Mitglied dieser Subfamilie, hOCTN1 wurde 1997 vom Menschen kloniert (Tamai et al., 1997), das Rattenortholog wurde erst im Jahr 2000 entdeckt (Wu et al., 2000a). hOCTN1 wird in Skelettmuskel, Plazenta, Prostata und Lunge exprimiert (Tamai et al., 1997). hOCTN1 besitzt im Gegensatz zu hOCT1-3 eine pH-Sensitivität und stellt einen Protonen/Kationen Antiporter dar. Da er ein großes Spektrum von Substanzen als Substrat akzeptiert, könnte OCTN1 der postulierten organische Kationen/Protonen Austauscher der Bürstensaummembran der Niere sein (s.o.). Eine weitere Besonderheit ist eine Bindedomäne für Nukleotide.

hOCTN2 wurde durch „Homologiescreening“ einer humanen Plazentazelllinie entdeckt (Tamai et al., 1998). Seine Orthologe wurden in Ratte (Sekine et al., 1998b; Brooks und Krähenbühl, 2001; Schömig et al., 1998) und Maus (Lu et al., 1998; Tamai et al., 2000) gefunden. *In situ* Hybridisierungsversuche zeigten, dass menschlicher OCTN2 in Herz, Kortex der Niere, Plazenta und Hirn vorkommt (Wu et al., 1999). Auf subzellulärer Ebene konnte OCTN2 in Maus und Ratte in der Bürstensaummembran der Niere lokalisiert werden (Tamai et al., 2001). Er besitzt ebenso wie OCTN1 eine Nukleotidbindesequenz.

Gegenüber den anderen organischen Kationentransportern besitzt OCTN2 die Besonderheit, dass er natriumabhängig Carnitin im Kotransport als Substrat akzeptiert. Er ist jedoch auch fähig andere Substrate, wie z.B. TEA natriumunabhängig zu transportieren. Außerdem wurde herausgefunden, dass ein Fehlen oder ein Defekt von OCTN2 die Krankheit des „systemischen Carnitinmangels“ auslösen kann (Nezu et al., 1999). Carnitin, ein wichtiger Kofaktor für die β -Oxidation von Fettsäuren, wird nach der glomerulären Filtration nicht mehr reabsorbiert und somit vermehrt ausgeschieden. Auf Grund des reduzierten Blut-Carnitinspiegels wird Carnitin in sehr reduziertem Maße in die Zellen transportiert werden, die β -Oxidation der Fettsäuren findet nur unvollständig statt was zu Myopathie, Cardiomyopathie, Hypoglykämie und Hyperammonämie führt (Tang et al., 1999).

OCTN3 wurde bisher nur aus der Maus kloniert (Tamai et al., 2000) und zeigte hier eine Expression in Niere und im Hoden.

Ebenfalls zur SLC22 Familie gehören die Transporter, welche organische Anionen transportieren, die Subfamilie der OAT-Transporter. Auf diese Transporter soll hier nicht weiter eingegangen werden.

Erst 2002 wurde ein neues Mitglied der SLC22-Transporter kloniert, welches den Namen CT2 bekommen hat (Enomoto et al., 2002) und das identisch ist zu dem Genprodukt OCT6, welches in hämatopoetischen Zellen gefunden wurde (Gong et al., 2002). CT2 kann

phylogenetisch zwischen den OCTs/OCTNs und den OATs eingeordnet werden. Seine Expression ist in fetaler Leber, Knochenmark, Leukozyten und einigen leukämischen Zelllinien zu finden. Vor allem kommt er aber im Nebenhoden vor, dessen Zellen die höchste Carnitinkonzentration im menschlichen Körper aufweisen (Enomoto et al., 2002). Die Besonderheit an diesem Protein ist seine hohe Affinität für Carnitin und die Tatsache, dass er keine der OCT oder OAT spezifischen Substrate transportiert.

Es sollte hier aber noch erwähnt werden, dass OCT-Proteine in Invertebraten wie *Caenorhabditis elegans* (Wu et al., 1999) und *Drosophila melanogaster* (Taylor et al., 1997; Eraly und Nigam, 2002) zu finden sind und dass es auch Vertreter dieser Genfamilie in der Pflanzenwelt wie z. B. in *Arabidopsis thaliana* (persönliche Mitteilung Prof. Dr. Hedrich, Institut für Botanik, Universität Würzburg) zu geben scheint. Das Vorkommen dieser Genfamilie mit der Konservierung ihrer Sequenzmotive in den unterschiedlich entwickelten Organismen unterstreicht ihre Wichtigkeit in der Evolution und fordert die weitere Aufklärung der physiologischen Bedeutung und die genaue Beschreibung der funktionellen Charakteristika.

1.5 Struktur und Funktion von Transportproteinen

Es wird angenommen, dass 20% aller Genprodukte Proteine sind, welche den Transport von Substanzen über die Zellmembran ermöglichen (Fleming, 2000). Um die dreidimensionale Struktur von Proteinen herauszufinden, müssen diese kristallisiert werden. Dies gelingt bei Membranproteinen nicht immer und wenn jedoch meist nur unter erheblichem Arbeitsaufwand, da diese sowohl lipophile als auch hydrophile Bestandteile aufweisen. Die dreidimensionale Konformation wird also sowohl durch Lipide, als auch durch das wässrige Zytosol stabilisiert. Da es wesentlich einfacher ist Kristalle aus hydrophilen Proteinen zu bilden als aus lipophilen, hatte dies in der Vergangenheit zur Folge, dass nur hydrophile Proteine oder die hydrophilen Anteile eines Transportproteins kristallisiert werden und deren dreidimensionale Struktur mit Hilfe der Röntgenkristallographie aufgeklärt werden konnten.

Der erste Transporter, der vollständig kristallographisch analysiert wurde, war das ABC „Multidrug Resistance Transportprotein“ MsbA von *E. coli* (Chang und Roth, 2001).

Da zu Beginn der Experimente noch die Suche nach einem zur Kristallisierung geeigneten Transportprotein stand, klonierten Chang und Roth zunächst insgesamt 20 Transporter aus 14

Organismen, überexprimierten und reinigten diese. Erst dann studierten sie die Möglichkeit diese zu kristallisieren. Hierzu wurden insgesamt 96000 Kristallisierungsansätze mit 20 verschiedenen Detergenzien ausgetestet. Am Ende zeigte sich, dass MsbA die besten Voraussetzungen für eine Röntgenstrukturanalyse besaß. Nach weiteren Optimierungsschritten konnte MsbA in einer Auflösung von 4.5 Å dargestellt werden.

Es lässt sich jedoch nur bedingt von der Struktur eines Transportproteins auch auf dessen Interaktion mit seinen Substraten schließen, denn auch wenn man weiß, wie die dreidimensionale Struktur eines Proteins aussieht ist noch lange nicht bekannt, welche Aminosäuren in Wechselwirkung mit den Substraten eines Transporters treten. Für ein umfassendes Verständnis eines Transporters müssen Methoden genutzt werden, welche die genauen Substrat-Transportprotein Wechselwirkungen beschreiben. Kaback et al. machen in ihrer zusammenfassenden Veröffentlichung zur Laktose Permease deutlich, dass nicht nur die Forschung nach der dreidimensionalen Struktur, sondern auch nach funktionellen Gruppen von großer Wichtigkeit ist (Kaback, et al. 2001). Erst wenn beide Forschungsrichtungen zusammengefasst werden, lassen sich Struktur und Funktion eines Transporters umfassend verstehen. Die dreidimensionale Struktur der Laktose Permease von *E. coli*, welche ebenfalls wie die SLC22-Transporterproteine zur „Major Facilitator Superfamilie“ gehört, wurde mittlerweile aufgeklärt (Abramson, et al. 2003a; Abramson, et al. 2003b).

Struktur- und Funktionsanalysen machen auch deutlich, dass es sich bei Substrat-Transporter Wechselwirkungen nicht nur um eine einzelne Aminosäure handelt, die mit einem Substrat interagiert, vielmehr sind es mehrere Aminosäuren, welche direkt interagieren können und mit weiteren Aminosäuren häufig eine größere Substratbindetasche bilden.

Eine wichtige Methode zur Identifizierung funktionell relevanter Gruppen innerhalb eines Transportproteins ist die Einführung von „Einzelpunktmutationen“, welche in der vorliegenden Arbeit genutzt wurde (siehe Kapitel 1.6). Bei auftretenden Funktionsänderungen können Rückschlüsse auf die Interaktion des Transportproteins mit dem Substrat gezogen werden. Somit trägt diese Methode zum Verständnis der Funktionsweise von rOCT1 bei.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Da bis zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit viele orthologe und homologe Proteine von rOCT1 bekannt waren, sollte an Hand von Sequenzvergleichen nach Aminosäuren gesucht werden, die innerhalb der OCT und OCTN Familie konserviert sind. Zwischen den Mitgliedern einer Proteinfamilie konservierte Aminosäuren geben einen Hinweis darauf, dass diese potentiell funktionell relevant sind, da sie im Laufe der Evolution nicht durch zufällige Mutationen ausgetauscht wurden. Das Erstellen helikaler Räder sollte Hinweise darauf geben in welcher räumlichen Nachbarschaft die konservierten Aminosäuren innerhalb von Transmembrandomänen zu einander liegen. Anhäufungen konservierter Aminosäuren auf einer Seite sollten Hinweise auf funktionell relevante Domänen geben.

Mit Hilfe der „Polymerase Chain Reaction Overlap Methode“ sollten Punktmutationen an auf diese Weise gefundenen Positionen gesetzt werden. Es sollten strukturell ähnliche und strukturell nicht-ähnliche Aminosäure ersetzt werden, um Rückschlüsse auf die Interaktion der Aminosäureseitenketten mit den organischen Kationen zu ziehen zu können.

Ziel dieser Arbeiten sollte es sein Aminosäuren ausfindig zu machen, die für den rOCT1 vermittelten Transport organischer Kationen von funktioneller Relevanz sind. Es sollte dafür das *Xenopus laevis* Oozytenexpressionssystem genutzt werden. Mit Hilfe der Oozyten sollten die Methoden der radioaktiven Substrataufnahme und der „Zwei-Elektroden-Spannungsklemme“ eingesetzt werden, mit denen die Transporteigenschaften der mutierten Proteine untersucht werden können. Der Einsatz der Immunoblottechnik sollte klären, welche der mutierten Proteine tatsächlich durch funktionelle Einschränkung, d.h. durch Änderung der für die Substratbindung verantwortlichen Aminosäuren, ihre Transportraten verringerten, oder ob ein verminderter membranärer Einbau dafür der Grund war. Durch den Einsatz verschiedener Substrate, sollten Rückschlüsse auf die Substratbindungstasche des rOCT1 Proteins gezogen werden. Im Hauptteil der vorliegenden Arbeit sollten die Ergebnisse der Versuche dargestellt werden, die zum verbesserten Verständnis der Substratbindungstaschen von rOCT1 verhelfen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

NAME	HERSTELLER
1,4 Dithio-DL-Threitol (DTT)	Fluka, Neu-Ulm
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	Fluka, Neu-Ulm
4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid) (AEBSF)	Sigma-Aldrich, Seelze
Acrylamid/Bisacrylamidlösungen	Roth, Karlsruhe
Acrylase TM	Stratagene, Heidelberg
Agar	Difco, Hamburg
Agarose	Serva, Heidelberg
Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad, Hercules (Cal., USA)
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Seelze
Benzamidin	Sigma-Aldrich, Seelze
Bovine Serum Albumine (BSA)	ICN, Eschwege
Bradfortreagenz	Biorad, Hercules (Cal., USA)
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Calziumdichlorid	Sigma-Aldrich, Seelze
Chinin	Sigma-Aldrich, Seelze
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Corticosteron	Fluka, Neu-Ulm
Cyanin863	Sigma-Aldrich, Seelze
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Seelze
Dimethylformamid	Sigma-Aldrich, Seelze
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Seelze
DNA-Molekulargewichtsstandard	Boehringer, Mannheim
ECL-Reagenz	Biorad, Hercules (Cal., USA)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Seelze
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt

Gentamycinsulfat	Fluka, Neu-Ulm
Glyoxal	Sigma-Aldrich, Seelze
Glyzerin, ultrapure™	Appllichem, Darmstadt
Glyzin	Life Technologies, Eggenstein
Harnstoff	Sigma-Aldrich, Seelze
Isoamylalkohol	Sigma-Aldrich, Seelze
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
L-Cystein	Sigma-Aldrich, Seelze
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Seelze
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich, Seelze
Magnesiumdichlorid	Fluka, Neu-Ulm
Methanol	Sigma-Aldrich, Seelze
N,N-bis[2-Hydroxyethyl]-2-aminoethan sulfonsäure (BES)	Appllichem, Darmstadt
N-1-Methylnicotinamid (NMN)	Sigma-Aldrich, Seelze
N-Methylchinin	pers. Herst. Dr. Montfoort, Uni-Bern
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Seelze
Natriumjodessigsäure	Sigma-Aldrich, Seelze
Polyacrylamid	ICN, Eschwege
RNA-Molekulargewichtsstandard	Sigma-Aldrich, Seelze
Roti-Phenol/Chloroform	Life Technologies, Eggenstein
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Streptomycinsulfat	ICN, Eschwege
Tetraethylammoniumchlorid (TEA)	ICN, Eschwege
Tetraethyl-ethylendiamin (TEMED)	Fluka, Neu-Ulm
Tetrapentylammoniumchlorid (TPeA)	Biorad, Hercules (Cal., USA)
Tris(2-Carboxyethyl)Phosphinehydrochlorid TCEP	Fluka, Neu-Ulm
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Fluka, Neu-Ulm

Tabelle 1: verwendete Chemikalien

2.1.2 Radiochemikalien

NAME	HERSTELLER
[³ H]N-Methyl-Chinin	pers. Herst. Fr. Dr. Montfoort, Schweiz
[³ H]Chinin	Biotrend, Köln
[¹⁴ C]Guanidinhydrochlorid	Biotrend, Köln
[³ H]Histamin	Amersham, Braunschweig
[³ H]1-Methyl-4-phenylpyridiniumiodid	Du Pont de Nemours, Dreieich
[³ H]Serotonin	Amersham, Braunschweig
[¹⁴ C]Tetraethylammonium	Biotrend, Köln

Tabelle 2: *verwendete Radiochemikalien*

2.1.3 Enzyme

NAME	HERSTELLER
DNase I	Ambion, Texas USA
Kollagenase (von <i>C. histolyticum</i>)	Sigma-Aldrich, Seelze
Restriktionsenzym Mlu 1	New England Biolabs, Schwalbach
SP6 Polymerase	Ambion, Texas USA
T7 Polymerase	Ambion, Texas USA

Tabelle 3: *verwendete Enzyme*

2.1.4 Antikörper

AK48 (Kaninchen), anti-rOCT1, poliklonal gegen grosse extrazelluläre Schleife	Eigene Herstellung (Meyer-Wentrup et al., 1998)
Sekundärer Antikörper (Antirabbit from goat, whole molecule)	Sigma-Aldrich, Seelze

Tabelle 4: *verwendete Antikörper*

2.1.5 Kits

NAME	HERSTELLER
mMESSAGE mMASCHINE™ SP6 Kit	Ambion, Texas USA
mMESSAGE mMASCHINE™ T7 Kit	Ambion, Texas USA

Tabelle 5: *verwendete Kits*

2.1.6 Arbeitsmaterialien

NAME	HERSTELLER
Einweg-Plastikgefäße	Eppendorf, Hamburg Greiner, Frickenhausen Nunc Seromed, Berlin Sarstedt, Nimbrecht
Entwickler	Kodak, Stuttgart
Filterpapier, Whatman	Hartenstein, Würzburg
Fixierer	Kodak, Stuttgart
Glaskapillaren	Hilgenberg, Malsfeld
Immobilon P (PVDF-Membran)	Millipore, Bedford (Cal., USA)
Operationsbesteck	Hartenstein, Würzburg
Polystyrolbecher	Sarstedt, Nimbrecht
Röntgenfilm Kodak Biomax MR	Kodak, Stuttgart
Szintillationscocktail Lumasafe Plus	Lumac LSC, Groningen (Niederlande)
Vömel-Operationfaden (Seide)	Roeko, Langenau
Zählröhrchen	Sarstedt, Nimbrecht

Tabelle 6: *verwendete Arbeitsmaterialien*

2.1.7 Geräte

NAME	HERSTELLER
Flüssigkeitsszintillationszähler Tri-Carb 1600CA	Canberra Packard, Dreieich
Fotokamera	Polaroid, Offenbach
Fotometer, Ultraspec3	Pharmacia, Freiburg
Inkubationsofen	Heraeus, Hanau
Mikrowasserfiler	Blendel, Würzburg
Mikroinjektionspumpe	Drummond, USA
elektronisches Multimeter	Konradelektroniks, Berlin
Lowpassfilter	Warner, New Haven
Verstärker, Warner OC725A	Warner, New Haven
Pipettenziehgerät	Sutter, Novato, CA, USA
SDS-Gelkammer	Hartenstein, Würzburg
Umwälzpumpe	LKB, Bromma (Schweden)
UV Transilluminator	Herolab, St. Leon
Zentrifugen und Rotoren JS 21 (JA 14, JA 20) RC 2-B (SS34, HS4, HB4) Biofuge 28 RS (HFA 22.1)	Beckmann, München Sorvall, Bad Homburg Heraeus, Hanau

Tabelle 7: verwendete Geräte

2.1.8 Computerprogramme

NAME	HERSTELLER
Betriebssysteme Windows 95 u.98	Microsoft, Redmond, Wasington, USA
Excel	Microsoft, Redmond, Wasington, USA
Figure P	Biosoft, Cambridge, England
Prizm	Graphpad, San Diego, CA, USA
Word	Microsoft, Redmond, Wasington, USA

Tabelle 8: *verwendete Computerprogramme*

2.1.9 Plasmide

pOG2 und pRSSP sind Expressionsvektoren, die zur Translation von Proteinen nach cRNA-Injektion in *Xenopus laevis*-Oozyten verwendet werden. Zur Verbesserung der Expression enthalten diese Vektoren untranslatierte Regionen des *Xenopus* β -Globin-Gens. rOCT1 wurde nach seiner Klonierung in den pRSSP-Vektor (Busch et al., 1996a) und rOCT2 in den pOG2-Vektor inkloniert.

2.2 Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden

2.2.1 Mutations- PCR

Die Mutanten wurden durch die „Polymerase Chain Reaction Overlap Methode“ hergestellt (Ho et al., 1989). Für die Herstellung jeder Mutante benötigte man 4 Primer: 2 komplementäre, welche die gewünschte Mutation (forward und reverse) enthielten und 2 flankierende Primer (der linke forward und der rechte reverse Primer). Als Matrize diente die rOCT1 DNA. Es wurden 2 separate PCR Ansätze durchgeführt: Ein Ansatz mit dem forward Mutationsprimer und dem rechten flankierenden Primer und der zweite mit dem reversen Mutationsprimer und dem linken flankierenden Primer. Aliquote aus beiden Ansätzen wurden nun zusammen pipettiert und eine Fusions-PCR mit den flankierenden Primern durchgeführt. Das Fusionsprodukt enthielt die rOCT1 Sequenz zwischen den flankierenden Primern, also mit der eingeführten Mutation.

Die flankierenden Primer wurden so ausgewählt, dass die amplifizierte rOCT1 Sequenz nah zu der Position dieser Primer zwei Restriktionsschnittstellen hat, die nur einmal in der rOCT1 Sequenz vorkommen und niemals im Vektor.

Nun wurde das Fusionsprodukt und in einem parallelen Ansatz der Wildtyp mit rOCT1 Vektor mit Restriktasen behandelt und die resultierenden Fragmente mittels einer präparativen Agarose-Elektrophorese von einander getrennt. Das PCR-Produkt und der rOCT1 Vektor wurden aus der Agarose isoliert. Dem rOCT1-Vektor fehlte nun eine Sequenz, welche dem PCR-Produkt entsprach. Beide Fragmente (PCR-Produkt und Vektor) hatten die Enden, die komplementär sind, da sie von denselben Restriktasen stammten. Nun wurden die Fragmente mit Hilfe der T4 DNA Ligase verbunden und diese nach entsprechender Entsalzung durch Elektrotransformation (Dower et al., 1988) in *E. coli* gebracht. Dem Plasmid wurde eine Ampizillin Resistenz verliehen, so dass erfolgreich transformierte Bakterien selektiert werden konnten. Mit Hilfe der Maxipräparation (Sambrock et al., 1989) konnten die erfolgreich transformierten Bakterien amplifiziert und im Anschluss die OCT-spezifische DNA von bakterieller DNA und RNA gereinigt werden. Die Reinigung geschah dabei durch die Caesiumchlorid-Dichtegradienten-Zentrifugation (Sambrock et al., 1989). Der Gehalt der so gewonnen Plasmid-DNA wurde photometrisch bestimmt.

2.2.2 Linearisierung von Plasmid-DNA

Nach der Aufreinigung der Plasmid-DNA musste diese linearisiert werden um im Anschluss transkribiert werden zu können. Hierzu wurden 10 µg der zu linearisierenden DNA zusammen mit 10 Einheiten des entsprechende Enzyms in RNase-freie, gepufferte Lösung gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Restriktion des pRSSP wurde das Enzym Mlu1 und zur Restriktion des pOG2 wurde das Enzym Not1 benutzt. Am folgenden Tag wurde die erhaltene, nun linearisierte DNA durch zweimalige Behandlung mit Phenol-Chloroform und einmalige Behandlung mit reinem Chloroform von Proteinen gereinigt (Walace, 1987). Zwischen den Reinigungsschritten wurden die wässrige und die organische Phase mittels Zentrifugation (10000 g, 5 min) von einander getrennt, die wässrige, DNA enthaltende Phase wurde für den nächsten Reinigungsschritt behalten. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde die organische Phase erneut verworfen und die DNA mittels 1/10 Volumeneinheit 3 M Natriumazetat-Lösung, pH 2.5, in 2.5 Volumeneinheiten 96%iger ethanolischer Lösung mindestens 20 min bei -20° C präzipitiert. Die so gefällte DNA wurde

20 min bei 10000 g zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Das DNA enthaltende Pellet wurde in 2.5 Volumeneinheiten 70%igen Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und anschließend getrocknet. Dann wurde die DNA in 10 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und photometrisch bei 260 und 280 nm auf ihre Konzentration und Reinheit überprüft.

2.2.3 Photometrische DNA-Analyse

Die Bestimmung der Konzentration der DNA erfolgte bei 260 nm. Hierbei wurde die Konzentration gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetzes aus der gemessenen Absorption und bekanntem Extinktionskoeffizienten errechnet. Die optische Dichte von 1 entsprach dabei einer Konzentration von 50 µg/ml. Die Reinheit der DNA-Lösung wurde mittels Bildung des Quotienten aus Absorption bei 260 nm und Absorption bei 280 nm unter Berücksichtigung der H₂O-Absorption ermittelt. Bei einem Quotienten zwischen 1.6 und 2.0 wurde die DNA als gut aufgereinigt betrachtet.

2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Um sicher zu gehen, dass die Linearisierungsreaktion tatsächlich erfolgreich war, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (Sambrock et al., 1989), in der die linearisierte mit der nicht linearisierten DNA verglichen wurde. Hierzu wurde ein Agarose-Gel bestehend aus 50 ml TAE-Puffer, 1% Agarose und 1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) hergestellt, in dem Puffer und Agarose zusammen aufgeköcht wurden und das Ethidiumbromid im Anschluss hinzugefügt wurde. Das erstarrte Gel wurde mit TAE-Puffer überschichtet. 1 µg der DNA wurde in 10 µl Auftragspuffer aufgenommen und in die Geltaschen befördert. Außerdem wurde noch ein DNA-Molekulargewichtsstandard aufgetragen, um zu erkennen, dass die erhaltene DNA die richtige Länge aufweist. Die Elektrophorese lief bei 6-8 V/cm. Durch die Interkalation des Ethidiumbromids mit der DNA konnte die DNA im Gel durch UV-Anregung auf einem Transilluminator sichtbar gemacht werden.

TAE-Puffer: 40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8.0

Auftragspuffer: 30% (v/v) Glycerin, 0.25% (w/v) Bromphenolblau

2.2.5 cRNA Synthese

Zur Charakterisierung von Proteinen kann linearisierte DNA *in vitro* in RNA umgeschrieben werden um anschließend in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert zu werden. Zur Herstellung der rOCT1 cRNA wurde das Ambion mMessageMachine™ SP6-RNA-Polymerase- und zur Herstellung der rOCT2 cRNA das entsprechende T7-RNA-Polymerase-Kitsystem benutzt. Die einzelnen Komponenten des Kits hatten folgende Konzentrationen:

Enzym Mix	50 % Glycerin mit RNA-Polymerasen und RNase-Inhibitoren, weitere nicht aufgeführte Komponenten	
10fach Reaktionspuffer	nicht näher spezifizierte Salze, Puffer und andere Komponenten, DTT in nicht genannter Konzentration	
2fach NTP/Cap	SP6 Kits	T7 Kits
dATP	10 mM	15 mM
dCTP	10 mM	15 mM
dUTP	10 mM	15 mM
dGTP	2 mM	3 mM
DNase 1	2 Einheiten / μ l	
Lithiumchlorid Lösung	7.5 M LiCl , 75 mM EDTA	
Gelprobenpuffer	95 % Formamid, 0.025% Xylol, 0.025 Bromphenolblau 18 mM EDTA, 0.025 mM SDS	

Der folgender Reaktionsansatz wurde erstellt:

- 2 μ l 10fach Reaktionspuffer
- 10 μ l 2fach Nukleotidtriphosphate
- 1 μ g linearisierte DNA
- 2 μ l Enzymmix

Dieser Reaktionsansatz wurde bis 20 μ l mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt, kurz leicht geschüttelt und 2 Stunden bei 37° C inkubiert. Im Anschluss wurde 1 μ l der im Kit

enthaltenden DNase 1 dem Reaktionsansatz zugefügt und weitere 15 Minuten zur Reduzierung der DNA inkubiert.

2.2.6 Lithiumchlorid Präzipitation

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 30 µl RNase-freiem Wasser und 25 µl Lithiumchlorid gestoppt. Der Reaktionsansatz wurde stark gevortext. Über Nacht fand bei -20° C die Fällung der RNA statt. Am folgenden Tag wurde die präzipitierte RNA 20 min bei 4° C mit 10 000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde einmalig mit dem 50fachen des Reaktionsansatzvolumens 70%igem Ethanol gewaschen, im Anschluss getrocknet und mit dem 2fachen des Reaktionsansatzvolumens RNase freiem Wasser aufgenommen.

2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese denaturierter RNA

Um die Qualität und Menge des RNA-Ertrages zu bestimmen wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierzu wurde 0.5 µl der RNA Lösung entnommen und mittels Glyoxal und DMSO denaturiert (McMaster und Camichael, 1977), welches im 6fachen Volumen der RNA-Probe hinzugefügt wurde. Zur Sichtbarmachung der RNA wurde dem Glyoxal / DMSO Ansatz noch Ethidiumbromid zugefügt. Die Denaturierung geschah über einen Zeitraum von 60 min bei 50° C im Wasserbad. In der Zwischenzeit konnte ein 1 %iges RNA-Gel frisch präpariert werden. Hierzu wurden 50 ml BES-Puffer mit 0.5 g Agarose kurz aufgeköcht. In der Abkühlphase wurde dem Gel, um RNase-Aktivitäten zu unterdrücken, 5 mM Natriumjodessigsäure zugefügt. Nach dem Erstarren wurde das Gel mit BES-Puffer überschichtet. Anschließend wurde zu den denaturierten RNA-Proben der mMMESSAGE mMASCHINETM Gelprobenpuffer (s.o.) im Verhältnis (Puffer:Probe)1:4 beifügt und die zu analysierende RNA auf das Gel aufgetragen. Als Längen- und Mengenstandard diente eine RNA-Leiter von GibcoBRL Life Technologies. Die Elektrophorese erfolgte bei konstant 5 V/cm in 75-90 min. Zur Vermeidung der Entstehung eines pH-Gradienten wurde nach 10 min eine Umwälzpumpe aktiviert, die den Laufpuffer von der Kathode zu Anode umwälzte.

BES-Puffer: 10 mM BES, 0.1 mM EDTA, pH 6,7

Glyoxalpuffer: 50 µg/ml Ethidiumbromid, 50 % DMSO, 1 M Glyoxal in Laufpuffer

Auftragspuffer: aus dem mMMESSAGE mMASCHINETM Kitsystem (s.o.)

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Differenzielle Zentrifugation

Es stellte sich während der Versuche mit Mutanten des rOCT1 Transporters immer wieder die Frage, ob ein Verlust der Funktion des Transporters vielleicht eine Verringerung des Proteingehalts in der Membran der mikroinjizierten Oozyte bedeutete oder aber eine Verringerung der Transportrate auf Grund struktureller Veränderungen am Protein. Um diese Frage zu beantworten wurden *Xenopus laevis* Oozyten durch Zentrifugation fraktioniert, so dass am Ende der Gehalt an rOCT1 Protein in der Membranfraktion analysiert werden konnte. Es wurde wie folgt vorgegangen (Geering et al., 1989) (modifiziert):

Drei Tage nach der Mikroinjektion der *Xenopus laevis* Oozyten mit RNA, wurde diese von den „Sixwell“ Kulturschalen in 1.5 ml „Eppendorf-Tubes“ überführt. Um in einem gut detektierbaren Bereich zu arbeiten, mussten mindestens 40 Oozyten pro Ansatz vorhanden sein. Diese wurden dann in 5 µl Homogenisierungspuffer pro Oozyte mechanisch durch auf- und abpipettieren durch eine auf 20-200 µl geeichte Eppendorfpipettenspitze zu einer homogenen Lösung verarbeitet. Dieses Homogenisat wurde dann 10 min bei 1000 g und 4° C zentrifugiert. Im Anschluss erhielt man das Pellet und den Überstand. Das Pellet bestand hauptsächlich aus Dotterschollenproteinen und konnte somit verworfen werden. Der Überstand wurde erneut 10 min bei 1000 g und 4° C zentrifugiert, so dass man erneut ein Pellet mit Dotterschollenproteinen und einen Überstand erhielt. Das Pellet konnte verworfen werden. Zur Sedimentierung der Membranfraktion wurde der verbleibende Überstand nun 60 min bei 35000 g und 4°C zentrifugiert.

Im Anschluss konnte der Überstand verworfen werden. Das 35000 g Pellet, in dem nun die Membranvesikel stark angereichert waren, wurde zum Entfernen von verbliebenen zytoplasmatischen Proteinen in 1.5 ml Homogenisierungspuffer resuspendiert und zuerst 10 min bei 1000 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet, in dem sich noch immer Dotterschollenproteine befanden, konnte verworfen werden. Aus dem Überstand wurde im Anschluss wiederum die Membranfraktion 60 min bei 35000 g und 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet in 1 µl Homogenisierungspuffer pro Oozyte resuspendiert. Unmittelbar vor Gebrauch wurde 1fach Inhibitormix und 1 mM des Serinproteaseninhibitors AEBSF zum Homogenisierungspuffer hinzugegeben.

Homogenisierungspuffer: 83 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.9

100fach Inhibitor Mix: (1mM Benzamidin, 5 µg/ml Leupeptin, 5 µg/ml Aprotinin)

2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford (Bradford, 1976). Hierbei wurde 1 µl der zu bestimmenden Proteinlösung zu 99 ml bidestilliertem Wasser pipettiert. Anschließend wurde 900 µl 1:5 verdünntes Bradfordreagenz hinzugefügt. Die Probe wurde kräftig geschüttelt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die optische Dichte im Photometer bei 595 nm gemessen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte an Hand einer parallel erstellten Eichgeraden aus bovinem Serum-Albumin-Standard (BSA-Standard).

Das SDS-Polyacrylamid Gel

Das SDS-Polyacrylamid Gel (Laemmli et al., 1970) dient der Trennung von Proteinen an Hand ihres Molekulargewichts und wurde vor jedem Versuch frisch hergestellt. Die Proteine wurden in einem 1 mm dicken, vertikalen Minigel aufgetrennt.

Die Glasplatten (eine mit einer Aussparung und eine weitere ohne Aussparung) des Gels, das Dichtungsgummi und der Geltaschenkamm wurden mit 70%igem Ethanol gereinigt und zusammengesetzt. Im Anschluss wurde das Trenngel zusammenpipettiert; der Hohlraum zwischen den beiden Platten wurde bis ca. 1 cm vor der Aussparung mit dem Gel gefüllt. Um einen ebenen Anschluss der Trenngelschicht zu gewährleisten, wurde diese mit einer wässrigen 0.5 %igen SDS-Lösung überschichtet. Nach spätestens 30 min war das Trenngel auspolymerisiert. Die SDS-Lösung wurde abgeschüttelt, das Sammelgel bis zum Rand der Aussparung oben aufpipettiert und der Geltaschenkamm eingeführt. Nach 15 min war nun auch das Sammelgel auspolymerisiert. Nach Entfernung des Geltaschenkamms und des Dichtungsgummis konnte das Gel nun in die Elektrophoresekammer eingebaut werden. Das untere Ende des Gels wurde in Laufpuffer blasenfrei eingetaucht, das Obere mit Laufpuffer überschichtet.

Die Proben wurden mit Probenpuffer versetzt und 30 min bei 37° C inkubiert. Im Anschluss wurde jede Gelkammer mit exakt 10 µg Protein beladen. Zusätzlich wurde eine der

Geltaschen mit einem Proteinmengenstandard beladen und die Elektrophorese gestartet. Bis zum Eintritt der Proben in das Trenngel wurde diese bei einer Spannung von 80 V laufen gelassen, anschließend bei 120 V. Bei Austritt des Bromphenolblau des Probenpuffers aus dem Gel, konnte die Elektrophorese gestoppt und das Gel aus den Glasplatten herausgelöst werden.

Trenngel:

10 % Polyacrylamid (v / v)
375 mM Tris, pH 8.8
0.1 % SDS (w / v)
0.05 % APS (w / v)
0.05 % TEMED (v / v)

Sammelgel:

4 % Polyacrylamid
125 mM Tris, pH 6.8
0.1 % SDS (w / v)
0.05 % APS (w / v)
0.1 % TEMED (v / v)

Laufpuffer:

25 mM Tris, pH 8.3
192 mM Glyzin
0.1 % SDS (w / v)

Probenpuffer (10fach):

10 % SDS (w / v)
500 mM DTT
300 mM Tris/HCl
0.001 % Bromphenolblau (w / v)

2.3.3 Das „Semidry“ Blot Verfahren

Das Semidry Blot Verfahren wurde nach Gershoni angewendet (Gershoni und Palade, 1983).

2.3.3.1 Die PVDF-Membran

Es konnte gezeigt werden, dass die Bindungskapazitäten einer PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid) für Membranproteine höher ist als die einer Nitrozellulosemembran. Dies mag mit der größeren Hydrophobizität von PVDF-Membranen zusammen hängen, die einer speziellen Vorbehandlung bedürfen (s.u.). Zudem sind PVDF-Membranen unempfindlicher gegen mechanische chemische und mechanische Einflüsse (Paladichuk, 1999). Daher wurden bei diesen Blots PVDF-Membranen benutzt.

2.3.3.2 Vorbehandlung der PVDF-Membran und des Blot-Papiers

Die Membran wurde auf 6 X 8.5 cm geschnitten. Aufgrund der hohen Hydrophobizität bedurfte die PVDF-Membran einer speziellen Vorbehandlung. Hierzu musste die Membran eine Minute in 100 %iges Methanol eingetaucht werden. Anschließend musste sie eine Minute in bidestilliertes Wasser getaucht werden, bis sich die Membran damit vollgesogen hatte, danach wurde sie zu Equilibrierung in Blotpuffer getaucht. Das Whatman-Filterpapier wurde mit den Maßen 5.9 X 8.4 cm etwas kleiner zurechtgeschnitten, um Kurzschluss-Ströme, die den Weg um die PVDF-Membran nehmen könnten zu unterbinden. Das Whatman-Papier wurde ebenfalls in Blotpuffer getaucht, bis es sich vollständig vollgesogen hatte.

2.3.3.3 Aufbau der Blottingapparatur und des Blots

Bei Verunreinigung der Karbonelektroden der Blottingapparatur wurden diese mit einem feinen Schmirgelpapier gesäubert.

Zu unterst lag die Anode (positiv geladen), sie wurde mit Blotpuffer befeuchtet. Darauf wurden 2 Lagen Filterpapier (s.o.) gelegt. Es war dabei sehr wichtig die Luft zwischen den Papieren selbst und zwischen der Anode hinauszudrücken, um eine gleichmäßige Verteilung des elektrischen Feldes und somit einen homogenen Transfer der Proteine zu gewährleisten. Als nächstes wurde die PVDF-Membran aufgelegt, das Gel und wieder 2 Lagen Filterpapier folgten. Die Kathode wurde noch mit Blotpuffer befeuchtet und dann auf das „Sandwich“ gelegt. Im Anschluss wurden die Kontakte angeschlossen. Das Blotten geschah 1 Stunden und 45 Minuten bei 2.3 mA/cm^2 . Der Blottingvorgang war erfolgreich, wenn im Anschluss die gefärbten Banden des Proteingrößenstandards auf die Membran übergetreten waren. Die Membran wurde nun von den Filterpapieren gelöst und 30 Minuten in 5 % Blockpuffer geblockt.

2.3.4 Die Antikörperinkubation

Danach wurde die Membran zusammen mit einem affinitätsgereinigten Antikörper s.u. (AK48, Eluat mit dem höchsten Titer; 1:500 in 4 ml 1 % Blockpuffer) in Folie eingeschweißt und bei 4° C über Nacht geschüttelt. Der primäre Antikörper war gegen die große extrazelluläre Schleife (Aminosäuren 46-158) von rOCT1 gerichtet (Meyer-Wentrup et al., 1998). Am nächsten Tag wurde die Membran häufig gewaschen (d.h. sie wurde 5 mal in 1 % Block Puffer getaucht, bevor sie 3 X 10 min auf dem Wippschüttler in 1 % Blockpuffer

inkubierte). Anschließend wurde sie zusammen mit dem in der Ziege hergestelltem anti-Kaninchen Antikörper (Sigma-Aldrich, Seelze) (1:2500 in 1 % Block Puffer) in Folie eingeschweißt und inkubierte 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Wippschüttler. Anschließend wurde beim Waschen wie oben vorgegangen. Beim letzten Schritt wurde jedoch reines TBS-T benutzt.

Blotpuffer: (Towbin et al., 1979) modifiziert	TBS-T:	5% bzw. 1% Blockpuffer:
25 mM Tris, pH 8,3	20 mM Tris	TBS-T
192 mM Glyzin	137 mM NaCl	5 % bzw. 1 % Mager-
0.1 % SDS (w / v)	0.1 % Tween 20 (v / v)	milchpulver (w / v)
20 % Methanol (v / v)		
primärer Antikörper	sekundärer Antikörper	
AK 48, Bestes Eluat 1:500 in 1 % Blockpuffer	Anti-Kaninchen aus der Ziege (ganzes Molekül) 1:2500 in 1 % Blockpuffer	

2.3.5 Nachweis von Protein auf PVDF-Membranen mittels ECL-Reagenz

Die Interaktion der an den sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase mit den ECL (Enhanced Chemoluminescens Reagenzien) (Biorad, Hercules, Californien, USA), erzeugt eine Lumineszenz, die auf Röntgenfilmen eine Schwärzung nach sich zieht.

Die Flüssigkeit auf der Membran wurde kurz abgetropft und die Membran auf eine Saranfolie gelegt. Je 1 ml des ECL 1 und 1 ml des ECL 2 Reagenz wurden gemischt, auf die Membran gebracht und dort 1 min belassen. Anschließend wurde die Flüssigkeit abgetropft, die Membran in frische Saranfolie eingeschlagen, mittels vorher angestrahler luminezierender Klebestreifen in der Fotokassette befestigt, der Röntgenfilm je nach Stärke des Signals zwischen 10 und 30 min aufgelegt und anschließend entwickelt.

2.4 Das Oozytenexpressionssystem

2.4.1 Allgemeines

Die *Xenopus laevis* Oozyte ist eine omnipotente und undifferenzierte Zelle. Auf Grund ihrer Größe ist es sehr einfach an ihr Manipulationen, wie z.B. Mikroinjektionen (Gurdon et al., 1971) vorzunehmen oder Methoden wie die „Zwei Elektroden Spannungsklemme“ an ihr durchzuführen und die Aufnahme von radioaktiven Substanzen zu erproben. Die Eigenschaft posttranskriptionale Modifikationen an Proteinen durchzuführen (Lane, 1983), welche im Gegensatz zur Proteinbiosynthese von Bakterien steht, macht sie zu einem wichtigen Instrument zur Erforschung von Membranproteinen. Neben ihrer Größe hat die *Xenopus laevis* Oozyte noch den Vorteil unter nicht sterilen Bedingungen kultiviert werden zu können, was eine Verringerung an Materialkosten und eine große zeitliche Ersparnis bedeutet.

2.4.2 Oozyten Kulturmedien

Um dem Oozyten Ringer (ORi), von Verunreinigungen möglichst frei zu halten, wurde der Millipor Ionen Austausch Anlage, welche die Leitfähigkeit des benutzten Wassers auf weniger als 0.005 μS verringerte, ein Mikrofilter nachgeschaltet (Firma Blendel), der eventuelle bakterielle Verunreinigungen, die innerhalb des Austauschsystems vorhanden sein konnten, eliminierte. Dieser Bakterienfilter wurde in zweiwöchentlichem Rhythmus autoklaviert. Der 10fach ORi wurde stets autoklaviert. Um jegliche Kontamination durch Organismen zu verhindern, wurde der verdünnte 1fach ORi erneut autoklaviert. Um die Stabilität und Funktionalität des benutzten Antibiotikums zu gewährleisten, wurde dieses erst nach dem Autoklavieren unmittelbar vor der Benutzung dem ORi zugefügt. Da Antibiotika in Lösung recht schnell ihre Wirkung verlieren (Lindl und Bauer, 1987), wurden die benutzten Kulturlösungen spätestens nach einer Woche frisch angesetzt. Während der Durchführung der Experimente wurde antibiotikumfreier ORi benutzt. Standardmäßig hatte der ORi pH 7.4. Bei den Versuchen mit dem rOCT2 Klon und dessen Interaktion mit Chinin wurden zusätzlich ORi-Lösungen mit den pH-Werten 6.0 und 8.5 benutzt.

	NaCl	KCl	CaCl ₂	MgCl ₂	MOPS
ORi	100	3	2	1	5
Ca ²⁺ -freier ORi	100	3	-	1	5

GentORi wurde zusätzlich mit 50 mg/l Gentamycin,
KulORi mit 20 mg/l Penicillin und 25 mg/l Streptomycin versetzt.

Haltung der *Xenopus laevis* Kröten

Es wurden weibliche *Xenopus laevis* Kröten von Kähler, Hamburg, Nasco, Fort Atkinson, USA und African Xenopus Fascillity, Knysna, Südafrika, bezogen. Sie besaßen eine durchschnittliche Körperlänge von 10-15 cm. Die Frösche wurden zu maximal 15 in 150 Liter Plastikwannen bei Temperaturen zwischen 18 und 20° C gehalten. Es bestand ein ständiger Frischwasserzufluss. Als Versteck dienten diesen rein aquatisch lebenden Fröschen längs halbierte Tonröhren und Tonplatten, die in etwa 50 cm Wassertiefe am Grund der Plastiktanks lagen. Die Frösche wurden regelmäßig 2 mal pro Woche mit vitaminversetzten Rinderherzstückchen gefüttert. Mittels einer Zeitschaltuhr und über den Becken befestigten 25 Watt Glühbirnen wurde eine konstante Tageslänge von 6.00 bis 18.00 Uhr vorgegeben.



Abb. 2: *Xenopus laevis* Weibchen

2.4.3 Entnahme und Präparation der Oozyten

Die Eierstöcke von *Xenopus laevis*-Weibchen sind paarig und bestehen aus bis zu 16 sackförmigen Mesovarien, auch Loben genannt. Diese Loben werden vom äußeren Ovarienepithel begrenzt und können bis zu 30000 Oozyten unterschiedlichen Entwicklungsstadiums enthalten (Dumont, 1972). Je nach Entwicklungsstand wird den Oozyten ein Stadium von I bis VI zu geordnet, wobei I den geringsten und VI den höchsten Entwicklungsstand bedeutet (siehe unten). Nach einem zirka 1-2 cm langen Bauchschnitt (Laparotomie) wurden unterhalb der Bauchmuskulatur die Oozyten sichtbar, die von einem Follikel­epithel, einer bindegewebigen Theka mit Fibroblasten und Blutkapillaren und dem inneren Ovarienepithel umgeben waren.

Zur Betäubung wurde der Frosch in eine 0.2 %ige Tricainlösung getaucht. Das Tricain tritt über die Haut in das Kreislaufsystem des Frosches ein. Es wurde gewartet bis der Frosch nicht mehr auf Berührung reagierte. Anschließend wurde das hautreizende Tricain mit fließendem Wasser von der Haut des Frosches entfernt. Der Frosch wurde zur Verlängerung der Narkose auf Eis gelegt. Nachdem überprüft wurde, dass der Schluckreflex ausgesetzt war, konnte die Laparotomie beginnen.

2.4.3.1 Laparotomie

Die Laparotomie wurde im unteren Abdominalbereich durchgeführt. Die schleimige Lederhaut wurde mit einem Zellstofftuch ergriffen und dann mit einer Pinzette festgehalten. Anschließend erfolgte der 1 bis 2 cm lange Schnitt mittels einer Schere parallel zur Körperachse durch die Lederhaut, der die Bauchmuskelschicht, welche von einer Muskelfaszie bedeckt war, freilegte. Die Faszie und die Muskelschicht wurden nun mit einer Pinzette erfasst und ebenfalls auf einer Länge von 1-2 cm geöffnet. Sogleich kamen die Mesovarien zum Vorschein, durch welche die Oozyten sehr gut zu erkennen waren. Die Mesovarien konnten je nach Bedarf auf einer Seite ganz oder nur teilweise entnommen werden. Dabei wurde darauf geachtet, dass sie nicht direkt am Ovarialstamm abgeschnitten wurden, damit eine Regeneration der Loben stattfinden und der Frosch nach einer gewissen Zeit erneut operiert werden konnte. Durch die einseitige Laparotomie konnte der Frosch noch vor der Beendigung der Regenerationszeit der operativ entfernten Mesovarien erneut operiert werden.

Die entnommenen Mesovarien wurden bis zur Weiterbehandlung in ORi eingelegt. Die Wunde konnte nun geschlossen werden. Dazu wurde eine gebogene Wundnadel genutzt, in deren Fadenthaler eine dünne, gezwirnte Seide eingespannt wurde. Die Wunde wurde geschlossen, indem die Oberhaut zunächst mit einer abgewinkelten Pinzette gefasst wurde. Da die Oberhaut eine feste, lederige Eigenschaft hatte, musste die Pinzette nun als Widerlager dienen. War die Penetration der Haut gelungen, wurde die Faszie und die Bauchmuskulatur durchstoßen. Auf der anderen Wundseite geschah dieser Vorgang in umgekehrter Reihenfolge. In der Regel wurden 3 Stiche vorgenommen. Erst wenn der letzte Stich beendet war, wurden die Nähte verknotet. Die Kröte wurde dann in ein verdunkeltes Behältnis gesetzt, welches nur knapp so hoch mit Wasser, das 0.5 g/l Meersalz und eine Spatelspitze Streptomycin pro 5 l enthielt, gefüllt war, dass die Nasenlöcher nicht mit Wasser bedeckt waren. Dadurch wurde gleichzeitig einer Austrocknung und einem Ertrinken der Kröte vorgebeugt. Um einer Austrocknung des Rückens vorzubeugen, wurde das Tier bis zum Erwachen regelmäßig mit Wasser beträufelt. Nachdem das Tier erwacht war, was durch kräftiges Strampeln der Extremitäten zu beobachten war, wurde der Eimer mit der obigen Wasserlösung bis auf eine Höhe von etwa 20 cm gefüllt und der Frosch im Eimer belassen. Am nächsten Tag konnte er in sein ursprüngliches Becken zurückgesetzt werden. Der Wundschluss geschah in einem Zeitraum von 2 bis 3 Wochen.

2.4.3.2 Vereinzelung der Oozyten

Die entnommenen Mesovarien wurden mittels zweier Pinzetten in kleine Stücke zerzupft, anschließend in einem 50 ml Greiner Röhrchen mit ORi gewaschen bis die oozytenumgebende Lösung klar war. Das restliche Lösung wurde abgeschüttet, die Oozyten in eine frische Petrischale überführt. Die Petrischale wurde nun mit 10 ml GentOri, welches mit 1200 U Kollagenase versetzt war, befüllt. Die Oozyten wurden so über Nacht bei 16° C inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die Oozyten zur Defollikulierung 5 min in Ca²⁺-freiem ORi gewaschen, anschließend in eine neue Petrischale überführt, welche mit GentORi gefüllt war. Nun konnten gesund aussehende Oozyten des Stadiums V und VI selektiert werden. Zum Auslesen der Oozyten wurde eine Glaspipette, zur Vergrößerung und Beleuchtung wurde ein Zoom-Stereo-Präparationsmikroskop und eine 150 W Kaltlichtleuchte genutzt.



Abb. 3: *Oozyten nach dem Kollagenaseverdau*

2.4.3.3 Auswahl der Oozyten

Wie weiter oben kurz erwähnt, werden die Oozyten je nach Entwicklungsstadium in Klassen I bis VI unterteilt. Es soll nur kurz auf die Merkmale zur Erkennung der unterschiedlichen Klassen eingegangen werden :

Stadium I: 50-300 μM große Oozyte mit transparentem Zytoplasma und großem, gut erkennbarem Zellkern

Stadium II: 300-450 μM große Oozyte, das Zytoplasma schimmert weißlich; die Vitellogenese, also Dotterbildung, beginnt

Stadium III: 450-600 μM große, dotterbildende Oozyte. Das Zytoplasma färbt sich braunschwarz; der Protein-Lipid-Dotter ist homogen verteilt. Die Oozyte erscheint homogen schwarzbraun

Stadium IV: 600-1000 μM große, dotterbildende Oozyte. Die Polarisierung in animalen (dunkel) und vegetativen Pol (hell) ist nun deutlich zu erkennen

Stadium V: 1000-1200 μM große, dotterbildende Oozyte. Der Zellkern befindet sich nun in der animalen Hemisphäre. Das Volumen der Zelle beträgt nun 0.9-1.2 μl . Im optimalen Fall ist die Pigmentierung des animalen Pols braun bis schwarz und sehr homogen; optimales Stadium zur Mikroinjektion von RNA



Abb. 4: *Oozyten des Stadiums V*

Stadium VI: 1200-1300 μM große, dotterhaltige Oozyte; im Bereich des Äquators bilden sich Pigmentringe.

2.4.4 Mikroinjektion und Lagerung der Oozyten

Die ausgelesenen Oozyten des Stadiums V und VI wurden in eine weitere mit GentORI gefüllte Petrischale überführt, in der sich ein Bänkchen mit eingearbeitete Rillen befand. Diese Rillen hatten in etwa den Durchmesser einer Oozyte und waren an einer Seite abgeflacht, so dass die Injektionskapillare gut an die Oozyten herangeführt werden konnten. Auf Grund des geringen Durchmessers der Rillen und der beidseitigen Eingrenzung durch weitere Eizellen, rutschten die Oozyten beim Injizieren nicht weg. Die Glasinjektionskapillare bestand aus Borosilikat (Hilgenberg, Malsfeld), hatte einen äußeren Durchmesser von 1 mm

und einen inneren von 0.5 mm. Die Glaskapillare wurde mit Hilfe der Glühwendel eines „Kapillarpullers“ in zwei sich extrem verjüngende Hälften gezogen. Die Enden waren nach diesem Vorgang verschmolzen und mussten später aufgebrochen werden.

Diese Injektionskapillare wurde nun mit Mineralöl (Sigma 400-5 Heavy Weight Oil, mit einer Dichte von 0.88 g/ml) befüllt und in eine Mikroinjektionpumpe der Firma Drummond eingespannt. Um die zu injizierende RNA vor Aufkonzentrierung durch Verdunstung oder vor Kontamination zu schützen, wurde diese unter einen sterilen Ölfilm pipettiert. Die verschmolzene Spitze der Injektionskapillare wurde mit einer feinen Pinzette aufgebrochen, bestehende Luftblasen wurden gänzlich, das Öl wurde nur zum Teil ausgepumpt und das gewünschte Volumen der zu injizierenden RNA aufgesaugt.

Die Kapillare wurde rechtwinkelig auf die Oozyte gesetzt und dann 0.1 bis 0.2 mm unter die Oozytenmembran gestochen. Es wurde immer ein Volumen von 50 nl, in dem 10 ng RNA gelöst war, injiziert, was in etwa 5 % des gesamten Oozytenvolumens ausmachte. Nach der Injektion wurde die Kapillare für zirka 5 sek. in der Oozyte belassen, so dass es zu einem Druckausgleich in der Oozyte kam und beim Herausziehen möglichst keine RNA verloren ging. Da die Oozyten ja nach „Batch“ nach der Injektion mehr oder weniger dotterten, wurden sie im Anschluss kurz mit ORi gewaschen bevor sie endgültig in die sechs-„Well“-Kulturschalen (nie mehr als 10 Oozyten pro „Well“) überführt wurden.

Die Oozyten lagerten hier so mindestens zwei Tage bis zur „Tracerflux“ Messung oder mindestens drei Tage für die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme und zur proteinbiochemischen Weiterverwendung. Degenerierte Oozyten wurden den Kulturschalen entnommen und verworfen. Degenerierten mehr als 20 % innerhalb eines „Wells“ wurde ein Austausch der Kulturlösung vorgenommen.

2.4.5 Transportmessungen mit radioaktiv markierten Substraten (Tracerflux Uptake)

Für die Messungen mit leicht radioaktiven Substraten (engl.: Tracer) sollten die Oozyten mindesten 48 h inkubiert worden sein. Wie im Folgenden beschrieben, wurde dabei der Transport der Tracer über die Membran in das Zytosol bestimmt.

2.4.5.1 Bestimmung der Substrataufnahme

Die Polystyrolreaktionsgefäße, in denen die Transportmessung stattfand, mussten zuvor mit einer trüben 2%igen Magermilchpulverlösung ausgespült werden. Die Proteine der Magermilch blockten so die Seitenketten des Polystyrols und verhinderten die Adhäsion der Oozyten an den Wänden oder am Boden des Gefäßes. Die Reaktionsgefäße wurden mit 190 µl ORi (für Ansätze ohne Inhibitor) bzw. 188 µl ORi (für Ansätze mit Inhibitor) gefüllt. Nachdem sie mit ORi gewaschen waren, wurden 8 bis 10 Oozyten in je ein Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde der Inhibitor in regelmäßigen Abständen zugefügt und mindestens 10 Minuten gewartet bis die Transportmessung durch das radioaktiv markierte Substrat so gestartet wurde, dass bei allen Ansätzen die Vorinkubationszeit des Inhibitors gleich war. Nach Schütteln wurden aus den Reaktionsgefäßen 2×10 µl der radioaktiven Lösung zur genauen Bestimmung der Anzahl radioaktiver Zerfälle entnommen. Die Transportmessung fand bei 22° C statt und wurde entweder nach 30 oder 60 min (siehe Beschreibungen zu den jeweiligen Versuchen und Abbildungen) mit eiskaltem ORi gestoppt. Die Oozyten wurden zur Entfernung der nicht aufgenommenen Substrate viermal mit eiskaltem ORi gewaschen und anschließend in Szintilationsgefäße vereinzelt. Damit die aufgenommene Radioaktivität gemessen werden konnte, wurden die Oozyten mittels 100 µl einer 5 %igen SDS Lösung 30 min auf dem Schüttler lysiert. Anschließend wurde in jedes Szintilationsgefäße 1 ml einer lumineszierenden Szintilationslösung (Lumasafe, Packard, Dreieich) zugegeben und kräftig gevortext. Im Anschluss wurden die Röhrchen in den Szintilationszähler Tricarb 1600 (Packard, Dreieich) gestellt, in welchem die Stärke der Lumineszens gemessen wurde, die proportional zur Menge der radioaktiven Zerfälle war. Als Leerwert wurde eine lysierte Oozyte gewählt, die nicht mit Radioaktivität in Berührung gekommen war. Alle Proben wurden drei Minuten lang im Szintilationszähler gemessen.

2.4.6 Die Zwei-Elektroden Spannungsklemme

Im wesentlichen besteht der Messplatz aus einem Voltage-Clamp-Verstärker (Warner OC 725A, Warner, New Haven), einer Messkammer, einer Kaltlichtquelle, einem Superfusionssystem mit Absaugvorrichtung und einem Schreiber. Zuerst mussten die Elektroden präpariert werden. Hierzu wurden Glaskapillaren aus Borosilikat mit Mikrofilament (Durchmesser außen: 1.2 mm, innen: 1 mm, Hilgenberg, Malsfeld) mit Hilfe eines Elektrodenziehers aufgeschmolzen, so dass sich die Spitzen dieser Kapillaren extrem

verjüngten. Um aus ihnen nun leitfähige Elektroden zu machen, wurden diese mit 3 M Kaliumchlorid-Lösung gefüllt. Die Elektroden mussten luftblasenfrei gefüllt werden, um ihre Leitfähigkeit zu gewährleisten. Sollten doch Blasen vorhanden gewesen sein, hefteten diese sich an das Mikrofilament und glitten nach leichten Erschütterungen an die Oberfläche der Elektrodenlösung. Die Elektroden wurden an einem Elektrodenhalter befestigt, der wiederum von Mikromanipulatoren gehalten wurde. Die beiden Referenzelektroden wurden über eine Agar-Kaliumchloridbrücke mit der Messkammer verbunden. Dies verringerte die Empfindlichkeit gegenüber elektrostatischen Störungen enorm und verhinderte das Auftreten von Artefakten, die beim Wechseln der Superfusionslösungen entstehen können. Der Widerstand der Elektroden wurde im Bad gemessen und sollte optimaler Weise zwischen 2 und 5 M Ω betragen. Dies gewährleistete, dass die Öffnung der Kapillare nicht zu groß war, so dass Kaliumchlorid-Lösung austreten konnte, aber auch nicht zu klein war, so dass kein Strom mehr registriert werden konnte.

Die zu messende Oozyte wurde nun in das mit ORi gefüllte Bad überführt und die Superfusion gestartet. Also nächstes wurden die Strom- und die Spannungselektrode an die Oozyte gebracht. Hier wurde noch ein „Offset“- Abgleich durchgeführt, um Spannungsgefälle zwischen den Elektroden auszugleichen. Nun wurden die Elektroden gleichzeitig in die Oozyte befördert. Der Schreiber wurde angestellt und das Membranpotenzial beobachtet. Eine Stabilisierung des Membranpotenzials zeigte an, dass sich die Einstichstellen abgedichtet hatten. Dies war das sogenannte Ruhepotenzial, welches sich je nach „Oozytenbatch“ zwischen -20 und -60 mV befand. Dann wurde das Membranpotenzial auf -50 mV geklemmt.

Die substratinduzierten Ströme wurden von dem Verstärker erfasst und amplifiziert, an den Schreiber weitergeleitet. Außerdem wurde ein „Low-pass“-Filter zwischen Verstärker und Schreiber geschaltet, um vor allem die störenden 50 Hz „Steckdosen-Wechselstromschwingungen“ auszufiltern. Im folgenden wurde auf dem Schreiber der Strom registriert, der benötigt wurde, um das Potenzial stabil auf -50 mV zu halten. Durch acht verschiedene Schläuche konnten der Oozyte nun mit einer Superfusionsgeschwindigkeit von 1 ml/min unterschiedliche Lösungen zugeführt werden. Der Flüssigkeitsspiegel wurde durch eine Absaugvorrichtung konstant gehalten.

2.4.7 Datenauswertung

2.4.7.1 Bestimmung der Substrataufnahme

Es wurden die Zerfälle pro Oozyte gemessen, dabei wurden durch Einsatz eines OCT-spezifischen Inhibitors (100 μM Cyanin863 oder 100 μM Chinin) in einem weiteren Ansatz mit ansonsten gleichen Bedingungen, durch Subtraktion die durch OCTs verursachten Transportmengen errechnet. Aus den entnommenen Proben bei den „Tracerflux“ Messungen ($2 \times 10 \mu\text{l}$) wurde die gesamte Menge an Radioaktivität im 200 μl Ansatz berechnet. Bei Einzelversuchen wurde stets der Median berechnet. Zusätzlich wurde der Standardfehler angegeben. Durch Einbeziehung der zugefügten Molmenge an Substrat und der Zeit konnte über einfachen Dreisatz die Transportrate bestimmt werden, welche stets die Einheit $\text{pmol} \times \text{Oozyte}^{-1} \times \text{Zeiteinheit}^{-1}$ besaß.

$$\frac{\text{Zerfälle pro Oozyte [DPM]}}{\text{Zerfälle im Ansatz [DPM]}} \times \text{Substratmenge im Ansatz [pmol]}$$

Da die Versuche stets wiederholt wurden, konnte der Mittelwert aus den Wiederholungen berechnet und mit seinem Standardfehler angegeben werden. Die genauen Durchführungen der Experimente werden jeweils unter den Abbildungen erläutert.

2.4.7.2 K_M - und V_{MAX} Bestimmung

Zur Berechnung dieser Werte wurden Verdünnungsreihen angelegt. Die Menge an zugegebener Radioaktivität wurde bei allen Konzentrationen möglichst konstant pipettiert. Die Zeitraum der Messungen zur Bestimmung der K_M - und V_{max} -Werte betrug immer 30 min. Die Erhaltenen Daten wurden mit dem Programm Prism (Graphpad, San Diego, USA) nach Michaelis Menten unter Annahme einer einzelnen Bindungsstelle angepasst.

$$V = \frac{V_{\text{Max}} \times [S]}{k_M + [S]}$$

V = Transportrate, V_{Max} = maximale Transportrate, k_M = Michaelis-Menten Konstante,

S = Substratkonzentration

2.4.7.3 IC₅₀-Wert Bestimmung

Die Bestimmung des IC₅₀-Wertes geschah durch Zugabe des radioaktiven Substrats, entweder [¹⁴C]TEA oder [³H]MPP, und des entsprechenden nicht radioaktivmarkiertem Hemmstoff. Die Inhibitionskurve wurde immer halblogarithmisch dargestellt, um Unterschiede deutlich sichtbar zu machen. Zur Berechnung der zur halbmaximalen Hemmung benötigten Hemmstoffkonzentration wurde die Hillgleichung benutzt, da die Transporthemmung der polyspezifischen organischen Kationentransporter komplexer Gesetze folgte. Die Anpassung der Regressionskurve geschah mit dem Programm „Figure P“.

2.4.8 Statistik

Zur Signifikanzberechnung wurde der ungepaarte Students t-Test verwendet. Für signifikante Unterschiede wurden eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % angenommen. Irrtumswahrscheinlichkeiten unterhalb von 1 % sind in den Legenden vermerkt.

3 Ergebnisse

3.1 Helikale Räder aller 12 hypothetischen TMDs von rOCT1

Transmembrandomänen haben bei Transportern sehr wichtige Funktionen, da sie den Weg bilden, durch den Substrate durch die Membranen gelangen und die Bindungsstellen bzw. –taschen stellen können, über die Transporter mit ihren Substraten interagieren. Den Mitgliedern der SLC22-Familie werden 12 solcher Transmembrandomänen vorausgesagt. Uns hat nun interessiert, welchen Grad der Konservierung diese 12 Domänen besitzen und wie die konservierten Aminosäuren innerhalb der jeweiligen Domäne verteilt sind. Hierzu haben wir

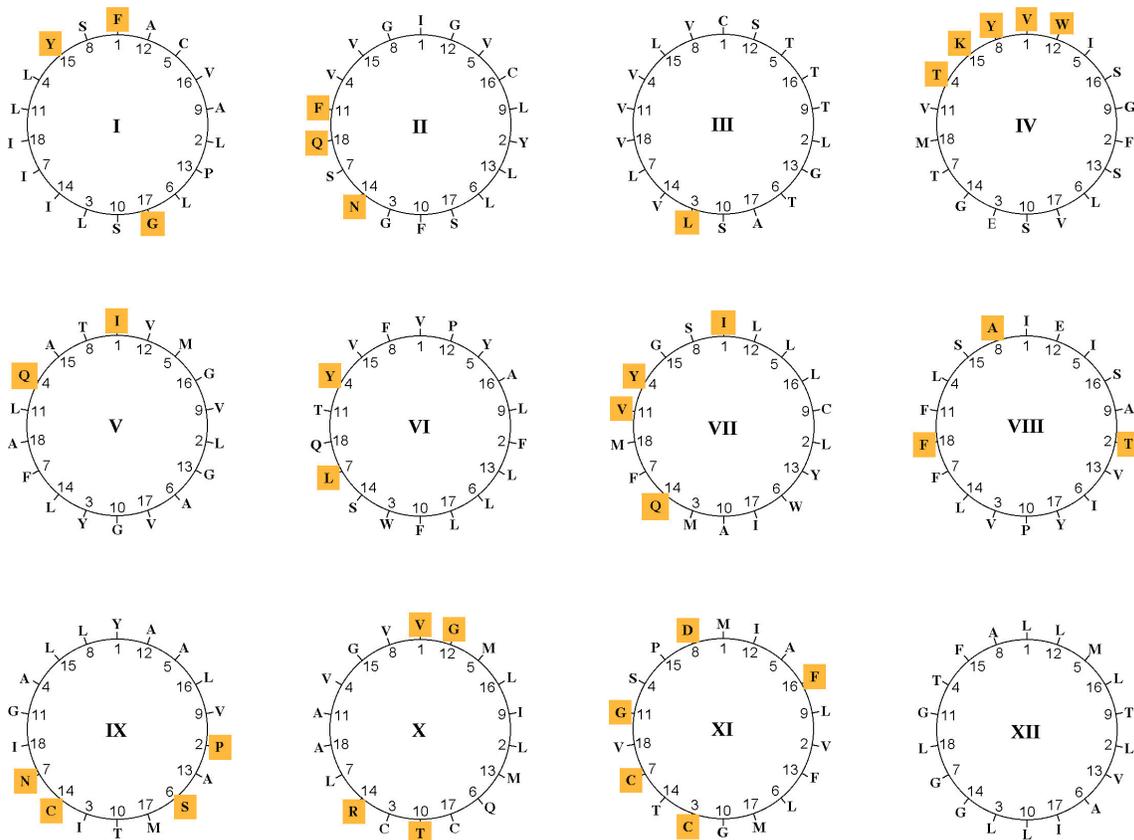


Abb. 5: *Helical Wheels* der 12 hypothetischen TMDs von rOCT1; Innerhalb der OCT oder OCTN Familien konservierte Aminosäuren sind gelb unterlegt.

die Möglichkeit der Darstellung der Transmembrandomänen als helikale Räder (engl.: Helical Wheels) genutzt, bei denen die in der vorausgesagten α -Helix untereinanderliegenden Aminosäuren je nach Abstand nebeneinanderliegend dargestellt werden (Abb. 5). Es wurden Aminosäuren markiert, die nur in OCTs oder aber in OCTs und OCTNs vorkamen.

Es ist hier deutlich ersichtlich, dass es eine Akkumulation der OCT- oder OCT und OCTN-spezifischen Aminosäuren auf einer Seite in Transmembrandomäne IV gibt. Sie soll in Kapitel 3.2 nun näher betrachtet werden (eine genauere Erklärung zu den „Helical Wheels“ erfolgt in der Diskussion in Kapitel 4.1.1.).

3.2 Die 4. Transmembrandomäne

Abb. 6 zeigt das „Helical Wheel“ der Transmembrandomäne IV mit der Nummerierung der Aminosäuren, wie sie in ihrer Reihenfolge im Protein vorkommen. Die nach dem Oben erklärten Schema konservierten Aminosäuren sind gelb markiert. Das *Glutamat* an der Position 227 ist nicht für die OCTs spezifisch, es ist jedoch in allen Familien der OCTs,

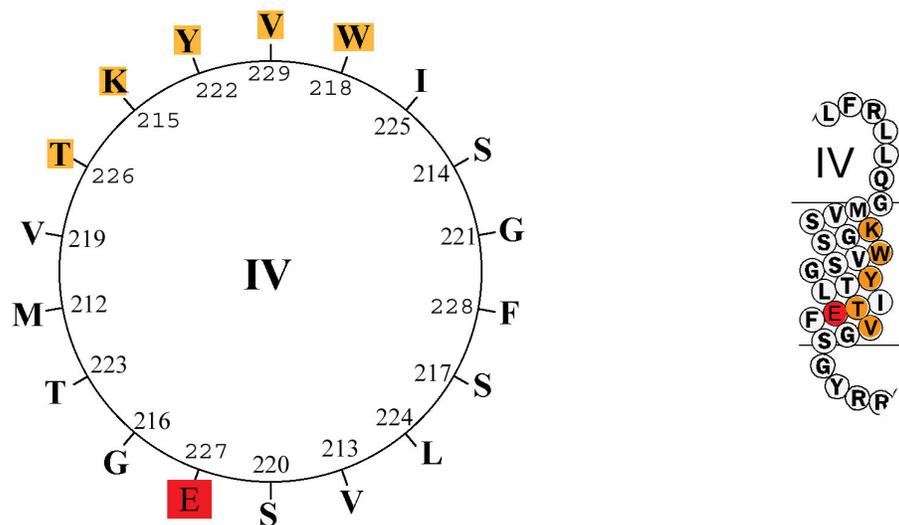


Abb. 6: Die vierte Transmembrandomäne von *rOCT1*; links: im „Helical Wheel“; rechts: wahrscheinliche Lage in der Membran; gelb: OCT oder OCT und OCTN-spezifische Aminosäuren, rot: durch alle Familien der OCTs und OATs konservierte Aminosäure

OCTNs und OATs konserviert und wurde deswegen in die Untersuchungen mit einbezogen. An diesen Positionen wurden zum Teil mehrere Mutationen durchgeführt und zwar:

native Aminosäure mit Position		substituierte Aminosäure(n)
<i>Lysin</i> [⊕]	215	<i>Glutamin, Arginin</i> [⊕]
<i>Tryptophan</i> ^a	218	<i>Phenylalanin</i> ^a , <i>Leucin, Tyrosin</i>
<i>Tyrosin</i> ^a	222	<i>Phenylalanin</i> ^a , <i>Leucin</i>
<i>Threonin</i>	226	<i>Alanin</i>
<i>Glutamat</i> ^θ	227	<i>Aspartat</i> ^θ , <i>Glutamin</i>
<i>Valin</i>	229	<i>Leucin</i>

Tabelle 9: Durchgeführte Aminosäuresubstitutionen. Positiv geladene Aminosäuren sind durch [⊕], negative durch ^θ und aromatische Aminosäuren durch ^a gekennzeichnet.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird häufig der „Ein-Buchstaben-Code“ der Aminosäuren verwendet. In Kapitel 7.6 des Anhangs findet sich eine Tabelle, in welcher den Aminosäuren der Ein-Buchstaben-Code zugeordnet ist.

3.2.1 Änderung der Substratselektivität bei Mutanten

Um Spezifitätsänderungen aufzudecken wurden diese Mutanten einem „Substratscreen“ unterzogen. Die Aufnahmen vier verschiedener Substrate wurden bei Konzentrationen, welche zirka 10fach unterhalb des k_M -Werts des Wildtyps lagen, miteinander im selben „Oozytenbatch“ (s.u.) verglichen. Signifikante Unterschiede wurden sowohl auf der 5 % als auch auf dem 1 % Niveau gesucht. Als Substrate wurden folgende radioaktive Substanzen in den genannten Konzentrationen gewählt: Tetraethylammonium (TEA, 10 μ M), N-Methyl-Phenyl-Pyridinium (MPP, 0.5 μ M), Guanidin (200 μ M) und Serotonin (2.5 μ M). Die Aktivität des Wildtypproteins und der Mutanten schwankte zwischen den Versuchserien, was mit dem unterschiedlich starkem Expressionsvermögen der verschiedenen „Oozytenbatches“ zusammenhing. Es wurden mehrere „Batches“ benötigt, um die Ergebnisse statistisch abzusichern. Ein „Batch“ ist die Menge aller Oozyten, die von einem Tier bei einer Laparotomie entnommen wird. Um die Daten miteinander vergleichbar zu machen, wurden

zwei Darstellungen gewählt, eine tabellarische und eine graphische Darstellung. In der tabellarischen Darstellung wurden die ermittelten Absolutwerte der Mutanten im Vergleich zu den Wildtyp-Absolutwerten gesetzt. Mit dieser Darstellung ist es übersichtlich möglich, signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante aufzuzeigen (siehe Anhang, Kapitel 7.2). Die graphische Darstellung in Abb. 7 zeigt die Substrataufnahme der Mutanten relativ zur Substrataufnahme des Wildtyps (Wildtypaufnahme = 100%). Das Hauptaugenmerk soll hier auf evtl. Unterschieden in der relativen Substrataufnahmen innerhalb der Mutanten liegen. Es kann somit gut diskriminiert werden, ob eine Mutante veränderte Transporteigenschaften bezüglich eines oder mehrerer Substrate aufweist.

3.2.1.1 K215

Die Mutanten des *Lysins* an der Position 215 (Arginin und Glutamin) zeigten im Vergleich zum Wildtyp einen signifikant verringerten Transport. Im Vergleich zu den wasserinjizierten Oozyten war der Transport der Mutanten von K215 nicht größer, so dass diese als nicht funktionierend eingestuft wurden. Es zeigt sich, dass an dieser Position nicht allein die Ladung der Aminosäure von relevanter Rolle für die Funktion von rOCT1 ist.

3.2.1.2 W218

Die Mutante *W218F* zeigte eine 3.8 fach erniedrigte Aufnahme für TEA, für Guanidin eine 2fach erniedrigte, keine Änderung der relativen Substrataufnahme für MPP und eine 2fach erniedrigte Aufnahme für Serotonin. Zwischen den Substraten konnte ein signifikanter Unterschied jedoch nur zwischen TEA und MPP festgestellt werden. Nur bei TEA war die absolute Aufnahme signifikant verschieden zum Wildtyp. Auffällig ist, dass die MPP Aufnahme im Gegensatz zu den anderen Substraten durch die Mutation unbeeinträchtigt erscheint.

Die Aufnahmeraten der Mutante *W218Y* waren bis auf MPP für alle Substrate in Bezug zum Wildtyp signifikant erniedrigt: für TEA 3.7fach, 4.9fach für Guanidin und 7.5fach für Serotonin.

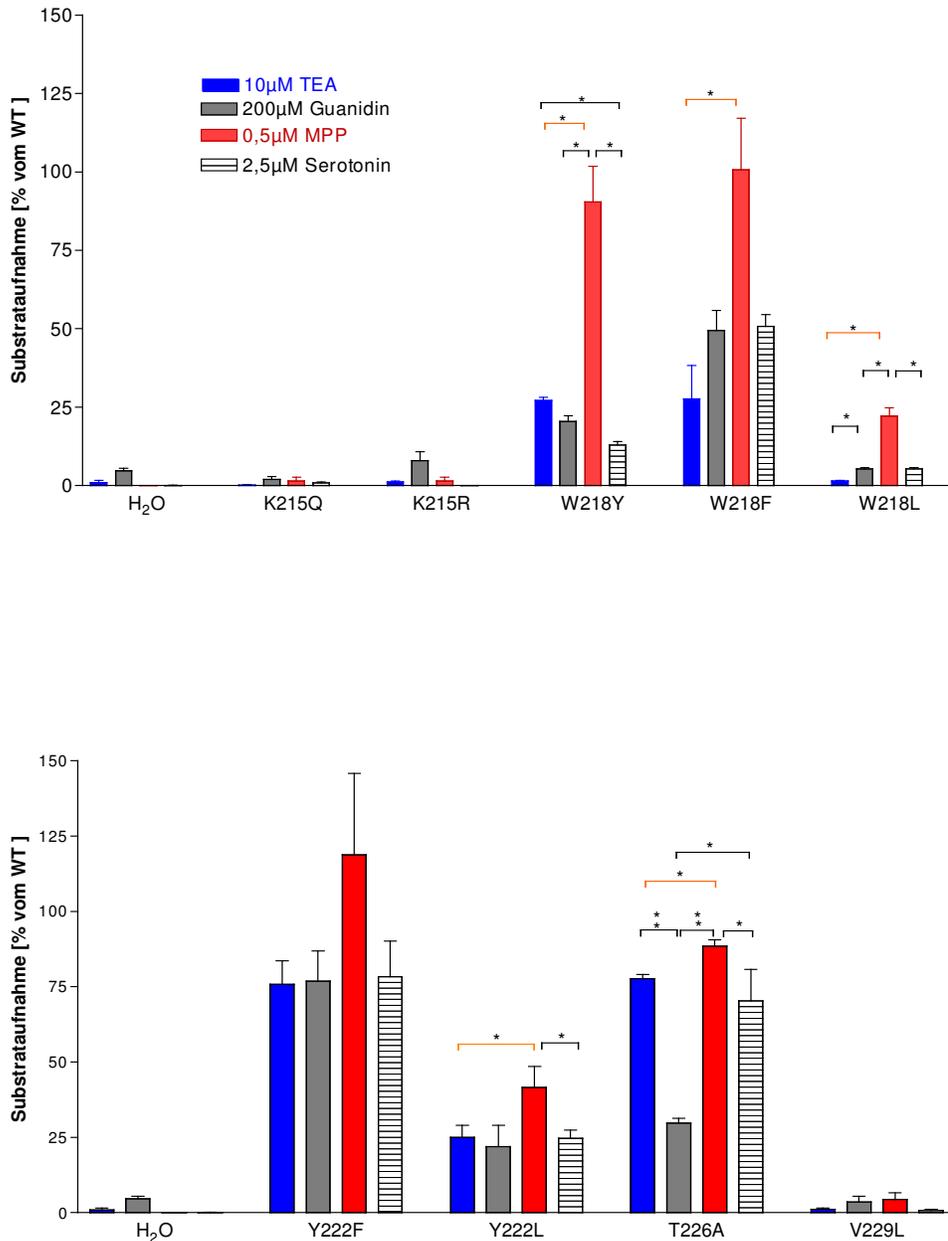


Abb. 7: Änderung der Substratspezifität durch Mutationen. Transportmessung mit verschiedenen [¹⁴C]- oder [³H]-markierten Substanzen. *X. laevis* Oozyten wurden mit Wasser oder 10 ng rOCT1-cRNA injiziert. Nach 2-3 Tagen wurde die Aufnahme der Substrate über einen Zeitraum von 30 min in die Oozyten gemessen. Es handelt sich hier um den durch 100 µM Chinin hemmbaren Anteil. Die Daten repräsentieren Mittelwerte mit Standardfehler aus 2-4 Versuchen; * = Signifikanzniveau 5 %, ** = Signifikanzniveau 1 %; rotmarkierte Signifikanzbalken: von allen Substraten am häufigsten zu einander signifikant verschieden

anderen Substraten signifikant unterschiedlich. Ausserdem zeigte sich noch eine signifikanter Unterschied in der relativen Aufnahme zwischen TEA und Serotonin.

W218L war die einzige Mutante an dieser Position, bei der eine aromatische Aminosäure gegen eine nicht aromatische Aminosäure ausgetauscht wurde. Im Bezug zum Wildtyp wurden bei dieser Mutante alle Substrate signifikant unterschiedlich aufgenommen. Hier waren die Aufnahmeraten dieser Substrate stark reduziert. Für TEA war der Transport mit einem Faktor von 58 sehr stark reduziert und zu Guanidin, MPP und Serotonin signifikant unterschiedlich. Die Guanidinaufnahme war um einen Faktor von 18.4 reduziert, es ist wiederum auffällig, dass die MPP Aufnahme von der Mutation am geringsten betroffen (nur um Faktor 4.2 verringert) und wie im Falle von *W218Y* zu allen anderen Substraten signifikant unterschiedlich war. Die Serotoninaufnahme verringerte sich um einen Faktor von 16.6 in Bezug zum Wildtyp (Abb. 7 oben).

Die MPP Aufnahme zeigt bei allen Mutanten von W218 die geringsten Änderungen. TEA die stärksten. Dieses unterschiedliche Verhalten der mutierten Transporter zu den Substraten ist ein Hinweis auf eine eine komplexere Bindungstasche im rOCT1 Protein.

3.2.1.3 *Y222*

Die Mutante *Y222F* zeigte bei keinen der Substrate signifikante Unterschiede der Aufnahmeraten (Abb. 7 unten).

Bei der Mutante *Y222L* wurde eine aromatische Aminosäure gegen eine nicht-aromatische ausgetauscht. Dies resultierte in einem insgesamt verminderten Transport bei allen Substraten. TEA wurde um einen Faktor 3.5, Guanidin um einen Faktor 5.9, MPP um einen Faktor 2.5 und Serotonin um einen Faktor 6.5 verringert. Alle Substrate wurden im Bezug zum Wildtyp signifikant weniger gut transportiert. Erneut hatte MPP die höchste relative Transportrate von allen und war zu allen andere Substraten bis auf das Guanidin signifikant unterschiedlich (Abb. 7 unten).

3.2.1.4 T226

An der Position 226 wurde ein *Threonin* durch ein *Alanin* ersetzt. Im Gegensatz zu den vorher betrachteten Mutanten wird das MPP relativ zum Wildtyp nicht deutlich verändert transportiert als das TEA und das Serotonin. Diese drei Substrate waren weder signifikant unterschiedlich zum Wildtyp noch zu einander. Relativ zum Wildtyp signifikant geringer transportiert wurde das Guanidin (Verringerung der Transportrate um das 3.3fache). Guanidin ist hier signifikant unterschiedlich zu TEA, MPP und Serotonin. Ausserdem finden sich signifikante Unterschiede im Vergleich von TEA zu MPP (Abb. 7 unten). Durch die Substitution des *Threonins* durch das *Alanin*, wurde eine Hydroxygruppe entfernt. Die fehlende Interaktion zwischen der Hydroxygruppe des *Threonins* 226 und dem Guanidin könnte der Grund für den schlechteren Transports des Guanidins bei der Mutante sein.

3.2.1.5 V229

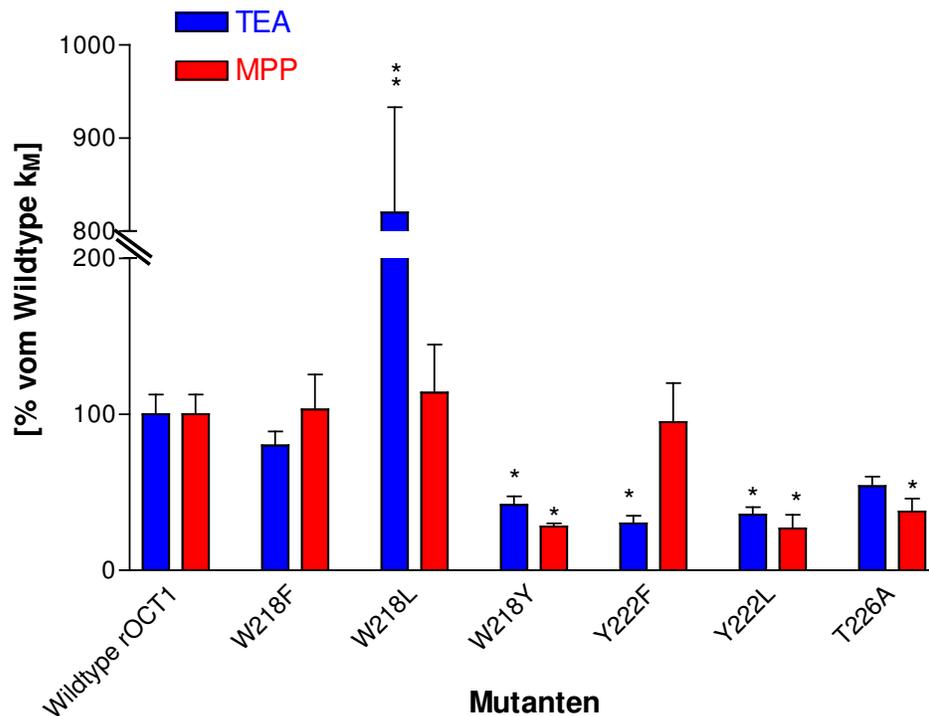
An der Position 229 wurde *Valin* gegen *Leucin* ausgetauscht, was in sehr stark verringerten Transportraten resultierte. Im Vergleich zu den wasserinjizierten Oozyten war der Transport der Mutanten von V229L nicht signifikant größer, so dass diese Mutante als nicht funktionierend eingestuft wurde. Wie bei den Mutanten der Position 215 hat auch hier nur eine kleine Veränderung der Aminosäurestruktur einen maximalen inhibierenden Effekt.

3.2.1.6 E227

Auch die Mutanten der Position 227, an der das negative *Glutamat* gegen das ebenfalls negative *Aspartat* und das neutrale *Glutamin* ausgetauscht wurde, zeigten keinen Transport, der sich signifikant von den wasserinjizierten Oozyten unterschied. Wie bei den Mutanten der Position 215 und 229 erzeugt eine minimale strukturelle Änderung an der Aminosäure dieser Position eine maximale Inhibierung des Transports aller vier rOCT1 Substrate. Dies unterstreicht die funktionelle Wichtigkeit der Aminosäuren an dieser Position. Die Frage, ob der Funktionsverlust auf einem verminderten in die Oozytenmembran oder aber auf ein nicht funktionsfähiges Protein in der Membran zurückzuführen ist, wird in Kapitel 3.2.7 erörtert.

3.2.2 Michaelis-Menten Konstanten

Im vorherigen Kapitel wurden einige Mutanten beschrieben, die eine zum Teil stark erniedrigte Transportrate aufwiesen (z.B. W218L). Eine Ursache für eine erniedrigte Transportrate bei geringen Konzentrationen kann eine verringerte maximale Transportrate sein, z.B. ausgelöst durch eine geringere Anzahl an Transportproteinen in der Membran. Eine weitere Ursache könnte eine weniger feste Bindung des Substrats zum Transporter sein, was



sich

in

einer

Abb. 8: Mutanten der 4. TMD zeigen unterschiedliche Änderungen der Substrataffinität. Mittelwerte aus 3-4 Versuchen. * = Signifikant unterschiedlich zum Wildtyp k_M (Signifikanzniveau = 5 %); ** = Signifikant unterschiedlich zum Wildtyp k_M (Signifikanzniveau = 1 %). Methodik siehe Abb. 7.

Erniedrigung der Affinität zeigt. Ein Maß für die Affinität ist die Michaelis-Menten Konstante. Um die funktionsfähigen transportierenden Mutanten auf veränderte Transporteigenschaften wie Michaelis-Menten-Konstante (k_M) und gleichzeitig für maximale Transportrate (V_{Max}) zu untersuchen, wurden diejenigen zwei Substrate ausgewählt, welche

in Kapitel 3.2.1 die häufigsten signifikanten Unterschiede in ihrem Transport zu einander aufwiesen. TEA und MPP waren bei fünf Mutanten (*W218F*, *Y*, *L*; *Y222L* und *T226A*) signifikant unterschiedlich zu einander und wurden in substratkonzentrationsabhängigen Transportexperimenten auf veränderte Aufnahmeeigenschaften untersucht. Abb. 8 zeigt die k_M -Werte in Prozentangaben relativ zum Wildtyp. In Tabelle 10 sind die im Bezug zum Wildtyp relativen und die absoluten Michaelis-Menten-Konstanten gezeigt. Wird der k_M -Wert für den Wildtyp aus den Daten der Tabelle Tabelle 10 errechnet, werden Schwankungen zwischen den einzelnen Meßreihen deutlich. Die Schwankungen sind wie schon in Kapitel 3.2.1 beschrieben vom benutzten „Oozytenbatch“ abhängig. Der Mittelwert der k_M -Werte lag bei $71 \pm 9 \mu\text{M}$ für TEA und $4.8 \pm 0.6 \mu\text{M}$ für MPP.

Mutante	TEA		MPP	
	k_M [μM]	k_M [% vom WT k_M]	k_M [μM]	k_M [% vom WT k_M]
W218F	41 ± 4.6	79.9 ± 9.0	3.2 ± 0.7	103.0 ± 10
W218L	$344 \pm 47.7^{**}$	$820.0 \pm 113^{**}$	6.6 ± 1.8	113.8 ± 31
W218Y	$30.3 \pm 4^*$	$41.9 \pm 5.5^*$	$1.9 \pm 0.2^*$	$28.0 \pm 1^*$
Y222F	$38 \pm 5.8^*$	$29.9 \pm 5^*$	3.8 ± 1.0	95.0 ± 25
Y222L	$47.3 \pm ^*$	$35.5 \pm 5^*$	$1.2 \pm 0.4^*$	$26.7 \pm 8.9^*$
T226A	67.7 ± 7.2	54.0 ± 6	$3.2 \pm 0.7^*$	$37.6 \pm 8.2^*$

Tabelle 10: relative und absolute Michaelis-Menten-Konstanten der Mutanten. $n = 3-4$; * = signifikant unterschiedlich zum Wildtyp V_{max} (Signifikanzniveau = 5 %); ** = signifikant unterschiedlich zum Wildtyp V_{max} (Signifikanzniveau = 1 %); die Einheit der Transportraten beträgt $\text{pmol} \times 30 \text{ min}^{-1} \times \text{Oozyte}^{-1}$. Methodik siehe Abb. 7

W218

Wurde an Position 218 das aromatische *Tryptophan* gegen das aromatische *Phenylalanin* ausgetauscht, so ergaben sich keine signifikanten Veränderungen der Affinitäten relativ zum Wildtyp (WT).

Bei den Versuchen in denen das *Tryptophan* an dieser Stelle gegen das nicht aromatische *Leucin* ausgetauscht wurde, zeigte die Mutante eine dramatisch verringerte Affinität um einen Faktor 8.2 zum TEA (Signifikanzniveau 1%). Es wurde jedoch keine signifikante Änderung der MPP Affinität beobachtet.

Wurde an dieser Stelle das *Tryptophan* gegen eine andere aromatische Aminosäure und zwar gegen das *Tyrosin* ausgetauscht, zeigte sich nun bei beiden Substraten eine signifikante Veränderung in der Affinität (Signifikanzniveau = 5 %). Für TEA war die Affinität um einen Faktor 2.4 und für MPP um einen Faktor 3.5 erhöht.

Die durch die Aminosäuresubstitutionen verursachten Änderungen lassen vermuten, dass für eine „normale“ TEA Affinität eine aromatische Aminosäure an Position 218 vorhanden sein muß. Die Hydroxylgruppe des Tyrosins verursacht eine Erhöhung der Affinitäten für TEA und MPP. Fehlt die Hydroxylgruppe lassen sich keine signifikanten Affinitätsänderungen in Bezug zum Wildtyp erkennen.

Y222

Die Mutante *Y222F* zeigte nur in der Affinität für TEA eine signifikante Veränderung. Die Affinität stieg um eine Faktor 3.3 blieb aber im Falle von MPP fast unverändert.

Wurde an dieser Stelle das Tyrosin gegen das nicht aromatische Leucin ausgetauscht so konnte beobachtet werden, dass für TEA die Affinität um einen Faktor 2.8 und für MPP um einen Faktor 3.8 stieg. Für eine hohe Affinität beider Substrate muß an der Position 222 keine aromatische Aminosäure vorhanden sein. Jedoch zeigen die veränderten Affinitätskonstanten deutlich an, dass die Position 222 an rOCT1 von großer funktioneller Relevanz ist.

T226

Bei der Mutante *T226A* zeigte sich sich keine signifikante Änderung in der Affinität für TEA. Im Gegensatz dazu war für MPP die Michaelis-Menten-Konstante im Vergleich zum Wildtyp um den Faktor 2.5 auf dem 5 % Niveau signifikant unterschiedlich erhöht.

3.2.3 Maximale Transportraten

Tabelle 11 zeigt die absoluten und relativen maximalen Transportraten der sechs deutlich transportierenden Mutanten. Wird der Bezug zur Affinität der jeweiligen Mutante bzw. Substrats hergestellt, kann diskutiert werden, ob die veränderten Transportraten auf einen veränderten Einbau der Transporter in die Membran, durch eine veränderte Substrataffinität oder durch veränderte Transporteigenschaften verursacht werden.

Mutante	TEA		MPP	
	V_{MAX}	V_{MAX}	V_{MAX}	V_{MAX}
	[pmolxOozyte ⁻¹ x30min ⁻¹]	[%vom WT V_{MAX}]	[pmolxOozyte ⁻¹ x30min ⁻¹]	[%vom WT V_{MAX}]
W218F	35.5 ± 3.3*	42.8 ± 4 *	15.4 ± 3	98.5 ± 17.4
W218L	8.9 ± 2.2**	9.6 ± 2.4**	6.1 ± 0.7**	17.5 ± 2**
W218Y	21.7 ± 1.4*	20.6 ± 1.3*	9 ± 0.5*	28.1 ± 1.6*
Y222F	48.7 ± 11.3*	35.6 ± 8.3*	19.7 ± 6.6*	62.1 ± 20.8*
Y222L	25.3 ± 11.7**	8.7 ± 1.6**	3 ± 0.3**	9.1 ± 0.9**
T226A	99 ± 29.2*	47.5 ± 14*	28.5 ± 8.1*	46.4 ± 1 3.2*

Tabelle 11: absolute und relative maximale Transportraten gut transportierender Mutanten; $n = 3-4$; * = signifikant unterschiedlich zum Wildtyp V_{max} (Signifikanzniveau = 5 %); ** = signifikant unterschiedlich zum Wildtyp V_{max} (Signifikanzniveau = 1 %); die Einheit der Transportraten beträgt $pmol \times 30 min^{-1} \times Oozyte^{-1}$. Methodik siehe Abb. 7

W218

Die Mutante *W218F* zeigte im Vergleich zum Wildtyp eine signifikante Erniedrigung der maximalen Transportrate beim TEA um einen Faktor von 2.3. Ein Blick auf die k_M -Werte zeigte keine Veränderung. Die maximale MPP-Aufnahme scheint genau wie die Michaelis-Menten-Konstante bei einem Austausch gegen ein Phenylalanin gänzlich unbeeinträchtigt zu sein.

Die Mutante *W218L* zeigt hingegen einen deutlich erniedrigten Transport für TEA; gegenüber dem Wildtyp nahm dieser um einen Faktor 11.2 ab. Die Affinität wurde um einen Faktor 8.2

verringert. Hier wird deutlich, daß die verringerte Transportrate mit einer verringerten Affinität einhergeht und nicht nur auf eine eventuell geringere Menge an Transportern in der Oozytenmembran zurückzuführen ist sondern auch auf eine geringere Affinität des Transporters zum Substrat. Der Transport von MPP war ebenfalls stark erniedrigt, jedoch nur um einen Faktor 5.7, der k_M -Wert war nicht signifikant betroffen.

Auch die Mutante *W218Y* zeigte eine signifikante Erniedrigung der Transportraten für beide Substrate und zwar für TEA um das 4.6fache und für MPP um das 3.5fache. Die Affinitäten wurden für beide Substrate erhöht; für TEA um einen Faktor von 2.4 und für MPP etwas stärker, um einen Faktor von 3.5.

Y222

Eine signifikante Erniedrigung der Transportraten zeigte sich bei der Mutante *Y222F* sowohl für TEA um einem Faktor von 2.8, als auch für MPP um einem Faktor von nur 1.6. Die Affinität für TEA war um einen Faktor von 3.3 erhöht, für MPP blieb sie jedoch nahezu unverändert.

Die Mutante *Y222L* zeigte für beide Substrate eine deutlich signifikante Erniedrigung der maximalen Transportrate und zwar um den Faktor 11.5 für TEA und um den Faktor 11 für MPP. Die Affinitäten waren um einen Faktor 2.8 (TEA) und 3.8 (MPP) verringert.

T226A

Die letzte Mutante, *T226A*, zeigte für TEA eine 2.1fache und für MPP eine 2.4fache Erniedrigung der V_{Max} Werte. Die k_M -Werte sanken um das 1.9fache für TEA und signifikant um das 2.5fache für MPP.

Es fiel auch hier auf, dass bei den Austausch an den aromatischen Aminosäuren die V_{Max} -Werte in geringerem Maße bei MPP verändert waren als es für TEA der Fall war. Das gleiche konnte auch schon bei den Affinitäten beobachtet werden. Diese Daten sprechen für eine Beteiligung der aromatischen Aminosäuren an der Bindung und am Transport von TEA. Diese Beteiligung scheint für den TEA Transport stärker als für den MPP-Transport zu sein.

3.2.4 IC₅₀-Werte

Die K_M -Werte für TEA und MPP waren unterschiedlich betroffen, wenn *W218* durch *Tyrosin* oder *Leucin* ersetzt wurde. Um herauszufinden, ob MPP bei den verschiedenen Mutanten durch TEA verdrängt werden kann, untersuchten wir, ob der durch die Inhibition der MPP Aufnahme mit TEA erhaltene IC₅₀ mit dem TEA K_M -Wert übereinstimmt.

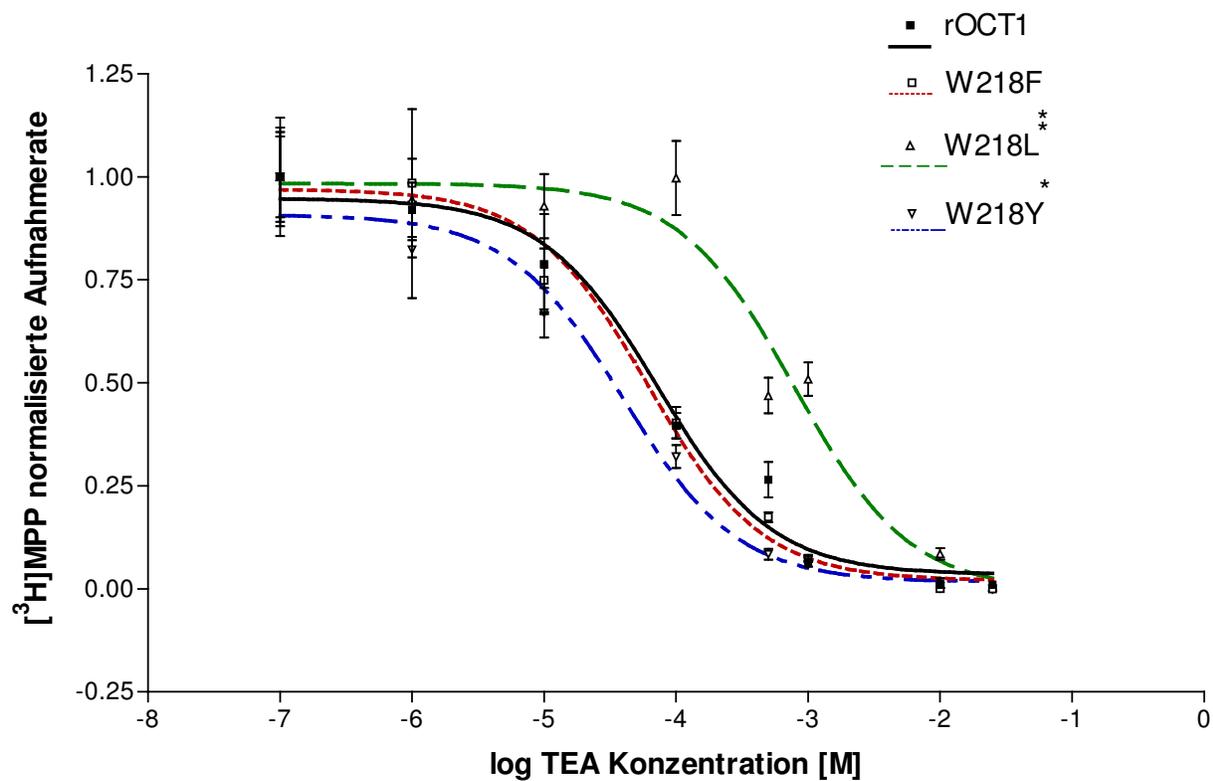


Abb. 9: *TEA Hemmung der Aufnahme von 0.5 μ M [³H]MPP.* Die Aufnahme von 0.5 μ M [³H]MPP wurde durch unterschiedliche Konzentrationen von TEA inhibiert. Die Oozyten wurden nach Injektion der entsprechenden cRNA 2-3 Tage inkubiert und im Anschluss 30 min in 0.5 μ M [³H]MPP in Ab- oder Anwesenheit verschiedener TEA-Konzentrationen inkubiert. Die Anpassung der Kurven wurde nach Hill vorgenommen ($n = 3$). * bzw. ** = signifikant unterschiedlich zum Wildtyp (5% bzw. 1% Signifikanzniveau)

Da die gewählte MPP Konzentration 10fach unterhalb dessen k_M -Wert liegt entspricht der IC_{50} -Wert dem k_i -Wert unabhängig davon, ob die Form der Kompetition kompetitiv oder nicht-kompetitiv sein sollte.

In Übereinstimmung mit den vorherigen Experimenten zeigt der IC_{50} -Wert der Mutante *W218F* mit $93 \pm 29 \mu M$ keine signifikante Änderung zum Wildtyp, der einen IC_{50} -Wert von $122 \pm 26 \mu M$ hatte. Die Mutante *W218L* zeigte mit $854 \pm 74 \mu M$ bei einem Signifikanzniveau von 1 % eine 7fache Verringerung der Affinität bei einer Substratkonzentration von $0.5 \mu M$ für MPP. Hingegen zeigte die Mutante *W218Y* wie erwartet eine Erhöhung der Affinität für TEA gegenüber dem Wildtyp. Der IC_{50} war hier auf $38 \pm 5 \mu M$ um einen Faktor 3.2 signifikant (Signifikanzniveau 5%) erniedrigt.

Die Daten weisen darauf hin, dass *W218* Teil einer gemeinsamen Substratbindedomäne für TEA und MPP ist.

Weiterhin wurde zunächst stichprobenartig nach Veränderungen der IC_{50} -Werte verschiedener Inhibitoren bei den deutlich transportierenden Mutanten gesucht (Tabelle 12). Dabei wurde bei der Mutante *Y222F* im ersten Versuch eine deutliche Affinitätserhöhung für die Inhibierung des TEA Transports durch TPcA beobachtet, dem durch weitere Versuche nachgegangen wurde. Um sie mit der Mutante *Y222L* vergleichbar zu machen wurde diese ebenfalls häufiger gemessen. So ergaben sich bei einem Versuchsumfang von $n = 3$ gegenüber dem Wildtyp für die Mutante *Y222F* eine signifikante Erhöhung der Affinität um einen Faktor von 20 für die Inhibierung des TEA Transports durch TPcA (Abb. 10). Der Austausch des *Tyrosins* an der Position 222 gegen das nicht aromatische *Leucin* ließ die Affinität um einen Faktor 2.2 bezüglich des Wildtyps sinken. Bei beiden Mutanten ließ die Hemmung durch Cyanin863 nach einem Versuch nicht auf eine Verschiebung oder eine deutliche Veränderung der IC_{50} -Werte schließen, da entweder wie im Falle von *Y222F* keine deutliche Änderung zu erkennen war oder wie im Falle von *Y222L* der Fehler 92 % des gemessenen Medians ausmachte. Im Falle von *T226A* wies der Vorversuch auf eine signifikante Änderung des IC_{50} -Werts hin. Die Affinität stieg für den TPcA inhibierten TEA Transport, war jedoch nicht signifikant unterschiedlich zum Wildtyp.

Die Mutanten des *Tryptophans* an der Position 218 zeigten nach den Vorversuchen keine nennenswerten Verschiebungen der Inhibitor-Affinitäten. Im Falle der Mutante *W218L* konnten auf Grund der geringen Transportraten keine auswertbaren Daten erhalten werden. Im Falle der Mutante *W218Y* wurden noch die Inhibitoren Corticosteron und Guanidin überprüft,

jedoch zeigten die ersten Versuche keinen Hinweis auf eine deutliche Verschiebung der Hemmungseigenschaften.

Substrat TEA						
Inhibitor	Wildtyp IC ₅₀		Mutanten IC ₅₀			
	TPeA	Cyanin	TPeA		Cyanin	
Messung mit Mutante	-	-	IC ₅₀	% WT	IC ₅₀	% WT
W218F	1.4 ± 0.3	3.7 ± 0.8	0.6 ± 0.3	42.9 ± 21.4	3.5 ± 0.7	94.5 ± 18.9
W218L	1.4 ± 0.3	3.7 ± 0.8	-	-	-	-
W218Y	1.4 ± 0.3	3.7 ± 0.8	0.9 ± 0.1	64.2 ± 7	3.3 ± 0.5	89.2 ± 13.5
Y222F	1 ± 0.2 ^a	0.16 ± 0.03	0.05* ± 0.02 ^a	5 ^a ± 2*	0.13 ± 0.02	81.3 ± 12.5
Y222L	1 ± 0.2 ^a	0.16 ± 0.03	2.2 ± 0.6 ^a	220 ^a ± 60	0.63 ± 0.58	393.7 ± 362.5
T226A	1 ± 0.2 ^a	0.16 ± 0.03	0.4 ± 0.03	40 ^a ± 3	0.71 ± 0.13	443 ± 81
Substrat TEA						
Inhibitor	Corticosteron	Guanidin	Corticosteron		Guanidin	
Messung mit Mutante	-	-	IC ₅₀	% WT	IC ₅₀	% WT
W218Y	107 ± 17.4	1821 ± 376	290 ± 202	271 ± 189	3787 ± 331	208 ± 18.1

Tabelle 12: IC₅₀ verschiedener Inhibitoren der [¹⁴C]TEA Aufnahme. Unterschiedliche Inhibitoren hemmten in mehreren Konzentrationen die [¹⁴C]TEA Aufnahme über einen Zeitraum von 30 min. IC₅₀-Werte (in µM) wurden nach Hill berechnet. * = signifikant unterschiedlich zum Wildtyp, Signifikanzniveau 5 %; a: n = 3, sonst n = 1

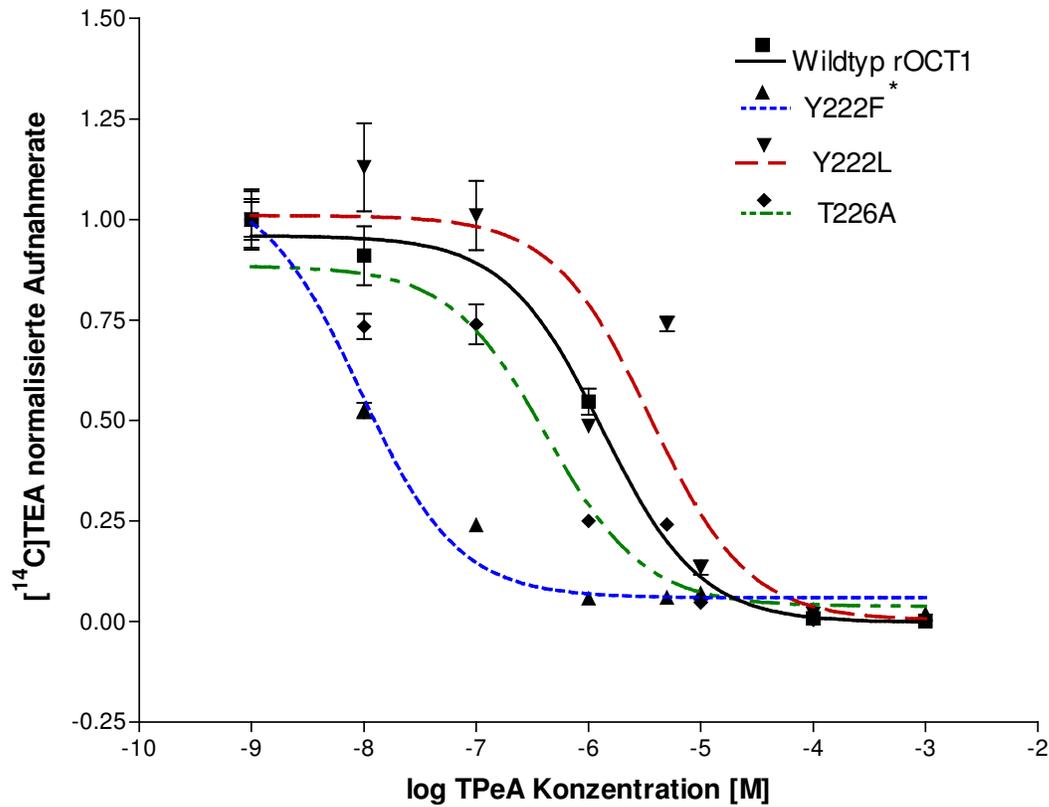


Abb. 10: TPeA Hemmung der Aufnahme von $10 \mu\text{M}$ $[^{14}\text{C}]\text{TEA}$. Die Aufnahme von $10 \mu\text{M}$ $[^{14}\text{C}]\text{TEA}$ wurde durch unterschiedliche Konzentrationen von TPeA inhibiert. Die Oozyten wurden nach Injektion der entsprechenden cRNA 2-3 Tage inkubiert und im Anschluss 30 min in $0.5 \mu\text{M}$ $[^3\text{H}]\text{MPP}$ in Ab- oder Anwesenheit verschiedener TEA-Konzentrationen inkubiert. Die Anpassung der Kurven wurde nach Hill vorgenommen ($n = 3$). * = signifikant unterschiedlich zum Wildtyp (5 % Signifikanzniveau).

3.2.5 MMTS – Steigerung der induzierten Ströme von rOCT1

Die Mutante *Y222F* zeigte mit einer Erhöhung der Affinität um einen Faktor von 3.3 die größte Affinitätssteigerung für TEA von allen Mutanten (siehe Kapitel 3.2.2). In Kapitel 3.2.4 zeigte sie zusätzlich eine 20fache Erniedrigung des IC_{50} -Werts für die Inhibierung der TEA-

Aufnahme durch TPeA. Veröffentlichungen aus unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die nach innen oder außen gerichtete Substratbindetasche von rOCT2 verschiedene Affinitäten für die nicht transportierten Inhibitoren Tetrabutylammonium (TBUA), Corticosteron und Chinin besitzt (Volk et al, 2003; Arndt et al, 2001) (siehe Kapitel 3.3). Hydrophobe Inhibitoren wie Corticosteron, Chinin und Cyanin863 können bei entsprechend langer Inkubationszeit passiv die Lipidmembran durchdringen und organische Kationen Transporter von der Innenseite her hemmen (Volk et al, 2003; Arndt et al, 2001). TPeA löst sich im Gegensatz zu den anderen Inhibitoren auch in höheren Konzentrationen (100mM) gut in wässrigen Lösungen, könnte aber auf Grund seiner hydrophoben Seitenketten evtl. auch passiv die Lipidmembran durchdringen. Haben diese Inhibitoren von innen eine höhere Affinität als von außen, wie z.B. Chinin für rOCT2, so entspricht der nach langer Inkubationszeit ermittelte IC_{50} -Wert der Affinität der nach intrazellulär gerichteten Konformation der Substratbindetasche (Arndt et al, 2001).

Auf Grund seiner relativ hydrophoben Struktur besteht die Möglichkeit, dass TPeA ebenfalls durch die Membran diffundiert. Daher wollten wir herausfinden, ob die zuvor gemessene hohe TPeA Affinität für die Mutante *Y222F* die Affinität des Transporters zu TPeA in seiner nach innen oder nach außen gerichteten Konformation widerspiegelt. Zu diesem Zweck sollte die Methode der „Zwei-Elektroden-Spannungsklemme“ genutzt werden. Hierzu mußten jedoch die Ströme der Transporter zunächst stimuliert werden (s.u.)

Die TEA induzierten Ströme bei rOCT1 sind nahe an der Grenze des Auflösungsvermögen des benutzten Verstärkers. Je nach „Oozytenbatch“ und dessen Expressionsstärke ist dieser Transporter bei dem einen Versuch messbar, bei einem anderen Versuch nicht. Nun gestaltete es sich um so schwieriger solche Experimente mit einer Mutante durchzuführen, die nur 36 % des maximalen Wildtyp-Transports besitzt (siehe Tabelle 11). Es wurde daher das Transport und Strom stimulierende Methyl-Methan-Thiosulfat (MMTS) eingesetzt und dessen Wirkung sowohl für Cholin, als auch für TEA überprüft. Abb. **II** zeigt die Stimulierung der TEA und Cholin induzierten Ströme durch 40 sekundenlange Superfusion mit 1 mM MMTS.

Die Ströme für TEA und Cholin waren gut stimulierbar. Der durch 1 mM Cholin induzierte Strom steigerte sich beim Wildtyp um einen Faktor 3.8 von 13.7 ± 2.4 auf 51.3 ± 6.7 nA und bei 5 mM Cholin um einen Faktor 6.3 von 8 ± 2.1 auf 50.5 ± 16.9 nA um einen Faktor 6.3. Die Ströme für die Mutante wurden im Vergleich zum Wildtyp von MMTS in geringerem

Maße stimuliert, nämlich bei der niedrigeren Konzentration nur um einen Faktor 2.6 von 6.0 ± 0.7 auf 15.5 ± 1.3 nA. Bei der höheren Konzentration kam es zu einer Steigerung um einen Faktor 2.1 und zwar von 8.2 ± 1.8 auf 16.8 ± 2.1 nA.

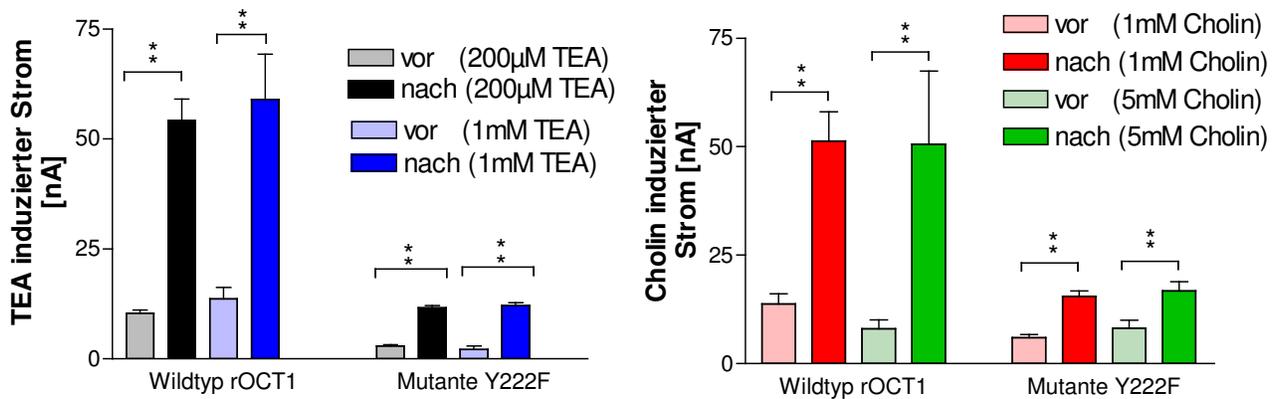


Abb. 11 **Substratinduzierte Ströme vor und nach Stimulierung mit MMTS.** *X. laevis* Oozyten wurden mit 10 ng rOCT1 cRNA injiziert. Nach 3 Tagen wurden diese auf -50 mV geklemmt und die Ströme vor und nach 40 sek. Stimulierung mit 1 mM MMTS gemessen. Die Daten zeigen die Mittelwerte und Standardfehler der substratinduzierten Ströme von 5-8 Versuchen. ** signifikant unterschiedlich zu einander bei einem Signifikanzniveau von 1 %

Für den Wildtyp konnte eine Stimulierung bei 200 μ M TEA von 10.4 ± 0.7 um einen Faktor 5.2 auf 54.2 ± 4.9 nA gemessen werden. Bei Superfusion von 1 mM TEA steigerte sich der Strom um einen Faktor von 4.3 von 13.6 ± 7.2 auf 59 ± 10.3 nA. Die Ströme für Y222F erhöhten sich in einem ähnlichen Maße, nämlich bei der niedrigeren Konzentration um einen Faktor 4 von 2.9 ± 0.4 auf 11.6 ± 0.5 nA und bei der höheren Konzentration um einen Faktor 5.8 von 2.1 ± 0.8 auf 12.1 ± 0.7 nA.

Es musste hier beachtet werden, dass MMTS Einfluss auf die Substratbindungseigenschaften nehmen könnte, daher wurden konzentrationsabhängige Ströme für TEA und Cholin für die Mutante Y222F gemessen und die k_M -Werte berechnet (siehe Tabelle 13). Die dazugehörigen MMTS stimulierten Wildtyp Referenz-Werte wurden von Herrn A. Sturm, Institut für Anatomie und Zellbiologie I, Würzburg, ermittelt und mir mitgeteilt.

Die Experimente bestätigten, dass die Mutante *Y222F* eine erhöhte Affinität zum TEA zeigte (vergleiche Kapitel 3.2.2), jedoch nur um einen Faktor 2. Für Cholin erhöhte sich die Affinität um einen Faktor von 3.5.

	Wildtyp	Y222F
Cholin	$1573 \pm 379 \mu\text{M}$	$452 \pm 34 \mu\text{M}$
TEA	$55 \pm 12 \mu\text{M}$	$28 \pm 4 \mu\text{M}$

Tabelle 13: k_M -Werte nach MMTS Stimulierung. Methodik siehe Abb. 12

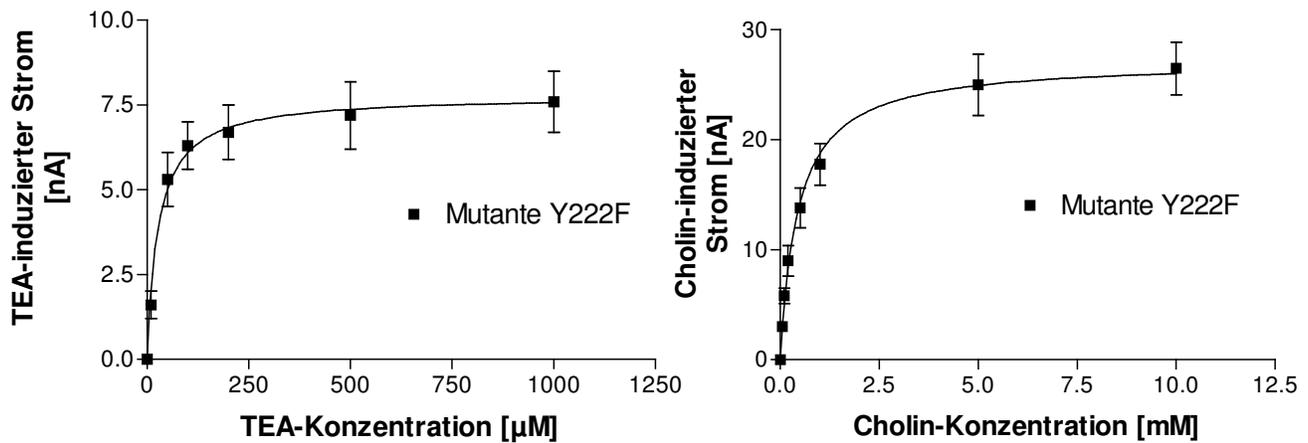


Abb. 12: *Michaelis-Menten-Kinetik verschiedener Substrate nach Stimulierung mit MMTS.* *X. laevis* Oozyten wurden auf -50 mV gelemmt und die substratkonzentrationsabhängigen Ströme nach 40 sek. Stimulierung mit 1 mM MMTS gemessen. Die Daten zeigen die Mittelwerte und Standardfehler der substratinduzierten Ströme von 4-6 Versuchen.

3.2.6 TPeA Inhibierung der substratinduzierten Ströme bei *Y222F*

Um die TPeA gehemmten TEA- bzw. cholininduzierten Ströme zu messen, wurden die Oozyten auf -50 mV geklemmt und mit 0.2 oder 1 mM TEA bzw. mit 1 oder 5 mM Cholin,

entweder mit der entsprechenden Inhibitorkonzentration oder auch ohne Inhibitor superfundiert. Der Inhibitor wurde entweder gleichzeitig mit dem Substrat superfundiert (Kurzzeitinkubation) oder das Substrat wurde nach 6 minütiger Inkubation (Langzeitinkubation) hinzugegeben. Durch die Verlängerung der Inkubationszeit des Inhibitors könnte es sein, dass dieser durch die Membran in die Oozyte gelangt und den Transporter von der intrazellulären Seite hemmt.

3.2.6.1 Kurzzeitinkubation von TPeA

Während der Superfusion mit Substrat und Inhibitor zeigte sich innerhalb von 10 sek. ein Strommaximum, anschließend nahm der Strom sehr schnell ab. Für diese Kurzzeitinkubation wurde jeweils der *maximale* Strom zu Berechnung der IC_{50} -Werte gewählt, der während der Superfusion der entsprechenden Substrat- und Inhibitorkonzentration beobachtet wurde. Die Kurve zur Ermittlung des IC_{50} -Werts wurde nach Hill angepasst. Hierbei kann es dazu kommen, wie in Abb. 13 zu beobachten ist, dass die Kurve nicht durch den Punkt $y = 1$ geht. Würde die Kurve durch den Punkt $y = 1$ gezwungen werden, hätte dies zur Folge, dass dadurch dieser Messpunkt stärker gewichtet würde, als die auf der Abszisse folgenden Daten. Es käme somit zu einer Verzerrung der gesamten Kurve und der ermittelten IC_{50} -Werte.

Abb. 13 zeigt, dass bei einer Substratkonzentration von 200 μM für TEA kein signifikanter Unterschied mehr in der Affinität des TPeA zum stimulierten Protein vorhanden war. Der IC_{50} für den Wildtyp lag bei $0.68 \pm 0.45 \mu\text{M}$, während er für die Mutante bei $0.55 \pm 0.37 \mu\text{M}$ lag. Die IC_{50} -Werte, welche bei einer TEA-Konzentration von 1 mM gemessen wurden, unterschieden sich signifikant von einander (Signifikanzniveau: 5 %). Sie lagen für den Wildtyp bei $1.7 \pm 0.8 \mu\text{M}$ und für die Mutante *Y222F* bei $0.53 \pm 0.33 \mu\text{M}$. Auch wenn der Unterschied nun signifikant war, war er bei weitem nicht so hoch, wie es aus den Inhibitionsstudien mit den „Tracern“ in Kapitel 3.2.4 beobachtet worden war. Daher wurde dieser Versuch zunächst mit einem weiteren Substrat, Cholin, wiederholt. Mit einem IC_{50} von $0.15 \pm 0.05 \mu\text{M}$ bei einer Cholinkonzentration von 1 mM ist die Affinität für den Wildtyp zu TPeA sogar höher als für die Mutante mit $0.2 \pm 0.04 \mu\text{M}$. Bei einer Cholinkonzentration von 5mM zeigte sich, dass der IC_{50} -Wert für den Wildtypen nach $0.31 \pm 0.09 \mu\text{M}$ verschoben wurde, während der IC_{50} -Wert für die Mutante mit $0.19 \pm 0.11 \mu\text{M}$ fast konstant blieb. Bei Berechnung des K_i unter Annahme einer kompetitiven Hemmung zeigte sich beim Wildtyp sowohl für TEA als auch für Cholin eine Konkurrenz zwischen Substrat und Inhibitor, der K_i lag für 200 μM TEA bei 0.174 ± 0.097 und bei 1 mM bei $0.089 \pm 0.042 \mu\text{M}$. Cholin hatte

K_i 's von $0.092 \pm 0.031 \mu\text{M}$ bei einer Konzentration von 1 mM und von $0.074 \pm 0.022 \mu\text{M}$ bei einer Konzentration von 5 mM. Diese Daten waren nicht signifikant unterschiedlich zu einander und wiesen somit auf eine Konkurrenz zwischen Substrat und Inhibitor hin.

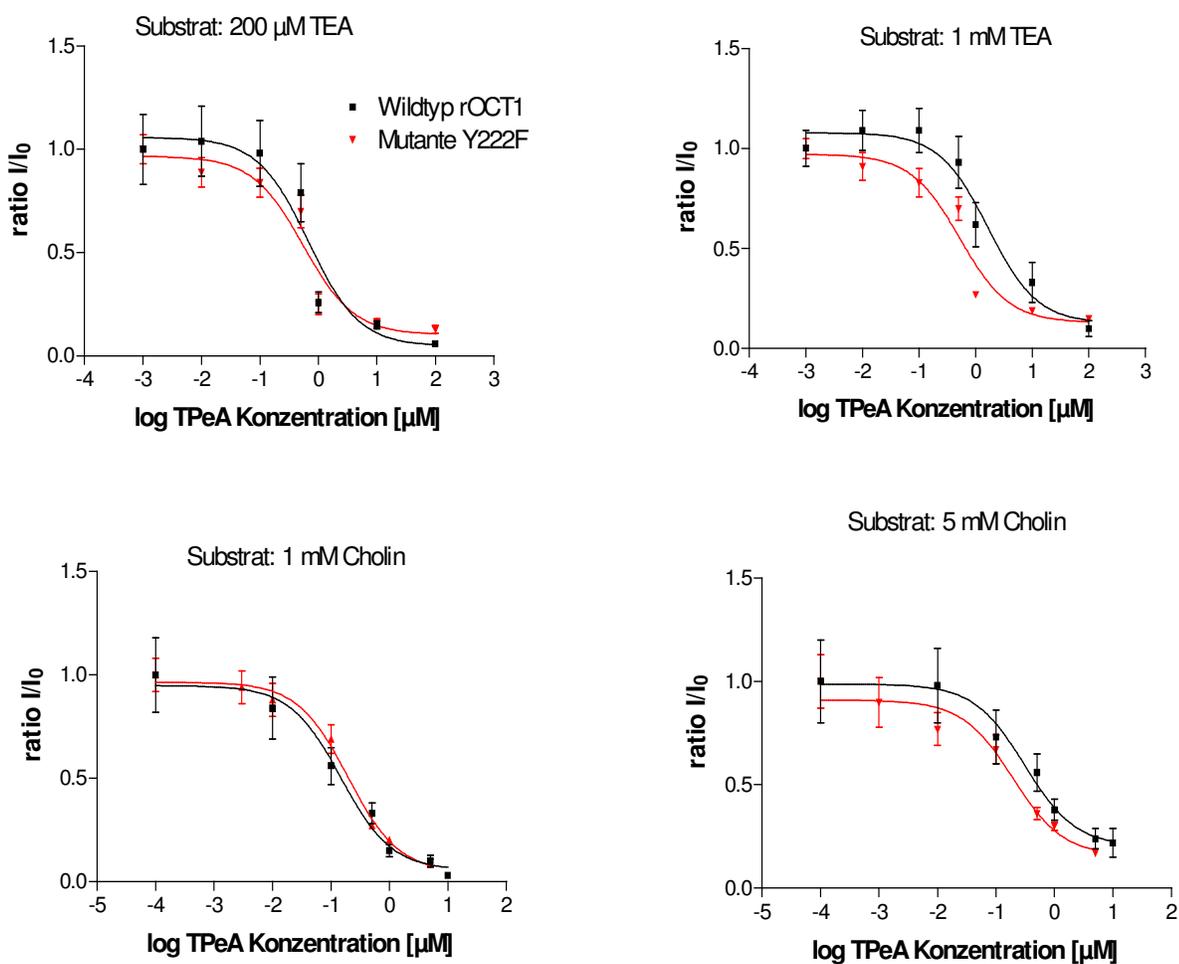


Abb. 13 Kurzzeitinkubation von TPeA bei verschiedenen Substratkonzentrationen. *X. laevis* Oozyten wurden auf -50 mV geklemmt. Die substratinduzierten Ströme (TEA oder Cholin) wurden ungehemmt oder in Gegenwart unterschiedlicher Inhibitor (TPeA) Konzentrationen nach 10 sek. Stimulierung mit 1 mM MMTS gemessen. Messwerterfassung 30 sek nach Start der Superfusion von Substrat und Inhibitor. Die Daten zeigen die Mittelwerte und Standardfehler der substratinduzierten Ströme von 4-6 Versuchen. Die Anpassung der Kurven wurde nach Hill vorgenommen.

Bei Annahme einer kompetitiven Hemmung ergaben sich für die Mutante *Y222F* signifikant unterschiedliche K_i -Werte (Signifikanzniveau 5%). Dies bedeutet, dass die Verdrängung von TPeA durch Cholin oder TEA beim Wildtyp, aber nicht bei der Mutante erfolgt. Es änderte sich hier die Form der Competition von kompetitiv beim Wildtyp zu nicht-kompetitiv bei der Mutante. Dies ist ein starker Hinweis dafür, dass sich *Y222* in der Substratbindetasche befindet.

Es zeigte sich bei diesen „Kurzzeitinkubationen“, dass die Affinität des TPeA zur Mutante nicht annähernd so hoch war, wie es in den „Tracermessungen“ aus Kapitel 3.2.4 ermittelt wurde. Ein Unterschied zu den „Tracerflux“-Messungen war natürlich, dass dort das MMTS nicht benutzt wurde. Ein weitere Grund könnte die Inkubationsdauer des TPeA sein. Es könnte somit sein, dass eine kurze Inkubation des TPeA die Affinität des nach aussen gerichteten Transporters widerspiegelt. Durch längere Inkubationszeiten sollte nun dem TPeA die Zeit gegeben werden, die Membran zu durchdringen und rOCT1 von innen zu hemmen.

3.2.6.2 Langzeitinkubation von TPeA

Wurde die Aufnahme von radioaktiv-markierten Substanzen im „Tracerflux“ über einen Zeitraum von 30 min gemessen, so dauerte die Messung zu Erlangung eines einzelnen Punktes in der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme 10 sek. Um den Einfluss der Inkubationszeit auf die TPeA Hemmung zu überprüfen, wurde das TPeA 6 Minuten vorinkubiert und dann erst das Substrat hinzugegeben. Abb. 14 zeigt die Ergebnisse dieser Versuche, die nur mit TEA durchgeführt wurden. Unter diesen Bedingungen wurden schon bei einer Substratkonzentration von 200 μM TEA unterschiedliche IC_{50} Werte für den Wildtyp im Vergleich zur Mutante gemessen. Dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant. Deutlicher und statistisch signifikant wurde dieser Unterschied zwischen den IC_{50} Werten bei einer TEA-Konzentration von 1 mM. Hier betrug der IC_{50} für den Wildtyp $0.55 \pm 0.014 \mu\text{M}$ und für die Mutante *Y222F* $0.058 \pm 0.018 \mu\text{M}$ (5% Signifikanzniveau) und ist somit um einen Faktor 9.5 affiner zum TPeA als der Wildtyp. Eine Berechnung der K_i Werte unter der Annahme einer kompetitiven Hemmung zeigt wieder eine kompetitive Inhibition für den Wildtyp ($K_i = 0.032 \pm 0.009 \mu\text{M}$ bei 200 μM ; $K_i = 0.029 \pm 0.007 \mu\text{M}$ bei 1 mM TEA). Bei der Mutante *Y222F* konnte eine kompetitive Hemmung erneut nicht bestätigt werden.

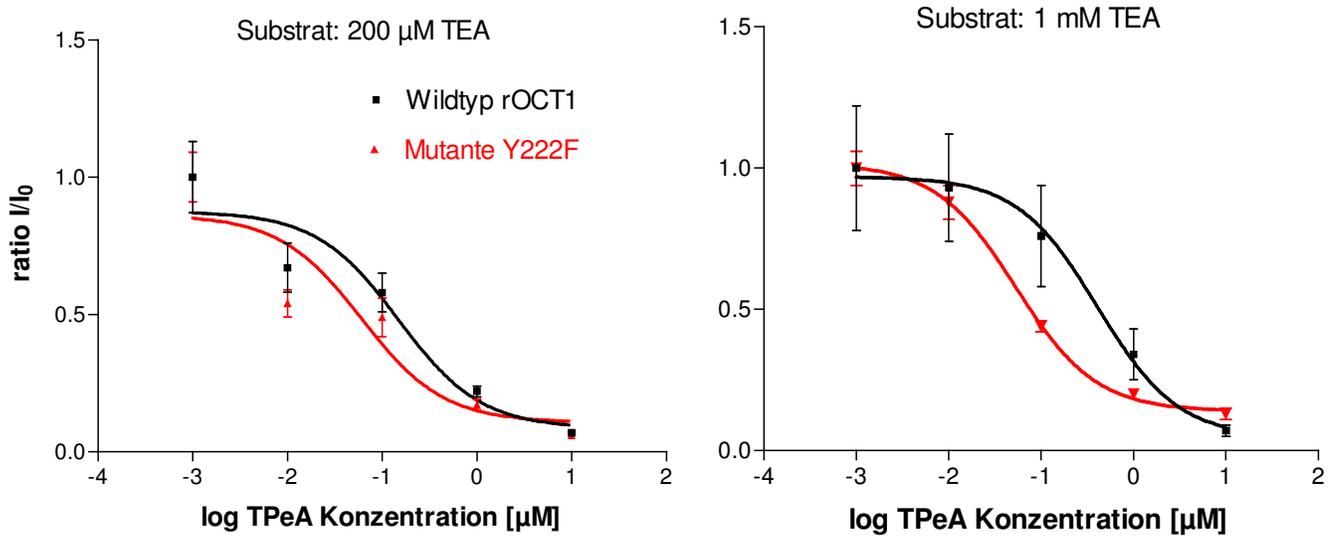


Abb. 14 Langzeitinkubation von TPeA bei verschiedenen TEA Konzentrationen. *X. laevis* Oozyten wurden auf -50 mV geklemmt. Die TEA-induzierten Ströme wurden ungehemmt oder in Gegenwart unterschiedlicher Inhibitor (TPeA) Konzentrationen nach 40 sek. Stimulierung mit 1 mM MMTS gemessen. Messwerterfassung 6 min nach Start der Superfusion mit TPeA. Die Daten zeigen die Mittelwerte und Standardfehler der substratinduzierten Ströme von 4-6 Versuchen. Die Anpassung der Kurven wurde nach Hill vorgenommen.

3.2.7 Anwesenheit nicht transportierender Mutanten in Membranvesikeln

In Kapitel 3.2.1 wurde gezeigt, dass die Mutanten *K215Q*, *R*, *E227D*, *Q* und *V229L* einen stark reduzierten oder keinen Transport mehr aufwiesen (siehe dazu auch Kapitel 7.1). Dieses Ergebnis könnte auf Störungen der Translation, der posttranslationalen Modifikation oder des Einbaus der mit rOCT1 beladenen Vesikel in die Plasmamembran beruhen. Um die Frage zu klären, ob eine Translation stattfindet, wurden durch differenzielle Zentrifugation (Geering et al., 1989) Membranvesikel, die sowohl aus Zytoplasmamembran, also auch aus intrazellulären Membranen entstanden sein können, von *Xenopus laevis* Oozyten isoliert und diese auf die Anwesenheit von rOCT1 Wildtyp bzw. dessen Mutanten überprüft. Abb. 15 zeigt durch Westernblot und Antikörperanalyse erhaltenen Resultate auf einem Röntgenfilm. Es war ein

deutliches Signal für den rOCT1 Wildtypen zu erkennen. Wasser injizierte Oozyten zeigten keine Reaktion mit dem anti-rOCT1 Antikörper AK 48. Das rOCT2 Signal teilte sich in zwei Banden auf, wovon eine in Höhe von 69 kD und die andere ca. bei 52 kD lief. Die 69 kD Bande könnte die glykosylierte Isoform des rOCT1 Protein darstellen, welches auf Grund der Zuckerseitenketten im SDS-Gel langsamer läuft.

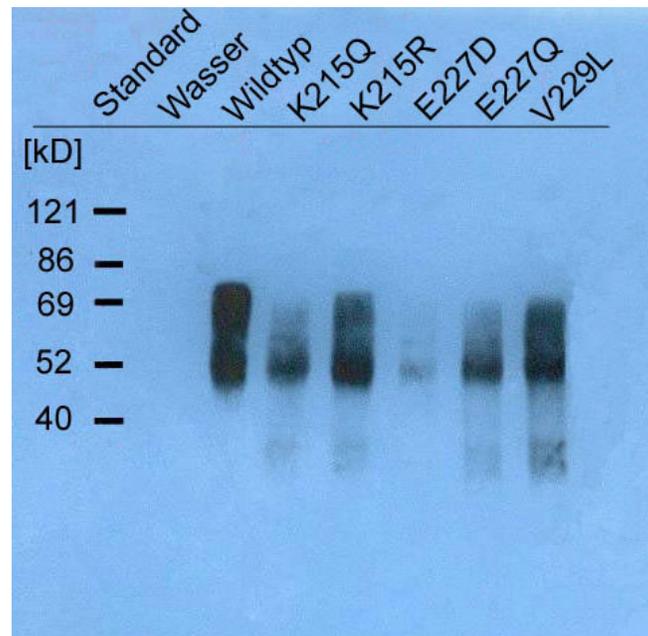


Abb. 15: Immunoblot von rOCT1 und nicht transportierender Mutanten. Je 50 Oozyten wurden homogenisiert und mit Plasmamembranen angereicherte Membranvesikel wurden durch differentielle Zentrifugation isoliert. 10 µg der so erhaltenen Proteine wurden je Geltasche auf eine SDS-PAGE aufgetragen, nach ihrem Molekulargewicht getrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und immunologisch nachgewiesen.

Bei der Mutante *K215Q* war die obere Bande deutlich schwächer. Die Mutante *K215R* zeigte zwei deutliche Signale, die aber nicht die gleiche Intensität besaßen, wie es beim Wildtyp der Fall war. Abb. 15 zeigt, dass die Mutante *E227D* nur ganz schlecht in die Membranvesikel eingebaut wurde. Das 69 kD Signal schien gänzlich verschwunden zu sein. Auch bei der Mutanten *E227Q* erschien das 69 kD schwächer als das 52 kD Signal. Die Mutante *V229L* zeigt zwei Banden, welche die Intensität des Wildtyps besaßen.

Ob die Mutanten *K215Q*, *K215R*, *E227D* und *V222L* keinen Transport zeigen, weil sie zwar in Vesikeln unterhalb der Plasmamembran angereichert sind aber nicht in die Plasmamembran

eingebaut werden, kann mit Hilfe dieser Methode nicht unterschieden werden. Jedoch können Rückschlüsse auf die Translation dieser Mutanten gezogen werden. Es ist somit deutlich, dass die Mutanten *K215R* und *V222L* ähnlich effektiv translatiert wurden, wie der Wildtyp. Die Mutanten *K215Q* und *E227Q* offensichtlich weniger gut translatiert als der Wildtyp. Da die Mutante *E227D* in unserer Präparation aus Plasmamembran und submembranären Vesikeln kaum nachweisbar ist, liegt bei dieser Mutante entweder eine Störung der Translation oder des Vesikeltransports vom endoplasmatischen Retikulum und Golgi Apparat zur Plasmamembran vor.

3.3 Interaktion von rOCT2 mit Chinin

In diesem Teil meiner Arbeit untersuchte ich die Frage, wie die schwache Base Chinin mit organischen Kationentransportern interagiert. In früheren Experimenten ist gezeigt worden, dass Chinin die Aufnahme verschiedener radioaktiver Substrate, aber auch Substrat induzierte Ströme nicht-kompetitiv hemmt (Busch et al., 1996b; Goralski et al., 2002; Gorboulev et al., 1999; Gründemann et al., 1994; Nagel et al., 2001). Ich versuchte deshalb herauszufinden, ob Chinin mit einer allosterischen Bindungsstelle interagiert oder ob die Hemmung das Resultat einer intrazellulären Interaktion von Chinin mit rOCT2 ist. Die zweite Möglichkeit wurde in Betracht gezogen, da Chinin eine schwache Base mit einem pK-Wert von 8.4 ist. Das heißt, dass es bei verschiedenen pH-Werten einen unterschiedlichen Protonierungsgrad aufweist und in seiner ungeladenen Form wahrscheinlich durch die Membran diffundieren kann. Bei pH 8.4 liegen 50 %, bei pH 7.4 10 % und bei pH 6.0 1 % der Chinin Moleküle in der ungeladenen Form vor.

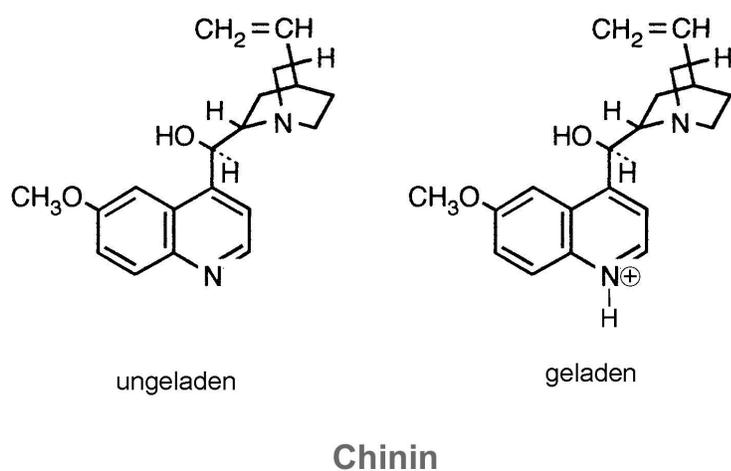


Abb. 16: Chinin in ungeladener und geladener Form

3.3.1 Aufnahme von Chinin in die Oozyte bei unterschiedlichem pH

Um abschätzen zu können, ob durch die Oozytenmembran diffundiertes Chinin intrazellulär mit rOCT2 interagiert, sollte zunächst herausgefunden werden, ob Chinin je nach Protonierungsgrad tatsächlich besser bzw. schlechter durch die Oozytenmembran diffundiert. Daher wurde zunächst die zeitabhängige Aufnahme von Chinin bei unterschiedlichen pH Werten gemessen und mit der Aufnahme von wasserinjizierten Oozyten verglichen (Abb. 17). Zwei Schlussfolgerungen ließen sich aus diesem Experiment ziehen: a) Bei einer extrazellulären Chinin Konzentration von $0.1 \mu\text{M}$ gab es keine signifikanten Unterschiede in

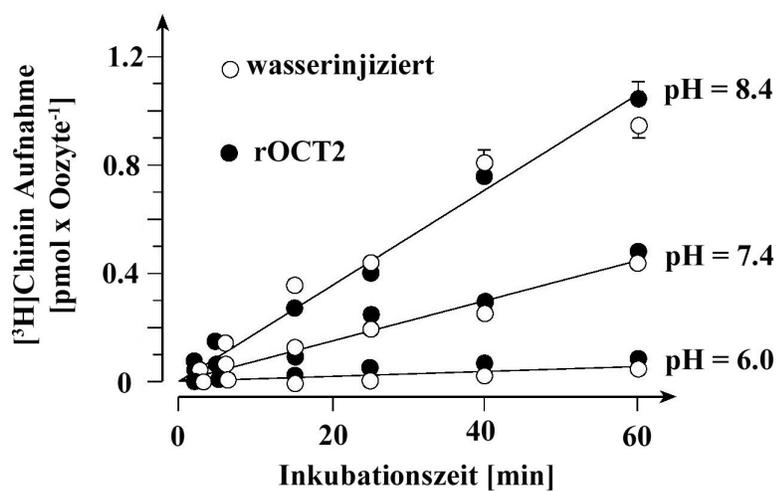


Abb. 17 Aufnahme von $[^3\text{H}]$ Chinin in *X. laevis* Oozyten. *X. laevis* Oozyten wurden mit Wasser oder rOCT2-cRNA injiziert und 3 Tage inkubiert. Anschließend wurden sie unterschiedlich lang in ORi inkubiert, welches $0.1 \mu\text{M}$ $[^3\text{H}]$ Chinin beinhaltete. Die Aufnahme wurde durch Waschen in eiskaltem ORi zu den angegebenen Zeiten gestoppt.

der Aufnahme von $[^3\text{H}]$ Chinin zwischen Wasser und rOCT2 injizierten Oozyten; und b) je höher der pH-Wert und je niedriger der Grad der Protonierung war, desto mehr Chinin gelangte in die Oozyte, somit war klar, dass das ungeladene Chinin in die Oozyte diffundiert. Der Grund für den langen lineare Anstieg der pH-abhängigen $[^3\text{H}]$ Chinin Aufnahme ist nicht

geklärt. Dies könnte jedoch mit dem langsamen Konzentrationsausgleich des Chinins zwischen den lipophilen Dotterschollenproteinen und dem hydrophilen Teil des Zytosol zusammen hängen (siehe dazu Kapitel 4.2 der Diskussion).

3.3.2 Inhibition der TEA Aufnahme durch Chinin bei unterschiedlichem pH

Nun wurde es interessant zu wissen, wie sich der pH-Wert und somit der Grad der Protonierung des Chinins auf die Hemmung von rOCT2 auswirkt. Es sollte die Frage erörtert werden, ob das ungeladene Chinin durch die Membran diffundiert und somit rOCT2 von der Innenseite hemmt. Hierzu wurde die Aufnahme von 10 μM des permanent geladenen [^{14}C]TEA durch unterschiedliche Chinin-Konzentrationen bei verschiedenen pH -Werten

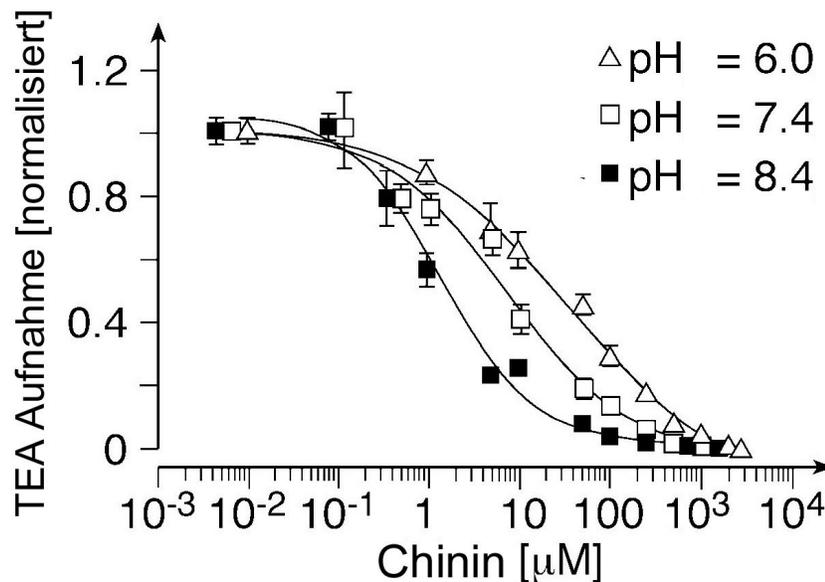


Abb. 18: Inhibition der TEA-Aufnahme durch Chinin von rOCT2 bei unterschiedlichen pH-Werten. rOCT2 exprimierende *X. laevis* Oozyten wurden bei verschiedenen pH-Werten 10 min mit [^{14}C]TEA in Abwesenheit oder Gegenwart unterschiedlicher Chininkonzentrationen inkubiert

gehemmt. Abb. 18 zeigt die so erhaltenen Daten in halblogarithmischer Darstellung. Es zeigte sich deutlich, je höher der pH-Wert, das heißt, je geringer der Grad der Protonierung ist, desto affiner ist das Chinin zum Transporter.

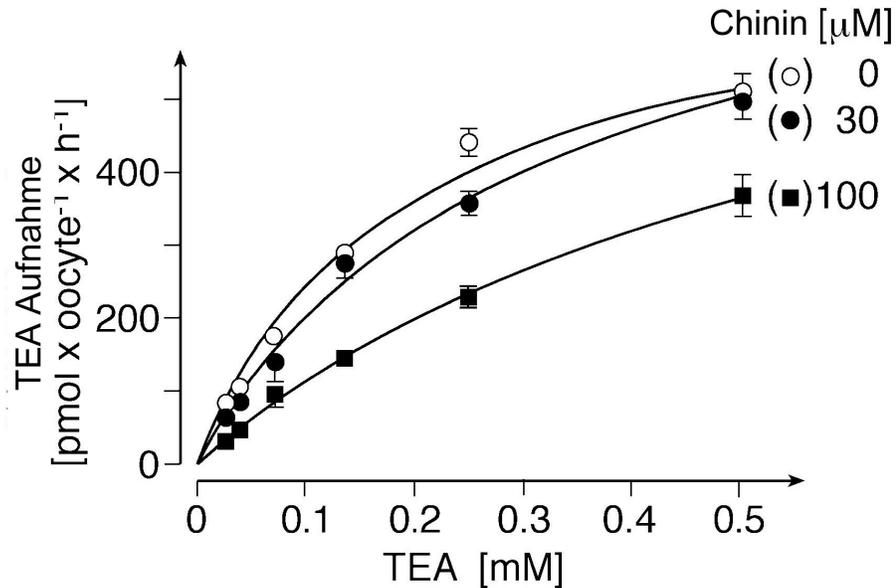


Abb. 19: Effekt von Chinin auf die konzentrationsabhängige [¹⁴C]TEA Aufnahme bei pH 6.0. *rOCT2* exprimierende Oozyten wurden zwei Tage der Mikroinjektion von 10 ng cRNA 10 min bei pH 6 in Abwesenheit oder Gegenwart der gezeigten Chinin Konzentrationen inkubiert.

In drei Versuchen wurden folgende IC₅₀ Werte ermittelt: bei pH 6.0 $38 \pm 5 \mu\text{M}$, bei pH 7.4 $8 \pm 2 \mu\text{M}$ bei pH 8.4 $1.5 \pm 0.3 \mu\text{M}$. Die bei den verschiedenen Versuchen erhaltenen IC₅₀ Werte waren auf dem 5% Niveau zueinander signifikant unterschiedlich. In elektrophysiologischen Messungen, durchgeführt von Thomas Budiman (Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt) wurde nachgewiesen, dass das Membranpotential nur leicht durch die Änderung des pH-Werts beeinflusst wurde und somit nicht der Grund für diese unterschiedlichen Affinitäten sein konnte (Arndt et al., 2001). Die Daten legen nahe, dass

Chinin in seiner ungeladenen Form durch die Membran diffundieren und rOCT2 mit einer erhöhten Affinität von innen hemmen kann.

Mit Hilfe des in Abb. 19 dargestellten Experiments sollte die Frage geklärt werden, ob der hohe IC_{50} -Wert bei pH 6.0 auf einer Hemmung durch eine geringe intrazelluläre Chininkonzentration oder auf einer wenig affinen Bindung von der extrazellulären Seite beruht. Ich habe deshalb die konzentrationsabhängige Aufnahme von radioaktiv markiertem TEA in Gegenwart von keinem, 30 μM und 100 μM Chinin bei einem pH-Wert von 6.0 gemessen. Die folgenden k_M -Werte in mM und V_{Max} -Werte in $\text{pmol} \times \text{h}^{-1} \times \text{Oozyte}$ Messungen wurden berechnet: Abwesenheit von Chinin: $k_M = 0.21 \pm 0.04$ und $V_{\text{Max}} = 725 \pm 72$; 30 μM Chinin: $k_M = 0.31 \pm 0.05$ und $V_{\text{Max}} = 872 \pm 64$; 100 μM Chinin: $k_M = 0.66 \pm 0.09$ und $V_{\text{Max}} = 844 \pm 80$. Bei Annahme einer kompetitiven Form der Inhibition berechnet sich ein K_i für Chinin von 55 μM in der Gegenwart von 30 μM Chinin und 45 μM in der Gegenwart von 100 μM Chinin. Diese Daten weisen auf eine kompetitive Form der Inhibition und auf eine Interaktion von Chinin mit der nach außen gerichteten Bindestelle von rOCT2 bei einem pH-Wert von 6.0 hin.

3.4 Interaktion von rOCT2 mit TBuA

Es könnte sein, dass die pH-Abhängigkeit der IC_{50} -Werte des Chinins auf einer Protonenabhängigkeit der Affinität der Bindungsstelle beruht. Daher wurde der in Abb. 18 gemachte Versuch mit einem Inhibitor ähnlicher Affinität verglichen. Als Inhibitor wurde hier das Tetrabutylammonium (TBuA) gewählt, welches eine permanente Ladung aufwies und somit nicht membranpermeabel war. In einem Einzelexperiment wurde die [^{14}C]TEA Aufnahme mit TBuA inhibiert (Abb. 20).

Die erhaltenen IC_{50} -Werte für die TBuA vermittelte Inhibition der [^{14}C]TEA Aufnahme lagen für rOCT2 bei den verschiedenen pH-Werten in folgenden Bereichen, pH 6.0 = 17.2 ± 3.8 ; pH 7.4 = 24.9 ± 5.7 μM und pH 8.4 = 18.2 ± 6.8 μM . Bei diesem Versuch war keine geradlinige Tendenz einer Verschiebung der IC_{50} -Werte in Abhängigkeit vom pH-Wert zu erkennen. Die veränderte Affinität ist also nicht auf eine Protonensensitivität von rOCT2 zurückzuführen.

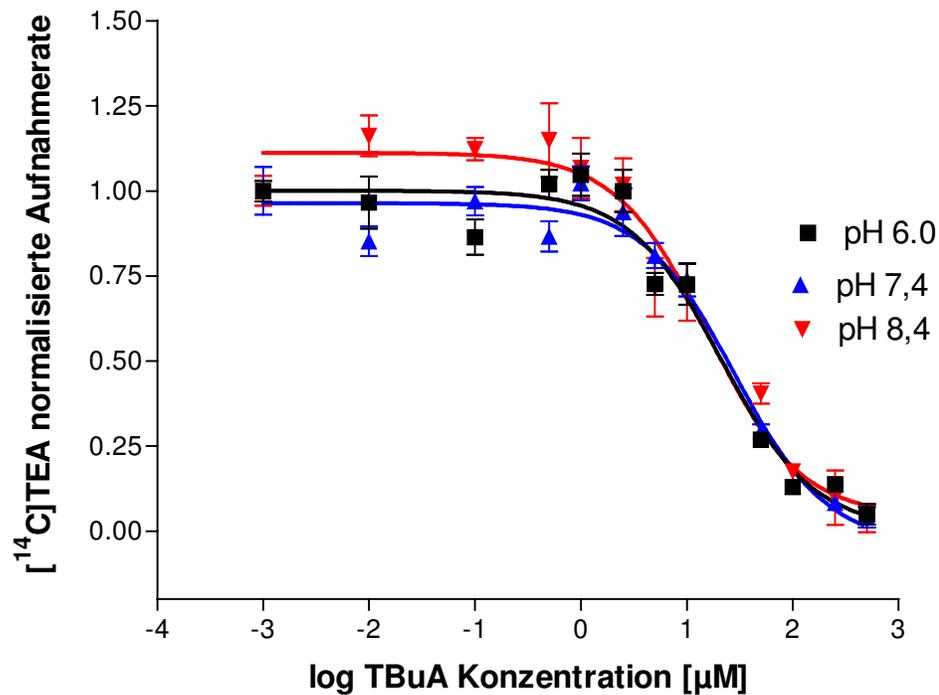


Abb. 20: *Inhibierung der $[^{14}\text{C}]\text{TEA}$ -Aufnahme durch TBuA von rOCT2 bei unterschiedlichen pH-Werten. *X. laevis* Oozyten wurden mit rOCT2 cRNA injiziert und 2-3 Tage inkubiert. Im Anschluss wurden 30 min lang die Aufnahme von $[^{14}\text{C}]\text{TEA}$ in Gegenwart verschiedener TBuA Konzentrationen gemessen. Die Anpassung geschah nach Hill.*

4 Diskussion

4.1 Die vierte Transmembrandomäne von rOCT1

Im Gegensatz zu den anderen elf hypothetischen Transmembrandomänen, läßt sich die vierte hypothetische Transmembrandomäne in einer Hydropathieanalyse nach Kyte-Doolittle nicht eindeutig als hydrophil oder hydrophob zuordnen (Gründemann et al., 1994). Die transmembranäre Eigenschaft könnte somit in Frage gestellt werden. Es gibt jedoch einige Erkenntnisse, dass es sich hier tatsächlich um eine Transmembrandomäne handelt. Bei den anderen Mitgliedern dieser Familie, sowohl innerhalb der Spezies bei rOCT2 (Okuda et al., 1996) und rOCT3 (Kekuda et al., 1998) und auch bei anderen Spezies wie bei der Maus (mOCT1) (Green et al., 2002), dem Kaninchen (rOCT1) (Terashita et al., 1998) und dem Menschen (hOCT1) (Gorboulev et al., 1997) zeigen die Kyte-Doolittle Hydropathieanalysen deutlich die transmembranären Eigenschaften der Aminosäuregruppe in diesem Bereich. Die kürzlich erst kristallisierte Laktose Permease, gehört ebenfalls wie rOCT1 der Superfamilie der „major fascillator“ an. Die Kristallstruktur zeigt eindeutig, dass die vierte zuvor nur hypothetische Transmembrandomäne dieser Permease tatsächlich transmembranär ist (Abramson et al, 2003a; Abramson, et al. 2003b).

4.1.1 Prinzip des „Helical Wheels“

Das Helical Wheel stellt eine α -Helix in der Aufsicht dar. Die Peptidkette ist schraubig gewunden. Auf jede Windung dieser Schraube kommen 3.6 Aminosäuren. Die α -Helix wird durch die Wasserstoffbücken zwischen den C=O und den N-H Gruppen der Hauptkette stabilisiert. Dabei bildet die N-H Gruppe eine Wasserstoffbrücke zu der C=O Gruppe aus, die in der linearen Sequenz vier Aminosäuren weiter entfernt liegt. Jeder Rest ist gegenüber dem nächsten 0.15 nm entfernt und um 100° gedreht. Deshalb liegen Aminosäuren, die in der linearen Sequenz 3 bis 4 Reste entfernt sind innerhalb einer α -Helix in unmittelbarer räumlicher Nachbarschaft. Aminosäuren, welche in der linearen Sequenz nur 2 Aminosäuren von einander entfernt sind liegen sich in der α -Helix gegenüber. Die Ganghöhe einer solchen Helix, das heißt die Entfernung zwischen zwei Punkten nach einer 360° Wendung der Helix beträgt 0.54 nm. Das Innere der α -Helix hat auf Grund der van-der-Waals-Radien der Atome

fast keinen Freiraum. Es können also auf keinen Fall Moleküle durch die Helix selbst gelangen. Die Reste der Aminosäuren schauen alle nach außen und können somit mit ihrer Umgebung interagieren (Koolmann und Röhm, 1998; Stryer, 1991).

4.1.2 Gemeinsamkeiten der vierten und elften Transmembrandomäne von rOCT1

In Abb. 5 wurden alle Transmembrandomänen des rOCT1 Proteins aufgezeigt und hier nur diejenigen Aminosäuren markiert, welche in OCTs allein oder aber in OCTs und OCTNs konserviert waren. Es fallen hier zwei Transmembrandomänen besonders ins Auge. Zum einen die Transmembrandomäne 11, bei der insgesamt fünf Aminosäuren auf die oben genannte Weise konserviert waren. Hierzu gehörte das schon früher charakterisierte *Aspartat* an der Position 475. Beim Austausch gegen *Glutamat* wies die Mutante Verschiebungen in den Affinitäten für N-Tetraalkylammoniumderivate auf, die Affinitäten waren für diese bei der Mutante erhöht (Gorboulev et al., 1999). Ebenfalls in der elften Transmembrandomäne sind auch die *Cysteine* an den Positionen 470 und 474 zu finden, welche durch *Alanin* substituiert wurden (Kapitel 7.1, Anhang). In einem Einzelexperiment zeigte die Mutante *C470A* eine 2.5 fache Verringerung der Affinität und eine ca. 3fache Erhöhung der maximalen Transportrate, was ein Indiz für die funktionelle Relevanz diese Transmembrandomäne ist. Im Gegensatz dazu ließen sich *C474A* keine Hinweise auf veränderte Transporteigenschaften erkennen.

Beide Transmembrandomänen haben die gleiche Anzahl an OCT oder OCT und OCTN spezifischen Aminosäuren, jedoch liegen diese im helikalen Rad über die 11. Transmembrandomäne verteilt vor, während sie in der 4. Transmembrandomäne alle auf einer Seite zu finden sind.

4.1.3 Änderung der Substratselektivität und –affinität bei Mutanten der 4. TMD

Es ist sehr wahrscheinlich, dass diese fünf zwischen OCT und/oder OCTN konservierten Aminosäuren im dreidimensionalen Raum untereinander liegen, wie es in Abb. 6 auf der rechten Seite dargestellt ist.

Im Uhrzeigersinn betrachtet beginnt dieser konservierte Bereich mit einem hydrophilen, positiv geladenen *Lysin* an der Position 215. Als nächstes kommt das aromatische *Tryptophan* an der Position 218, dann das *Tyrosin* an der Position 222, welches ebenfalls aromatisch ist und zudem eine hydrophile Hydroxy-Gruppe besitzt, das *Threonin* an der Position 226 welches ebenfalls durch seine Hydroxy-Gruppe hydrophil ist und endet mit dem hydrophoben *Valin* an Position 229.

4.1.3.1 *Lysin* 215

Es zeigte sich, dass die Mutante bei Austausch des *Lysins* an Position 215 in das ungeladene *Glutamin* und in das ebenfalls positiv geladene *Arginin* nur noch einen Resttransport aufwies. Dieser Transport war nicht signifikant größer als der Transport der wasserinjizierten Oozyten. Somit kann dieser Transporter als nicht funktionsfähig eingestuft werden.

Die funktionelle Relevanz einer positiv geladenen Aminosäure in einem Kationentransporter wäre z.B. die Interaktion mit einer negativ geladenen Aminosäure im selben Protein, die über die Ausbildung von Salzbrücken die dreidimensionale Struktur des Proteins stabilisiert, wie es z.B. im Fall des „Lactosecarriers“ von *Escherichia coli* (King et al., 1991) und des Glukose Transporters 4 (GLUT 4) beschrieben wurde (Schurmann et al., 1997).

Ebenso ist es vorstellbar, dass nach dem „Umklappen“ eines Kationen Transporters die positiv geladene Aminosäure in die Nähe des kationischen Substrats gelangt und dieses durch Abstoßung aus der „Transportertasche“ hinausbefördert, wie es beim Arginin an der Position 735 der V-ATPase vermutet wird (Kawasaki-Nishi et al., 2001).

Kürzlich wurde gezeigt, dass hOCT1 und hOCT2 die negativ geladenen Hormone Prostaglandin E₂ und Prostaglandin F_{2α} transportieren können (Kimura et al., 2002). Da das oben beschriebene *Lysin* auch in den menschlichen OCTs zu finden ist, könnte man annehmen, dass es vielleicht mit diesen negativ geladenen Substraten interagiert.

Besonders interessant sind die Aminosäurereste *Tryptophan* 218 und *Tyrosin* 222. Proteine, welche an dieser Stelle mutiert wurden, zeigen eine deutliche Änderung der Selektivität für vier verschiedenen Substrate und teilweise Änderungen in der Affinität für TEA und MPP.

4.1.3.2 *Tryptophan 218*

Für den Austausch *Tryptophan* gegen das aromatische *Tyrosin* zeigten sich folgende zum Wildtyp relative Transportraten (da es sich um relative Transportraten handelt erhält der Wildtyp relative Raten von 100 % für jedes Substrat, also gilt für den Wildtyp MPP = TEA = Guanidin = Serotonin)

MPP >> TEA > Guanidin > Serotonin,

die Affinität war für MPP in Bezug zum Wildtyp stärker (4fach) erhöht als für TEA (2.4fach), der V_{Max} war für MPP auf 62% und für TEA auf 21% gesunken. Für den Austausch gegen das aromatische *Phenylalanin* zeigte sich eine Selektivität von

MPP >> Guanidin ~ Serotonin > TEA,

die Affinitäten für TEA und MPP waren nicht verändert. Ebenfalls zeigte der V_{Max} für MPP keine Änderung, jedoch war er für TEA auf 43 % reduziert. Für den Austausch gegen das nichtgeladene, hydrophobe und nicht-aromatische *Leucin* zeigte sich eine Selektivität von

MPP >> Guanidin ~ Serotonin > TEA.

Hier konnte keine Änderung in der Affinität zu MPP, jedoch eine starke Verringerung der Affinität zu TEA (8fach) nachgewiesen werden. Für MPP war der V_{Max} auf 17% und für TEA auf 10 % reduziert.

Bei den zwei Mutanten mit einer in Bezug zum Wildtyp veränderten Affinität, war es immer das TEA, dessen relative Affinität niedriger war als die des MPPs. Auch kann man ganz klar erkennen, dass das MPP von allen Substraten immer die höchsten relativen Transportraten besaß. Das TEA besaß in zwei Fällen die niedrigste relative Transportrate. In allen Fällen war der V_{Max} für TEA stärker erniedrigt als für MPP. Es stellte sich die Frage, welche Ursachen diese durch Substitution hervorgerufenen Diskrepanzen zwischen relativer TEA und relativer MPP Aufnahme haben könnten.

Die Strukturformel von MPP lässt folgende Eigenschaften erkennen: MPP besitzt zwei aromatische Ringsysteme, im Gegensatz zu den anderen Substraten, die gar kein (TEA,

Guanidin) oder aber nur ein aromatisches Ringsystem (Serotonin) besitzen. Zudem ist bei MPP die positive Ladung Teil des aromatischen Ringsystems. Durch diese Ladungsverteilung kommt es zu einer Abschwächung der positiven Ladung. Bei allen anderen Substraten ist dies nicht der Fall. Außerdem ist MPP auf Grund der beiden aromatischen Ringsysteme relativ groß und starr. Eine abgeschwächte positive Ladung könnte Einfluss auf eine erleichterte Dissoziation des Substrats vom Transporter haben, man könnte dadurch eine relativ niedrige Affinität des Substrats zum Transporter erwarten, was beim MPP mit einem k_M -Wert von durchschnittlich 5 μ M jedoch nicht der Fall ist. Da aber z.B. bei der Mutanten *W218L* keine Änderung der MPP Affinität, jedoch eine starke Änderung der Affinität zu TEA zu beobachten war, scheint es daher wahrscheinlicher, dass dieses relativ große MPP-Molekül einen anderen oder vielleicht zusätzlichen Teil der Substratbindungstasche belegt, welcher nicht durch diese Mutationen beeinflusst wird.

Interessant wäre es zu erfahren, ob das dem MPP strukturell ähnliche ASP auch ähnliche Eigenschaften bezüglich der Mutanten der vierten Transmembrandomäne von rOCT1 aufweist. ASP ist ebenfalls ein Substrat von rOCT1, besitzt fluoreszierende Eigenschaften und kann daher ohne die Hilfe von radioaktivmarkierten Substanzen zur Messung von Bindungseigenschaften von rOCT1 benutzt werden. Warum gerade aromatische Aminosäuren für die Bindung von Kationen eine wichtige Rolle spielen könnten, wird weiter unten diskutiert.

Die K_M -Werte für TEA und MPP waren unterschiedlich betroffen, abhängig davon, ob *W218* durch *Tyrosin* oder *Leucin* ersetzt wurde, daher wurde es interessant der Frage nachzugehen, ob die Überlappung bzw. Interaktionen zwischen den Bindedomänen von TEA und MPP von *W218* abhängt. Um dies herauszufinden wurde die Aufnahme einer sehr geringen MPP Konzentration mit TEA gehemmt. Es zeigte sich eine Affinitätsreihenfolge der Mutanten und des Wildtyps (von höchster zu geringster Affinität) von

W218Y > *W218F* ~ Wildtyp >> *W218L*

Da die gewählte MPP Konzentration weit unterhalb des K_M -Werts für MPP lag entsprach der IC_{50} -Wert dem K_i . Die vorherigen Versuche wurden bestätigt, da der K_i für die TEA inhibierten MPP Aufnahme für *W218Y* am niedrigsten und für *W218L* am höchsten war. Dies lässt darauf schließen, dass für eine hohe Affinität des TEAs zu rOCT1 nicht *Leucin* an

Position 218 vorhanden sein darf. Es könnte sogar sein, dass an dieser Position eine aromatische Aminosäure Bedingung für eine hohe Affinität des Transporters zu TEA ist. Beim Studium der Literatur fanden sich einige Hinweise, dass aromatische Aminosäuren in Transportproteinen und Rezeptoren von großer funktioneller Relevanz für deren Affinität zu quaternäre Ammoniumionen wie TEA sind.

So wurde gezeigt, dass TEA-sensitive Kaliumkanäle an ihrer Porenöffnung eine aromatische Aminosäure, hier ein *Tyrosin*, besitzen. TEA-insensitive Kanäle besitzen dies nicht. Entfernte man das *Tyrosin* bei TEA-sensitiven Kanälen, verloren diese ihre Sensitivität, wurde bei insensitiven Kanälen dort ein Tyrosin substituiert, so wurde eine Sensitivität induziert (Heginbotham und MacKinnon, 1992; MacKinnon und Yellen, 1990).

Beim nikotineren Acetylcholinrezeptor findet man sogar eine Anhäufung von aromatischen Aminosäuren, die ein Art Spalt bzw. Bindungstasche bilden, in welcher das Acetylcholin gebunden wird. Bei einer dieser Aminosäuren wurde eine eindeutige Interaktion des Indolringsystems eines *Tryptophans* mit dem quaternären Ammonium des Acetylcholins nachgewiesen (Zhong et al., 1995). Diese Autoren, ebenso wie die Autoren der Kaliumkanalveröffentlichungen, postulieren hier eine sogenannte Kationen- π Interaktion, bei der die Elektronen des π -Orbitals von aromatischen Ringsystemen mit den positiven Ladungen von Kationen in Kontakt treten (siehe Kapitel 4.1.6). Die Tatsache, dass die *Tyrosin* Mutante sogar eine höhere Affinität zum TEA aufwies als der Wildtyp, könnte an den Elektronenpaaren des Sauerstoff der Hydroxy-Gruppe des Phenolrestes liegen. Dieser Rest ist beweglicher als die planaren Ringe des starren Indols. Es könnte aufgrund seiner größeren Beweglichkeit eine stärkere Interaktion mit den Substraten hervorrufen.

4.1.3.3 *Tyrosin 222 und Threonin 226*

Auch bei der Mutation des *Tyrosins* an der Position 222 ist zu erkennen, dass die relative Transportrate des MPP höher ist, als die der anderen Substrate. So ergibt sich für die Mutation zu *Phenylalanin* eine Selektivität von

MPP > TEA ~ Guanidin ~ Serotonin,

die Affinität änderte sich für MPP nicht, jedoch wurde sie für TEA um einen Faktor 3 erhöht. Wenn das *Tyrosin* gegen das *Leucin* ersetzt wurde, so konnte eine relative Selektivität von

MPP > TEA ~ Serotonin ~ Guanidin

beobachtet werden. Die Affinität für TEA war um das 2.9fache und für MPP um das 3.8fache erhöht. Die maximalen Transportraten waren für beide Substrate auf ca. 9% reduziert. Deutlich ist hier, dass die aromatische Eigenschaft der Aminosäure an Position 222 für die Affinität des TEAs und MPPs zu rOCT1 nicht relevant zu sein scheint. Geht diese durch die Substitution von *Tyrosin* zu *Leucin* verloren, so erhöht sich sogar die Affinität des Transporters zu MPP und TEA.

Die aromatische Eigenschaft der Aminosäure an Position 222 könnte jedoch wichtig für die maximale Transportrate sein, denn die Substitution durch das aromatische *Phenylalanin* ließ diese bei weitem nicht so stark sinken (TEA 2.8fach und MPP 1.6fach) wie es bei der Substitution durch das nicht aromatische *Leucin* (TEA 11.5fach und MPP 11fach) der Fall war. Es konnte jedoch nicht unterschieden werden, ob die Translokationsgeschwindigkeit verringert war oder aber der Einbau der Transporter in die Membran verringert wurde.

Die Mutante *T226A* zeigte ebenfalls eine Änderung der Selektivität im Vergleich zum Wildtyp. Auch hier stand MPP an erster Stelle, die Reihenfolge der Selektivität war

MPP > TEA ~ Serotonin >> Guanidin.

Die Reihenfolge der Selektivität lässt keinen Rückschluss auf eine bevorzugte Substratstruktur zu. Die maximalen Transportraten waren für TEA und MPP auf etwa die Hälfte reduziert. Die Erhöhung der Affinität für MPP um einen Faktor 2.5 war signifikant.

Die Anwesenheit der Hydroxy-Gruppe des *Threonins* und somit dessen freien Elektronenpaars, trägt also nicht zur Affinität für TEA und MPP bei. Die Abwesenheit dieser Hydroxy-Gruppe erhöhte sogar die Affinität des Transporter zu seinen Substraten.

Ebenfalls interessant ist auch das Ende dieser „Fünferkette“ der konservierten Aminosäuren. Sie endet mit einem hydrophoben *Valin* an der Position 229. Wurde nur eine Acylgruppe entfernt, so dass daraus ein Alanin entstand, war nahezu kein Transport mehr zu detektieren. Das *Valin* macht sicherlich aufgrund seiner Hydrophobizität keine Interaktion mit den Substraten, es scheint aber sehr wichtig für die Funktion des Transporters zu sein. Vielleicht

besitzt es eine funktionelle Relevanz für die Ausbildung der vierten Transmembrandomäne. Die Antikörperreaktion auf der PVDF-Membran zeigte deutlich zwei Signale bei dieser Mutante, man kann daher davon ausgehen, dass die Mutante *V229L* translatiert und zumindest in Membranvesikel eingebaut wird (Abb. 15).

Außerhalb dieser fünf in OCTs konservierten Aminosäuren wurde noch das *Glutamat* an der Position 227 untersucht, welches gegen Aspartat bzw. Glutamin ausgetauscht wurde. Die Mutante zeigte keine Substrataufnahme, die sich signifikant von der Substrataufnahme wasserinjizierte Oozyten unterschied. Hervorzuheben ist jedoch die deutlich geringere Menge an Protein der *Aspartat* Mutante, welche die Membranvesikel erreicht, was sich in drei Versuchen eindeutig herausstellte. Hier scheint die Translation gestört zu sein. Die 69 kD Bande, welche das OCT Protein wahrscheinlich in seiner glykosylierten Form darstellt, tauchte ebenfalls nicht mehr auf.

Die Mutante mit der Substitution *Glutamat* gegen *Glutamin* zeigt einen stärkeren Einbau in die Membranvesikel. Auch ist hier die potentielle Glykosylierungsbande gut zu erkennen. Jedoch wird bei beiden Mutanten auf Grund des reduzierten Transports, des geringen Proteingehalts in den Membranvesikeln und des hohen Konservierungsgrads deutlich, dass es sich bei *Glutamat 227* um eine für das rOCT1 Protein essentielle Aminosäure handelt.

4.1.4 Inhibition der Mutanten der Position Y222

Die gut transportierenden Mutanten wurden weiter untersucht, indem die Aufnahme von $10\mu\text{M}$ [^{14}C]TEA durch verschiedene Inhibitoren gehemmt wurde. Ein wirklich auffälliger Effekt zeigte sich jedoch nur bei einer der substituierten Aminosäuren. Die Austausch von *Tyrosin* gegen *Phenylalanin* an der Position 222 resultierte in einer besonders hohen Affinität des Transporters für Tetrapentylammonium (TPeA). Es sollte nun die Frage geklärt werden, ob die hohe Affinität des TPeAs die intra- oder extrazelluläre Hemmung von rOCT1 widerspiegelt. Hierzu wurden Messungen mit Hilfe der „Zwei-Elektroden-Spannungsklemme“ durchgeführt. Zunächst soll aber diskutiert werden, welche Problematiken auftreten können, versucht man Transportprotein vermittelte Ströme mit Hilfe dieser Methode zu messen

4.1.5 Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

Möchte man Transportproteine mit Hilfe der „Zwei-Elektroden-Spannungsklemme“ (im englischen „Two Electrode Voltage Clamp“ kurz TEVC) genauer charakterisieren, ist man vor das Problem gestellt, dass Transporter oft nur sehr geringe Ströme produzieren. In dem hier benutzten System benötigte man mindestens Ströme von 10 nA, damit sie sich deutlich vom Hintergrundrauschen unterscheiden. Mit dem rOCT1 Wildtyp war dies durchaus häufiger der Fall. Die Mutante *Y222F* zeigte jedoch selten Ströme in diesem Bereich (siehe Abb. II). Daher mussten diese durch die Zugabe des Sulfhydrylgruppen modifizierende Reagenz MMTS stimuliert werden. Warum die durch rOCT1 vermittelten Ströme dadurch stimuliert werden, ist jedoch völlig unklar. Das zu 70% identische Transportprotein rOCT2 (Okuda et al., 1996) lässt sich interessanterweise durch MMTS nicht stimulieren. (persönliche Mitteilung von Alexander Sturm, Inst. für Anatomie und Zellebiologie, Würzburg).

4.1.5.1 TEVC und MMTS

Die ersten Messungen mit den Substraten TEA und Cholin konnten die aus den „Tracerflux-Messungen erhaltenen TPeA IC₅₀-Werte nicht bestätigen. Für beide Substrate waren die IC₅₀-Werte unter den zunächst benutzten Bedingungen für das mutierte Protein und dem Wildtyp nicht signifikant verschieden. Es stellte sich die Frage warum die Ergebnisse aus den „Tracerflux“-Messungen nicht zu bestätigen waren.

Zum einen ist hier natürlich die Zugabe von MMTS zu nennen. MMTS ist membrangängig und modifiziert freie und somit reduzierte SH-Gruppen. Die potenziell veränderten SH Gruppen könnten Auswirkungen auf die Interaktionen zwischen Protein und dem Inhibitor TPeA haben. Verglichen werden können in der TEVC Methode ausschließlich der Wildtyp und Mutante nach Stimulation, da der von der unstimulierten Mutante produzierte Strom nicht auflösbar war. So zeigte das stimulierte mutierte Protein im Vergleich zum stimulierten Wildtyp eine um 2fach erhöhte Affinität für TEA. Unstimuliert im „Tracerflux“ war es eine Erhöhung der Affinität um das 3.3fache für die Mutante (Kapitel 3.2.2). Es bleibt jedoch unklar, ob diese leichte Verschiebung um einen Faktor von 1.7 durch die TEVC Methode oder aber durch das MMTS verursacht wird.

Für Cholin zeigte sich eine 3.5fache Erhöhung der Affinität für die stimulierte Mutante in Bezug zum stimulierten Wildtyp. Unstimulierte Referenzdaten für Aufnahme von Cholin durch *Y222F* aus dem „Tracerflux“ sind nicht vorhanden.

4.1.5.2 Unterschiede zwischen TEVC und „Tracer Flux“ Messungen

Durch die Aufnahme von Kationen kann es im „Tracerflux“ je nach Konzentration der Substrat-Inhibitorlösung zu einer mehr oder weniger starken Depolarisierung der Zelle kommen. Dies kann bei potenzialabhängigen Transportern zu einer Verringerung der Transportrate führen. Im Unterschied dazu wird in der Spannungsklemme das Membranpotenzial der Oozyte konstant gehalten.

Ein weiterer Unterschied ist die Dauer der Superfusion (TEVC) bzw. Inkubation („Tracer Flux“) des Substrats und des Inhibitors. Bei „Tracerflux“-Messungen wurde die Aufnahme über einen Zeitraum von 30 Minuten Inkubationszeit bestimmt, wohingegen in der Spannungsklemme die Inhibierung zunächst nach 10 Sekunden gemessen wurde. Da diese eine transiente Eigenschaft besaß, wurde der Punkt des größten Stroms zur Berechnung des IC_{50} -Werts benutzt.

Zudem wurde der Inhibitor bei den Messungen mit radioaktiv markierten Substanzen vorinkubiert. Diese Vorinkubation wurde nun auf die Methode der Spannungsklemme übertragen, indem zunächst mit der entsprechende Konzentration an Inhibitor über einen Zeitraum von 6 Minuten superfundiert wurde. Im Anschluss daran wurde das Substrat hinzugefügt und zur Berechnung des IC_{50} -Wertes der Messpunkt benutzt, welcher nach Einstellung eines Plateaus ermittelt wurde.

4.1.5.3 TPeA hemmt TEA induzierte Ströme bei *Y222F* nicht kompetitiv

Auf diese Weise wurde bei der höheren Substratkonzentration eine ca. 10fache Erhöhung der Affinität für TPeA bei der Mutante *Y222F* verglichen mit dem Wildtyp ermittelt. Die Form der Inhibierung war für den Wildtyp deutlich kompetitiv.

Da sich bei der Mutante *Y222F* der IC_{50} -Wert für TPeA trotz Erhöhung der Substratkonzentration nicht änderte, war die Form der Inhibierung hier deutlich nicht-kompetitiv. Die Änderung der Affinität für TPeA und die Änderung der Form der Kompetition wiesen darauf hin, dass TPeA hier nah der Substratbindungstasche interagiert, wie es auch schon zuvor vermutet wurde (Gorboulev et al., 1999). Für das zweite Substrat, Cholin, wurde dieser Versuch nicht durchgeführt.

Es zeigte sich also, dass zum Vergleich der Affinität des TPeAs die Versuchsbedingungen der beiden Technologien, soweit wie möglich einander angepasst werden mussten. Da die Mutante bei beiden Methoden eine erhöhte Affinität aufwies und sich zudem auch noch die

Form der Konkurrenz veränderte, ist sehr stark davon auszugehen, dass das *Tyrosin* an der Position 222 Teil der Bindungstasche von rOCT1 ist.

Es stellt sich jedoch die Frage, warum der rOCT1 Wildtyp nicht die Form der Konkurrenz bei einer Langzeitinkubation ändert. Es wäre möglich, dass die kurze Inkubationszeit die Affinität des Transporters zum TPeA in seiner nach außen gerichteten Konformation reflektiert. Nach einer Inkubationszeit von sechs Minuten wäre es durchaus denkbar, dass soviel TPeA in die Zelle eingedrungen ist, dass es den Wildtyp Transporter von innen inhibieren kann. Der niedrige k_M würde somit die höhere Affinität des TPeA zur Substratbindetasche des nach innen gerichteten Transporters widerspiegeln. Im Fall von rOCT2 wurde dies schon mit TEA als Substrat und Chinin als Inhibitor diskutiert (Arndt et al., 2001) (siehe auch Kapitel 4.2). Jedoch zeigte sich bei diesen Versuchen eine nicht-kompetitive Form der Inhibition beim rOCT2 Wildtyp. Dies könnte dadurch entstehen, dass Chinin auf Grund seiner fehlenden Ladung einfacher durch die Oozytenmembran diffundiert als das geladene TPeA und TEA nur schlecht mit Chinin um die innere Bindungsstelle von rOCT2 konkurrieren kann. Die Membran wirkt sozusagen wie ein Filter, welcher Chinin hindurch lässt, TEA jedoch blockiert. TPeA kann jedoch erst seine hohe Affinität zu rOCT1 ausbilden, wenn es selbst den Transportweg zur Hälfte passiert hat, da es nur schlecht durch die Membran diffundiert. Bei einer Erhöhung der Substratkonzentration von aussen lässt TPeA sich kompetitiv von der inneren Bindungsstelle des Transporter verdrängen.

4.1.6 Aromatische Aminosäuren können mit Kationen und geladenen Aminosäuren interagieren

Die Reste aromatischer Aminosäuren besitzen die Eigenschaft über die Elektronen ihrer π -Orbitale mit positiven Ladungen zu interagieren (Dougherty, 1996) (Abb. 21). Dabei kann es zu Interaktionen mit dem Substrat (sowohl organisch und anorganische Kationen) (MacKinnon und Yellen, 1990; Zhong et al., 1995), aber auch zu Interaktionen zwischen den Aminosäureresten innerhalb eines Proteins kommen (Gallivan und Dougherty, 1999). Derartige Interaktionen können recht stark sein, so beträgt die freie Energie einer kovalenten Bindung -50 bis -100 kcal/mol, die einer Wasserstoffbrückenbindung -3 bis -6 kcal/mol und die eines Benzolrings zum quaternären Ammonium -19 kcal/mol (Dougherty, 1996). Dies zeigt, dass diese Form der Interaktion nicht vernachlässigt werden darf. Bei unseren Experimenten haben wir jedoch nicht mit dem quaternären Ammonium gearbeitet, sondern

mit dem größeren Derivat TEA. Leider konnte ich in der Literatur keine Referenz zur genauen Bindungsenergie der π -Elektronen zum TEA finden. Jedoch konnte ich in einem Übersichtsartikel von Ma und Dougherty, in dem u. a. Daten aus Computeranalysen und Gasphase-Experimenten zusammengefasst wurden, freie Bindungsenergien der aromatischen Aminosäuren zum etwas kleineren TMA und auch zum quaternären Ammonium ausfindig machen (Ma und Dougherty, 1997). TMA ist ebenfalls ein Substrat von rOCT1 und induziert im „TEVC“- Experiment sogar höhere Ströme als TEA (Budiman et al., 2001).

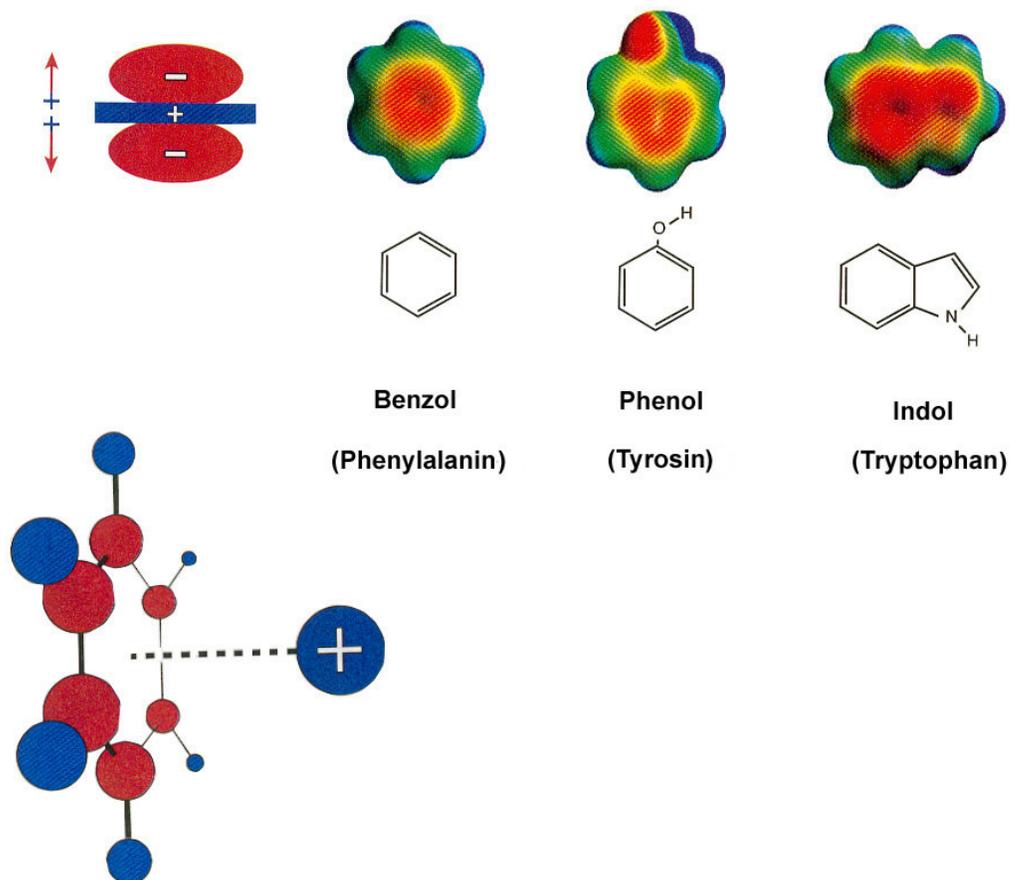


Abb. 21: Ladungsverteilung in Resten aromatischer Aminosäuren. Blau bis grüner Bereich: geringe Elektronegativität, gelber bis roter Bereich, starke Elektronegativität (Dougherty, 1996).

In der Veröffentlichung von Ma und Dougherty wird die freie Energie für eine Interaktion von TMA zu Benzol in einem Bereich von 8.4 bis 15.4, zum Phenol von 10.7 bis 11.9 und zum Indol von 11.7 bis 16.3 kcal/mol angegeben. Die Autoren erwähnen leider nur, dass die Alkylierung von Ammonium die freie Bindungsenergie minimiert, ob die Länge der Seitenketten einen Einfluß darauf hat, wird jedoch offen gelassen. Ammonium bindet mit einer freien Energie in einem Bereich von 19 bis 22.2 kcal/mol an Benzol, mit 20.5 kcal/mol an Phenol und mit 25.9 kcal/mol an einen Indolring. Diese Bindungsenergien liegen deutlich oberhalb der Energie einer Wasserstoffbrückenbindung. Die Tatsache, dass es beim Austausch von aromatischen Aminosäuren in der vierten Transmembrandomäne zu starken Änderungen der TEA Affinität kommt, lässt eine Kationen- π Interaktion sehr wahrscheinlich erscheinen.

4.1.7 Potentielle Beteiligung der konservierten Aminosäuren an der Substratbindungstasche

Unsere Versuche wiesen stark auf eine Interaktion von TEA mit den π -Elektronen des *Tryptophan 218* hin. Im Gegensatz zum TEA wiesen die Mutanten der Position 218 entweder keine Änderung oder aber eine Erhöhung der Affinität zum MPP auf. Die Tatsache, daß sich die Affinitäten und auch die Transportraten der zwei Substrate nicht in gleichem Maße ändern oder wie im Falle der Mutante W218L, eine Affinität stark verändert, die andere aber identisch mit der des Wildtyps ist, zeigt, dass es sich hier um eine komplexe Bindungstasche im rOCT1 Protein handelt. Vorstellbar wäre zum Beispiel eine Kavität innerhalb der Bindungstasche, die groß genug ist um eine Interaktion mit dem kleineren, flexibleren TEA-Molekül zu vermitteln, die jedoch zu klein ist um das größere und starrere MPP Molekül zu binden. MPP scheint mit einer anderen Stelle der Bindungstasche zu interagieren. Doch wie ist es dann möglich, dass bei der Mutante W2218F die Affinität für TEA und MPP erhöht ist? Eine mögliche Antwort ist, dass durch die zusätzliche Hydroxygruppe erst eine Interaktion dieses Teils der Substratbindungstasche mit dem MPP Molekül möglich wird.

Im Gegensatz dazu scheint das aromatische *Tyrosin* an der Position 222 nicht essentiell für die Stärke der Bindung des Transporters zum TEA zu sein, da der Austausch in das nicht aromatische *Leucin* die Affinität für TEA und MPP in gleichem Maße erhöhte, was ein Hinweis darauf ist, dass dieser Teil der Substratbindungstasche von beiden Molekülen genutzt

wird. Ein weiterer eindeutiger Hinweis auf eine Beteiligung von *Tyrosin 222* an der Substratbindungstasche sind die elektrophysiologischen Experimente. Diese zeigen eindeutig eine Änderung der Form der Kompetition zwischen Substrat und Inhibitor. Besaß der Wildtyp in unserem Versuchsansatz kompetitive Eigenschaften, so änderten sich diese nach der Substitution in das ebenfalls aromatische *Phenylalanin* zu nicht-kompetitiv. Die Dauer der Inkubation von TPeA änderte die Form der Inkubation nicht; auch nach 6 minütiger Inkubation war die Form der Inhibition beim Wildtyp kompetitiv und bei der Mutante Y222F nicht-kompetitiv.

Das *Threonin* an der Position 226 scheint ebenfalls an der Substratbindungsstelle beteiligt zu sein, da sich sowohl Selektivitäten als auch Affinitäten änderten, wenn die Hydroxy-Gruppe entfernt und das *Threonin* gegen *Alanin* getauscht wurde. Die Transportraten der vier verschiedenen Substrate waren von dieser Mutation in unterschiedlichem Maße betroffen. Dies ist ein Hinweis auf die komplexe Struktur einer Substratbindungstasche innerhalb der rOCT1 Proteins, in der vielleicht auch die Überlappung verschiedener Bindedomänen innerhalb der Substratbindetasche möglich ist, wie es in unserer Arbeitsgruppe für rOCT2 diskutiert wurde (Volk et al., 2003).

Die Substitution des *Valins* gegen das strukturell sehr ähnliche *Alanin* an der Position 229, zerstörte den Transport von verschiedenen Substraten nahezu vollständig. Eine Veränderung der Konformation des Proteins könnte die Ursache hierfür sein, da das Protein in gleichem Maße in die Membranvesikel eingebaut wurde, wie es beim Wildtyp der Fall war.

Hervorzuheben ist noch, dass bei allen funktionierenden Mutanten die Änderung der Eigenschaften des MPP-Transports am geringsten war. Die weiter oben diskutierte Hypothese einer Interaktion des MPP-Moleküls mit einem anderen Teil der Substratbindungstasche als TEA kann somit um die restlichen Substrate erweitert werden kann, denn die Ergebnisse weisen darauf hin, dass MPP ebenfalls mit einem anderen Teil der Substratbindetasche interagiert als Serotonin und Guanidin.

Es wird durch diese Experimente sehr deutlich, dass mindestens drei der fünf in OCT und OCTN spezifischen Aminosäuren der vierten Transmembrandomäne an der Bildung der Substratbindungstasche von rOCT1 beteiligt sind. Diese drei Aminosäuren werden zum C- und N-Terminus von 2 weiteren Aminosäuren eingegrenzt, bei denen die Substitution durch eine strukturell ähnliche Aminosäure zu einem Funktionsverlust von rOCT1 führt. Alle fünf diskutierten Aminosäuren sind daher von großer funktioneller Relevanz für das rOCT1-Protein.

Im folgenden Teil der Diskussion wird die Fragestellung der intrazellulären Inhibierung (siehe auch Kapitel 3.2.6 und 4.1.5.3) durch einen nicht permanent geladenen Inhibitor genauer erörtert.

4.2 Chinin hemmt in Oozyten exprimiertes rOCT2 Protein von innen

Die nicht permanent geladene schwache Base Chinin zeigte scheinbar diskrepante Ergebnisse, wenn man ihre Interaktion mit rOCT2 in verschiedenen Systemen untersuchte. Eine spezielle Messmethode beim „Macropatch“-Verfahren ermöglicht es, ein Stück der Zellmembran einer Zelle anzusaugen und anschließend herauszureißen, so dass die vormals intrazelluläre Seite dem Medium zugewandt ist (engl. inside-out). Durch „inside-out“-Versuche im „Macropatch“ ist es möglich, die Interaktion von Membranproteinen mit Substanzen an der Innenseite einer Zellmembran zu studieren. Solche „inside-out“-Versuche wiesen darauf hin, dass rOCT2 von dem Antimalaria Mittel Chinin in kompetitiver Form von innen gehemmt wird (Budiman et al., 2001). Versuche mit intakten Oozyten zeigten jedoch eine nicht-kompetitiv Hemmung (Arndt et al., 2001). Der Grund für diese Diskrepanz sollte nun mit Hilfe des „Tracerflux“-Systems an intakten Oozyten genauer analysiert werden.

Chinin ist eine schwache Base mit einem pK-Wert von 8.4. In ihrer ungeladenen Form könnte sie problemlos die Plasmamembran durchdringen und rOCT2 von der Innenseite hemmen. Gibt man von außen das permanent geladene TEA hinzu, würde man eine Transinhibition des Substrats erwarten. Die Form der Inhibierung wäre nicht-kompetitiv, da Chinin (da von innen hemmt) und TEA (da es von außen an die Substratbindestelle bindet) nicht um den gleichen Teil der Substratbindungstasche konkurrieren. Auf diese Weise könnte bestimmt werden, ob die Hemmung der Chinin inhibierten TEA Aufnahme intra- oder extrazellulär ist.

Es zeigte sich, dass die Theorie mit der Praxis übereinstimmte, denn die passive Chininaufnahme war in *Xenopus laevis* Oozyten um so höher, je höher der pH-Wert der umgebenen Lösung war (Abb. 17). Die für die Chinin-gehemmte TEA Aufnahme ermittelten IC₅₀-Werte stiegen mit sinkendem pH-Wert von 1.5 µM bei einem pH-Wert von 8.4 auf 38 µM bei pH 6.0 an (Abb. 18). Da bei einem pH Wert von 6.0 99 % der Chininmoleküle eine positive Ladung besitzen, können diese nur noch schwerlich passiv durch die Plasmamembran diffundieren. Der hohe IC₅₀ repräsentiert also die Affinität des Chinins von seiner Außenseite. Bei diesem pH-Wert wurde ganz deutlich eine Kompetition des Substrats TEA mit dem Inhibitor Chinin festgestellt. Die intrazelluläre Interaktion zwischen Chinin und rOCT2 geschieht wahrscheinlich in dessen nach innen gerichteter Konformation, welche durch die

hohe Affinität repräsentiert wird. Bei einem pH-Wert von 7.4 ist die Form der Inhibition der TEA Aufnahme durch Chinin eindeutig nicht-kompetitiv (Arndt et al., 2001). Dass die veränderten Affinitäten nicht auf eine eventuelle Protonensensitivität des Transporters hinwies, ist durch die Versuche mit TBuA gezeigt worden. Dieser Inhibitor besitzt eine ähnliche Affinität wie Chinin, ist permanent geladen und somit nicht membranpermeabel. Die pH-Wert Verschiebungen hatten keine Auswirkung auf die IC_{50} -Werte der TBuA inhibierten TEA Aufnahme. Es blieb weiterhin ungewiss, ob die ungeladene Form des Chinins von der Membranseite her den Transporter hemmt, oder aber bei einem ungefähren intrazellulären pH-Wert von 7.1 nur die geladenen Chininmoleküle interagieren.

Eine Auswirkung des Grads der Ionisierung wurde auch am hOCT2 Protein von einer anderen Arbeitsgruppen beschrieben. Als Substrat wurde hier Cimetidin verwendet, welches einen pK-Wert von 6.9 besitzt (Barendt und Wright, 2002).

Mit diesen Experiment wurde deutlich, dass Chinin durch die Plasmamembran diffundieren kann und rOCT2 von innen hemmt, so dass eine nicht-kompetitive Hemmung der Substrataufnahme durch rOCT2 beobachtet wurde. Die Verschiebung der IC_{50} -Werte bei unterschiedlichen pH-Werten auf Grund einer pH-Sensitivität von rOCT2, konnte mit Hilfe des permanent geladenen Inhibitors TBuA ausgeschlossen werden.

5 Zusammenfassungen

5.1 Zusammenfassung

Durch Expressionsklonierung wurde 1994 der erste organische Kationentransporter, rOCT1, aus der Ratte isoliert (Gründemann et al., 1994). 1999 wurde eine Aminosäure in der 11. Transmembrandomäne von rOCT1 entdeckt, welche Teil der Substratbindungstasche dieses Transporters war (Gorboulev et al., 1999). Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es weitere funktionell relevante Aminosäuren zu identifizieren. Ein Vergleich der „Helical Wheels“ aller 12 hypothetischen Transmembrandomänen zeigte eine Akkumulation von 5 OCT und OCTN spezifischen Aminosäuren in der vierten Transmembrandomäne auf einer Seite.

Bei diesen Aminosäuren handelte es sich um *K215*, *W218*, *Y222*, *T226* und *V229*. Es wurden verschiedene Punktmutationen an diesen Positionen eingeführt. Es zeigte sich mit Hilfe radioaktiv markierter Substrate von rOCT1, dass selbst Substitutionen durch strukturell verwandte Aminosäuren bei den flankieren Aminosäuren zu einem Ausfall des rOCT1 vermittelten Substrattransport führte. Weiterhin schien an Position 218 für den rOCT1-vermittelten Transport von TEA eine aromatische Aminosäure von großer funktioneller Relevanz zu sein. Wir vermuten hier eine Kationen π -Elektronen Interaktion des aromatischen Ringsystems des *Tryptophans* mit der positiven Ladung des TEA.

Versuche mit den Mutanten des *Tyrosins* 222 zeigten ebenfalls Änderungen bei den Transportraten und Affinitäten verschiedener Substrate. Eine Kationen- π Interaktion konnte ausgeschlossen werden, jedoch war die Affinität der Mutante *Y222F* zum TPeA um einen Faktor 20 gegenüber dem Wildtyp erhöht. Weiterführende Untersuchungen mit der Zwei-Elektrodenspannungsklemme zeigten unterschiedliche Affinitäten des TPeA zum Wildtyp im Vergleich zum mutierten Protein in seiner nach außen bzw. nach innen gerichteten Konformation. War die Form der Inhibierung des TEA-induzierten Stromes durch TPeA beim Wildtyp kompetitiv, so zeigte sie bei der Mutante einen nicht-kompetitiven Charakter.

Die Mutante *T226A* zeigte ebenfalls Änderungen in Affinität und Selektivität. Bei allen transportierenden Mutanten zeigte sich, dass der Transport von MPP nicht oder kaum verändert war, hingegen wurden sehr starke Änderungen der Transportcharakteristika von TEA gefunden, was auf verschiedene Substratbindungsstellen in rOCT1 hinweist.

Diese Versuche zeigen deutlich die funktionelle Relevanz und die Beteiligung der mutierten Aminosäurepositionen an der Substratbindetasche von rOCT1.

In Versuchen, in welchen Chinin als Inhibitor des rOCT2 vermittelten Transports genutzt wurde, passierte Chinin mittels Diffusion in seiner ungeladenen Form die Oozytenmembran und hemmte rOCT2 von der Innenseite. Dies könnte der Grund für die nicht-kompetitive Form der Inhibition der TEA-Aufnahme durch Chinin sein. Diese Versuche wurden dadurch bestätigt, dass die protonierte Form des Chinins eine kompetitive Form der Inhibition zeigte und den Transporter von außen hemmte.

5.2 Summary

The first organic cation transporter was cloned from rat (rOCT1) in 1994 by using the expression cloning technique (Gründemann et al., 1994). In 1999 it was found that one of the aminoacids in the 11th transmembranedomain of rOCT1, is part of its substrate binding pocket (Gorboulev et al., 1999). It was the aim of this thesis to identify more aminoacids of functional relevance for this transport protein. A comparison of all 12 helical wheels of the transporter showed, that there is an accumulation of 5 OCT and OCTN specific aminoacids at one side of the α -helix. These aminoacids were *K215*, *W218*, *Y222*, *T226* and *V229*. Different single point mutations have been generated at these positions. Using radiolabeled substrates for rOCT1, the experiments showed, that even a substitution by a structural related aminoacid at the flanking aminoacids resulted in a failure of substrate transport. For TEA transport it has been suggested that the aminoacid at position *218* should have aromatic properties. We therefor suggest a cation- π interaction between the aromatic ringsystem of *W218* and the positive charge of TEA.

Experiments with mutations in position *Y222* also showed differences in transport rates and affinities referring to the wildtype using different substrates. A cation- π interaction could be excluded, but it was shown, that there was a 20fold increased affinity of TPeA for the mutant *Y222F*. Further experiments utilizing the two electrode voltage clamp technique showed different affinities for wildtype rOCT1 in comparison to the mutated protein in its outward and inward conformation. The wildtype showed a competitive type of inhibition for TPeA inhibited TEA current, the mutant showed a non-competitive type of inhibition.

The mutant *T226A* also showed changes in affinity and selectivity.

In all transporting mutants we found no or lowest changes in the transport characteristics of MPP, but very big changes in the transport characteristics of TEA, an indication for different binding sites for these substrates. The experiment clearly showed, that these five aminoacids are of functional relevance for rOCT1 transport.

In experiments using quinine as inhibitor of rOCT2 mediated transport quinine in its uncharged form passed the oocyte membrane by diffusion and inhibited rOCT2 from the inside. This might be the reason for the non-competitive type of inhibition, using quinine as the inhibitor for TEA uptake. This hypothesis was confirmed when we showed that the type of inhibition changed into the competitive type, when we used the protonated form of quinine.

6 Literaturverzeichnis

- Abramson J., I. Smirnova, V. Kasho, G. Verner, S. Iwata und H.R. Kaback. „The lactose permease of *Escherichia coli*: overall structure, the sugar-binding site and the alternating access model for transport.” *FEBS Lett* 555 (2003a):96-101.
- Abramson J., I. Smirnova, V. Kasho, G. Verner, S. Iwata und H.R. Kaback. „Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*.” *Science* 301 (2003b):603- 604.
- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts und M.J. Watson. „*Molecular biology of the cell*.“ 2 Ed. New York & London: Garland Publishing, Inc., 1989.
- Arndt, P., C. Volk, V. Gorboulev, T. Budiman, C. Popp, I. Ulzheimer-Teuber, A. Akhoundova, S. Koppatz, E. Bamberg, G. Nagel und H. Koepsell. „Interactions of cations, anions, and weak base quinine with rat renal cation transporter rOCT2 compared with rOCT1.“ *Am J Physiol Renal Physiol* 281(2001):F454-F468.
- Ashton, K. und H. Koepsell. „Measurement of Na⁺/K⁺-ATPase activity in segments of proximal tubules from superficial and juxtamedullary rat nephrons during antidiuresis.“ *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 363(1976):251-253.
- Bahn, A., D. Prawitt, D. Buttler, G. Reid, T. Enklaar, N.A. Wolff, C. Ebbinghaus, A. Hillemann, H.-J. Schulten, B. Gunawan, L. Füzesi, B. Zabel und G. Burckhardt. „Genomic structure and in vivo expression of the human organic anion transporter 1 (hOAT1) gene.“ *Biochem Biophys Res Co* 275(2000):623-630.
- Barendt, W.M. und S.H. Wright. „The human organic cation transporter (hOCT2) recognizes the degree of substrate ionization.“ *J Biol Chem* 277(2002):22491-22496.
- Bennett, E.R., H. Su und B.I. Kanner. „Mutation of arginine 44 of GAT-1, a (Na⁺ + Cl⁻)-coupled γ -aminobutyric acid transporter from rat brain, impairs net flux but not exchange.“ *J Biol Chem* 275(2000):34106-34113.

-
- Biemesderfer, D., J. Pizzonia, A. Abu-Alfa, M. Exner, R. Reilly, P. Igarashi und P.S. Aronson. „NHE3: a Na⁺/H⁺ exchanger isoform of renal brush border.“ *Am J Physiol* 265(1993):F736-F742.
- Bradford, M. „A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding.“ *Anal Biochem* 72(1976):248-254.
- Brooks, H. und S. Krähenbühl. „Identification and tissue distribution of two differentially spliced variants of the rat carnitine transporter OCTN2.“ *FEBS Lett* 508(2001):175-180.
- Budiman, T., E. Bamberg, H. Koepsell und G. Nagel. „Mechanism of electrogenic cation transport by the cloned organic cation transporter 2 from rat.“ *J Biol Chem* 275(2001):29413-29420.
- Busch, A.E., U. Karch, D. Miska, V. Gorboulev, A. Akhoundova, C. Volk, P. Arndt, J.C. Ulzheimer, M.S. Sonders, C. Baumann, S. Waldegger, F. Lang und H. Koepsell. „Human neurons express the polyspecific cation transporter hOCT2, which translocates monoamine neurotransmitters, amantadine, and memantine.“ *Mol Pharmacol* 54(1998):342-352.
- Busch, A.E., S. Quester, J.C. Ulzheimer, V. Gorboulev, A. Akhoundova, S. Waldegger, F. Lang und H. Koepsell. „Monoamine neurotransmitter transport by the polyspecific cation transporter rOCT1.“ *FEBS Letters* 395(1996a):153-156.
- Busch, A.E., S. Quester, J.C. Ulzheimer, S. Waldegger, V. Gorboulev, P. Arndt, F. Lang und H. Koepsell. „Electrogenic properties and substrate specificity of the polyspecific rat cation transporter rOCT1.“ *J Biol Chem* 271(1996b):32599-32604.
- Calabresi, P., D. Centonze und G. Bernardi. „Electrophysiology of dopamine in normal and denervated striatal neurons.“ *Trends Neurosci* 23(2000):S57-S63.
- Cha, S.H., T. Sekine, J.I. Fukushima, Y. Kanai, Y. Kobayashi, T. Goya und H. Endou. „Identification and characterization of human organic anion transporter 3 expressing predominantly in the kidney.“ *Mol Pharmacol* 59(2001):1277-1286.

-
- Cha, S.H., T. Sekine, H. Kusuvara, E. Yu, J.Y. Kim, D.K. Kim, Y. Sugiyama, Y. Kanai und H. Endou. „Molecular cloning and characterization of multispecific organic anion transporter 4 expressed in placenta.“ *J Biol Chem* 275(1999):4507-4512.
- Chang, G. und C. Roth. „Structure of MsbA from *E. coli*: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters.“ *Science* 293(2001):1793-1800.
- Denison, M.S. und J.P.J. Whitlock. „Xenobiotic-inducible transcription of cytochrom P450 genes.“ *J Biol Chem* 270(1995):18175-18178.
- Dougherty, D.A. „Cation- π interactions in chemistry and biology: a new view of benzene, phe, tyr, and trp.“ *Science* 271(1996):163-168.
- Dower, W.J., J.S. Miller und C.W. Ragsdale. „High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation.“ *Nucleic Acid Res* 16(1988):6217-6145.
- Dumont, J.N. „Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). 1. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals.“ *J Morphol* 136(1972):153-180.
- Enomoto, A., M.F. Wempe, H. Tsuchida, H.J. Shin, S.H. Cha, N. Anzai, A. Goto, K. Sakamoto, T. Niwa, Y. Kanai, M.W. Anders und H. Endou. „Molecular identification of a novel carnitine transporter specific to human testis.“ *J Biol Chem* 277(2002):36262-36271.
- Eraly, S.A. und S.K. Nigam. „Novel human cDNAs homologous to *Drosophila* Orct and mammalian carnitine transporters.“ *Biochem Biophys Res Co* 297(2002):1159-1166.
- Feng, B., M.J. Dresser, Y. Shu, S.J. Johns und K.M. Giacomini. „Arginine 454 and lysine 370 are essential for the anion specificity of the organic anion transporter, rOAT3.“ *Biochemistry* 40(2001):5511-5520.
- Fleming, K.G. „Riding the wave: structural and energetic principles of helical membrane proteins.“ *Curr Opin Cell Biol* 4(2000):148-151.(Abstract)
- Francis, P.T., A.M. Palmer, M. Snape und G.K. Wilcock. „The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress.“ *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 66(1999):137-147.

-
- Gallivan, J.P. und D.A. Dougherty. „Cation-pi interactions in structural biology.“ *Proc Natl Acad Sci* 96(1999):9459-9464.
- Geering, K., I. Theulaz, F. Verrey, M.T. Hauptle und B.C. Rossier. „A role for the beta-subunit in the expression of functional Na⁺-K⁺-ATPase in *Xenopus* oocytes.“ *Am J Physiol* 257(1989):C851-C858.
- George, R.L., X. Wu, W. Huang, Y.-J. Fei, F.H. Leibach und V. Ganapathy. „Molecular cloning and functional characterization of a polyspecific organic anion transporter from *Caenorhabditis elegans*.“ *J Pharmacol Exp Ther* 291(1999):596-603.
- Gershoni, J.M. und G.E. Palade. „Protein blotting: principles and applications.“ *Analytical Biochemistry* 131(1983):1-15.
- Giros, B., S.E. Mestikawy, L. Bertrand und M.G. Caron. "Cloning and functional characterization of a cocaine-sensitive dopamine transporter." *FEBS Lett.* 295(1991):149-154.
- Gong, S., X. Lu, Y. Xu, C. Swiderski, C. Jordan und J. Moscow. „Identification of OCT6 as a novel organic cation transporter preferentially expressed in hematopoietic cells and leukemias.“ *Exp Hematol* 30(2002):1162-1169.
- Goralski, K.B., G. Lou, M.T. Prowse, V. Gorboulev, C. Volk, H. Koepsell und D.S. Sitar. „The cation transporters rOCT1 and rOCT2 interact with bicarbonate but play only a minor role for amantadine uptake into rat renal proximal tubule.“ *J Pharmacol Exp Ther* 303(2002):959-968.
- Gorboulev, V., J.C. Ulzheimer, A. Akhoundova, I. Ulzheimer-Teuber, U. Karbach, S. Quester, C. Baumann, F. Lang, A.E. Busch und H. Koepsell. „Cloning and characterisation of two human polyspecific organic cation transporters.“ *DNA Cell Biol* 16(1997):871-881.
- Gorboulev, V., C. Volk, P. Arndt, A. Akhoundova und H. Koepsell. „Selectivity of the polyspecific cation transporter rOCT1 is changed by mutation of aspartate 475 to glutamate.“ *Mol Pharmacol* (1999):1254-1261.

-
- Green, R.M., K. Lo, C. Sterritt und D.R. Beier. „Cloning and functional expression of a mouse liver organic cation transporter.“ *Hepatology* 29(1999):1556-1562.
- Gründemann, D., J. Babin-Ebell, F. Martel, N. Örding, A. Schmidt und E. Schömig. „Primary structure and functional expression of the apical organic cation transporter from kidney epithelial LLC-PK₁ cells.“ *J Biol Chem* 272(1997):10408-10413.
- Gründemann, D., V. Gorboulev, S. Gambaryan, M. Veyhl und H. Koepsell. „Drug excretion mediated by an new prototype of polyspecific transporter.“ *Nature* 372(1994):549-552.
- Gründemann, D., B. Schechinger, G.A. Rappold und E. Schömig. „Molecular identification of the corticosterone-sensitive extraneuronal catecholamine transporter.“ *Nature neuroscience* 1(1998):349-352.
- Gurdon, J.B., C.D. Lane, H.R. Woodland und G. Marbaix. „Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells.“ *Nature* 233(1971):177-182.
- Heginbotham, L. und R. MacKinnon. „The aromatic binding site for tetraethylammonium ion on potassium channels.“ *Neuron* 8(1992):483-491.
- Ho, S.N., H.D. Hunt, R.M. Horton, J.K. Pullen und L.R. Pease. „Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction.“ *Gene* 77(1989):51-59.
- Hyde, T.M. und J.M. Crook. „Cholinergic systems and schizophrenia: primary pathology or epiphenomena?“ *J Chem Neuroanat* 22(2001):53-63.
- Isacson, O., H. Seo, L. Lin, D. Albeck und A.C. Granholm. „Alzheimer's disease and Down's syndrome: roles of APP, trophic factors and ACh.“ *Trends Neurosci.* 25(2002):79-84.
- Karbach, U., J. Kricke, F. Meyer-Wentrup, V. Gorboulev, C. Volk, D. Loffing-Cueni, B. Kaissling, S. Bachmann und H. Koepsell. „Localization of organic cation transporters OCT1 and OCT2 in rat kidney.“ *Am J Physiol Renal Physiol* 279(2000):F679-F687.
- Kavanaugh, M.P., A. Bendahan, N. Zerangue, Y. Zhang und B.I. Kanner. „Mutation of an amino acid residue influencing potassium coupling in the glutamate transporter GLT-1 induces obligate exchange.“ *J Biol Chem* 272(1997):1703-1708.

-
- Kawasaki-Nishi, S., T. Nishi und M. Forgac. „Arg-735 of the 100-kDa subunit a of the yeast V-ATPase is essential for proton translocation.“ *Proc Natl Acad Sci*(2001):12397-12402.
- Kekuda, R., P.D. Prasad, X. Wu, H. Wang, Y.-J. Fei, F.H. Leibach und V. Ganapathy. „Cloning and functional characterization of a potential-sensitive, polyspecific organic cation transporter (OCT3) most abundantly expressed in placenta.“ *J Biol Chem* 273(1998):15971-15979.
- Kim, M.-H., M. Lu, E.-J. Lim, Y.-G. Chai und L.B. Hersh. „Mutational analysis of aspartate residues in the transmembrane regions and cytoplasmic loops of rat vesicular acetylcholine transporter.“ *J Biol Chem* 274(1999):673-680.
- Kim, M.-H., M. Lu, E.-J. Lim, Y.-G. Chai und L.B. Hersh. „Mutational analysis of basic residues in the rat vesicular acetylcholine transporter. Identification of a transmembrane ion pair and evidence that histidine is not involved in proton translocation.“ *J Biol Chem* 275(2000):6175-61780.
- Kimura, H., M. Takeda, S. Narikawa, A. Enomoto, K. Ichida und H. Endou. „Human organic anion transporters and human organic cation transporters mediate renal transport of prostaglandins.“ *J Pharmacol Exp Ther* 301(2002):293-298.
- King, S.C., C.L. Hansen und T.H. Wilson. „The interaction between aspartic acid 237 and lysine 358 in the lactose carrier of *Escherichia coli*.“ *Biochim Biophys Acta* 1062(1991):177-186.
- Koepsell, H. „Organic cation transporters in intestine, kidney, liver, and brain.“ *Annu Rev Physiol* 60(1998):243-266.
- Koepsell, H., V. Gorboulev und P. Arndt. „Molecular pharmacology of organic cation transporter in kidney.“ *J Membr Biol* 167(1999):103-117.
- Koepsell, H., V. Gorboulev, C. Popp, J.E.v. Montfoort, P.J. Meier, P. Arndt und C. Volk. Organic cation transporters in the sinusoidal membrane of hepatocytes. In: *Hepatobiliary transport: From bench to bedside*. Edited by Matern, S., J.L. Boyer, D. Keppler, and P.J. Meier-Abt. Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publishers, 2001, S.3-15.

-
- Koolmann, J. und K.-H. Röhm. „*Taschenatlas der Biochemie*.“ 2. Ed. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 1998.
- Kusuhara, H., T. Sekine, N. Utsunomiya-Tate, M. Tsuda, R. Kojima, S.H. Cha, Y. Sugiyama, Y. Kanai und H. Endou. „Molecular cloning and characterization of a new multispecific organic anion transporter from rat brain.“ *J Biol Chem* 274(1999):13675-13680.
- Laemmli, U.K., F. Beguin und G. Gujer-Kellerberger. „A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation.“ *J Mol Biol* 47(1970):69-85.
- Lane, C.D. „The fate of genes, messengers, and proteins introduced into *Xenopus* oocytes.“ *Curr Top Dev Biol* 18(1983):89-116.
- Lesch, K.P., B.L. Wolozin, H.C. Estler, D.L. Murphy und P. Riederer. "Isolation of a cDNA encoding the human brain serotonin transporter." *J Neural Transm Gen Sect* 91(1993):67-72.
- Lindl, T. und J. Bauer. „*Zell- und Gewebekultur*.“ Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1987.
- Lu, K., H. Ishimori, Y. Akamura, K. Hima und M. Uwajima. „A missense mutation of mouse OCTN2, a sodium-dependent carnitine cotransporter, in the juvenile visceral steatosis mouse.“ *Biochem Biophys Res Co* 252(1998):590-594.
- Lucas, K.A., G.M. Pitari, S. Kazerounian, I. Ruiz-Stewart, J. Park, S. Schulz, K.P. Chepenik und S.A. Waldman. „Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP.“ *Pharmacol Rev* 52(2000):375-413.
- Ma, J.C. und D.A. Dougherty. „The cation- π interaction.“ *Chemical Reviews* 97(1997):1303-1324.
- MacKinnon, R. und G. Yellen. „Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage-activated K^+ channels.“ *Science* 250(1990):276-279.
- McMaster, G.K. und G.G. Camichael. „Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacryamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange.“ *Proc Natl Acad Sci* 74(1977):4835-4838.

-
- Mehrens, T., S. Lelleck, I. Cetinkaya, M. Knollmann, H. Hohage, V. Gorboulev, P. Boknik, H. Koepsell und E. Schlatter. „The affinity of the organic cation transporter rOCT1 is increased by protein kinase C-dependent phosphorylation.“ *J Am Soc Nephrol* 11(2000):1216-1224.
- Merickel, A., P. Rosandich, D. Peter und R.H. Edwards. „Identification of residues involved in substrate recognition by a vesicular monoamine transporter.“ *J Biol Chem* 270(1995):25798-25804.
- Meyer-Wentrup, F., U. Karbach, V. Gorboulev, P. Arndt und H. Koepsell. „Membrane localization of the electrogenic cation transporter rOCT1 in rat liver.“ *Biochem Biophys Res Co* 248(1998):673-678.
- Mooslehner, K.A. und N.D. Allen. „Cloning of the mouse organic cation transporter 2 gene, Slc22a2, from an enhancer-trap transgene integraton locus.“ *Mammalian Genome* 10(1999):218-224.
- Moseley, R.H., S.M. Jarose und P. Permod. „Organic cation transport by rat liver plasma membrane vesicles: studies with tetraethylammonium.“ *Am J Physiol* 263(1992):G775-G785.
- Motohashi, H., Y. Sakurai, H. Saito, S. Masuda, Y. Urakami, M. Goto, A. Fukatsu, O. Ogawa und K.K. Inui. „Gene expression levels and immunolocalization of organic ion transporters in the human kidney.“ *J Am Soc Nephrol* 13(2002):866-874.
- Nagel, G., C. Volk, T. Friedrich, J.C. Ulzheimer, E. Bamberg und H. Koepsell. „A reevaluation of substrate specificity of the rat cation transporter rOCT1.“ *J Biol Chem* 272(2001):31953-34956.
- Nezu, J., I. Tamai, A. Oku, R. Ohashi, H. Yabuuchi, N. Hashimoto, H. Nikaido, Y. Sai, A. Koizumi, Y. Shoji, G. Takada, T. Matsuishi, M. Yoshino, H. Kato, T. Ohura, G. Tsujimoto, J. Hayakawa, M. Shimane und A. Tsuji. „Primary systemic carnitine deficiency is caused by mutations in a gene encoding sodium ion-dependent carnitine transporter.“ *Nat Genet* 21(1999):91-94.

-
- Okuda, M., H. Saito, Y. Urakami, M. Takano und K.-I. Inui. „cDNA cloning and functional expression of a novel rat kidney organic cation transporter, OCT2.“ *Biochem Biophys Res Co* 224(1996):500-507.
- Paladichuk, A. „How the western was won: A profile of tools and kits available for western blotting.“ *The Scientist* 13(1999):1-8.
- Pietig, G., T. Mehrens, J.R. Hirsch, I. Cetinkaya, H. Piechota und E. Schlatter. „Properties and regulation of organic cation transport in freshly isolated human proximal tubules.“ *J Biol Chem* 276(2001):33741-33746.
- Pourcher, T., M.-L. Zani und G. Leblanc. „Mutagenesis of acidic residues in putative membrane-spanning segments of the melibiose permease of *Escherichia coli* I. Effect on Na⁺-dependent transport and binding properties.“ *J Biol Chem* 268(1993):3209-3215.
- Pritchard, J.B. und D.S. Miller. „Renal secretion of organic cations: a multistep process.“ *Advanced Drug Delivery Reviews* in press(1996)
- Race, J.E., S.M. Grassl, W.J. Williams und E.J. Holtzman. „Molecular cloning and characterization of two novel human renal organic anion transporters (hOAT1 and hOAT3).“ *Biochem Biophys Res Co* 255(1999):508-514.
- Ross, C.R. und P.D. Holohan. „Transport of organic anions and cations in isolated renal plasma membranes.“ *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 23(1983):65-85.
- Saito, H., S. Masuda und K.-I. Inui. „Cloning and functional characterization of a novel rat organic anion transporter mediating basolateral uptake of methotrexate in the kidney.“ *J Biol Chem* 271(1996):20719-20725.
- Sambrock, E., E. Fritsch und T. Maniatis. „*Molecular cloning, a laboratory manual.*“ Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Schlatter, E., V. Monnich, I. Cetinkaya, T. Mehrens, G. Ciarimboli, J.R. Hirsch, C. Popp und H. Koepsell. „The organic cation transporters rOCT1 und hOCT2 are inhibited by cGMP.“ *J Membr Biol* 189(2002):237-244.

-
- Schömig, E., F. Spitzenberger, M. Engelhardt, F. Martel, N. Örding und D. Gründemann. „Molecular cloning and characterization of two novel transport proteins from rat kidney.“ *FEBS Letters* 425(1998):79-86.
- Schrøder, R.L., B.S. Jensen, D. Strøbæk, S.P. Olesen, and P. Christophersen. „Activation of the human, intermediate-conductance, Ca²⁺-activated K⁺ channel by methylxanthines.“ *Pflug Arch Eur J Physiol* 440(2000):809-818.(Abstract)
- Schurmann, A., H. Doege, H. Ohnimus, V. Monser, A. Buchs und H.G. Joost. „Role of conserved arginine and glutamate residues on the cytosolic surface of glucose transporters for transporter function.“ *Biochemistry* 36(1997):12897-12902.
- Schweifer, N. und D.P. Barlow. „The *Lx1* gene maps to mouse chromosome 17 and codes for a protein that is homologous to glucose and polyspecific transmembrane transporters.“ *Mammalian Genome* 7(1996):735-740.
- Sekine, T., S.H. Cha, M. Tsuda, N. Apiwattanakul, N. Nakajima, Y. Kanai und H. Endou. „Identification of multispecific organic anion transporter 2 expressed predominantly in the liver.“ *FEBS Letters* 429(1998a):179-182.
- Sekine, T., H. Kusuhara, N. Utsunomiya-Tate, M. Tsuda, Y. Sugiyama, Y. Kanai und H. Endou. „Molecular cloning and characterization of high-affinity carnitine transporter from rat intestine.“ *Biochem Biophys Res Co* 251(1998b):586-591.
- Slitt, A.L., N.J Cherrington, D.P Hartley, T.M Leazer und C.D. Klaassen. Tissue distribution and renal developmental changes in rat organic cation transporter mRNA levels. *Drug Metabolism and Disposition* 30(2002):212-219
- Somogyi, A. „New insights into the renal secretion of drugs.“ *TiPS* 8(1987):354-357.
- Song, H., G. Ming, E. Fon, E. Bellocchio, R.H. Edwards und M. Poo. „Expression of a putative vesicular acetylcholine transporter facilitates quantal transmitter packaging.“ *Neuron* 18(1997):815-826.
- Steiner-Mordoch, S., A. Shirvan und S. Schuldiner. „Modification of the pH profile and tetrabenazine sensitivity of rat VMAT1 by replacement of aspartate 404 with glutamate.“ *J Biol Chem* 271(1996):13048-13054.

-
- Stryer, L. „*Biochemie*.“ 4. Ed. Heidelberg, Berlin, New York: Spektrum Verlag, 1991.
- Sweet, D.H., D.S. Miller und J.B. Pritchard. „Basolateral localization of organic cation transporter 2 in intact renal proximal tubules.“ *Am J Physiol Renal Physiol* 279(2000):F826-F834.
- Sweet, D.H., N.A. Wolff und J.B. Pritchard. „Expression cloning and characterization of ROAT1, the basolateral organic anion transporter in rat kidney.“ *J Biol Chem* 272(1997):30088-30095.
- Tamai, I., K. China, Y. Sai, D. Kobayashi, J.-I. Nezu, E. Kawahara und A. Tsuji. „Na⁺-coupled transport of L-carnitine via high-affinity carnitine transporter OCTN2 and its subcellular localization in kidney.“ *Biochim Biophys Acta* 1512(2001):273-284.
- Tamai, I., R. Ohashi, J.-I. Nezu, Y. Sai, D. Kobayashi, A. Oku, M. Shimane und A. Tsuji. „Molecular and functional characterization of organic cation/carnitine transporter family in mice.“ *J Biol Chem* 275(2000):40064-40072.
- Tamai, I., R. Ohashi, J. Nezu, H. Yabuuchi, A. Oku, M. Shimane, Y. Sai und A. Tsuji. „Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2.“ *J Biol Chem* 273(1998):20378-20382.
- Tamai, I., R. Ohashi, J. Nezu, Y. Sai, D. Kobayashi, A. Oku, M. Shimane und A. Tsuji. „Molecular and functional characterization of organic Cation/Carnitine transporter family in mice.“ *J Biol Chem* 275(2000):40064-40072.
- Tamai, I., H. Yabuuchi, J. Nezu, Y. Sai, A. Oku, M. Shimane und A. Tsuji. „Cloning and characterization of a novel human pH-dependent organic cation transporter, OCTN1.“ *FEBS Lett* 419(1997):107-111.
- Tang, N.L.S., V. Ganapathy, X. Wu, P. Seth, P.M.P. Yuen, T.F. Fok und W. Huang. „Mutations of OCTN2, an organic cation/carnitine transporter, lead to deficient cellular carnitine uptake in primary carnitine deficiency.“ *Hum Mol Genet* 8(1999):655-660.

-
- Taylor, C.A.M., K.N. Stanley und A.D. Shirras. „The *Orct* gene of *Drosophila melanogaster* codes for a putative organic cation transporter with 6 or 12 transmembrane domains.“ *Gene* 201(1997):69-74.
- Terashita, S., M.J. Dresser, L. Zhang, A.T. Gray, S.C. Yost und K.M. Giacomini. „Molecular cloning and functional expression of a rabbit renal organic cation transporter.“ *Biochim Biophys Acta* 1369(1998):1-6.
- Towbin, H., T. Staehelin und J. Gordon. „Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.“ *Proc Natl Acad Sci* 76(1979):4350-4354.
- Ullrich, K.J. „Specificity of transporters for „organic anions“ and „organic cations“ in the kidney.“ *Biochim Biophys Acta* 1197(1994):45-62.
- Urakami, Y., M. Akazawa, H. Saito, M. Okuda und K. Inui. „cDNA cloning, functional characterization, and tissue distribution of an alternatively spliced variant of organic cation transporter hOCT2 predominantly expressed in the human kidney.“ *J Am Soc Nephrol* 13(2002):1703-1710.
- Urakami, Y., M. Okuda, S. Masuda, H. Saito und K.-I. Inui. „Functional characteristics and membrane localization of rat multispecific organic cation transporters, OCT1 and OCT2, mediating tubular secretion of cationic drugs.“ *J Pharmacol Exp Ther* 287(1998):800-805.
- Van Montfoort, J.E., B. Hagenbuch, K.E. Fattinger, M. Müller, G.M.M. Groothuis, D.K.F. Meijer und P.J. Meier. „Polyspecific organic anion transporting polypeptides mediate hepatic uptake of amphipathic type II organic cations.“ *J Pharmacol Exp Ther* 291(1999):147-152.
- Van Montfoort, J.E., M. Müller, G.M.M. Groothuis, D.K.F. Meijer, H. Koepsell und P. J. Meier. „Comparison of "Type I" and "Type II" Organic Cation Transport by Organic Cation Transporters and Organic Anion-Transporting Polypeptides.“ *J Pharmacol Exp Ther* Vol. 298(2001), 110-115.
- Verhaagh, S., N. Schweifer, D.P. Barlow und R. Zwart. „Cloning of the mouse and human solute carrier 22a3 (Slc22a3/SLC22A3) identifies a conserved cluster of three organic

-
- cation transporters on mouse chromosome 17 and human 6q26-q27.“ *Genomics* 55(1999):209-218.
- Volk, C., V. Gorboulev, T. Budimann, G. Nagel und H. Koepsell. „Different affinities of inhibitors to the outwardly and inwardly directed substrate binding site of organic cation transporter 2.“ *Mol Pharmacol* 64(2003):1037-1047
- Walace, D.M. „Large- and small-scale phenol extractions.“ *Methods Enzymol* 152(1987):33-41.
- Wilson, D.M. und T.H. Wilson. „Asp-51 and Asp-120 are important for the transport function of the *Escherichia coli* melibiose carrier.“ *J Bacteriol* 174(1992):3083-3086.
- Wu, X., Y.-J. Fei, W. Huang, C. Chancy, F.H. Leibach und V. Ganapathy. „Identity of the F52F12.1 gene product in *Caenorhabditis elegans* as an organic cation transporter.“ *Biochim Biophys Acta* 1418(1999):239-244.
- Wu, X., R.L. George, W. Huang, H. Wang, S.J. Conway, F.H. Leibach und V. Ganapathy. „Structural and functional characteristics and tissue distribution pattern of rat OCTN1, an organic cation transporter, cloned from placenta.“ *Biochim Biophys Acta* 1466(2000a):315-327.
- Wu, X., W. Huang, M.E. Ganapathy, H. Wang, R. Kekuda, S.J. Conway, F.H. Leibach und V. Ganapathy. „Structure, function, and regional distribution of the organic cation transporter OCT3 in the kidney.“ *Am J Physiol Renal Physiol* 279(2000b):F449-F458.
- Wu, X., W. Huang, P.D. Prasad, P. Seth, D.P. Rajan, F.H. Leibach, J. Chen, S.J. Conway und V. Ganapathy. „Functional characteristics and tissue distribution pattern of organic cation transporter 2 (OCTN2), an organic cation/carnitine transporter.“ *J Pharmacol Exp Ther* 290(1999):1482-1492.
- Yabuuchi, H., I. Tamai, J.-I. Nezu, K. Sakamoto, A. Ku, M. Himane, Y. Ai und A. Suji. „Novel membrane transporter OCTN1 mediates multispecific, bidirectional, and pH-dependent transport of organic cations.“ *J Pharmacol Exp Ther* 289(1999):768-773.

-
- Yamaguchi, A., T. Akasaka, N. Ono, Y. Someya, M. Nakatani und T. Sawai. „Metal-tetracycline/H⁺ antiporter of *Escherichia coli* encoded by transposon Tn10.“ *J Biol Chem* 267(1992):7490-7498.
- Zhang, L., M.J. Dresser, A.T. Gray, S.C. Yost, S. Terashita und K.M. Giacomini. „Cloning and functional expression of a human liver organic cation transporter.“ *Mol Pharmacol* 51(1997):913-921.
- Zhang, X., K.K. Evans und S.H. Wright. „Molecular cloning of rabbit organic cation transporter rbOCT2 and functional comparison with rbOCT1.“ *Am J Physiol Renal Physiol* 283(2002):F124-F133.
- Zhong, W., J.P. Gallivan, Y. Zhang, L. Li, H.A. Lester und D.A. Dougherty. „From ab initio quantum mechanics to molecular neurobiology: a cation-pi binding site in the nicotinic receptor.“ *Proc Natl Acad Sci* 95(1995):12088-12093.

7 Anhang

7.1 Punktmutationen geladenener Aminosäuren von rOCT1

Zur Identifizierung für den Transport von organischen Kationen funktionell relevanter Aminosäuren von rOCT1 wurde zunächst eine Strategie verfolgt, welche von vielen Arbeitsgruppen genutzt wird, die mit Iontentransportern oder –kanälen arbeiten: Es wurde nach konservierten, geladenen Aminosäuren gesucht. Eine starke Konservierung könnte auf die Wichtigkeit für die Funktionalität des Transporters hinweisen, im Falle von Kationentransportern bzw. Kanälen sind es negativ geladene Aminosäuren, im Falle von Anionentransportern bzw. –kanälen sind es die positiv geladene Aminosäuren, welche ein Substrat z.B. an einen Transporter binden könnten. Diese Aminosäuren wurden dann ersetzt und das Transportprotein bzw. der Kanal auf eine Veränderung seiner Transport bzw. Kanaleigenschaften überprüft (Bennett et al., 2000; Feng et al., 2001; Kavanaugh et al., 1997; Kim et al., 1999). Im Falle des organischen Kationentransporters rOCT1, führte dieser Ansatz schnell zum Erfolg (Gorboulev et al., 1999). Wurde das negativ geladene *Aspartat* 475 gegen ein positiv geladenes *Arginin* ausgetauscht, so ging die Fähigkeit Kationen zu transportieren verloren. Bei einem Austausch gegen das ebenfalls negativ geladene *Glutamat* erhöhten sich die Affinitäten und die Selektivität für bestimmte Kationen wurde verändert. Im Rahmen dieser Dissertation wurde zuerst die Strategie verfolgt die in den Familien der OCTs, OATs und OCTNs konservierten negativ geladenen Aminosäuren von rOCT1 zu substituieren. Dies wurde an den Aminosäuren *D150*, *E227*, *D379* und *E387* durchgeführt, welche Bestandteil der Transmembrandomänen (TMDs) waren. Diese wurden dann durch andere geladene, aber teilweise auch durch nicht geladene Aminosäuren ersetzt. Außerdem wurden weitere als potentiell funktionell relevant befundene Aminosäuren, wie z.B. das *Aspartat* an Position 95 untersucht, da dieses als einzige negativ geladene Aminosäure aus der großen extrazellulären Schleife zwischen TMD 1 und 2 alle oben genannten Kriterien besaß. Außerdem wurde eine evtl. Phosphorylierungsstelle (*S286*), zwei nah beieinanderliegende Cysteine (*C470*, *C474*), aber auch zwei Aminosäuren, zwischen denen eine Interaktion vermutet wurde (*E387+R440*) mutiert.

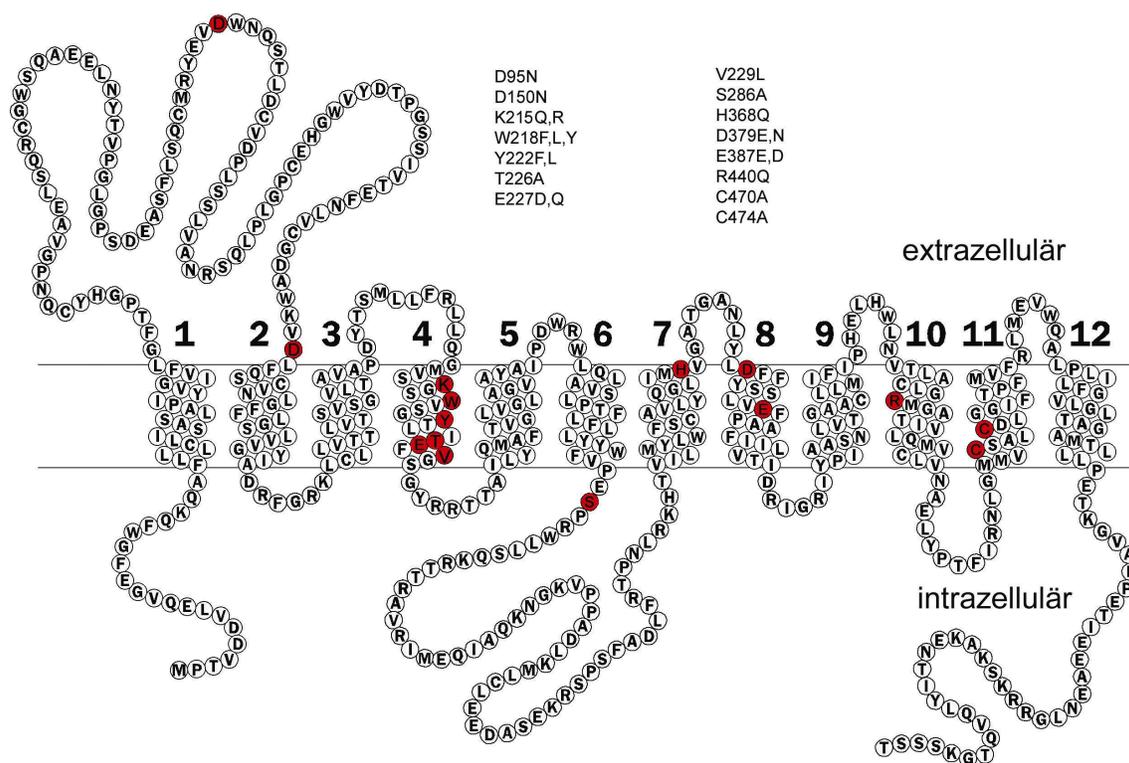


Abb. 22: An rOCT1 durchgeführte Aminosäuresubstitutionen

Die Tabelle 14 bis Tab 17 zeigen die Aufnahme von radioaktiv markiertem TEA und MPP. Diese Experimente waren als Vorversuche gedacht und sollten einen Hinweis auf für den Transport dieser Stoffe funktionell relevante Aminosäuren geben. Es wurden zunächst Aufnahmeexperimente mit Konzentrationen durchgeführt, die weit unterhalb der k_M -Werte für den Wildtyp lagen (Konzentrationen: TEA = 10 μ M, MPP = 0,1 μ M). Diese Messungen waren grundsätzlich gut, um nicht bzw. sehr schlecht transportierende Mutanten ausfindig zu machen.

Bei einigen dieser Mutationen schien ein Resttransport vorhanden zu sein, konnte aber auf Grund der geringen Transportraten von $\leq 4\%$ im Vergleich zum Wildtypen nicht weiter untersucht werden, da die Auflösungsgrenze dieser Methode überschritten wurde.

Nach den ersten Vorversuchen mit den deutlich transportierenden Mutanten zeigte sich jedoch gleich, dass hier keine deutlichen Verschiebungen in Selektivität und Affinität zu beobachten war (siehe Tabelle 12-15). *D95N* zeigte für TEA eine Senkung der Transportrate auf 57% und für MPP 92%, *D150N* zeigte für TEA eine Steigung auf 177% und für MPP auf 109%. Diese Effekte wurden als nicht groß genug eingestuft und daher nicht weiter untersucht.

Die Mutanten, bei welchen die dem *Glutamat* strukturell ähnliche Aminosäure *Aspartat* und die strukturell weniger ähnliche Aminosäure *Glutamin* an Position 227 substituiert wurden, zeigten keinerlei Transport mehr. Dies ist um so interessanter, als dass die Verkürzung der Seitenkette um einen Acylrest (*Glutamat* zu *Aspartat*) einen solchen starken Effekt aufwies und von allen Mutanten die geringste Expression im Western Blot zeigte.

Im Vergleich zum Wildtyp waren die Unterschiede bei den übrigen in diesem Kapitel genannten Mutanten im Substrattransport so klein, dass die entsprechenden Aminosäuren keine funktionelle Relevanz für das rOCT1 Proteinen zu haben schienen. Nur durch die Mutation *E387D* schien eine funktionell relevante Aminosäure gefunden worden zu sein. Die recht starke, aber dennoch gut messbare Reduzierung der Transportraten bei dieser Mutante führte zu weiteren Untersuchungen, welche eine Erhöhung des k_M – Werts für MPP um einen Faktor von 3.6 erkennen liessen. Diese Mutation wurde jedoch als nicht funktionell relevant eingestuft, da bei einer zuvor veröffentlichten Studie aus unserer Arbeitsgruppe an anderer Position des rOCT1 Proteins viel größere k_M -Wert Änderungen beobachtet worden waren (Gorboulev et al., 1999). Daher wurde die Suche auf positiv geladene Aminosäuren erweitert, denn diese könnten durch Abstoßungsreaktionen mit den Kationen oder aber auch mit negativ geladenen Aminosäuren anderer Transmembrandomänen interagieren, wie es z.B im Fall von GLUT 4 vermutet wurde (Schurmann et al., 1997) oder aber ein Funktion bei der Herausbeförderung des Kations aus der Tasche besitzen (Kawasaki-Nishi et al., 2001). Dieser Strategie folgend wurden die Mutanten *K215Q*, *K215R* und *H368Q* hergestellt. Die Mutanten, bei denen an Position 215 Aminosäuren ausgetauscht wurden, zeigten keinen Transport mehr, obwohl das Protein exprimiert und auch in Vesikelmembranen eingebaut wurde (Abb. 15).

Die Substitution des *Histidins* an Position 368 in ein *Glutamin* zeigte widersprüchlich Ergebnisse und soll daher nicht weiter diskutiert werden.

Weiterhin wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Aminosäuren *E387* und *R440* auf Grund ihrer Lage in den Transmembrandomänen 8 und 10 ein interagierendes Paar bilden könnten. Bei einer Bestätigung dieser Hypothese könnte ein Ladungsaustausch der negativen und positiven Aminosäuren die Funktionen von rOCT1 erhalten. Dies war der Grund zur Erstellung der Doppelmutante *E387R + R440E*. Diese Mutante zeigte jedoch keinen Transport. Der Nachweis des Proteineinbaus in die Oozytenmembran muss noch erbracht werden.

Erstaunlicherweise zeigte der gleichzeitige Austausch dieser Aminosäuren in das neutrale *Glutamin* die Funktionalität dieser Doppelmutante an, so dass die Substrataufnahme

konzentrationsabhängig gemessen werden konnte. Hierbei zeigten sich im Bezug zum Wildtyp keine deutlichen Verschiebungen in den k_M -Werten, jedoch war der V_{max} -Wert für TEA um das 6fache gesunken und für MPP um das 4.3fache. Da der Unterschied zwischen TEA und MPP V_{max} nicht signifikant war, konnte nicht diskriminiert werden, ob die Verringerung auf einen verminderten Einbau des Transportproteins in die Membran zurückzuführen war oder ob sie eine Verringerung der Transportraten auf Grund struktureller Veränderungen bedeuteten.

Weiterhin wurde das *Serin* an der Position 286 untersucht, welches durch die gesamte OCT Familie konserviert ist. Intrazelluläres *Serin* ist neben *Threonin* und *Tyrosin* Phosphorylierungsstelle für die Proteinkinase A oder C (Alberts et al., 1989; Koolmann und Röhm, 1998), über welche die Funktionen von Proteinen reguliert werden. Es wurde gezeigt, dass rOCT1 in stabil transfizierten HEK293 Zellen über PKC und PKA stimulierbar war. Zudem wurde mit Hilfe eines Phosphoserinantikörpers nachgewiesen, dass es sich dabei um einen *Serin* Rest handeln musste (Mehrens et al., 2000). Ein Austausch dieser Aminosäure gegen das *Alanin* resultierte in einer starken Reduzierung der Funktion, so dass es nicht möglich war diese Mutante weiter zu untersuchen (Tabelle 16 und Tab 17). Diskutiert man dieses Ergebnis in Zusammenhang mit der hohen Konservierung des *Serin* 286, so kann dies als weitere Bestätigung betrachtet werden, dass diese Aminosäure für die Funktion und Regulation des rOCT1 Proteins von großer Bedeutung ist.

Weiterhin wurde vermutet, dass die *Cysteine* an den Positionen 470 und 474 ein disulfidbrückenbildendes Paar darstellen könnten, da diese innerhalb der OCT Familien nur zusammen auftreten oder beide fehlen (Koepsell et al., 1999). Daher wurden die *Cysteine* einzeln gegen das strukturell sehr ähnliche *Alanin* mutiert, welches jedoch keine Sulfhydrylgruppe besitzt. Es zeigte sich bei Konzentrationen weit unterhalb des k_M -Werts für TEA und MPP nur eine deutliche Änderung in der Transportrate für TEA bei C470A. Bei dieser Mutante wurde die Transportrate auf 181% gesteigert (Tabelle 16). Die substratkonzentrationsabhängige Aufnahme zeigte eine 2.4fache Erhöhung des k_M -Werts, allerdings eine 3fache Erhöhung des V_{max} -Werts (Tabelle 18). Diese Effekte wurden jedoch als zu gering erachtet, um sie weiter zu verfolgen.

Tabelle 18 zeigt k_M und V_{Max} -Werte von transportierenden Mutanten, bei denen auf Grund vielversprechender Daten aus den Vorversuchen oder relevanter konservierte Position, eine

TEA Konzentration [μM]	Wildtyp rOCT1 TEA Aufnahme [pmol x h ⁻¹ x Oozyte ⁻¹]			Mutante TEA Aufnahme [pmol x h ⁻¹ x Oozyte ⁻¹]					
	10	100	400	10		100		400	
Messung					% WT		% WT		% WT
<i>D95N</i>	10.2 ± 1.9	-	-	5.7 ± 1.2	56.6 ± 11.6	-	-	-	-
<i>D150N</i>	5 ± 0.7	-	-	8.9 ± 1.3	177 ± 27	-	-	-	-
<i>K215Q</i>	5.7 ± 1	-	-	0.1 ± 0.01	1.9 ± 0.2	-	-	-	-
<i>K215R</i>	24.5 ± 1.8	-	-	0.43 ± 0.12	1.7 ± 0.5	-	-	-	-
<i>E227D</i>	-	83.4 ± 9.7	147.7 ± 29.3	-	-	0.07 ± 0.0	0.02 ± 0.3	0.23 ± 0.43	0.2 ± 0.3
<i>E227Q</i>	24.5 ± 1.8	-	-	0.6 ± 0.1	2.4 ± 0.4	-	-	-	-
<i>H368Q</i>	5.7 ± 1.6	102.8 ± 10	147.5 ± 17.9	6.4 ± 1.1	113.2 ± 19	89.2 ± 13.1	86.8 ± 12.8	153.1 ± 24.8	103.8 ± 16.8
<i>D379E</i>	5.7 ± 1.9	-	-	5.6 ± 1.1	99.2 ± 16.4	-	-	-	-
<i>D379N</i>	24.1 ± 1.3	83.4 ± 9.7	147.7 ± 29.3	11.1 ± 0.9	46 ± 3.9	75.7 ± 12.2	90.7 ± 14.6	191.1 ± 11.6	129.4 ± 7.8
<i>E387D</i>	-	62 ± 3.4	128 ± 8.4	-	-	10.2 ± 0.7	16.5 ± 1.2	8.2 ± 1	6.4 ± 0.8
<i>E387Q</i>	9.7 ± 2.1	-	-	0.2 ± 0.1	1.7 ± 1	-	-	-	-
<i>E387R</i>	5 ± 0.7	-	-	0.2 ± 0.0	4 ± 0.0	-	-	-	-
<i>R440Q</i>	-	62 ± 3.4	128 ± 8.4	-	-	1.8 ± 0.2	2.9 ± 0.3	2.9 ± 0.7	2.3 ± 0.6
<i>E387R</i> + <i>R440E</i>	23.1 ± 1.5	-	-	0.2 ± 0.2	0.9 ± 0.9	-	-	-	-
<i>E387Q</i> + <i>R440Q</i>	19.8 ± 1.4	-	-	20.7 ± 2.8	104.5 ± 14.1	-	-	-	-

Tabelle 14: TEA Aufnahme unterschiedlicher Mutanten im Bezug zum WT

MPP Konzentration[μM]	Wildtyp rOCT1 - MPP Aufnahme [pmol x h ⁻¹ x Oozyte ⁻¹]			Mutante MPP Aufnahme [pmol x h ⁻¹ x Oozyte ⁻¹]					
	0.1	3	12	0.1	3	12	0.1	3	12
Messung					% WT		% WT		% WT
<i>D95N</i>	0.94 ± 0.13	-	-	0.87 ± 0.09	92 ± 10.1	-	-	-	-
<i>D150N</i>	0.84 ± 0.09	-	-	0.91 ± 0.11	109 ± 13	-	-	-	-
<i>K215Q</i>	0.7 ± 0.09	-	-	0.01 ± 0.01	1.5 ± 0.8	-	-	-	-
<i>K215R</i>	0.6 ± 0.12	-	-	0.02 ± 0.01	3.2 ± 1.3	-	-	-	-
<i>E227D</i>	-	19.3 ± 3.4	50.1 ± 7.9	-	-	0.14 ± 0.03	0.7 ± 0.2	0.34 ± 0.22	0.7 ± 0.4
<i>E227Q</i>	0.6 ± 0.12	-	-	0.02 ± 0.01	4.2 ± 1.1	-	-	-	-
<i>H368Q</i>	0.37 ± 0.09	14.3 ± 3.1	48.1 ± 3.4	1.3 ± 0.2	347 ± 39	26.3 ± 2.8	184.9 ± 19.7	54.8 ± 2	113.8 ± 4.1
<i>D379E</i>	0.37 ± 0.09	-	-	0.32 ± 0.03	85 ± 9.3	-	-	-	-
<i>D379N</i>	0.7 ± 0.9	-	-	0.46 ± 0.05	63.5 ± 6.3	-	-	-	-
<i>E387D</i>	-	17.4 ± 1.2	27.5 ± 1.5	-	-	3.7 ± 0.4	21.3 ± 2.7	7.1 ± 0.5	25.7 ± 1.9
<i>E387Q</i>	0.22 ± 0.02	-	-	0.01 ± 0.01	1.84 ± 1.8	-	-	-	-
<i>E387R</i>	0.84 ± 0.09	-	-	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0	-	-	-	-
<i>R440Q</i>	-	17.4 ± 1.2	27.5 ± 1.5	-	-	0.8 ± 0.2	5 ± 0.7	1.7 ± 0.22	6.2 ± 0.8
<i>E387R</i> + <i>R440E</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E387Q</i> + <i>R440Q</i>	0.99 ± 0.06	-	-	0.46 ± 0.05	46.5 ± 0.05	-	-	-	-

Tabelle 15: MPP Aufnahme unterschiedlicher Mutanten im Bezug zum WT

TEA Konzentration [μM]	Wildtyp rOCT1 TEA Aufnahme [pmol x h ⁻¹ x Oozyte ⁻¹]			Mutante TEA Aufnahme [pmol x h ⁻¹ x Oozyte ⁻¹]					
	10	100	400	10		100		400	
Messung					% WT		% WT		% WT
S286A	-	111 ± 7	150.5 ± 10.1	-	-	0.6 ± 0.3	0.6 ± 0.3	3.9 ± 0.4	2.6 ± 0.2
C470A	9.7 ± 2.1	-	-	17.5 ± 1.3	181.5 ± 13.8	-	-	-	-
C474A	16.8 ± 1.1	-	-	19 ± 1	113.5 ± 5.7	-	-	-	-

Tabelle 16: TEA Aufnahme unterschiedlicher Mutanten im Bezug zum WT

MPP Konzentration [μM]	Wildtyp rOCT1 - MPP Aufnahme [pmol x h ⁻¹ x Oozyte ⁻¹]			Mutante MPP Aufnahme [pmol x h ⁻¹ x Oozyte ⁻¹]					
	0.1	3	12	0.1		3		12	
Messung					% WT		% WT		% WT
S286A	-	18.8 ± 1.5	43.7 ± 2	-	-	0.74 ± 0.1	4 ± 0.6	1.5 ± 0.11	3.5 ± 0.2
C470A	0.22 ± 0.02	-	-	0.23 ± 0.02	108 ± 10	-	-	-	-
C474A	0.42 ± 0.12	-	-	0.32 ± 0.09	76.7 ± 22.3	-	-	-	-

Tab 17: MPP Aufnahme unterschiedlicher Mutanten im Bezug zum WT

Auswirkung auf die Affinität zu erwarten war. Ausgewählt wurden die Mutanten *H368Q* und *E387D*, da sich für die verschiedenen Konzentrationen aus den Vorversuchen unterschiedliche Transportraten relativ zum Wildtyp bei MPP zeigten. *E387Q+R440Q* wurde näher untersucht, da eine Interaktion zwischen diesen Aminosäuren vermutet wurde und die Transportraten deutlich reduziert waren. Die Transportrate von *C470A* war bei dem

Vorversuch im Falle von TEA in Bezug zum Wildtypen deutlich erhöht und wurde daher genauer untersucht.

	TEA				MPP			
	Wildtyp rOCT1		Mutante		Wildtyp rOCT1		Mutante	
	K_M [μM]	V_{Max} [$\text{pmol} \times \text{h}^{-1} \times$ Oozyte $^{-1}$]	K_M [μM]	V_{Max} [$\text{pmol} \times \text{h}^{-1} \times$ Oozyte $^{-1}$]	K_M [μM]	V_{Max} [$\text{pmol} \times \text{h}^{-1} \times$ Oozyte $^{-1}$]	K_M [μM]	V_{Max} [$\text{pmol} \times \text{h}^{-1} \times$ Oozyte $^{-1}$]
<i>Messung</i>								
<i>H368Q</i>	90 ± 29	318 ± 37	70 ± 22	359 ± 22	3.6 ± 0.9	49 ± 3	7.9 ± 1.4	82 ± 4.1
<i>E387D</i>	265 ± 92	100 ± 17	402 ± 215	37 ± 11	2.2 ± 0.3	49 ± 3	7.9 ± 1.4	82 ± 4.1
<i>E387Q</i> + <i>R440Q</i>	20 ± 3	120 ± 6	17 ± 4	20 ± 1	7 ± 1	82 ± 6	4.9 ± 1	19 ± 4.9
<i>C470A</i>	103 ± 29	204 ± 16	247 ± 26	603 ± 247	-	-	-	-

Tabelle 18: K_M und V_{Max} Werte ausgesuchter Mutanten im Vergleich zum Wildtyp rOCT1

Sicherlich hervorzuheben ist hier die 3.6 fache Erhöhung des k_M - Wertes der Mutanten *E387D* für MPP. Die Affinität für TEA sank bei dieser Mutante nur um das 1.5 fache, jedoch lag hier der Standardfehler bei mehr als 50 % Prozent. Die maximale Transportrate sank um einen Faktor von 2.7 bei TEA und stieg bei MPP um einen Faktor von 1.7.

Die Doppelmutante *E387Q+R440Q* zeigte eine deutlich verringerte Transportrate und zwar um das 6fache bei TEA und um das 4fache bei MPP.

Die einzige Mutante, die eine deutlich erhöhte maximale Transportrate zeigte, war *C470A*, und zwar um einen Faktor 3 für TEA. Die Affinität sank um einen Faktor von 2.4.

Es fällt hier deutlich auf, dass die Affinitäten für TEA im Falle des Wildtyps bei den Versuchen mit den Mutanten *E387D* und *E387Q+R440Q* um einen Faktor 13 schwanken. Diese Messungen sind innerhalb eines großen Zeitraums gemacht worden. Diese starken Schwankungen können mit jahreszeitliche bedingten Änderungen des Oozytenstoffwechsels

zusammenhängen. Aus diesem Grund wurde immer der Wildtyp als Referenz mitgemessen, damit die Daten weiterhin vergleichbar blieben.

Aus den Versuchen mit der Mutante *D475E* (Gorboulev et al., 1999) waren Affinitätsverschiebungen bis zum achtfachen für TEA beobachtet worden. Da Affinitätsveränderungen in diesem Maße bei den bis zu diesem Punkt durchgeführten Mutationen nicht zu beobachten waren, musste die Strategie zur Auffindung für den Transport von rOCT1 wichtiger Aminosäuren verändert werden. Dadurch behielten die oben aufgeführten Messungen ihren stichprobenhaften Charakter mit einer Experimentenanzahl von $n = 1$. Es wurden also keine Wiederholungen durchgeführt, so dass die oben aufgeführten Ergebnissen statistisch nicht abgesichert waren. Um potentielle funktionell relevante Aminosäuren im rOCT1 Protein ausfindig zu machen, wurde daher die Strategie geändert. Hierzu wurden die „Helical Wheels“ aller Transmembrandomänen mit einander verglichen (siehe Kapitel 3.1).

7.2 Selektivitäten der Mutanten der 4. Transmembrandomäne

Aus Gründen der Übersicht wurde in Kapitel 3.2.1 des Ergebnisteils auf eine Tabelle, welche die selektiven Aufnahmearten der Mutanten im direkten Vergleich zeigt, verzichtet. Dies soll nun auf den folgenden Seiten geschehen. In der hier gezeigten tabellarischen Darstellung wurden die ermittelten Absolutwerte der Mutanten im Vergleich zu den Wildtyp-Absolutwerten gesetzt. Mit dieser Darstellung ist es übersichtlich möglich, signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante aufzuzeigen. Zur Interpretation der Ergebnisse siehe Kapitel 3.2.1.

	Aufnahmerate			
	[pmol/30min/Oozyte]			
	TEA [10µM]	MPP [0.5 µM]	Guanidin [200µM]	Serotonin [2.5µM]
Wildtyp	14.6 ± 3.3	2.2 ± 0.4	28.5 ± 7.3	7.3 ± 1.4
K215Q	0.03 ± 0.03**	0.03 ± 0.03**	0.4 ± 0.2**	0.1 ± 0.03**
Faktor	486.7	73.3	71.2	73
<hr/>				
Wildtyp	14.6 ± 3.3	2.2 ± 0.4	28.5 ± 7.3	7.3 ± 1.4
K215 R	0.2 ± 0.1**	0.03 ± 0.03**	0.03 ± 0.02**	0**
Faktor	73	73.3	950	-
<hr/>				
Wildtyp	23.2 ± 1.5	3.0 ± 0.3	68.2 ± 6.2	8.3 ± 0.3
W218F	6.1 ± 2.4**	2.9 ± 0.5	34.7 ± 7.6*	4.2 ± 0.4*
Faktor	3.8	1	2	2
<hr/>				
Wildtyp	23.2 ± 1.5	3.0 ± 0.3	68.2 ± 6.2	8.3 ± 0.3
W218L	0.4 ± 0.1**	0.7 ± 0.1*	3.7 ± 0.5**	0.5 ± 0.04**
Faktor	58	4.3	18.4	16.6
<hr/>				
Wildtyp	23.2 ± 1.5	3.0 ± 0.3	68.2 ± 6.2	8.3 ± 0.3
W218Y	6.2 ± 0.3*	2.4 ± 2.1	14.0 ± 2.1*	1.1 ± 0.1**
Faktor	3.7	1.25	4.9	7.5
<hr/>				
Wildtyp	14.6 ± 2.8	3 ± 0.5	67.4 ± 1.8	7.8 ± 0.7
Y222F	11.2 ± 2.2	3.0 ± 0.1	53.1 ± 12.3	6.6 ± 1.1
Faktor	1.3	1	1.3	1.2
<hr/>				
Wildtyp	14.6 ± 2.8	3 ± 0.5	67.4 ± 1.8	7.8 ± 0.7
Y222L	4.2 ± 0.5*	1.2 ± 0.2*	11.4 ± 1.2*	1.2 ± 0.2**
Faktor	3.5	2.5	5.9	6.5

	Aufnahmerate			
	[pmol/30min/Oozyte]			
	TEA [10µM]	MPP [0.5 µM]	Guanidin [200µM]	Serotonin [2.5µM]
Wildtyp	17.3 ± 2.0	3.5 ± 0.2	80.6 ± 3.2	8.3 ± 0.7
T226A	13.5 ± 1.7	3.1 ± 0.2	24.3 ± 4.1*	5.6 ± 0.4
Faktor	1.3	1.1	3.3	1.5
<hr/>				
Wildtyp	14.6 ± 3.3	2.2 ± 0.4	28.5 ± 7.3	7.3 ± 1.4
V229L	0.2 ± 0.3**	0.1 ± 0.05**	0.7 ± 0.4**	0.1 ± 0.04**
Faktor	73	22	40.1	73
<hr/>				
Wildtyp	14.6 ± 3.3	2.2 ± 0.4	28.5 ± 7.3	7.3 ± 1.4
E227D	0.3 ± 0.03**	0**	0.17 ± 0.4**	0**
Faktor	48.7	-	187.7	-
<hr/>				
Wildtyp	14.6 ± 3.3	2.2 ± 0.4	28.5 ± 7.3	7.3 ± 1.4
E227Q	0.1 ± 0.05**	0**	0.5 ± 0.1**	0**
Faktor	146	-	57	-
<hr/>				
Wildtyp	14.6 ± 3.3	2.2 ± 0.4	28.5 ± 7.3	7.3 ± 1.4
H₂O	0.2 ± 0.1**	0**	0.9 ± 0.2**	0**
Faktor	73	-	31.7	-

Tabelle 19: Aufnahmeraten der Mutanten der 4. Transmembrandomäne. Mittelwerte aus 3-4 Versuchen. Transportmessung mit verschiedenen [¹⁴C]- oder [³H]-markierten Substanzen. *X. laevis* Oozyten wurden mit Wasser oder 10 ng rOCT1-cRNA injiziert. Nach 2-3 Tagen wurde die Aufnahme der Substrate über einen Zeitraum von 30 min in die Oozyten gemessen. Es handelt sich hier um den durch 100 µM Chinin hemmbaren Anteil. Die Daten repräsentieren Mittelwerte mit Standardfehler aus 3-4 Versuchen; * = Signifikant unterschiedlich zum Wildtyp k_M (Signifikanzniveau = 5 %); ** = Signifikant unterschiedlich zum Wildtyp k_M (Signifikanzniveau = 1 %).

7.3 Interaktion von N-Methylchinin mit rOCT1 und rOCT2

In einer Veröffentlichung von van Montfoort wurde gezeigt, dass N-Methylchinin von rOCT1 transportiert wird (Van Montfoort et al, 2001). N-Methylchinin ist ein Derivat des in Kapitel 3.3 beschriebenen Chinins und besitzt eine permanente positive Ladung. Es galt die Interaktion von N-Methylchinin mit rOCT1 und rOCT2 näher zu beschreiben. Abb. 23 zeigt die Aufnahme von N-Methylchinin. Es war deutlich zu sehen, dass rOCT2 fast kein N-Methylchinin transportierte; bei einer extrazellulären Konzentration von N-Methylchinin von 1,5 μM zeigte rOCT1 eine mit 100 μM Cyanin863 hemmbare Aufnahme von $2 \pm 0.13 \text{ pmol} \times 30 \text{ min}^{-1} \times \text{Oocyte}^{-1}$.

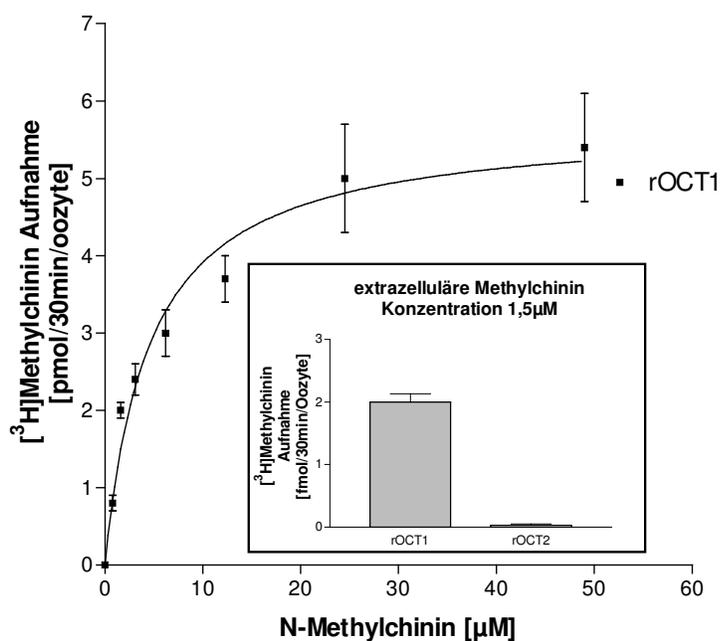


Abb. 23: Die konzentrationsabhängige Aufnahme von $[^3\text{H}]$ N-Methylchinin ist nur in rOCT1 und nicht in rOCT2 exprimierenden *X. laevis* Oozyten nachweisbar. rOCT1 und rOCT2 exprimierende Oozyten wurden über 30 min in An- und Abwesenheit von 100 μM Cyanin 863 mit verschiedenen Substratkonzentrationen inkubiert. Es konnte nur für rOCT1 exprimierende Oozyten eine nichtlineare Regression nach Michaelis-Menten angepasst werden. Die Punkte repräsentieren den Median von 8-10 Oozyten mit dem Standardfehler des Mittelwerts.

Die cyanininhibierbare Aufnahme bei rOCT2 war mit $0.03 \pm 0.02 \text{ pmol} \times 30 \text{ min}^{-1} \times \text{Oozyte}^{-1}$ sehr gering und nicht größer als die Aufnahme der wasserinjizierten Oozyten.

Im nächsten Experiment wurde versucht, die konzentrationsabhängige Aufnahmeraten und somit den k_M - und V_{\max} -Wert zu bestimmen. Dies war für rOCT2 nicht möglich, da nach Abzug des nicht cyanininhibierbaren Anteils die Transportraten knapp über null oder aber sogar negative Werte annahmen. Für rOCT1 wurde ein k_M -Wert von $4.6 \pm 0.9 \text{ } \mu\text{M}$ und ein V_{\max} -Wert von $5.7 \pm 0.3 \text{ pmol} \times 30 \text{ min}^{-1} \times \text{Oozyte}^{-1}$ ($n = 1$) erhalten.

Mit N-Methylchinin wurde ein Substrat entdeckt, welches von rOCT1, nicht aber von rOCT2 transportiert wird. Es zeigte mit einem k_M -Wert von $5 \text{ } \mu\text{M}$ eine recht hohe Affinität zum rOCT1-Protein. N-Methylchinin ist somit ein sehr gutes Werkzeug zur Bestimmung der Transporteigenschaften bei chimären Proteinen, die aus rOCT1- und rOCT2-Anteilen bestehen. Sollte beim Austausch von Transmembrandomänen (rOCT1 in rOCT2) plötzlich ein Transport von N-Methylchinin für diese Chimäre nachgewiesen werden so, wäre dies ein Hinweis für die Wichtigkeit dieser Domäne am Transportgeschehen.

7.4 Interaktion von rOCT1 mit cGMP

Es ist in der Vergangenheit gezeigt worden, dass rOCT1 in HEK293 Zellen durch zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) stimulierbar ist (Mehrens et al., 2000). Es zeigte sich eine Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), der Proteinkinase C, (PKC) und der $p56^{\text{lck}}$ Kinase, welche eine Phosphorylierung des Transporters zur Folge hatte. Die Phosphorylierung von rOCT1 resultierte in gesteigerten Affinitäten zu verschiedenen Substraten. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Aufnahme von organische Kationen in isolierte menschliche Nierentubuli ebenfalls über PKA und PKC reguliert ist, aber auch über das atriale natriuretische Peptid (Pietig et al., 2001). Im Rahmen einer Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Schlatter von der Westfälischen Wilhelms Universität Münster wurde die Interaktion des zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP) mit rOCT1 untersucht.

Das zyklische Guanosinmonophosphat hat ein Reihe von wichtigen „Messenger“ Funktionen innerhalb des menschlichen Körpers. Es reguliert die Entspannung glatter Muskulatur und ist somit einer der Regulatoren des Blutdrucks und der Erektion des Penis, es inhibiert die Aktivierung von Blutplättchen, reguliert die Chlorid- und Wassersekretion in der Bürstensaummembran des Dünndarms und ist entscheidend für den Vorgang des Sehens. (Lucas et al., 2000).

Prof. Dr. Schlatter hatte zuvor mit Hilfe des fluoreszierenden Kations 4-(4-dimethylamino)styryl)-N-methylpyridinium (ASP) und dessen Einsatz als Agens in der Mikrofluorimetrie nachgewiesen, dass dessen Aufnahme in HEK293 Zellen durch die Gabe des membrangängigen cGMP-Derivats 8-Bromo-cGMP (8-Br-cGMP) gehemmt werden konnte (Schlatter et al., 2002). Die Frage, ob es sich um eine direkte oder eine indirekte Interaktion des 8-Br-cGMP mit dem rOCT1 Protein handelte, sollte geklärt werden. Hierzu wurde das Oozyten Expressionssystem genutzt.

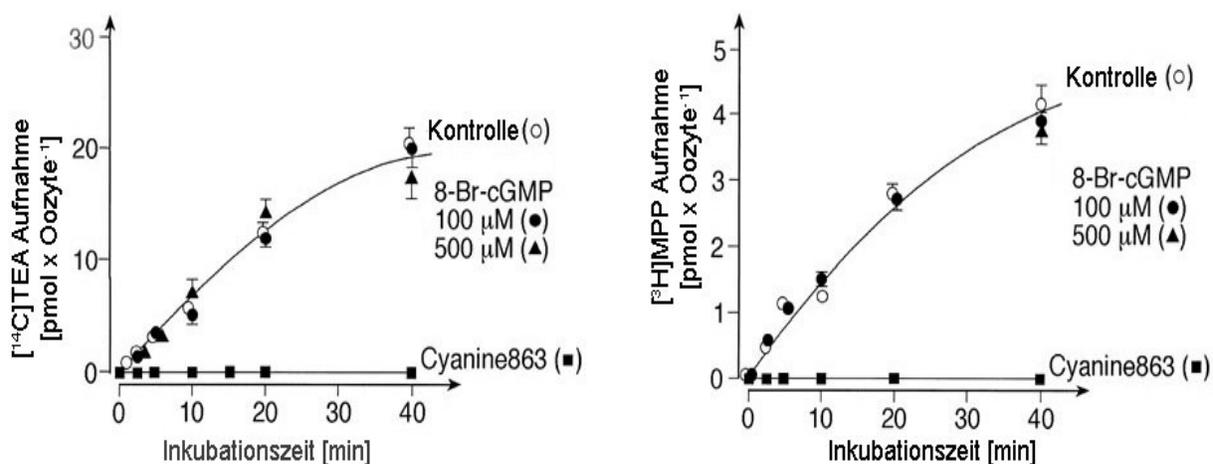


Abb. 24 : In *X. laevis* Oozyten exprimierter rOCT1 ist insensitiv gegen 8-Br-cGMP. rOCT1 wurde in *X. laevis* Oozyten exprimiert und die Aufnahme von $10 \mu\text{M}$ $[^{14}\text{C}]\text{TEA}$ oder $[^3\text{H}]\text{MPP}$ nach verschiedenen Zeiten in Abwesenheit (Kontrolle) oder Gegenwart von unterschiedlichen 8-Br-cGMP Konzentrationen gemessen. Zur weiteren Kontrolle wurde die Aufnahme mit $100 \mu\text{M}$ Cyanin863 gehemmt. Die Aufnahme der Tracer wurde durch Waschen in eiskaltem ORi zu den angegebenen Zeiten gestoppt.

Abb. 24 zeigt den zeitlichen Verlauf der Aufnahme des radioaktiv markierten TEAs allein und in Gegenwart von 100 oder 500 μM 8-Br-cGMP. Zum Vergleich wurde die Hemmung von 100 μM Cyanin863 mitaufgezeigt. Es war kein hemmender Effekt von 8-Br-cGMP auf den Transport von TEA zu erkennen.

TEA besitzt auf chemischer Basis keinerlei Ähnlichkeit mit ASP. So wurde für einen weiteren Versuch das strukturell sehr ähnliche MPP gewählt. Der rechte Teil der Abb. 24 zeigt dessen Transport allein und in Gegenwart von 100 bzw. 500 μM cGMP. Zum Vergleich

wurde die Aufnahme des MPP erneut mit Cyanin863 gehemmt. Die Hemmung durch Cyanin863 war deutlich zu erkennen, wohingegen der Transport von MPP in Gegenwart der beiden 8-Br-cGMP Konzentrationen keinen Unterschied zum MPP Transport allein zeigt. Es musste also ein anderer Grund für das unterschiedliche Verhalten dieser Substrate in den beiden Systemen vorhanden sein.

Es zeigte sich selbst bei hohen 8-Br-cGMP Konzentrationen keinerlei Effekt auf den Transport dieser Substrate. Die Interaktion zwischen dem „Messenger“ und dem Protein schien daher innerhalb der *Xenopus laevis* Oozyte nicht direkt zu sein. Es konnte daraus geschlossen werden, dass die cGMP vermittelte Inhibierung ein Bindeprotein benötigt, welches in HEK293 Zellen vorhanden ist. Die Inhibierung des organischen Kationen Transport könnte für diese, aber auch für andere Transporterfamilien spezifisch sein, sie wird jedoch nicht immer beobachtet, z.B. zeigt ein cGMP regulierter K^+ Kanal diese Regulierung nach Expression in HEK293 Zellen nicht mehr (Schröder et al., 2000).

7.5 Abkürzungen und Einheiten

8-Br-cGMP	8'-bromo-cyclic guanosin-monophosphat (8'-Bromo-zyklisches-Guanosinmonophosphat)
A	Ampère
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ASP	4-(4-dimethyl-amino)styryl)-N-methylpyridinium
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BES	N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-2-ethansulfonsäure
Bq	Becquerel
bzw.	beziehungsweise
cpm	counts per minute (gezählte radioaktive Zerfälle pro Minute)
Ci	Curie (3.7×10^{10} Bequerel)
cAMP	cyclic adenosin-monophosphat (zyklisches Adenosinmonophosphat)
cGMP	cyclic guanosin-monophosphat (zyklisches Guanosinmonophosphat)
cRNA	copy ribonucleic acid (kopierte Ribonukleinsäure)
Da	Dalton (molekulare Masse)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
dATP	2'-Desoxy-adenosin-5'triphosphat
dCTP	2'-Desoxy-cytidin-5'triphosphat
dGTP	2'-Desoxy-guanosin-5'triphosphat
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'triphosphat
dTTP	2'-Desoxy-thymidin-5'triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
g	Gramm
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde

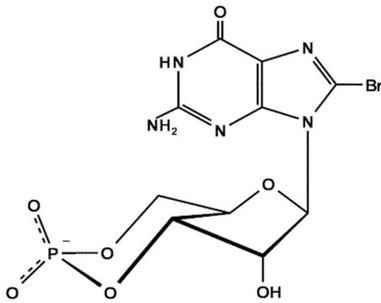
kDa	KiloDalton
M	molar
MBq	MegaBecquerel
mg	Milligramm
min	Minute
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MPP	1-Methyl-4-phenylpyridinium
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
nA	NanoAmpère
NMN	N-Methylnikotinamid
NTPs	Nukleotidtriphosphate
OD	Optische Dichte
PKA	Proteinkinase A
PKC	Poteinkinase C
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
Rnase	Ribonuklease
rNTP's	Ribonukleosid-5'-triphosphat
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natriumdodezylsulfat)
sog.	sogenannte
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-HCl-, NaBorat- und EDTA-gepufferte Lösung
TBuA	Tetrabutylammonium
TEA	Tetraethylammonium
TPeA	Tetrapentylammonium
TEMED	N,N,N'N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
u. a.	unter anderem
U	unit (Enzymeinheit)
UTP	Uridin-5'-triphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt

(v/v)	volume per volume (Volumen pro Volumen)
W	Watt
(w/v)	weight per volume (Gewicht pro Volumen)
z.B.	zum Beispiel

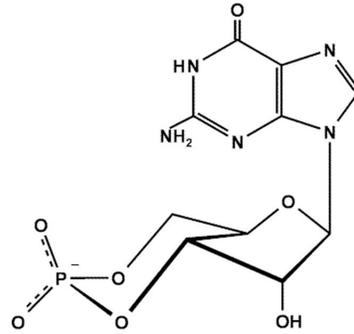
7.6 Aminosäuren

Alanin	A
Arginin	R
Asparagin	N
Aspartat	D
Cystein	C
Glutamat	E
Glutamin	Q
Glycin	G
Histidin	H
Isoleucin	I
Leucin	L
Lysin	K
Methionin	M
Phenylalanin	F
Prolin	P
Serin	S
Threonin	T
Tryprophan	W
Tyrosin	Y
Valin	V

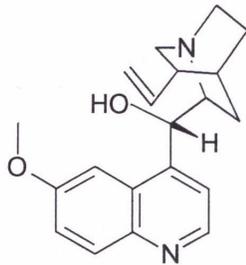
7.7 Chemische Strukturformeln



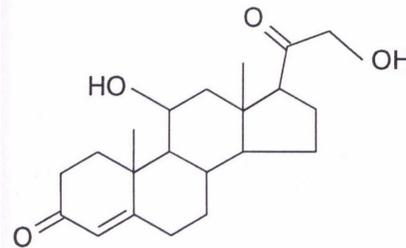
8-Br-cGMP



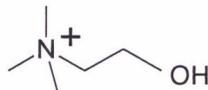
cGMP



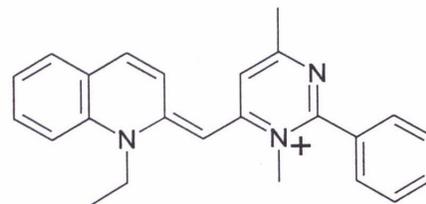
Chinin



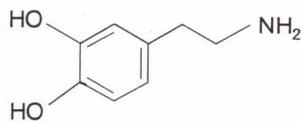
Corticosteron



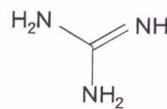
Cholin



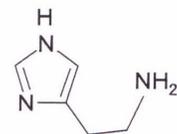
Cyanin863



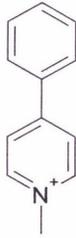
Dopamin



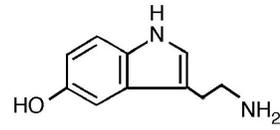
Guanidin



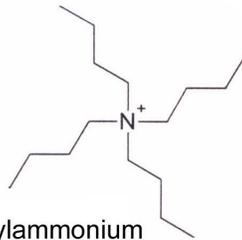
Histamin



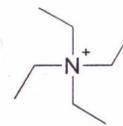
1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP)



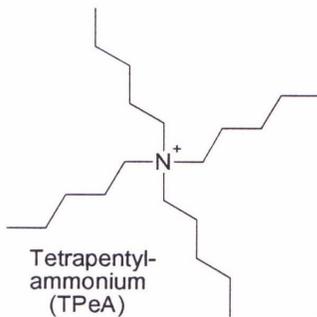
Serotonin
(5-Hydroxytryptamin)



Tetrabutylammonium
(TBuA)



Tetraethylammonium
(TEA)



Tetrapentylammonium
(TPeA)

8 Veröffentlichungen

- Arndt, P., C. Volk, V. Gorboulev, T. Budiman, C. Popp, I. Ulzheimer-Teuber, A. Akhoundova, S. Koppatz, E. Bamberg, G. Nagel und H. Koepsell. „Interactions of cations, anions, and weak base quinine with rat renal cation transporter rOCT2 compared with rOCT1.“ *Am J Physiol Renal Physiol* 281(2001):F454-F468.
- Koepsell, H., V. Gorboulev, C. Popp, J.E.v. Montfoort, P.J. Meier, P. Arndt und C. Volk. Organic cation transporters in the sinusoidal membrane of hepatocytes. In: *Hepatobiliary transport: From bench to bedside*. editiert von Matern, S., J.L. Boyer, D. Keppler und P.J. Meier-Abt. Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publishers, 2001, p.3.
- Popp, C., T. Budiman, P. Arndt, V. Gorboulev, E. Bamberg, G. Nagel und H. Koepsell. „The weak base quinine diffuses through the plasma membrane and inhibits the organic cation transporter from the intracellular side.“ *Pflug Arch - Eur J Physiol* 441(2001):R249(Abstract).
- Popp C., V. Gorboulev, T.D. Müller, D. Gorbunov, N. Shatskaya und H. Koepsell. „Aminoacids critical for substrate affinity of organic cation transporter 1 line the substrate binding region in a model derived from solved tertiary structure of lactose permease.“ 2004.(UnPub).
- Rückes-Nilges, C., C. Popp, U. Weber, K. Fryen, B. Lindemann, H. Glanz, H. Lindemann, W. Clauss und W.-M. Weber. „Ion transport in nasal and paranasal sinus mucosa in mucoviscidosis and chronic sinusitis.“ *HNO* 47(1999):157-166.
- Schlatter, E., V. Monnich, I. Cetinkaya, T. Mehrens, G. Ciarimboli, J.R. Hirsch, C. Popp und H. Koepsell. „The organic cation transporters rOCT1 und hOCT2 are inhibited by cGMP.“ *J Membr Biol* 189(2002):237-244.
- Weber, W.-M., C. Popp, W. Clauss und W. Van Driessche. „Maitotoxin induces insertion of different ion channels into the *Xenopus* oocyte plasma membrane via Ca²⁺-stimulated exocytosis.“ *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 439(2000):369.

9 Curriculum Vitae

Name: Christian Popp

Geboren: 16.09.1971

Geburtsort: Marl

Eltern: Hubert Popp, Ruth Pluntke-Popp geb. Theis

Schule: 1978-1982 Comeniusgrundschule Herten

1982-1988 Besuch der Sekundarstufe I der Gesamtschule Herten

1988-1991 Besuch der gymnasialen Oberstufe der Gesamtschule Herten
mit erfolgreichem Erlangen der allgemeinen Hochschulreife

Ersatzdienst: 1991-1993 beim Arbeiter-Samariter-Bund Herten

Studium:

- WS 93/94 Beginn des Studiums der Biologie an der JLU Gießen
- Dez. 1995 Erfolgreiches Ablegen der Diplom-Vorprüfung des Fachbereichs Biologie in den Fächern Zoologie, Botanik, Chemie und Physik
- Juli-Okt. 96 dreimonatiger Praktikumsaufenthalt auf den Philippinen
- Dez. 1997 Erfolgreiches Ablegen der Diplomprüfungen in den Hauptfächern Genetik und Zoologie, in den Nebenfächern Tierphysiologie und Zellbiologie
- Jan.1998 Diplomarbeit mit dem Thema „Regulation der Ionentransporte im respiratorischen Epithel von Gesunden und Mukoviszidose-Patienten“ am Institut für Tierphysiologie der JLU Gießen
- Jan. 1999 bis Dez.2002 Promotion am Institut für Anatomie und Zellbiologie der JMU- Würzburg zum Thema „Mutationsanalyse am Organischen Kationen Transporter 1 der Ratte (rOCT1)“
- März 2003 Anstellung bei Aventis Pharma AG, Abt. Functional Genomics
- Aug. 2003 Anstellung bei der Virion\Serion GmbH, Würzburg

10 Danksagung

Diese Dissertation wurde am Anatomischen Institut der Bayerischen Julius-Maximilian-Universität in Würzburg am Lehrstuhl für Anatomie und Zellbiologie I von Herrn Prof. Dr. Hermann Koepsell angefertigt. Ich danke Prof. Dr. Koepsell für die wissenschaftliche Anleitung, für die vielen interessanten Diskussionen und für die engagierte Betreuung meiner Arbeit.

Dr. Valentin Gorboulev möchte ich für die Herstellung von rOCT1 und dessen Mutanten danken und dafür, dass er mir stets in allen Fällen ein guter Ansprechpartner war.

Dr. Christopher Volk möchte ich für die geduldige Einarbeitung an den Arbeitsplätzen, für die vielen Stunden die er für die Korrektur dieser Dissertation benötigt hat danken und dafür, dass er mir im Laufe der Jahre ein wertvoller Freund geworden ist. Ich konnte mir seiner Unterstützung stets sicher sein.

Dr. Petra Arndt danke ich für die vielen wertvollen Tips, die sie mir zum Verfassen dieser Dissertation gegeben hat und für den Zuspruch, den ich von ihr bekommen habe.

Dr. Maike Veihl danke ich, da sie mich in jeglicher Art unterstützt hat und ohne die ich in Würzburg nur halb so viel Spaß gehabt hätte. Sie ist mir eine wertvolle Freundin geworden.

Dr. Bernhard Schmitt danke ich, da er mir gezeigt hat, dass es nichts gibt, was nicht hinterfragt werden kann.

Irina Schatz möchte ich danken, da sie mir die handwerklichen Kniffe beibrachte, die man für das molekularbiologische Arbeiten benötigt und dafür, dass sie mir vieles an molekularbiologischer Routinearbeit abgenommen hat.

Bei Daniela Scholz möchte ich mich bedanken, da sie die Hauptgastgeberin unserer dienstagabendlichen „Arbeitsgruppentreffen“ war. Diese Abende haben dazu beigetragen vieles aus dem Laboralltag zu relativieren.

Meiner Lebensgefährtin Sonja Wisiol möchte ich dafür danken, dass sie mir trotz meiner Arbeitstätigkeit an vielen Abenden und Wochenenden den Rücken gestärkt und freigehalten hat, so dass ich diese Dissertation gut zu Ende bringen konnte.

Bei meinen Eltern bedanke ich mich für ihre ständig offenen Ohren und die seelische Unterstützung, die ich von Ihnen erhalten habe. Ohne sie hätte ich es nicht so weit gebracht.

Erklärungen zur Zulassung zum Promotionsverfahren.

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich diese Dissertation selbständig angefertigt habe und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Weiterhin erkläre ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt habe.

Ich habe früher keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.