

**Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Universität Würzburg, Lehrstuhl I
Vorstand: Prof. Dr. med. Hermann Koepsell**

**Funktionelle Charakterisierung von Chimären der organischen
Kationentransporter zur Aufklärung der Bedeutung
der großen extrazellulären Schleife**

**Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius – Maximilians – Universität Würzburg**

**vorgelegt von
Stefan Koppatz
aus Dresden**

Würzburg, Januar 2005

Referent: Prof. Dr. med. Hermann Koepsell

Koreferent: Prof. Dr. med. Michael Gekle

Dekan: Prof. Dr. med. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2005

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	
1.1	Die Familie der OCT	1
1.2	Die große extrazelluläre Schleife	6
1.3	Fragestellung der Arbeit	8
2	Material und Methoden	
2.1	Herstellung der cDNA	12
2.2	Synthese von cRNA	12
2.3	Expressionssystem <i>Xenopus laevis</i> – Oozyten	14
2.4	<i>Tracer flux</i> – Messungen	17
2.5	Statistik und Versuchsauswertung	20
2.6	Verwendete Substanzen und Hilfsmittel	22
3	Ergebnisse	
3.1	Chimären A und B: Transport der Substrate TEA und Histamin	26
3.2	Chimären A und B: Substratabhängigkeit von TEA	30
3.3	Chimären C und D: Untersuchung verschiedener Substrate	33
3.4	Chimären A und B: Untersuchung von Stoffen unterschiedlicher Affinität gegenüber rOCT1 und rOCT2	36
4	Diskussion	
4.1	Interpretation der erhobenen Daten	48
4.2	Beispiele für andere extrazelluläre Schleifen und deren Bedeutung	52
4.3	Klinische Relevanz der organischen Kationentransporter	53
4.4	Ausblick	55

5 Zusammenfassung	56
6 Literaturverzeichnis	58
7 Anhang	
7.1 Einige Vertreter der OCT-Familie	75
7.2 Formelzeichen	77
7.3 Abkürzungen	79
7.4 Zusammenfassung aller Hemmkinetiken von rOCT1, rOCT2 und den Chimären A und B	80

1 Einleitung

1.1 Die Familie der OCT

Eines der wichtigsten Definitionen von Leben ist die Erhaltung eines Fließgleichgewichtes in einem künstlichen Raum. Unter Energieaufwand wird eine Homöostase in recht engen Grenzen aufrecht erhalten. Vielfältige Transporter und Kanäle regeln dabei die Aufnahme organischer und anorganischer Substanzen, aber auch die Elimination von Substanzen, welche die Konstanz physiologischer Funktionen gefährden würden. Während hydrophobe Substanzen passiv durch die „Barrieren des Lebens“, die Plasmamembranen (*Singer und Nicholson, 1972*), diffundieren können, sind Ionen und geladene Moleküle im Wesentlichen auf Kanalproteine und Transporter in den Membranen angewiesen.

Transport geschieht zu einem Teil aktiv, das heißt gegen einen bestehenden Konzentrationsgradienten. Der dazu nötige Energieaufwand wird entweder durch metabolische Prozesse in sogenanntem primäraktiven Transport ermöglicht - die größte Rolle spielt die Hydrolyse von ATP -, anderenfalls wird ein bestehender, durch primäraktiven Transport entstandener elektrochemischer Gradient eines anderen Substrates dafür zweckgenutzt. Dieser als sekundäraktiv bezeichnete Transport läuft dabei mit dem anderen Substrat entweder gleichgerichtet (Symport) oder entgegengesetzt (Antiport). Stoffe und Moleküle gelangen aber unter bestimmten Bedingungen auch entlang ihres elektrochemischen Gradienten zur Gegenseite. Neben den (Ionen-)Kanälen spielen dabei auch spezifisch bindende Transporterproteine eine große Rolle. Eine Translokation des Substrates beruht hier auf erleichterter Diffusion. Die besondere Leistung dieser Transporter liegt in der Selektion der zu transportierenden Substanzen.

Eine solche Aufgabe kommt bisherigen Forschungen zufolge einer Transporterfamilie zu, die in der Lage ist, in erleichterter Diffusion verschiedenartige große geladene organische Moleküle unterschiedlicher Spezifität durch biologische Membranen hindurch zu expedieren. Dieses Charakteristikum lässt sich wohl am treffendsten mit dem Begriff Polyspezifität kennzeichnen.

Wenngleich der Grundstein zur Entdeckung dieser Eiweiße schon mit der Beschreibung des organischen Kationentransports an der Niere (*Rennick et al., 1947; Sperber, 1947*) gelegt war, stieß man seit der Klonierung und Charakterisierung des ersten polyspezifischen organischen Kationentransporters rOCT1 (*Gründemann et al., 1994*) durch Homologie-Screening auf immer neue Transporterproteine, die aufgrund der ähnlichen Aminosäuresequenz und Eigenschaften eine nun schon große Familie bilden (*Abb. 1.1*). In einer Veröffentlichung aus dem Jahre 2000 sind die bis dato aus dem Genom unterschiedlichster Spezies klonierten Proteine der so bezeichneten OCT-Familie sehr übersichtlich sowohl in ihrer Aminosäuresequenz als auch mit ihren Besonderheiten und ihrer Lokalisation im Gewebe der Spezies dargestellt (*Burckhardt und Wolff, 2000*). Nunmehr benennt man die menschlichen Transporter eher nach ihrem genomischen Namen SLC22. Darunter sind neben verschiedensten Transportern, die die Diffusion erleichtern, auch einige Anionenaustauscher, „multidrugresistente“ Proteine und Protonenantiporter eingeschlossen, die eine Vielzahl an Substraten transportieren wie z.B. monoamine Neurotransmitter, Xenobiotika, Carnitin, Prostaglandine, Nukleosidabkömmlinge oder Harnsäure (*Mooslehner und Allen, 1999; Koepsell und Endou, 2003; Koepsell et al., 2003*).

Die Transporter der OCT-Familie (*Abb. 1.1*) weisen als Gemeinsamkeit die durch Hydrophobizitätsanalysen nach Kyte und Doolittle als sehr wahrscheinlich anzunehmenden zwölf Transmembrandomänen auf. Diese Annahme wird gestützt von immunhistologischen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe mit spezifischen Antikörpern gegen Sequenzen der großen extrazellulären Schleife und gegen das intrazellulär liegende C-terminale Proteinende von rOCT1

Zhang et al., 1998). In vielen Charakterisierungen wurde gezeigt, dass die Affinitäten der Substrate und Hemmstoffe zu den einzelnen Transportern hierbei häufig unterschiedlich sind; dieses gilt auch bezüglich der Richtung des Transportes (Gründemann et al., 1994; Gorboulev et al., 1997; Nagel et al., 1997; Urakami et al., 1998; Kekuda et al., 1998; Zhang et al., 1999; Okuda et al., 1999; Martel et al., 1999; Dresser et al., 2000; Arndt et al., 2001). Gleichermaßen kann aber aus diesen Ergebnissen auch eruiert werden, dass bei fehlender Funktion eines der Transporter abzusehen ist, dass verwandte Transporterproteine bei ein und derselben Spezies die Funktion mit übernehmen.

Die Subfamilie der OCTN integriert mehrheitlich pH- und natriumabhängige Transporter, mit hOCTN2 wurde im Übrigen ein hochaffiner Carnitin-Transporter entdeckt (Tamai et al., 1998). Ein Carnitinmangelsyndrom (Karpati et al., 1975) bei Mutation im Gen dieses Transporters wurde beschrieben (Nezu et al., 1999; Burwinkel et al., 1999; Koizumi et al., 1999). Diese autosomal rezessiv vererbte Krankheit zeigt sich klinisch vor allem durch Myopathie mit einer langsam progressiven, in der Kindheit ihren Anfang nehmenden Muskelschwäche vor allem der proximalen Extremitäten, des Nackens, des Kopfes und des Rumpfes. Schluck- und Atemmuskulatur sind meist mit beteiligt. Häufig besteht zudem eine Hepatopathie, die sekundär zu einer Enzephalopathie mit möglichen Epilepsien und Psychosyndromen führen kann. Ursächlich für die Krankheit ist die durch die Mutation verminderte Aufnahme von Carnitin in die Körperzellen, welches insbesondere als Carrier für Fettsäuren bei der β -Oxidation dient, und dadurch auch erhöhte Wiederausscheidung mit dem Urin (Eriksson et al., 1988; Treem et al., 1988; Tein et al., 1990; Scaglia et al., 1998). Muskelzellen besitzen wegen ihrer beträchtlichen Kapazität zur β -Oxidation besonders viel intrazelluläres Carnitin. Bei Diagnosestellung durch Nachweis von fettspeichernden Typ-I-Fasern in einer Muskelbiopsie therapiert man derzeit mit Carnitin per os (2-6g/Tag) und gegebenenfalls zusätzlich mit Prednison per os (50-100mg/Tag) (Gerok, Huber, Meinertz und Zeidler et al., 2000).

Bestimmte organische Anionen sind im Gegensatz zu den vorab beschriebenen Transportersubfamilien Substrate der OAT-Subfamilie. Neben endogenen Substanzen wie zyklischen Nukleotiden, Prostaglandinen und Harnsäure werden durch diese Eiweiße auch etliche in der Struktur völlig differente Medikamente wie Antibiotika, NSAR oder Diuretika transportiert (*Sekine et al., 2000; Koepsell und Endou, 2003*).

Das Charakteristikum der zwölf Transmembrandomänen und die Konservierung einer spezifischen Aminosäuresequenz (Signatur) im Bereich zwischen der zweiten und dritten vermuteten Transmembrandomäne (*Henderson et al., 1993; Paulsen et al., 1996*) ordnen die OCT- bzw. SLC22-Familie zu der „Major Facilitator“ - Superfamilie (MFS) zu (*Griffith et al., 1992; Marger and Saier, 1993; Koepsell et al., 1998; Pao et al., 1998; Saier, 1999*). Zu der „Major Facilitator Superfamily“ - auch „Uniporter - Symporter - Antiporter“- Superfamilie (kurz USA-Superfamilie) - gehören unter anderem Transporter für Zucker (z.B. die GLUT-Transporter), Xeno- und Antibiotika und Katecholamine.

Die Transporter der OCT-Familie scheinen insbesondere hinsichtlich der Ausscheidung verschiedenster Substanzen aus dem Körper ihre Bedeutung zu erlangen. Mit Hilfe von Westernblot und Immunhistologie konnten die Proteine vor allem in Niere, Leber, Dünndarm und Plazenta lokalisiert werden, hierbei jedoch in unterschiedlicher Dichte (zum Teil fehlend) und spezifischer Membrantopologie (bevorzugt die basolateralen Membrananteile) je nach Transporter (*Gründemann et al., 1994; Schweifer and Barlow, 1996; Terashita et al., 1998; Okuda et al., 1996; Busch et al., 1998; Kekuda et al., 1998; Gründemann et al., 1998; Meyer-Wentrup et al., 1998; Urakami et al., 1998; Mooslehner and Allen, 1999; Verhaag et al., 1999; Karbach et al., 2000; Wu et al., 2000*). Basale Transkription ließ sich per RT-PCR für Vertreter der OCT-Familie aber beispielsweise auch in Magen, Hirn, Colon, Herz und Milz nachweisen (*Gründemann et al., 1997; Gorboulev et al., 1997; Busch et al., 1998; Kekuda et al., 1998*). Die verschiedenen Transporter weisen dabei auch in Speziesabhängigkeit große Unterschiede bezüglich der Gewebeverteilung auf.

Allem Anschein nach sind die OCT insbesondere die ersten Transportstationen bei der mehrere Schritte benötigenden Elimination verschiedenster Moleküle aus dem Organismus heraus, obgleich sie auch bei der Reabsorption einer Vielzahl an Substanzen eine Rolle spielen. Während für den Transporter hOCTN2 Carnitin als wichtigstes Substrat erwiesen scheint, wird immer noch spekuliert, ob für die Vielzahl der Transporter der OCT-Familie die Substrate gefunden sind, welche evolutionsbiologisch die Entstehung der Familie erklären könnten. In diesem Hinblick interessant erscheint die Vielzahl an stoffwechselaktiven Substanzen und Neurotransmittern wie beispielsweise biogener Amine, die von den OCT transportiert werden (*Busch et al., 1996[a]; Busch et al., 1996[b]; Gorboulev et al., 1997; Breidert et al., 1998; Busch et al., 1998; Gründemann et al., 1998; Wessler et al., 2001*).

1.2 Die große extrazelluläre Schleife

Aufgrund von Hydrophobizitätsanalysen weisen die Major-Facilitator-Superfamilie und mit ihnen die Familie der OCT bzw. der SLC22 aller Wahrscheinlichkeit nach zwölf Transmembrandomänen auf (*Abb. 1.2*). In das Auge sticht unter anderem die meist lange Aminosäurenkette, die sich extrazellulär zwischen erster und zweiter Transmembrandomäne in gewisser Nähe zum N-terminalen Ende befindet. Eine weitaus kleinere Schleife, die zwei Proteinkinase C abhängige Phosphorylierungsstellen enthält, lokalisiert sich wahrscheinlich intrazellulär zwischen den Transmembrandomänen sechs und sieben (*Koepsell et al., 1998*).

Auffällig ist die generell stärkere Konservierung der Aminosäurenabfolge in Nähe des N-Terminus gegenüber dem C-terminalen Ende in der MF-Superfamilie (*Griffith et al., 1992*). Diese Aussage trifft auch für die große extrazelluläre Schleife zu. So finden sich z.B. bei den eng verwandten Transportern rOCT1 und rOCT2, die zu etwa 70% homolog sind, auf der putativen großen extrazellulären Schleife mit einer gesamten Länge von je 108

Aminosäuren nur 15 differente Aminosäuren (*Gründemann et al., 1994; Okuda et al., 1996*).

Dies führt zu der Vermutung, dass die große extrazelluläre Schleife eine wichtige Funktion ausübt. Sie könnte beispielsweise an der Substratbindung beteiligt sein.

Eine herausragende Rolle der großen extrazellulären Schleife wird auch deshalb spekuliert, weil in der Schleife bei den verschiedenen Transportern vier oder sechs Cysteinreste vorhanden sind, die durch die Bildung von Disulfidbrücken die Konformation der Schleife stabilisieren könnte (*Koepsell et al., 1999*).

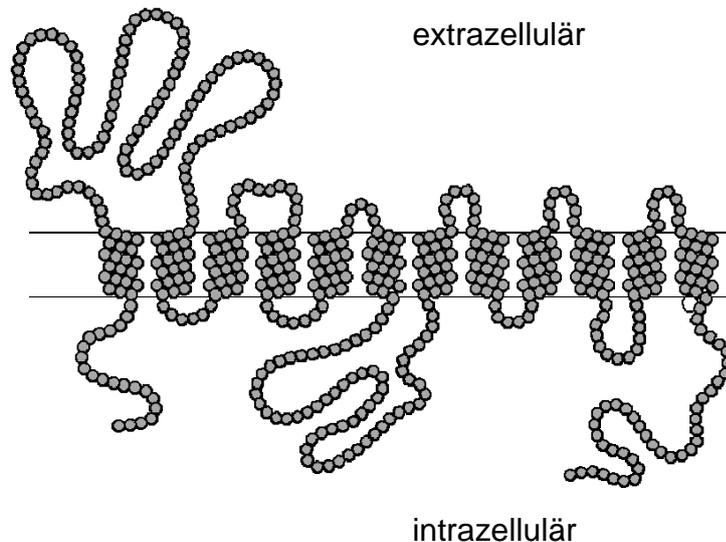


Abb. 1.2: Typische postulierte Topologie der OCT-Transporter mit zwölf Transmembrandomänen, einer großen extrazellulären und einer kleineren intrazellulären Schleife.

1.3 Fragestellung dieser Arbeit

Agrund der im vorangegangenen Kapitel beschriebenen besonderen Eigenschaften der großen extrazellulären Schleife, dabei insbesondere dem hohem Grad der Konservierung der Aminosäuresequenz, sollte in meiner Arbeit eruiert werden, ob sich Hinweise dafür ergeben, dass sich die große extrazelluläre Schleife an der Bildung der Substratbindungsstelle beteiligt.

Eine gängige Verfahrensweise, um Erkenntnisse zur Funktion bzw. Funktionsweise und möglicherweise der Struktur eines Proteins oder eines Proteinabschnittes gewinnen zu können, ist die Vergleichsmessung zwischen nativem und punktuell oder abschnittsweise verändertem Protein. Bei Transporterproteinen lassen sich dabei beispielsweise durch veränderte oder konstante Affinitäten zu Substraten oder hemmenden Substanzen Aussagen über die Funktion des veränderten Bereichs treffen. Wenn einem Eiweiß ein bestimmter Sequenzabschnitt durch den eines anderen Proteins durch Austausch ersetzt wird, spricht man dabei von einer Chimäre.

Chimaera war in der griechischen Mythologie ein Drachenwesen, welches aus einem Löwenkopf, einem Ziegenkörper und einem Schlangenschwanz bestand. Von dem lykischen Helden Bellerophon auf dem geflügelten Pferd Pegasus soll dieses Unwesen nach einem tagelangen Kampf besiegt worden sein.

Um einer Antwort auf die Frage nach der Bedeutung der großen extrazellulären Schleife insbesondere in der Familie der OCT näher zu kommen, wurden in unserer Arbeitsgruppe vier, sich jeweils durch die große extrazelluläre Schleife vom Wildtyp unterscheidende Chimären kreiert, deren Charakterisierung Hinweise auf die Schleifenfunktion bieten sollte:

Eine Chimäre A entstand durch Insertion der großen extrazellulären Schleife von rOCT1 in die Grundstruktur von rOCT2 anstelle deren Schleife (Abb. 1.3).

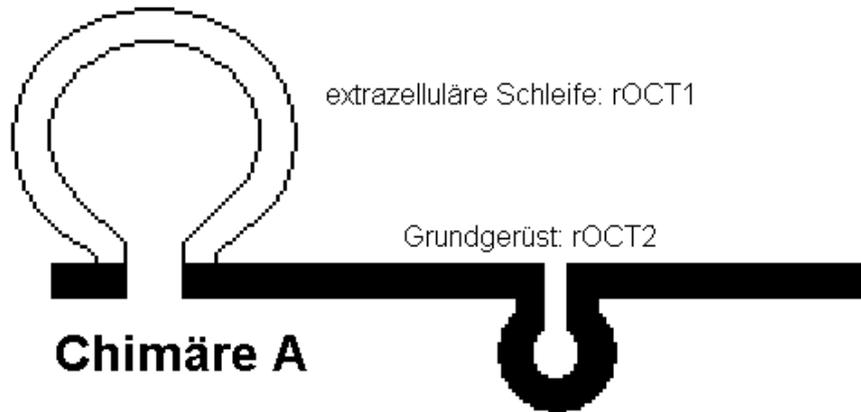


Abb. 1.3: Modell der Chimäre A.

Die so titulierte Chimäre B integrierte in die Grundstruktur von rOCT1 anstelle der eigenen die große extrazelluläre Schleife von rOCT2 (Abb. 1.4).

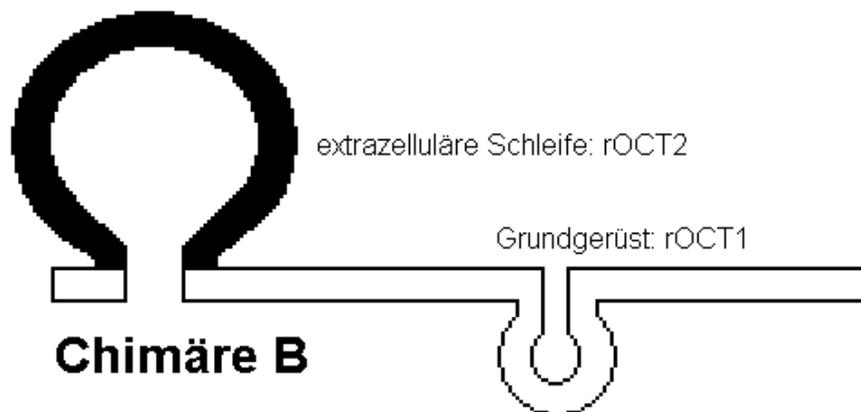


Abb. 1.4: Modell der Chimäre B.

Aus der weitläufigen Verwandtschaft innerhalb der MFS wurde die entsprechende Schleife des humanen GLUT1-Transporters in den Bereich zwischen den ersten beiden Transmembrandomänen in die Grundstruktur von rOCT1 eingefügt und erhielt den Namen Chimäre C (Abb. 1.5).

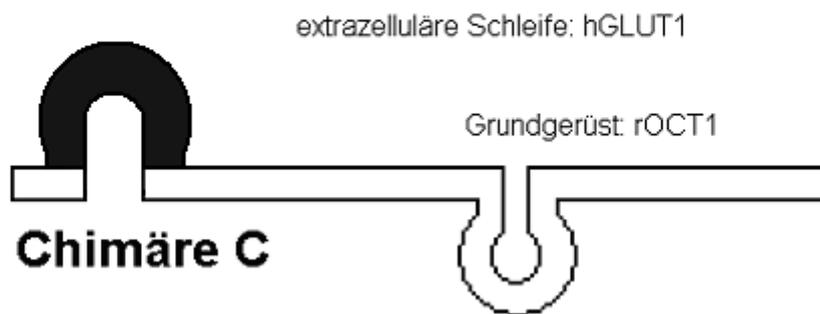


Abb. 1.5: Modell der Chimäre C.

Ein Austausch der großen extrazellulären Schleife mit einem Vertreter der OAT-Subfamilie erfolgte in der so genannten Chimäre D: Die Schleife von rOAT1 wurde in die Grundstruktur von rOCT1 eingebaut (Abb. 1.6).

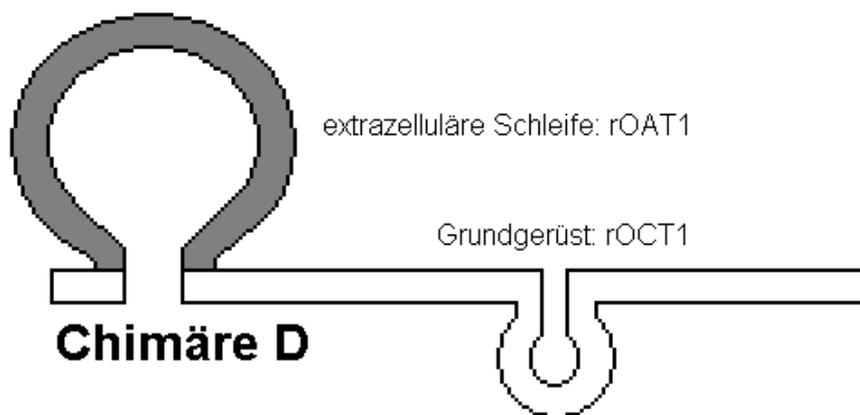


Abb. 1.6: Modell der Chimäre D.

Seit Jahren werden klonierte Transporter in unserer Arbeitsgruppe nach Expression in Oozyten des Afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* (Abb. 1.7) funktionell charakterisiert.

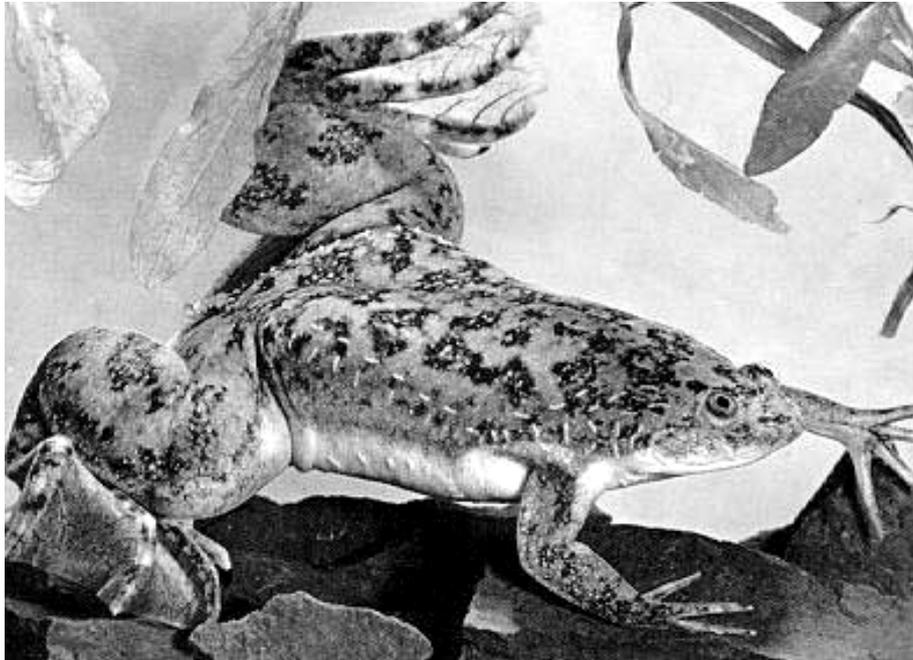


Abb. 1.7: Der afrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis*.

Durch Transportmessungen an diesem Expressionssystem sollte untersucht werden, ob spezifische Eigenschaften wie Affinitäten oder Substrate eines Transportsystems durch den Austausch der großen extrazellulären Schleife auf ein anderes Transportsystem übertragen werden können. Derartige Befunde würden beweisen, dass die große extrazelluläre Schleife an der Substraterkennung oder am Transport beteiligt ist.

2 Material und Methoden

2.1 Herstellung der cDNA

Die Chimären wurden durch Dr. Valentin Gorboulev aus den Wildtypen rOCT1, rOCT2, rOAT1 und hGLUT1, die in Plasmidvektoren integriert waren, mittels PCR synthetisiert. Dabei wurden durch Ankopplung von jeweils zwei Primern an determinierte Bereiche der Transportersequenzen und nach PCR drei verschiedene PCR-Produkte aus ursprünglich zwei Transportern erhalten. Zwei dieser Produkte entsprachen dabei jeweils Regionen des Chimären-Grundgerüsts, die dritte der Schleife des anderen Transporterwildtyps. In einer nun folgenden Fusions-PCR wurden diese drei Produkte so miteinander verbunden, dass eine Sequenz resultierte, in der in einem kürzeren Abschnitt aus dem Bereich des N-terminalen Endes des Chimären-Grundgerüsts anstelle der ursprünglichen großen extrazellulären Schleife das Pendant eines anderen Transporters eingepasst war. Diese PCR-Produkte wurden nun unter Zuhilfenahme von Restriktionsenzymen in bestehende Wildtyp-Plasmidvektoren eingebunden und kloniert. Die plasmid-DNAs der Chimären wurden in der Arbeitsgruppe durch Dr. Valentin Gorboulev, Aida Akhoundova und Irina Schatz aus Bakterienlysaten in Maxipräparation gewonnen und gereinigt. Freundlicherweise stellte mir Dr. Valentin Gorboulev die fertige plasmid-DNA sowohl der Wildtypen als auch der Chimären zur Verfügung.

2.2 Synthese von cRNA

Zur Synthese der komplementären RNA (daher cRNA) wurde nach Linearisierung durch die Restriktionsenzyme Not1 bzw. Mlu1 die DNA extrahiert. Das geschah - im Wechsel mit Zentrifugationsschritten - durch mehrmaliges Ausschütteln in Chloroform-Phenol und Chloroform und Fällung durch Zugabe von Natrium-Acetat und eisgekühltem Ethanol (96%). Das nach

einer letzten Zentrifugation erhaltene DNA-Pellet wurde in mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem Wasser gelöst. Am Fotometer wurde unter Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes die DNA durch Absorptionsmessung bei 260nm und 280nm und Division der gemessenen optischen Dichten auf ihre Reinheit und Konzentration kontrolliert; ein Quotient zwischen 1,5 bis 2 erlaubte die Annahme einer für die cRNA-Synthese gebrauchsfähigen DNA.

Eine kleine Menge von 1-2 µl linearisierter DNA diente nun RNA-Polymerasen der Bakteriophagen T7 bzw. SP6 als Ansatzpunkt für die cRNA-Synthese. Neben der DNA, der DNA-spezifischen Polymerase und Nukleosidtriphosphaten (rATP, rUTP, rGTP, rCTP) fanden weiterhin Transkriptionspuffer, RNase-Inhibitor, 5'-Cap-Analogon, anorganische Pyrophosphatase und Dithiotreitol (DTT) im Reagenz Verwendung, um eine optimale RNA-Ausbeute zu erlangen. Die Transkription erfolgte über eine Dauer von zwei Stunden bei genau 37°C im Wasserbad. Die synthetisierte RNA wurde in ähnlicher Weise wie - oben beschrieben – die DNA nach Linearisierung extrahiert.

Die Menge der synthetisierten cRNA konnte abschließend nach Elektrophorese abgeschätzt werden. Hierzu wurde ein kleiner Teil der gewonnenen cRNA mit DMSO/Glyoxal nach der von Gründemann und Koepsell beschriebenen Methode denaturiert und zusammen mit einem Nukleotid-Standard auf Agarosegel aufgetragen (*Gründemann und Koepsell, 1993*). Bei gelungener Transkription stellte sich nach etwa 80 Minuten Elektrophorese bei 60-80V die mit Ethidiumbromid markierte RNA unter UV-Licht als einzelne Bande an typischer Lokalisation im Vergleich zur RNA-Leiter dar. Die Dichte bzw. die Leuchtstärke der Bande korrelierten dabei mit der RNA-Quantität.

2.3 Expressionssystem *Xenopus laevis* - Oozyten

Eizellen des in südafrikanischen Gewässern und in Südkalifornien ansässigen Glatten oder auch Großen Krallenfrosches *Xenopus laevis* (Daudin, 1802) sind ein ideales Expressionssystem für sehr viele Transportproteine. Neben dieser Anwendung ist der Frosch insbesondere ein beliebtes Labortier für Forschungen an Embryogenese und Steroidhormonen, neuerdings auch bei Identifizierung von Dopingeinnahme. Different zu anderen Amphibien ist *Xenopus laevis* ein reiner Wasserbewohner, aufwendige Terrarienhaltung ist daher nicht nötig. Auch hinsichtlich Lebensraum und Futter ist der Frosch wenig anspruchsvoll. Epidermale und endogene Faktoren machen ihn gegen Infektionen relativ resistent (Zasloff, 1987; Ali et al., 2001), ein Umstand, der eine rigorose Asepsis bei den Operationen nicht zwingend nötig macht.

Durch die Fähigkeit dieser lebenden undifferenzierten Zellen, in das Zytoplasma mikroinjizierte mRNA zu translatieren (Gurdon et al., 1971), das entstandene Eiweiß gegebenenfalls zu modifizieren und im Falle von Membranproteinen in die eigene Plasmamembran einzubauen (Sigel, 1990), eignen sich die Oozyten des Krallenfrosches sehr gut für Transportmessungen und elektrophysiologische Ionenstrommessungen. Durch trotz sparsamem RNA-Einsatz hohen Proteinausbeuten hat dieses System aber z.B. auch zur Proteinpräparation Bedeutung erlangt. Vorteilhaft ist die recht unkomplizierte Handhabung der Eizellen. Sowohl Präparation und Mikroinjektion als auch Lagerung und Einzelzellmessungen gestalten sich aufgrund der Robustheit und Größe dieser Oozyten als recht einfach.

Die Oozyten wurden durch Laparotomie eines lebenden Krallenfrosches gewonnen. Die Frösche wurden zur Operation mittels des Kurzzeitanästhetikums Tricain, welches als Narkotikum für Kaltblüter direkt über deren Haut resorbiert wird, und durch Unterkühlung betäubt. Für den Zeitraum der Operation waren die Frösche in Eis eingebettet. Das Aussetzen motorischer Reflexe, insbesondere des Schluckreflexes, zeigte den Erfolg der Narkose an.

Etwa 1,5cm kranial der Hüftfalte wurde ein dem Wechselschnitt ähnelnder, maximal 1cm langer Unterbauchschnitt durch Haut, Faszie, Muskelschicht und Peritoneum vorgenommen. Beginnend von kaudal erfolgte nun die Entnahme eines Teils des Ovars. Die im ausgewachsenen Zustand hinsichtlich der Kopf-Steiß-Länge 10-15cm großen *Xenopus laevis* - Weibchen enthalten das gesamte Jahr über in ihren paarigen Ovarien Oozyten unterschiedlicher Reife, die nach Dumont in die Stadien I bis VI eingeteilt werden (Dumont, 1972).

Die von Ovaryepithel, Blutgefäßen, Theka und Follikel epithel in kleineren Lobuli umgarnten Oozyten ließen sich unschwer aus der Bauchhöhle herauslösen. Nach Verschluss der Bauchdecke mit zwei bis drei Einzelnähten ist das im Frosch verbleibende Ovar nun in der Lage, sich in gewissem Umfang zu regenerieren, und steht nach einer Schonfrist von mindestens zwei Monaten zur erneuten Ovarotomie zur Verfügung. Allerdings kann man bei Bedarf nach schon vier Wochen eine Laparotomie zur Gewinnung von Oozyten auf der Gegenseite ausführen. Die Frösche bleiben also am Leben, nach kurzer Spülung unter lauwarmem Leitungswasser kehren sämtliche Reflexe und motorischen Fähigkeiten wieder zurück. Zur postoperativen Kontrolle verweilten die Tiere etwa einen Tag im Einzelbecken mit Meerwasser mit einer der Gefäßgröße angepassten Menge an Streptomycin.

Die Lagerung der Oozyten erfolgte bei 16 bis 18°C in Oozyten-Ringer-Lösung, im Folgenden kurz ORi bezeichnet. Diese Lösung beinhaltete 100mM Natriumchlorid, 2mM Kalziumchlorid, 3mM Kaliumchlorid, 1mM Magnesiumchlorid und 5mM 3-(N-Morpholino-) Propansulfonsäure (MOPS); mit Natriumhydroxid wurde sie bei der Herstellung auf einen pH von 7,4 eingestellt. Im Bedarfsfall - um Bakterienwachstum vorzubeugen - kann man Antibiotika hinzufügen, gebräuchlich sind KulORi mit 20mg/l Penicillin und 25mg/l Streptomycin bzw. GentORi mit 50mg/l Gentamycin. Die bei anderen Zellkulturen erforderliche Substitution an Aminosäuren und anderen Nährstoffen ebenso wie eine Zugabe an Hormonen kann bei den Eizellen umgangen werden, da sie diese Stoffe in ihrem Eidotter vorrätig haben.

Die mit Pinzette vorsichtig ein wenig zerpfückten Ovarlappen wurden mehrmals mit ORi gespült und die kleinen Oozytenpakete nun über Nacht in Oozyten-Ringer-Lösung gelagert, der 1mg/ml Kollagenase zugesetzt war. Diese Prozedur bewirkte eine Trennung der interzellulären Verbände, vorzugsweise der Gewebeverbindungen der Theka. Nach Inkubation von etwa 10 bis 12 Stunden wurde die Kollagenase-Einwirkung durch Spülung mit ORi beendet. Eine Vereinzelung der Oozyten - oft noch von einer schlaffen Hülle von Follikelepithelzellen umgeben - erfolgte mit kalziumfreier ORi.

Aus dem Pool an Eizellen wurden unter dem Mikroskop möglichst einheitlich große und kugelförmige, gesunde Oozyten der Stadien V oder VI nach Dumont ausgewählt (*Dumont, 1972*). Diese Zellen mit einem Durchmesser von etwas mehr als einem Millimeter haben als Charakteristikum eine schon mit bloßem Auge sichtbare Polarität in Art zweier farblich unterschiedlicher Hemisphären. Der durch reichlich Melaninpigment dunkelbraun bis schwarz gefärbte animale Pol enthält den Zellkern und ist besonders mitochondrienreich. Der hingegen hell, meist beige-gelblich imponierende vegetale Pol birgt vor allem den Dotter der Eizelle.

Unter dem Mikroskop wurde die zu exprimierende und in Wasser gelöste cRNA den separierten Oozyten mittels Mikroinjektionspumpe mit Hilfe einer ausgezogenen Glaskapillare einzeln injiziert. Angestrebt wurde ein Injektionsvolumen von 50nl RNA-Lösung pro Eizelle mit jeweils 10ng RNA. Die Spitze der Glaskapillare am Nanoinjektor sollte dabei nicht zu groß sein, damit die Plasmamembran der Oozyten sich nach der Prozedur wieder verschloss. Damit nach den Einstrom des zusätzlichen Volumens nicht die eingebrachte RNA oder Eidotter aus der Eizelle heraus gedrückt wurde, erfolgte unmittelbar vor der Injektion die Inkubation der Eizellen mit hyperosmolarer ORi (130mM Natriumchlorid) für wenige Minuten.

Der Einstich geschah im Bereich des hellen vegetalen Pols, um eine Injektion der RNA in den Zellkern zu vermeiden. Weil eine Vergleichbarkeit der

Transportmessungen nur bei Verwendung von Eizellen der selben Ovarotomie und unter den gleichen (Lagerungs-)Bedingungen erfüllt ist (gleicher „batch“), wurden anschließend die zu vergleichenden RNA mikroinjiziert. Wasserinjizierte Oozyten dienten als Negativkontrolle. Die Lagerung der Oozyten erfolgte nun nach den oben beschriebenen Bedingungen bei 16 bis 18°C in KulORi bzw. GentORi.

Die Translation im *Xenopus* - Expressionssystem benötigt einige Zeit; mit ausreichend Eiweiß für Transportmessungen kann frühestens nach zwei Tagen gerechnet werden. Limitierender Faktor für eine erfolgreiche Expression - die Translation und den membranalen Einbau des Proteins vorausgesetzt - ist oftmals die Haltbarkeit der Oozyten. Verantwortlich macht man endogene - z.B. qualitativ saisonale Schwankungen (*Dascal, 1987*) der Oozyten-Lebensdauer - oder exogene Störeinflüsse - wie proteolytische Prozesse - für die pseudo-meiotischen Vorgänge, die hiernach das Aufplatzen der Eizelle und das Auslaufen des Dotters zur Folge haben. Die Haltbarkeit für die durchschnittlichen Oozyten schwankt je nach Versuchstier, Jahreszeit und sonstigen exogenen Einflüssen zwischen einem Tag und bis zu drei Wochen. Wesentlich zur Pflege der injizierten Eizellen bis zur Verwendung bei den Experimenten trug daher die tägliche Umsetzung in frische ORi und das regelmäßige Autoklavieren bzw. Reinigen der benutzten Materialien bei. Alternde oder defekte Oozyten sind rigoros verworfen worden.

2.4 *Tracer flux* - Messungen

In die Zytoplasmamembran der Oozyten eingebaute und funktionstüchtige Transporterproteine zeigten nach Translation der zu analysierenden RNA in sogenannten *Tracer flux* - Messungen signifikant erhöhte Aufnahmeraten der transportierten Substrate im Vergleich zur Negativkontrolle (wasserinjizierten Oozyten). Bei dieser Methode wurden den Eizellen definiert konzentrierte, radioaktiv markierte Substanzen über eine feste Zeit zugesetzt und

anschließend in einem Radioszintillationszähler die von der Einzelzelle aufgenommene Substratmenge ermittelt.

Reine Aufnahmemessungen zur Beantwortung der Frage, ob die Aufnahme einer spezifischen Substanz generell über ein bestimmtes Transportereiweiß geschieht, benötigten zum Vergleich ausschließlich die Negativkontrollen. Von einer Aufnahme bei einer festgelegten Substratkonzentration war dann auszugehen, wenn sich die Aufnahmeraten der RNA-injizierten Oozyten signifikant von denen der wasserinjizierten Eizellen unterschieden. Bei der Wahl der Substratkonzentration sollte berücksichtigt werden, dass bei zu niedriger Konzentration niederaffine Bindungen zwischen Substrat und Transportprotein nur in geringem Maße stattfinden, bei zu hoher Konzentration aber geringer Transport durch die nun aber ebenfalls erhöhte unspezifische Aufnahme (mit dementsprechend höheren Fehlerraten) möglicherweise übersehen wird. Bei zu hohen Substratkonzentrationen waren zudem toxische Wirkungen auf die Oozyten zu beobachten.

Transportkinetiken zur Ermittlung der Michaelis-Menten-Konstante (K_m -Wert) und der maximalen Aufnahmegeschwindigkeit (V_{max}) wurden mit dem zu untersuchenden Substrat in aufsteigenden Konzentrationen durchgeführt. „Kaltes“ Substrat wurde hierbei mit „heißem“ d.h. radioaktiv markiertem gemischt, derart, dass in den einzelnen Inkubationsansätzen vergleichbare Mengen an radioaktivem Material vorhanden waren. Vorbedingung für eine Bestimmung der konzentrationsabhängigen Substrataufnahme war natürlich, dass dieses Substrat auch generell über diesen Transporter in die Zelle aufgenommen wurde. Pro Ansatz erfolgte eine gleichartige Aufnahmemessung unter Zugabe eines hochaffinen Inhibitors - im Fall der OCT wurde üblicherweise Cyanin 863 benutzt - kombiniert mit Messungen an wasserinjizierten Oozyten, um Hintergrundaktivität durch unspezifische Aufnahmemechanismen zu erkennen.

Dagegen wurden bei Inhibitionsmessungen zur Bestimmung der halbmaximalen Hemmkonzentration (IC_{50}) mehreren Ansätzen bei Einsatz einer jeweils konstanten Substratkonzentration eine andere - die zu beurteilende - Inhibitorsubstanz in aufsteigender Konzentration beigefügt. Die „kalte“ d.h. nicht radioaktive, zu untersuchende Substanz konkurrierte bei höher werdender Konzentration mit dem radioaktiv markierten Substrat in Art einer kompetitiven Hemmung oder aber hemmte - nicht kompetitiv - durch Bindung an den Transporter dessen Aufnahme; ein bei steigender „kalter“ Substratmenge immer geringer werdende Aufnahme resultierte. Ein Ansatz ohne das „kalte“ Substrat diente als Positivkontrolle, wasserinjizierte Oozyten dagegen zur Erkennung unspezifischer Aufnahme als Negativkontrolle.

Die Inkubation mit jeweils 200µl Substratlösung erfolgte in kleinen Bechern mit jeweils 10 Oozyten pro Ansatz, um individuellen Schwankungen von Aufnahmeraten der Einzeloozyten statistisch zu begegnen. Vorab wurden die Eizellen nach Lagerung in Antibiotika enthaltender ORi mehrfach in „reiner“ ORi gewaschen, um eine Beeinflussung der Messungen durch diese Therapeutika auszuschließen. Die defekten Oozyten wurden selektiert.

Man beabsichtigte, möglichst gleiche Messbedingungen zu schaffen. So wurde das Substrat den Oozyten in definierten Zeitabständen hinzugegeben. Bei konstanten 22°C wurden die Oozyten nun über eine Stunde im Wasserbad gerüttelt. Die Wahl einer Inkubationsdauer von einer Stunde beruhte darauf, dass in Zeitkinetiken für die Transporter rOCT1 und rOCT2, die in der Arbeitsgruppe durchgeführt worden, über eine Dauer von mindestens 90 Minuten lineare Aufnahmeraten für TEA in einer relativ hohen Konzentration (von 400 µM) gezeigt werden konnten. Eine Vergleichbarkeit der Messergebnisse an verschiedenen Transportern wurde dadurch erreicht, indem man die Messungen an parallel injizierten Oozyten eines einzigen operierten Frosches durchführte (Parallel-Batch). Bei Messungen an verschiedenen Oozytenpräparationen waren Schwankungen von Substrataffinitäten beobachtet worden (*Arndt et al., 2001*), die auf unterschiedlichen

Ruhepotentialen in Oozyten verschiedener Frösche beruhten. Die Affinität von Substraten zeigt sich gegenüber den OCT-Transportern hierbei abhängig von dem Membranpotential.

Vor Abschluss der Inkubation wurde ein Teil der so entstandenen „heißen“ Substratlösung abgenommen; dieser so bezeichnete „Überstand“ diente als Referenz zur beigefügten Menge an radioaktiver Substanz. Nach Ablauf der Inkubationsdauer stoppte man nun die Substrataufnahme mit eiskalter ORi. Die Oozyten wurden vierfach gewaschen und einzeln in Szintillationsgefäße überführt. Zur Zellyse erfolgte die Zugabe 5%iger Sodiumdodecylsulfat-Lösung (SDS) in diese Phiolen. Nach abschließendem Hinzutun von Luminiszenzflüssigkeit konnte die Aktivität der Lysate und der „Überstände“ in den Szintillationsgefäßen - gemessen in Counts pro Minute - im Radioszintillationszähler ausgemacht werden. Durch die direkte Korrelation zwischen Aktivität und Aufnahmerate ließ sich aus diesen Messergebnissen die von den einzelnen Oozyten aufgenommene Substratmenge ermitteln.

2.5 Statistik und Versuchsauswertung

Die im Radioszintillationszähler gemessenen Aktivitäten erlauben einen direkten Rückschluss auf die von der Eizelle aufgenommene Radioaktivität bzw. des „heißen“ Substrates. Abhängig von der Konzentration dieses Markers in einem bestimmten Volumen der Inkubationslösung ist somit eine Berechnung der Menge aufgenommenen Substrates möglich.

Die im Szintillationszähler nach Luminiszenzkorrektur registrierten Aktivitäten in Counts pro Minute (cpm) wurden je nach verwendetem Radioisotop über die sogenannte Quenchkorrektur in Zerfälle pro Minute (dpm) umgerechnet. Aus der gemessenen Aktivität der Zellysate (dpm_{Oozyt}) bzw. des „Überstands“ ($dpm_{\text{Überstand}}$) erhielt man die Gesamtaktivität (dpm_{Gesamt}) eines Ansatzes mit 10

Oozyten bei 200 µl Inkubationsvolumen (V) und dem Mittelwert einer Doppelbestimmung eines Überstandvolumens von 10 µl:

$$\text{dpm}_{\text{Gesamt}} = 10 \cdot \text{Median}(\text{dpm}_{\text{Oozyt}}) + 20 \cdot \text{Mittelwert}(\text{dpm}_{\text{Überstand}})$$

Um die in einer Oozyte transportierte Substratmenge (v) zu berechnen, wurde folgende Rechnung durchgeführt:

$$v = (\text{dpm}_{\text{Oozyt}} \cdot c) / (\text{dpm}_{\text{Gesamt}} \cdot V)$$

Dabei bezeichnet v die Transportrate in pmol pro Zeiteinheit und Oozyte, c die Substratkonzentration im Inkubationsansatz in pmol pro ml und V das Volumen der Inkubationslösung in µl. Aus Einzelmessungen an 8 bis 10 Oozyten wurden die Mediane der Aufnahmeraten bestimmt. Im Gegensatz zu den Mittelwerten fallen dabei starke Ausreißer weniger ins Gewicht. Außerdem wurden die Standardfehler der Mittelwerte (SE) berechnet.

Transportkinetiken zur Bestimmung der maximal transportierten Substratmenge pro Zeiteinheit (v_{max}) und der Michaelis-Menten-Konstante (K_m) - dieser entspricht die für eine halbmaximale Transportgeschwindigkeit erforderliche Substratkonzentration [$s_{1/2v_{\text{max}}}$] - wurden nach der Michaelis-Menten-Gleichung gefittet:

$$v = v_{\text{max}} \cdot [s] / (K_m + [s])$$

Grafisch wurde die transportierte Substratmenge pro Zeiteinheit (v) in Abhängigkeit zur Substratkonzentration [s] in ein Koordinatensystem transponiert, folglich [s] auf der Abszisse, v auf der Ordinate.

Die Aufnahmeraten bei den Hemmkinetiken hingegen wurden prozentual zur Positivkontrolle dargestellt (V_i/V_0), somit als Quotient von Aufnahmegeschwindigkeit des Substrats bei unterschiedlicher Hemmstoffkonzentration

(V_i) durch die Aufnahme rate der Positivkontrolle (V_0). Wie oben schon erläutert, meint die Positivkontrolle die Aufnahme rate des Substrats in Abwesenheit des Hemmstoffes. Interessant für die Abschätzung der Affinität eines Hemmstoffes zum Transporter ist die Inhibitorkonzentration halbmaximaler Hemmung (IC_{50}). Im partiell logarithmischen Koordinatensystem (die Konzentrationen des Hemmstoffes wurden in Dezimallogarithmus auf der Abszisse aufgetragen) ist dies der Punkt mit der größten Steilheit, einen monoexponentiellen, einfach sigmaförmigen Kurvenverlauf vorausgesetzt.

Da der Hemmmechanismus nicht bekannt ist, wurden die Hemmkinetiken anstatt nach Michaelis-Menten nach der Hill-Gleichung gefittet. Ein endogener Transport (v_{min}) musste bei den Berechnungen der Substrataufnahme von [^{14}C]TEA nicht berücksichtigt werden, bestätigt durch in jedem Gesamtexperiment durchgeführten Negativ-Kontrollmessungen an wasserinjizierten Eizellen. Die verwendete Funktion zur Kurvenanpassung nach Hill lautet:

$$(V_i/V_0) = v_{max} - (v_{max} * [s]^p) / (IC_{50}^p + [s]^p)$$

2.6 Verwendete Substanzen und Hilfsmittel

Für die DNA-Linearisierung und -Fällung gebrauchte ich:

Bezeichnung	Hersteller
Agarose	Serva, Heidelberg
Chloroform, Roti-Phenol/Chloroform	Roth, Karlsruhe
DEPC	Sigma, Deisenhofen
Ethanol	Mallinckrodt-Baker, Deventer, NL
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Natriumacetat	Sigma, Deisenhofen
Restriktionsenzyme und -puffer	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Spektro-Fotometer Ultrospec III	Pharmacia LKB Biochrom

Die im nächsten Schritt der RNA-Synthese zusätzlich zur DNA-Linearisierung erforderlichen Materialien und Geräte waren im Einzelnen:

Bezeichnung	Hersteller
Cap-Substanz	New England Biolabs, Frankfurt
DTT	Biorad, München
T7 mMESSAGE mMACHINE™ Kit	Ambion Inc., Austin, USA
SP6 mMESSAGE mMACHINE™ Kit	Ambion Inc., Austin, USA
Nukleosidtriphosphat-Mix	Sigma, Deisenhofen
T7 Polymerase	Stratagene, Heidelberg
SP6 Polymerase	Stratagene, Heidelberg
RNA – Kilobasentreppe	Sigma, Deisenhofen
RNAse-freie DNAse	Stratagene, Heidelberg
RNAse-Inhibitor	Stratagene, Heidelberg

Die mMESSAGE mMACHINE™ Kits benutzte ich seit Anfang des Jahres 2000 zur RNA-Synthese.

Die *Xenopus laevis* - Weibchen bezog man von Kähler, Hamburg bzw. Nasco, Fort Atkinson, USA. Die Haltung der Tiere erfolgt in großen Wasserbecken im Anatomischen Institut Würzburg. Dabei wird auf eine Einstellung möglichst konstanter Verhältnisse bezüglich der Wasserqualität, der Tageslänge und der Wassertemperatur geachtet, bei gleichzeitig möglichst artgerechter Haltung. Eine Fütterung mit vitaminsubstituiertem Rinderherz erfolgte etwa zwei Mal pro Woche.

Für die Mikroinjektion und anschließende Lagerung der Oozyten wurden eingesetzt:

Bezeichnung	Hersteller
Kaliumchlorid	Merck, Heidelberg
Kalziumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Kollagenase	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumchlorid	Serva, Heidelberg
MOPS	Fluka, Neu-Ulm
Natriumchlorid	Fluka, Neu-Ulm
Penicillin G	Fluka, Neu-Ulm
Streptomycin	ICN, Eschwege
Glaskanülen-Puller P-30	Sutter Instruments, Novato, USA
Nanoliter-Injektor-Pumpe	WPI, Sarasota, USA
6-wells Kulturschalen	Greiner, Frickenhausen

Im Rahmen der Tracer flux – Messungen wurden die folgenden Chemikalien, Radiochemikalien und Gerätschaften verwendet:

Bezeichnung	Hersteller
Corticosteron	Fluka, Neu-Ulm
Cyanin863	Sigma, Deisenhofen
Chinin	Sigma, Deisenhofen
Guanidin	Sigma, Deisenhofen
Mepiperphenidol (Darstin)	MerckSharp&Dome, Raway, USA
3-O-Methyl-Isoprenalin (OMI)	Boehringer, Ingelheim
Procainamid	Sigma, Deisenhofen
Tetraethylammonium (TEA)	Fluka, Neu-Ulm
Radiochemikalien (wie [^{14}C]-JTEA und [^3H]-MPP)	ARC Inc., St. Louis, USA
Radioszintillationszähler Tri-Carb 1600CA	Canberra Packard, Dreieich
Rüttelinkubator und Rüttler	Köttermann, Hänigsen
Szintillationsgefäße	Canberra Packard, Dreieich
Szintillationscocktail Lumasafe plus	Lumac LSC, Groningen, NL

Die statistische Auswertung und grafische Darstellung geschah mit Hilfe dieser Tabellenkalkulationsprogramme:

Anwendung	Firma
Excel	Microsoft Systems, USA
FigurePi	Fig.P Software Corp., Durham, USA
SigmaPlot	Jandel, USA

3 Ergebnisse

3.1 Chimären A und B: Transport der Substrate TEA und Histamin

Um zu testen, ob die Transportfunktion durch den Schleifenaustausch zwischen rOCT1 und rOCT2 prinzipiell gestört würde, wurde bei den Chimären A und B zunächst der Transport von Substraten untersucht, die von rOCT1 und rOCT2 mit vergleichbarer Michaelis-Menten-Konstante und ähnlichen Raten transportiert werden. Substrate mit ähnlichen K_m -Werten für beide Transporter sind TEA und Histamin, die für TEA bei etwa 100 μM und für Histamin im Bereich von 300 μM liegen (Arndt *et al.*, 2001). Für andere Substrate waren in der selben Arbeit dagegen erhebliche Unterschiede der Michaelis-Menten-Konstanten beobachtet worden. Ein Beispiel dafür ist Guanidin mit einem K_m -Wert von etwa 1700 μM für rOCT1 und einem K_m -Wert von etwa 170 μM für rOCT2.

In der Abbildung 3.1 wird in einem Beispiel das Aufnahmeverhalten der Chimären A und B im Vergleich zu den Wildtypen rOCT1 und rOCT2 und der Negativkontrolle bei einer festen Substratkonzentration von 10 μM Tetraethylammonium gezeigt (Abb. 3.1).

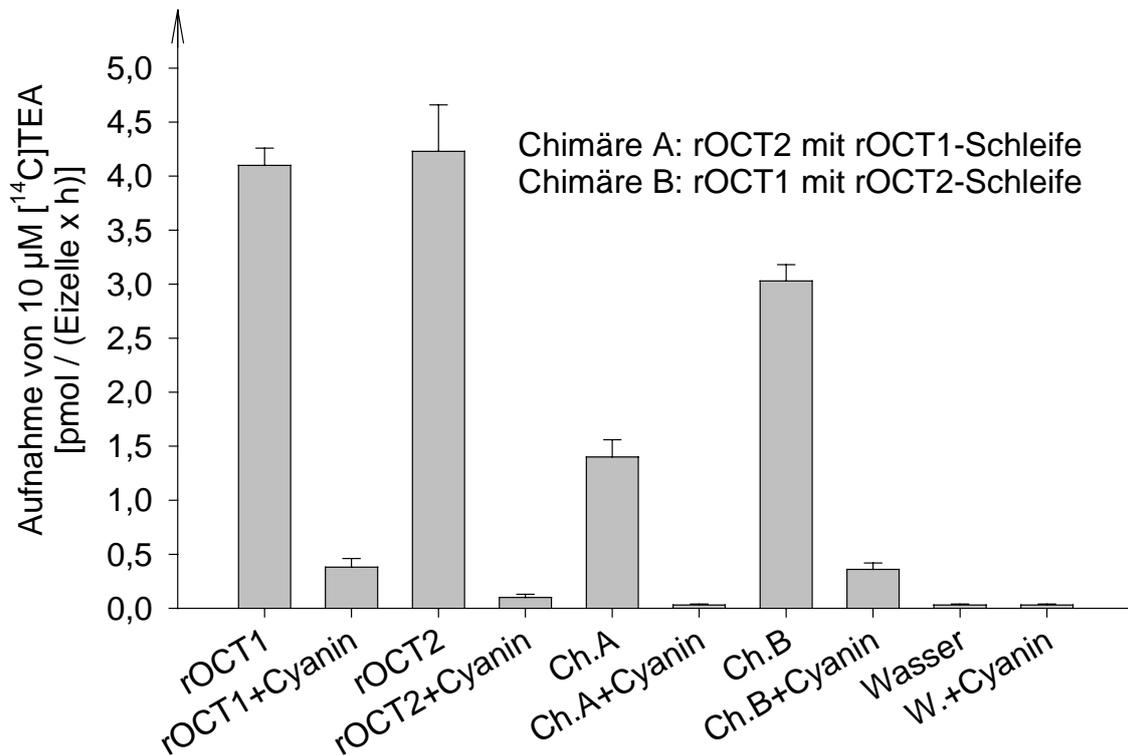


Abb. 3.1: Aufnahme von 10µM [¹⁴C]TEA durch die Transporter rOCT1, rOCT2 und die Chimären A und B. Alle Messungen erfolgten an einem gemeinsamen Versuchstag mit Oozyten eines Frosches, jeweils mit und ohne Hemmung durch 50µM Cyanin 863. Gemessen wurde jeweils der Transport durch 10 Eizellen. Zur Darstellung kommt in der Grafik der Median der Einzelmessungen mit ihren Standardfehlern. Der cyaninhemmbarer Anteil betrug für rOCT1 3,72, für rOCT2 4,13, für die Chimäre A 1,37 und für die Chimäre B 2,67 pmol / (Eizelle x h).

Es zeigte sich, dass die durch einen Schleifenaustausch der Wildtypen rOCT1 und rOCT2 resultierenden Chimären A und B das Substrat TEA im Vergleich zu den wasserinjizierten Oozyten signifikant transportierten. Der Transport war durch den Inhibitor Cyanin 863 deutlich hemmbar. Die Transportraten der Chimären waren geringer als die der Wildtypen.

Dieses Aufnahmeverhalten wurde in einer Vielzahl von Messungen gefunden. In der Regel wurde eine etwas herabgesetzte Aufnahme der beiden Chimären A und B gegenüber den Wildtypen beobachtet. In der folgenden

Grafik wurden aus mehr als 10 Messreihen die relativen Aufnahmeraten in Bezug zu rOCT1 dargestellt (Abb. 3.2).

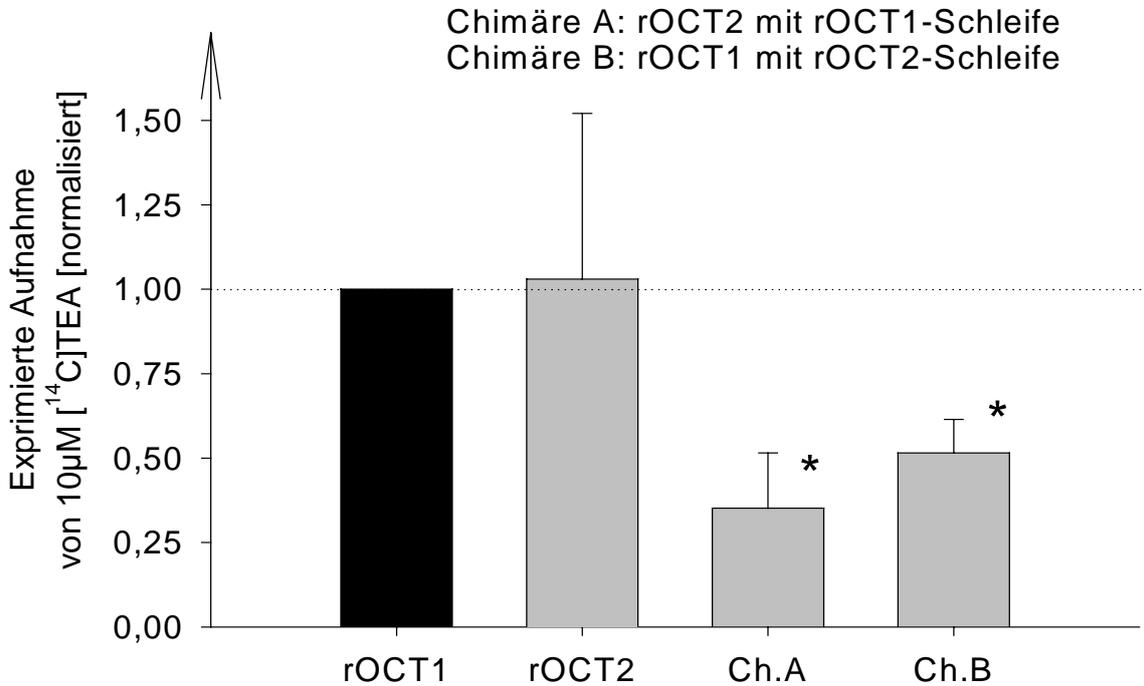


Abb. 3.2: Zusammenfassung der Aufnahmemessungen von 10 μM [¹⁴C]TEA mit rOCT1, rOCT2 und den Chimären A und B. Es werden die Mediane der durch 50 μM Cyanin-hemmbareren Aufnahmeraten aus jeweils 10 Versuchen mit den Wildtypen rOCT1 und rOCT2 und jeweils 20 für die Chimären gezeigt. Dargestellt ist die relative Aufnahme gegenüber rOCT1. Aufnahmeraten, die sich signifikant von denen der Wildtypen rOCT1 und rOCT2 unterschieden, sind durch Sternchen markiert (p<0,05).

Die Aufnahmeraten der Chimären fanden sich signifikant (p<0,05) kleiner als die von rOCT1 und rOCT2. Des Weiteren konnte gesehen werden, dass die Aufnahmeraten abhängig von verschiedenen exogenen Faktoren (wie saisonalen Einflüssen) starken Schwankungen unterlagen.

Als nächstes wurde das Aufnahmeverhalten der Chimären A und B für radioaktiv markiertes Histamin untersucht (Abb. 3.3).

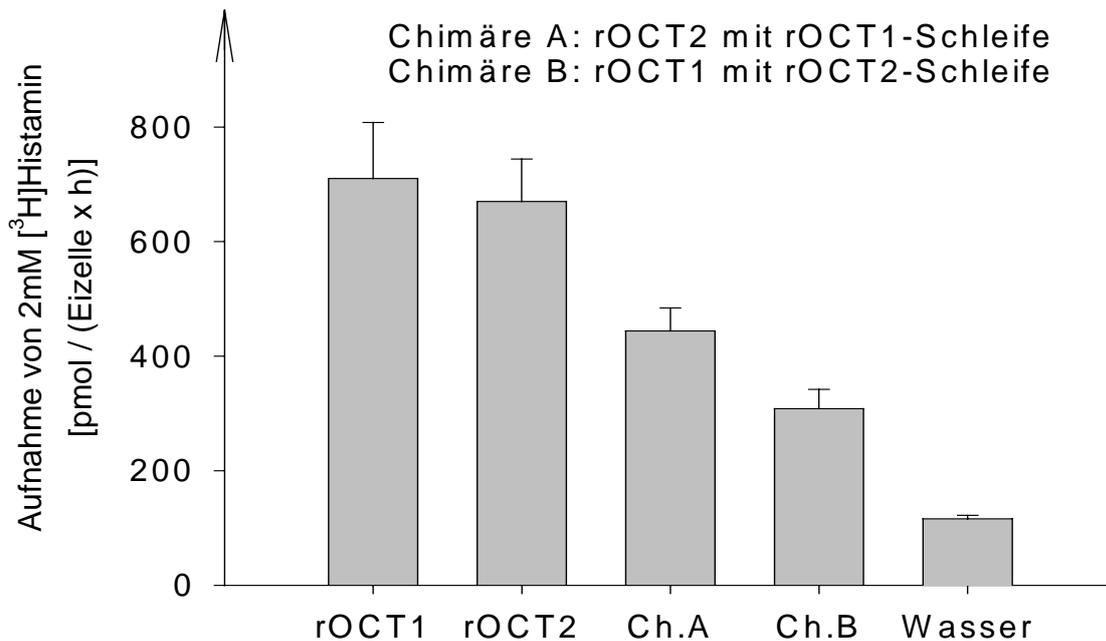


Abb. 3.3: Aufnahme von 2mM [³H]Histamin über die Transporter rOCT1, rOCT2, Chimäre A und Chimäre B. Alle Messungen erfolgten unter gleichen Messbedingungen und mit wasserinjizierten Oozyten als Negativkontrolle. Die medianen Transportraten aus Messungen mit jeweils 10 Einzelzellen lagen für rOCT1 bei 710, für rOCT2 bei 670, für die Chimäre A bei 444, für die Chimäre B bei 308 und für die wasserinjizierten Oozyten bei 116 pmol / (Eizelle x h) und sind in der Abbildung jeweils mit Standardfehler dargestellt.

Auch in diesem Einzelversuch ließ sich eine dem endogenen Transport der wasserinjizierten Eizellen gegenüber signifikant höhere Aufnahme der Chimären A und B finden. Histamin wurde bei dieser Substratkonzentration aber auch nicht so stark transportiert wie durch die Wildtypen rOCT1 und rOCT2. Parallelen mit dem Transportverhalten von TEA, wo ebenfalls etwa 50 Prozent der hemmbaren Transportraten der Wildtypen erreicht wurden, sind zu erkennen.

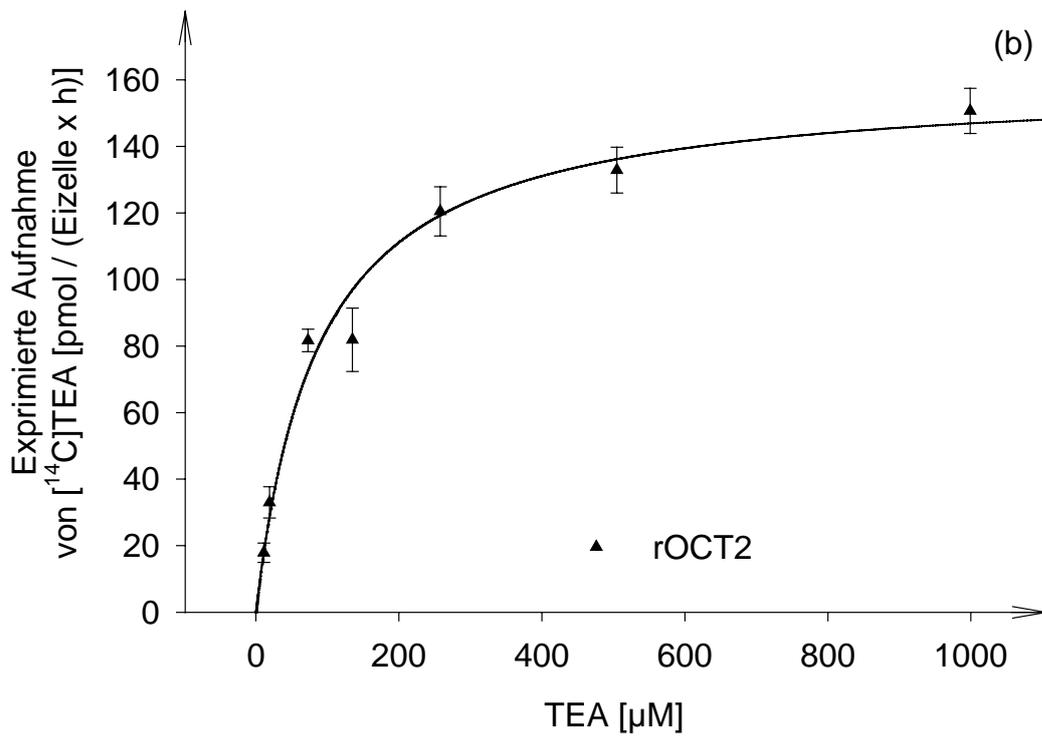
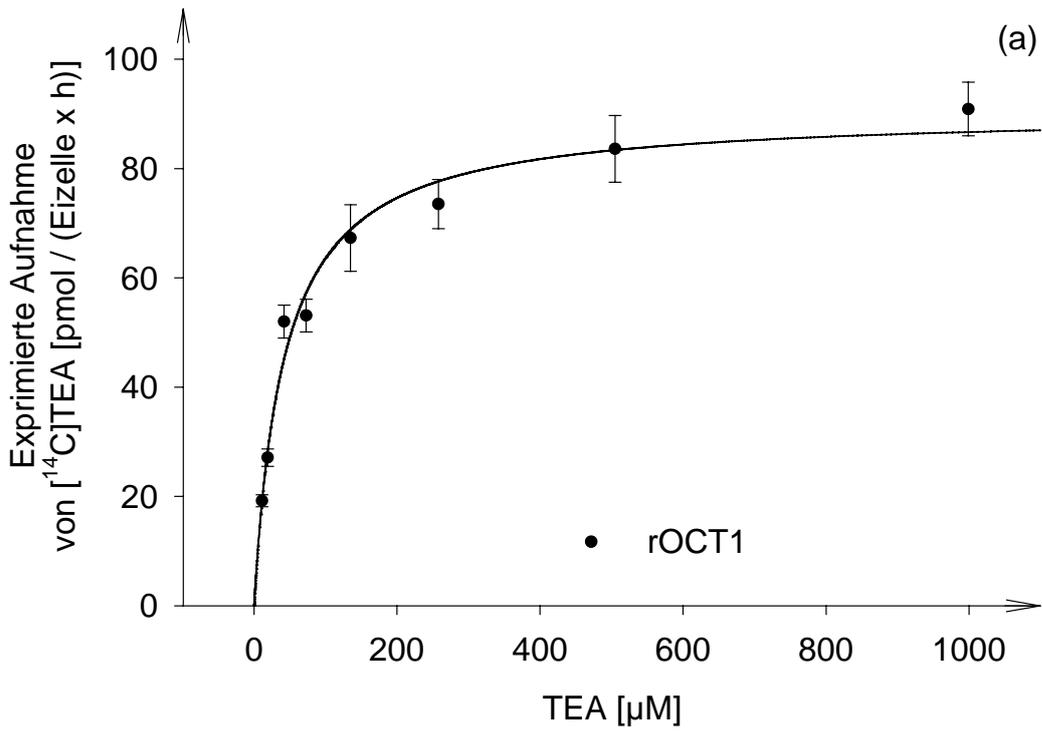
Ein Transport der untersuchten Substrate TEA und Histamin wurde somit nachgewiesen. Daraus lässt sich weiterhin schließen, dass die injizierte cRNA der Chimären in der Eizelle translatiert und in die Plasmamembran der Eizelle eingebaut wird. Mit Tetraethylammonium fand sich das ideale Substrat für die weiteren Untersuchungen, weil TEA nur unbedeutend von endogenen

Transportern der Oozyten bzw. passiv in die Eizellen aufgenommen wird und die Hemmstoffe, wie das Cyanin 863, in der Lage waren, den Transport des Tetraethylammoniums drastisch zu hemmen. In der Regel tendierten die minimalen Aufnahmegeschwindigkeiten (v_{\min}) in den im Folgenden beschriebenen Hemmkinetiken (*Kapitel 3.4*) sogar nahe gegen Null.

3.2 Chimären A und B: Substratabhängigkeit von TEA

Eine Beurteilung und ein Miteinandervergleichen von Hemmkinetiken unterschiedlicher Transporterarten kann nur dann sinnvoll geschehen, wenn man zuvor Transportkinetiken für das in den Hemmkinetiken in konstanter Konzentration zugesetzte „heiße“ Substrat anfertigt. Der Grund dafür ist, dass die Inhibitionsmessungen am besten bei Substratkonzentrationen weit unterhalb der Sättigung durchgeführt werden sollten. Bei diesen Bedingungen können Hemmmechanismen unabhängig von möglichen Kompetitionen an der Substratbindungsstelle erfolgen. Für die Messungen in dieser Arbeit wurde eine Substratkonzentration gewählt, die um eine Zehnerpotenz niedriger lag als die Michaelis-Menten-Konstante (K_m).

Um festzustellen, ob sich die Michaelis-Menten-Konstante für den Transport von TEA bei den Chimären A und B gegenüber rOCT1 und rOCT2 geändert hat, wurde eine Vergleichsmessung an parallel injizierten Oozyten eines Frosches durchgeführt. Damit wurden Affinitätsänderungen in Abhängigkeit von unterschiedlichen Oozyteneigenschaften ausgeschlossen. Die Oozyten wurden 60 Minuten lang mit aufsteigenden Konzentrationen an Substrat inkubiert. Um nur den exprimierten Transport zu erfassen, wurde für jede Substratkonzentration eine Parallelmessung in Gegenwart des spezifischen Hemmstoffes Cyanin 863 in einer Konzentration von 100 μ M durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3.4a-d gezeigt. Dabei wurden die Cyanin-hemmbareren Aufnahmeraten dargestellt.



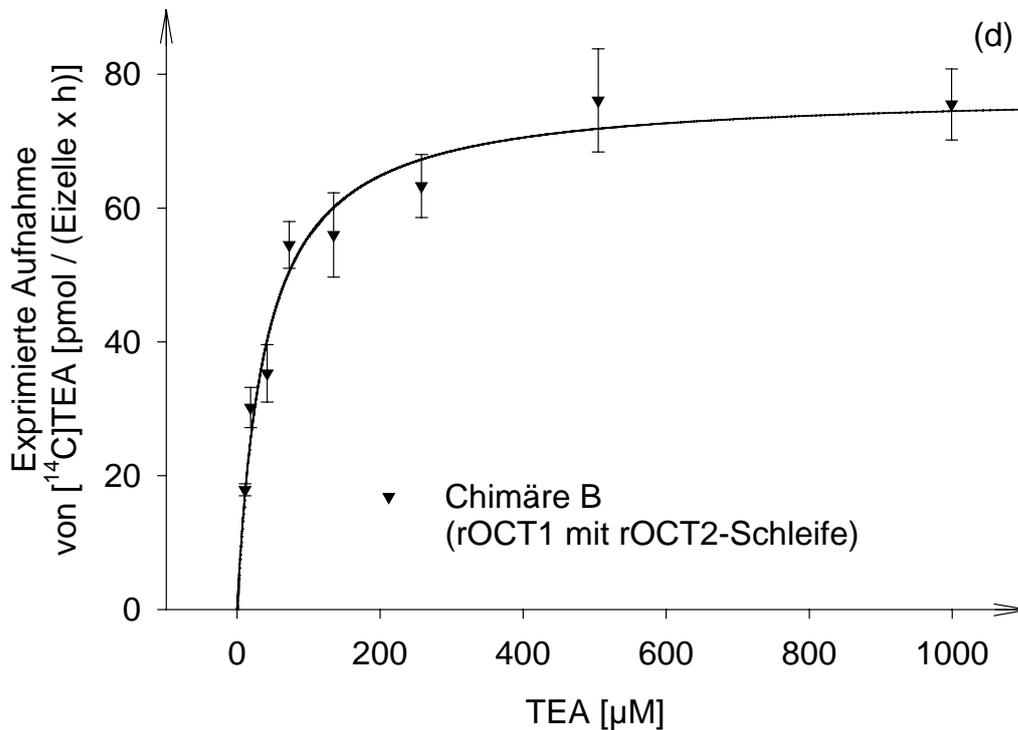
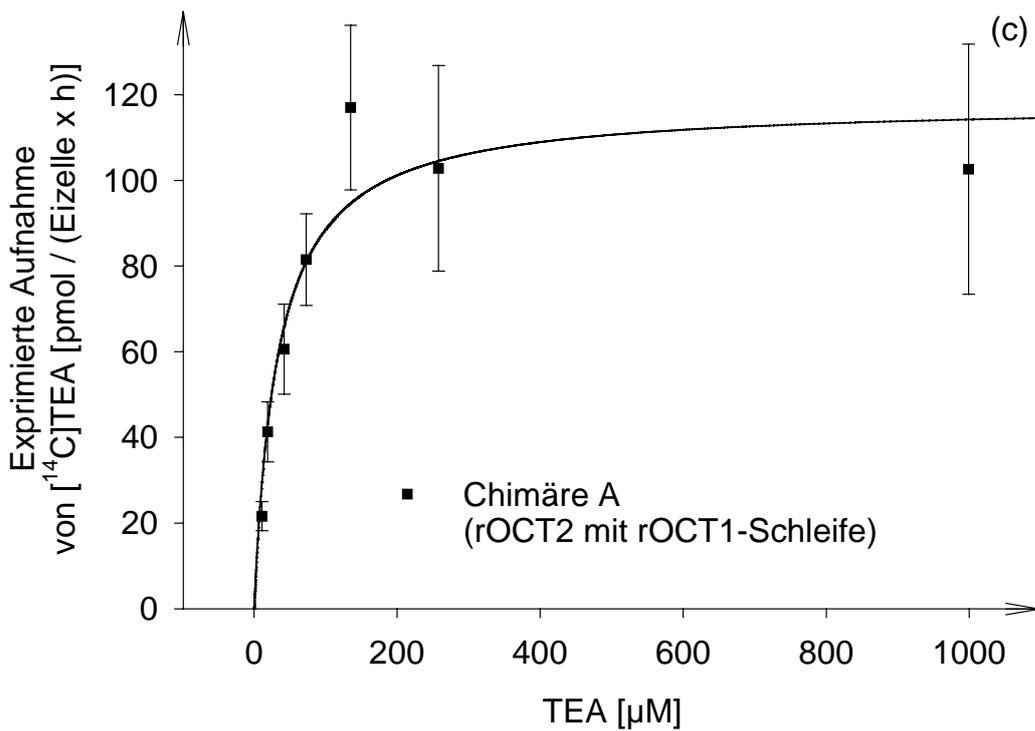


Abb. 3.4a-d: Aufnahme in Abhängigkeit der Substratkonzentration von $[^{14}\text{C}]\text{TEA}$ für rOCT1, rOCT2 und die Chimären A und B. Die Messungen von jeweils 10 Einzelzellen pro Substratkonzentration und Protein erfolgten parallel. Die Aufnahmeraten sind abzüglich der Transportraten nach Cyaninhemmung dargestellt.

Die aus den vorliegenden Messergebnissen ermittelten kinetischen Parameter sind tabellarisch dargestellt (Tab. 3.1).

cRNA	K_m [μM] \pm SE	v_{max} [$\mu\text{mol} / (\text{Eizelle} \cdot \text{h})$] \pm SE
rOCT1	42,09 \pm 5,82	90,34 \pm 3,13
rOCT2	87,56 \pm 17,37	158,80 \pm 8,65
Chimäre A	33,30 \pm 10,72	118,00 \pm 10,02
Chimäre B	38,76 \pm 6,54	77,38 \pm 3,21

Tabelle 3.1: K_m und v_{max} der Transporter rOCT1 und rOCT2 und der Chimären A und B für das Substrat Tetraethylammonium.

Wie sich zeigte, unterschieden sich die Michaelis-Menten-Konstanten nur gering voneinander. Lediglich der K_m -Wert von rOCT2 fand sich etwas höher als der der Chimären und von rOCT1, insgesamt aber noch im Schwankungsbereich der in Vorarbeiten ermittelten Michaelis-Menten-Konstanten der Wildtypen. Aus diesem Grund wurde die üblicherweise für die Hemmkinetiken der Transporter rOCT1 und rOCT2 angewandte Substratkonzentration von 10 μM radioaktiv markiertem Tetraethylammonium auch bei den folgenden Hemmkinetiken an den Chimären A und B verwendet.

Die maximalen Aufnahmegeschwindigkeiten für TEA differierten insgesamt nicht ausgesprochen stark. Dennoch konnte man feststellen, dass in diesem Versuch die maximalen Aufnahmegeschwindigkeiten der Chimäre A und von rOCT2 höher lagen als die der Chimäre B und von rOCT1.

3.3 Chimären C und D: Untersuchung verschiedener Substrate

Als nächster Schritt erfolgten Untersuchungen der Chimären C und D, Konstrukten mit dem Grundgerüst des Transporters rOCT1. Bei diesen Chimären wurde die große extrazelluläre Schleife von rOCT1 durch die entsprechenden Schleifen aus hGLUT1 bzw. rOAT1 ersetzt.

Substrate der organischen Kationentransporter (Tetraethylammonium, Cholin und 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP)) und ein Substrat der organischen Anionentransporter (α -Ketoglutarat) wurden auf ihr Transportverhalten untersucht. Als Vergleich dienten wasserinjizierte Eizellen.

Zunächst erfolgten Aufnahmemessungen mit Tetraethylammonium. In der folgenden Abbildung ist ein Beispielexperiment dargestellt (Abb. 3.5).

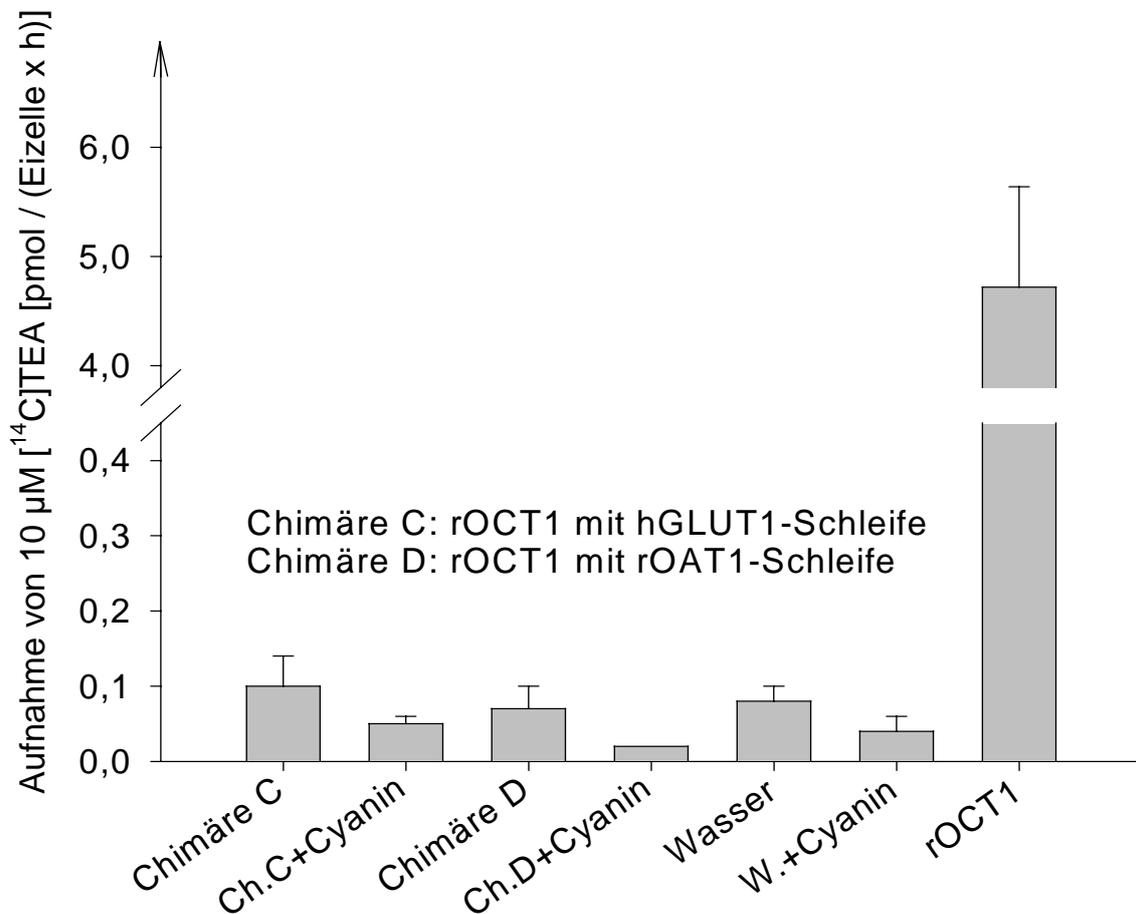


Abb. 3.5: Aufnahme von $10 \mu\text{M}$ $[^{14}\text{C}]\text{TEA}$ über die Chimären C und D im Vergleich zu wasserinjizierten Oozyten und rOCT1. Bei den Messungen an den Chimären C und D sind jeweils die Mediane der Einzelmessungen an 20 Eizellen, bei den Messungen an rOCT1 und an den cyaningehemmtten und wasserinjizierten Oozyten jeweils die Mediane der Einzelmessungen an 10 Eizellen mit deren Standardfehler dargestellt.

Abbildung 3.5 zeigt, dass durch die Chimären C und D kein Transport von TEA exprimiert werden konnte. Die Aufnahmeraten der Chimären unterschieden sich nicht signifikant von den endogenen Transportraten der Eizellen.

Da es sich bei TEA um den Prototyp bzw. das bedeutendste Modellsubstrat kationischen Transportes handelt, wurden die Aufnahmeexperimente mit TEA mehrmals (insgesamt fünf Experimente) und mit unterschiedlich langer Expressionszeit und Konzentration (bis 50 μM) durchgeführt. In keinem Fall konnte ein Transport dieses Substrates nachgewiesen werden.

Sodann erfolgten Transportmessungen mit den radioaktiv markierten Substanzen Cholin, α -Ketoglutarat und 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP) (Abb. 3.6).

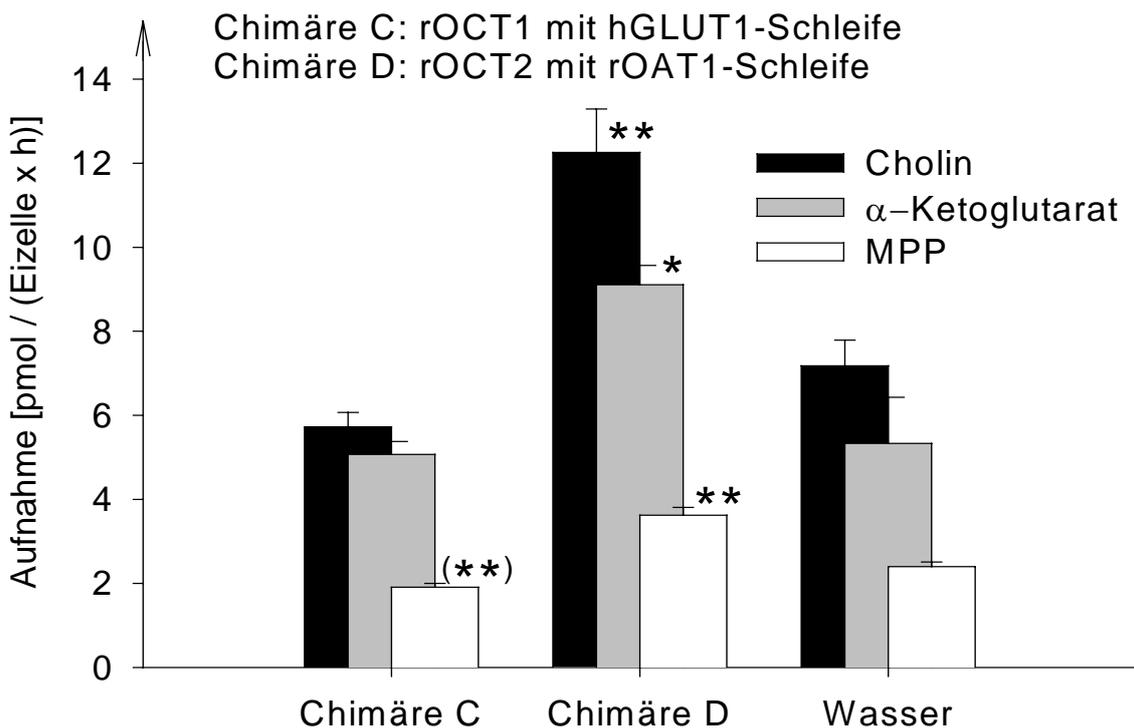


Abb. 3.6: Aufnahme von $[^3\text{H}]$ Cholin, $[^3\text{H}]$ MPP und $[^{14}\text{C}]$ α -Ketoglutarat in einer Konzentration von jeweils 10 μM durch die Chimären C und D im Vergleich zu wasserinjizierten Oozyten. Dargestellt sind die Mediane aus jeweils 8-10 Einzelmessungen mit Standardfehler. Signifikant veränderte Aufnahmeraten gegenüber den wasserinjizierten Kontrollen sind mit Sternchen markiert ($P < 0,05$ * und $P < 0,01$ **).

Aus diesen Messungen ergab sich, dass sich die Transportrate von der Chimäre C mit der eingebauten kurzen Schleife von hGLUT1 für alle untersuchten Stoffe in der dargebotenen Konzentration nicht von der endogenen Transportrate der Eizellen unterschied. Sicherlich wären zu einer abschließenden Bewertung weitere Messungen erforderlich. Wenn die Chimäre C tatsächlich nicht transportiert, ist ohne zusätzliche Untersuchungen nicht auszumachen, ob dies durch eine fehlende Expression der Chimäre C oder durch eine Inaktivierung bedingt ist.

Für die drei untersuchten Substanzen MPP, Cholin und α -Ketoglutarat waren in dem in Abbildung 3.6 gezeigten Versuch bei der Chimäre D (rOCT1 mit der extrazellulären Schleife von rOAT1) signifikant höhere Aufnahmezeiten gegenüber den Negativkontrollen zu beobachten.

Vergleicht man die durch die Chimäre D exprimierten Aufnahmezeiten mit publizierten Daten der exprimierten Aufnahme von MPP und α -Ketoglutarat durch die Transporter rOCT1 und rOAT1, so sieht man, dass Funktion der Chimäre im Vergleich zu den Wildtypen stark eingeschränkt ist. So wurde eine Aufnahmezeit von mehr als 40 pmol / Eizelle / Stunde von 5 μ M α -Ketoglutarat durch den Transporter rOAT1 beschrieben (*Sekine et al., 1997*), in meinen Messungen wurde allenfalls etwa ein Zehntel dieser Aufnahmezeiten bei 10 μ M α -Ketoglutarat erreicht. An anderer Stelle wurde eine Aufnahmezeit von etwa 50 pmol / Eizelle / Stunde von 10 μ M MPP durch den Transporter rOCT1 gemessen (*Busch et al., 1996*), während die Chimäre D in meinen Messungen nur etwa den fünfzigsten Teil davon transportierte.

3.3 Chimären A und B: Untersuchung von Stoffen mit unterschiedlicher Affinität gegenüber rOCT1 und rOCT2

Um herauszufinden, ob rOCT1-spezifische oder rOCT2-spezifische Affinitäten mit dem Austausch der großen extrazellulären Schleife von einem Subtyp auf

den anderen übertragen werden können, wurden die Affinitäten der Chimären gegenüber Substanzen gemessen, die sich hinsichtlich der Affinitäten gegenüber rOCT1 und rOCT2 stark unterscheiden.

o-Methyl-Isoprenalin, ein Derivat des sympathikomimetisch wirkenden Noradrenalins, zeigte sich in den publizierten Messungen zu rOCT1 um etwa den Faktor 50 affiner als zu rOCT2 (Arndt et al., 2001). Für das bis vor wenigen Jahren noch häufig benutzte Antiarrhythmikum Procainamid, ein p-Amino-Benzoesäure-Abkömmling, war ein ähnlicher Befund erhoben worden. Die IC_{50} -Werte unterschieden sich um den Faktor 15 bis 20 (Arndt et al., 2001). Auch Darstin (Mepiperphenidol) verhielt sich als Hemmsubstanz zu rOCT1 sehr viel affiner als zu rOCT2 (Arndt et al., 2001). Der von Petra Arndt ermittelte Affinitätsunterschied zwischen rOCT1 und rOCT2 um etwa den Faktor 100 fand sich aber in meinen Messungen weniger deutlich ausgeprägt, sondern betrug den Faktor 20 (Abb. 3.8). Das elektroneutrale Nebennierenrindenhormon Corticosteron weist ebenfalls eine unterschiedliche Affinität gegenüber den Transportern rOCT1 und rOCT2 auf. Seine Bedeutung im Bereich der Forschungen an der Transporterfamilie der OCT bekam Corticosteron vor allem durch seine hochaffine Hemmung des menschlichen Transportersubtyps OCT3 (Gründemann et al., 1998; Martel et al., 1999). Dieser Transporter wird von einigen Autoren mit dem durch funktionelle *in vivo*-Messungen definierten extraneuronalen Monoamintransportsystem uptake2 gleichgesetzt (Gründemann et al., 1998, Koepsell et al., 2003). Im Gegensatz zur relativ hohen Affinität von Corticosteron zu rOCT2 (Wu et al., 1998, Arndt et al., 2001) bindet Corticosteron um einen Faktor über 30 niederaffiner an rOCT1 (Gründemann et al., 1994, Martel et al. 1996).

In der Tabelle 3.2 sind die von mir zusammen mit Petra Arndt gemessenen halbmaximalen Hemmkonzentrationen (IC_{50}) dieser Substanzen für die Transporter rOCT1 und rOCT2 zusammengefasst (Tab. 3.2). Die ermittelten Werte wurden zusammen mit anderen Daten von Petra Arndt publiziert (Arndt et al., 2001)

	OMI	Darstin	Procainamid	Corticosteron
rOCT1	37 ± 5	7,1 ± 2,0	20 ± 11	151 ± 26
rOCT2	2620 ± 710	474 ± 218	445 ± 262	4 ± 0,7

Tabelle 3.2: Hemmung des TEA-Transportes durch o-Methyl-Isoprenalin (OMI), Darstin (Mepiperphenidol), Procainamid und Corticosteron. Diese Daten zeigen die halbmaximalen Hemmkonzentrationen (IC_{50}) von 10 μ M [14 C]TEA aus Hemmkinetiken mit 8 bis 10 unterschiedlichen Konzentrationen. Gemessen wurde jeweils nach einstündiger Inkubation der Eizellen mit Hemmstoff und Substrat. Die IC_{50} -Werte (in μ M) wurden nach Anpassung der Hill-Gleichung an die Daten ermittelt. Es erfolgten 3 bis 5 Parallelmessungen.

Die IC_{50} -Werte waren für rOCT1 und rOCT2 signifikant unterschiedlich. Während bei Darstin der Affinitätsunterschied sich um $P < 0,05$ signifikant zeigte, wurden für Corticosteron, o-Methyl-Isoprenalin und Procainamid Signifikanzen von $P < 0,01$ erhalten.

Diese vier sich in der Affinität deutlich gegenüber den Transporterproteinen rOCT1 und rOCT2 unterscheidenden Stoffe wurden nun in gemeinsamen Hemmkinetiken mit den Chimären A und B untersucht. Die im Folgenden abgebildeten Grafiken zeigen jeweils einzelne, parallel - das heißt an einem Tag mit Eizellen eines Frosches - an allen vier Proteinen durchgeführte Transportmessungen mit 10 μ M [14 C]TEA und mit 9 bis 13 verschiedenen Hemmkonzentrationen (Abb. 3.7 bis 3.10). Die Kurven wurden nach Hill gefittet.

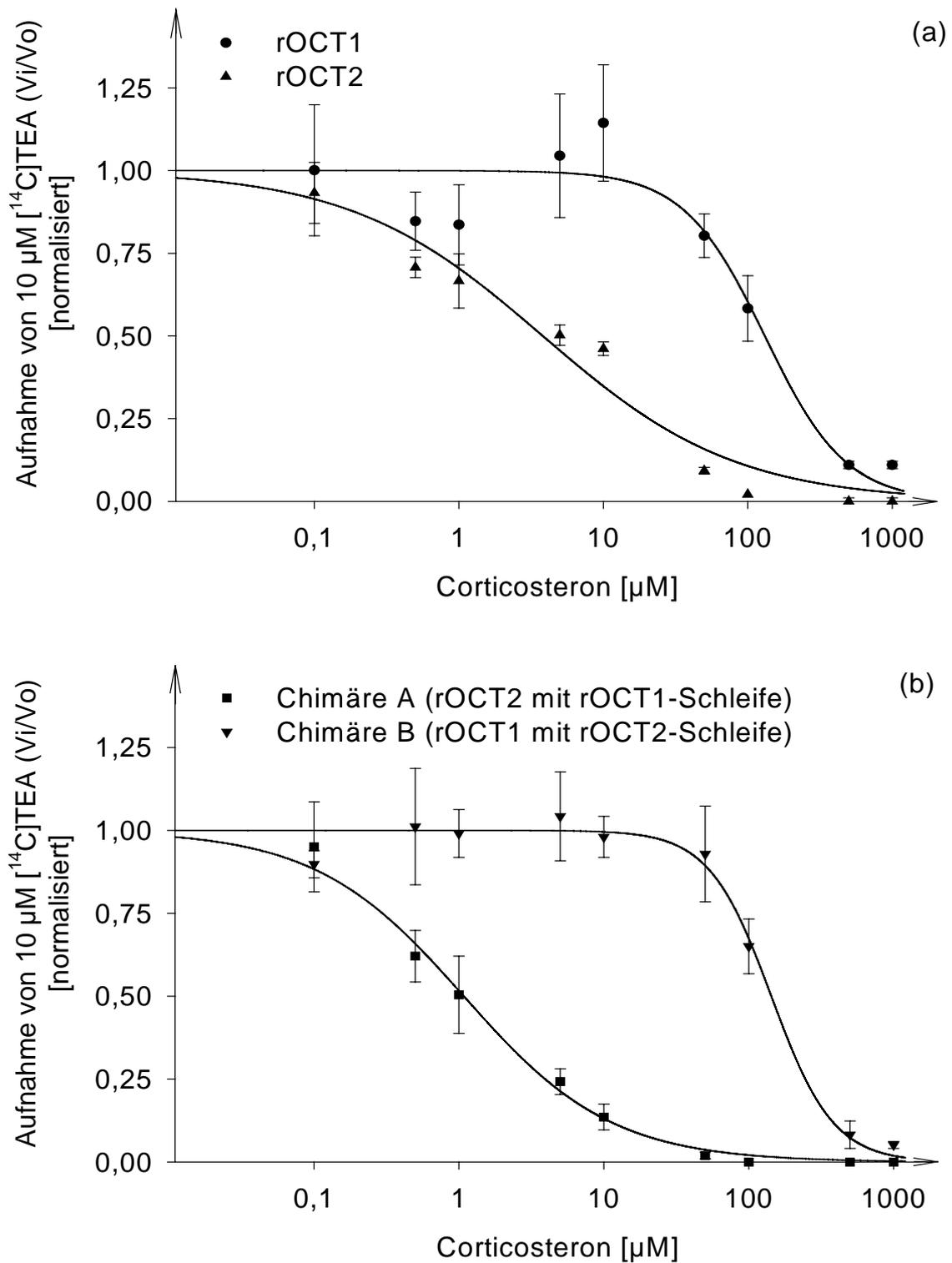


Abb. 3.7a/b: Aufnahme von 10 μM [¹⁴C]TEA in Abhängigkeit zur Hemmstoffkonzentration von Corticosteron für rOCT1 und rOCT2 (a) und die Chimären A und B (b). Dargestellt sind die Mediane mit Standardfehler aus 8-10 Einzelmessungen. IC₅₀ [μM]: rOCT1 131 ± 36; rOCT2 3,8 ± 1,4; Chimäre A 1,1 ± 0,2; Chimäre B 143 ± 17

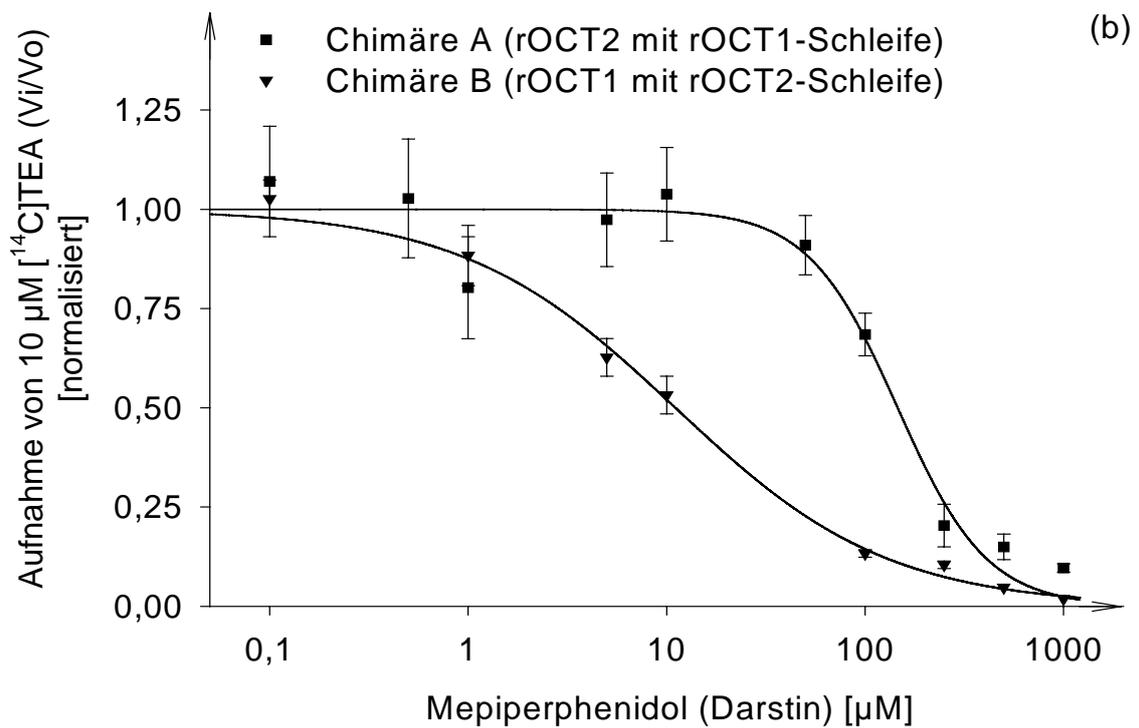
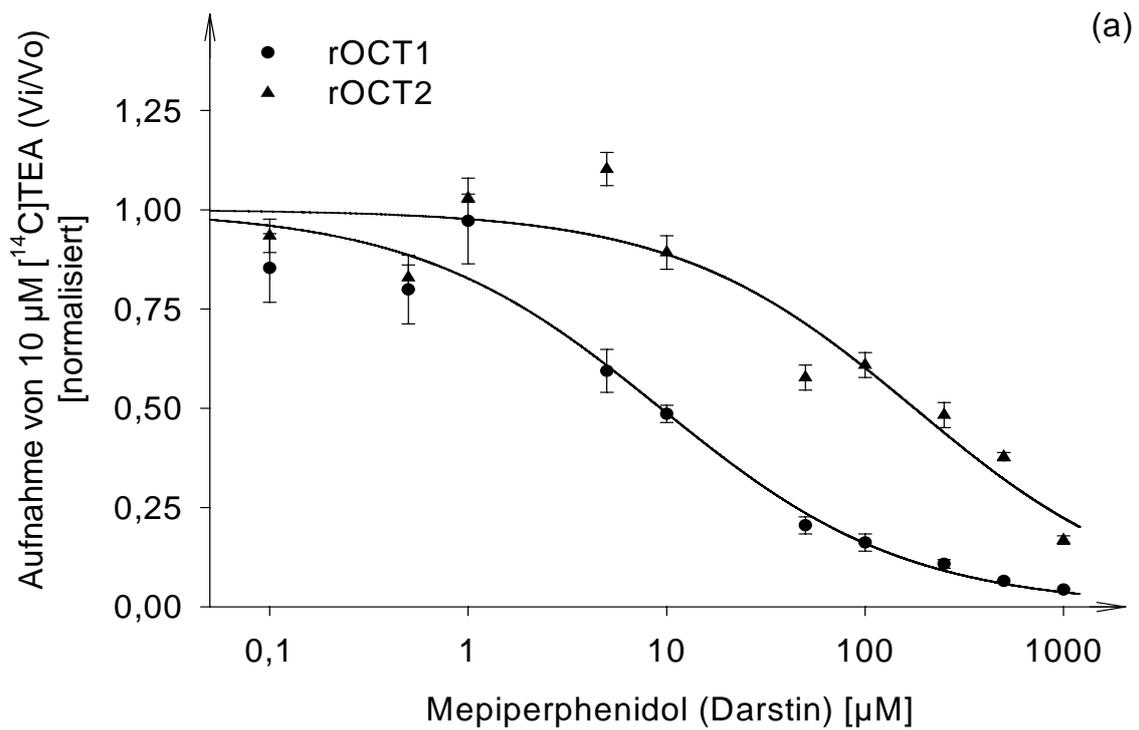


Abb. 3.8a/b: Aufnahme von 10 μM [^{14}C]TEA in Abhängigkeit zur Hemmstoffkonzentration von Darstin für rOCT1 und rOCT2 (a) und die Chimären A und B (b). Dargestellt sind die Mediane mit Standardfehler aus 8-10 Einzelmessungen. IC_{50} [μM]: rOCT1 $9,4 \pm 3,2$; rOCT2 177 ± 64 ; Chimäre A 146 ± 23 ; Chimäre B 11 ± 2

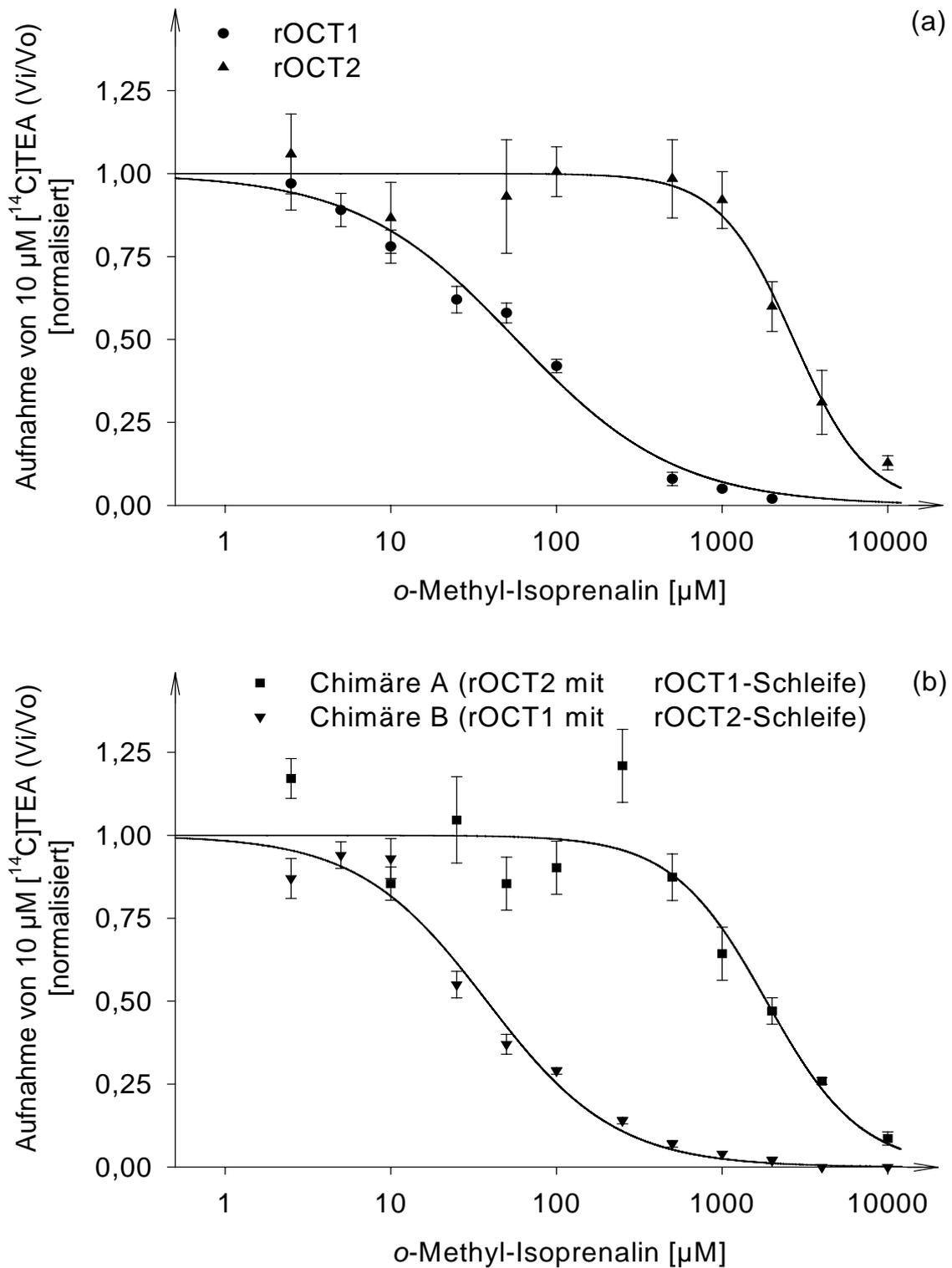


Abb. 3.9a/b: Aufnahme von $10 \mu\text{M } [^{14}\text{C}]\text{TEA}$ in Abhängigkeit zur Hemmstoffkonzentration von *o*-Methyl-Isoprenalin für rOCT1 und rOCT2 (a) und die Chimären A und B (b). Dargestellt sind die Mediane mit Standardfehler aus 10 Einzelmessungen. IC_{50} [μM]: rOCT1 57 ± 8 ; rOCT2 2696 ± 328 ; Chimäre A 1849 ± 421 ; Chimäre B 38 ± 6

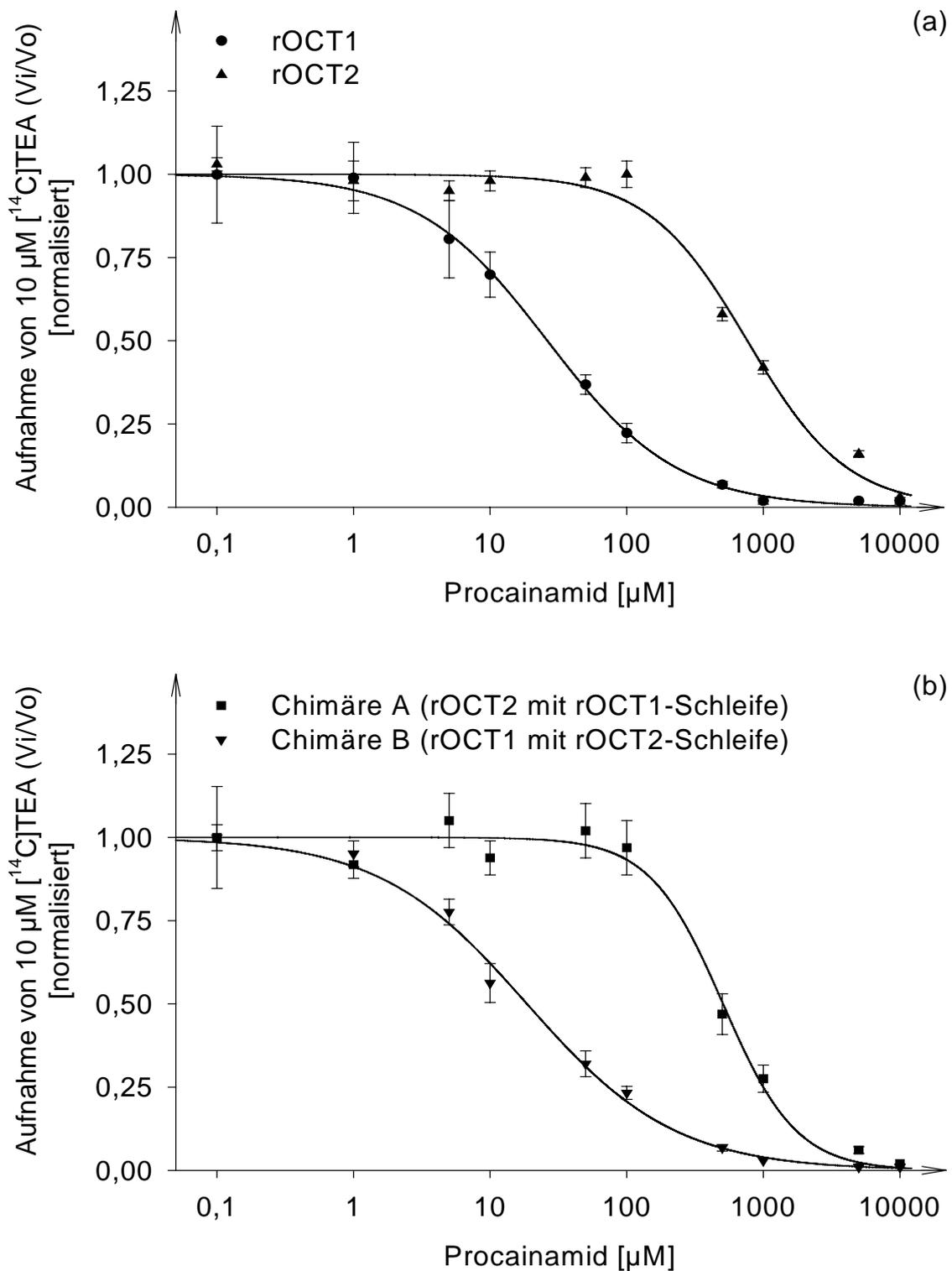


Abb.3.10a/b: Aufnahme von $10\mu\text{M}$ [^{14}C]TEA in Abhängigkeit zur Hemmstoffkonzentration von Procainamid für rOCT1 und rOCT2 (a) und die Chimären A und B (b). Dargestellt sind die Mediane mit Standardfehler aus 10 Einzelmessungen. IC_{50} [μM]: rOCT1 26 ± 2 ; rOCT2 764 ± 89 ; Chimäre A 507 ± 56 ; Chimäre B 19 ± 2

Die in den vorangegangenen Abbildungen dargestellten Ergebnisse wurden durch weitere Messungen bestätigt (*Tab. 7.2 bis 7.7 im Anhang*).

Die Daten aus den Messungen zeigten, dass sich die Chimäre A mit dem Grundgerüst von rOCT2 bezüglich der vier Stoffe Darstin, Corticosteron, α -Methyl-Isoprenalin und Procainamid wie rOCT2 verhielt. Dagegen entsprach das Affinitätsverhalten der Chimäre B mit dem Grundgerüst von rOCT1 dem des Transporters rOCT1. Es lässt sich daraus schließen, dass ein Schleifenaustausch zwischen den Transportern rOCT1 und rOCT2 die Affinität der untersuchten Hemmstoffe zum Transporter nicht beeinflusst.

Die Affinitäten eines weiteren Substrates, Guanidin - einem den Biguaniden ähnlichen Iminoharnstoff -, und des nicht transportierten Xenobiotikums Cyanin 863 wurden ebenfalls untersucht. In unserer Arbeitsgruppe war durch Petra Arndt gezeigt worden, dass Guanidin von rOCT1 und rOCT2 mit unterschiedlicher Michaelis-Menten-Konstante transportiert wird (*Arndt et al., 2001*). Isabel Ulzheimer-Teuber hatte in ihrer Dissertation beschrieben, dass Cyanin 863 ein nicht kompetitiver Hemmstoff von rOCT1 ist.

In parallelen Untersuchungen für die Transporter rOCT1, rOCT2 und die Chimären A und B wurde die Hemmung des Transportes von $10\mu\text{M}$ Tetraethylammonium durch Guanidin und Cyanin 863 gemessen (*Abb. 3.11 und 3.12*). Die Kurven wurden nach Hill aus den Medianen von jeweils 8 bis 10 Einzelmessungen gefittet. Die Messreihen bestanden aus 9 aufsteigenden Konzentrationen von Guanidin und 13 aufsteigenden Konzentrationen von Cyanin 863.

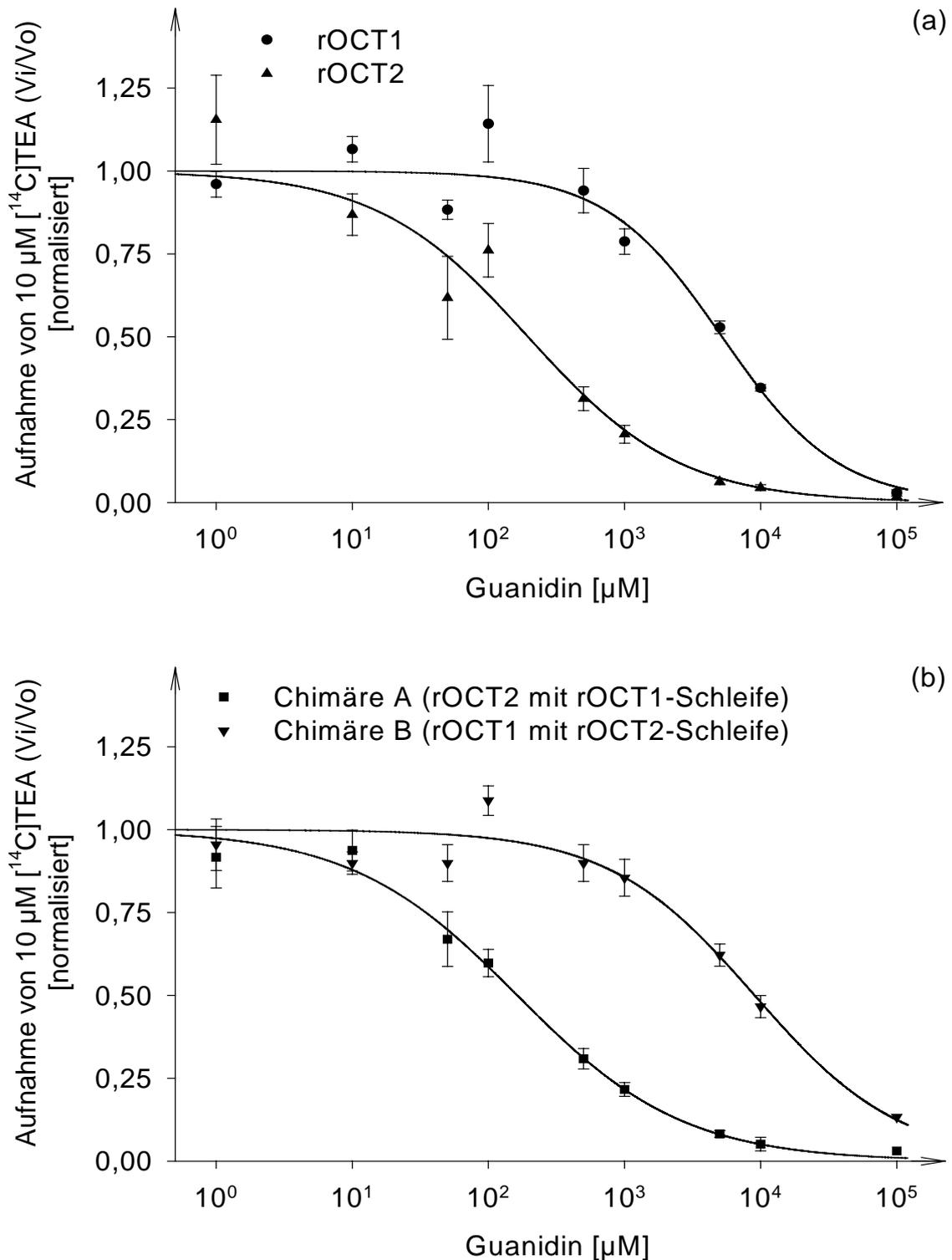


Abb.3.11a/b: Aufnahme von 10 μM [^{14}C]TEA in Abhängigkeit zur Hemmstoffkonzentration von Guanidin für rOCT1 und rOCT2 (a) und die Chimären A und B (b). Dargestellt sind die Mediane mit Standardfehler aus 10 Einzelmessungen. IC_{50} [μM]: rOCT1 5205 ± 1285 ; rOCT2 195 ± 80 ; Chimäre A 163 ± 25 ; Chimäre B 9033 ± 2587

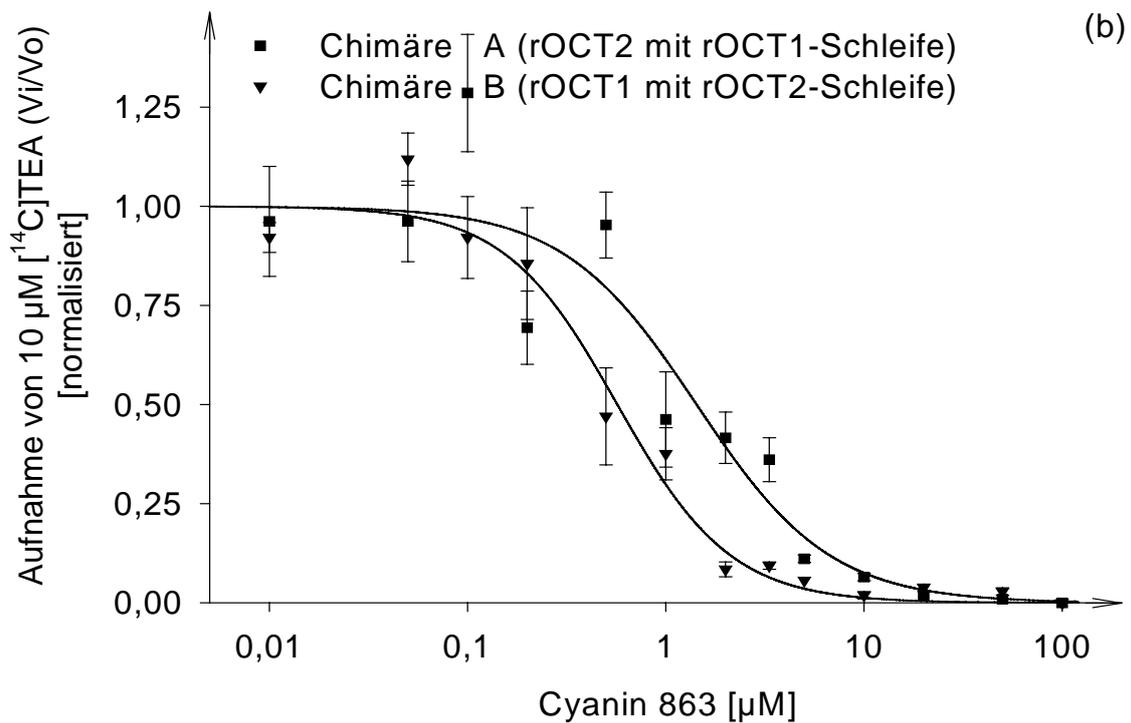
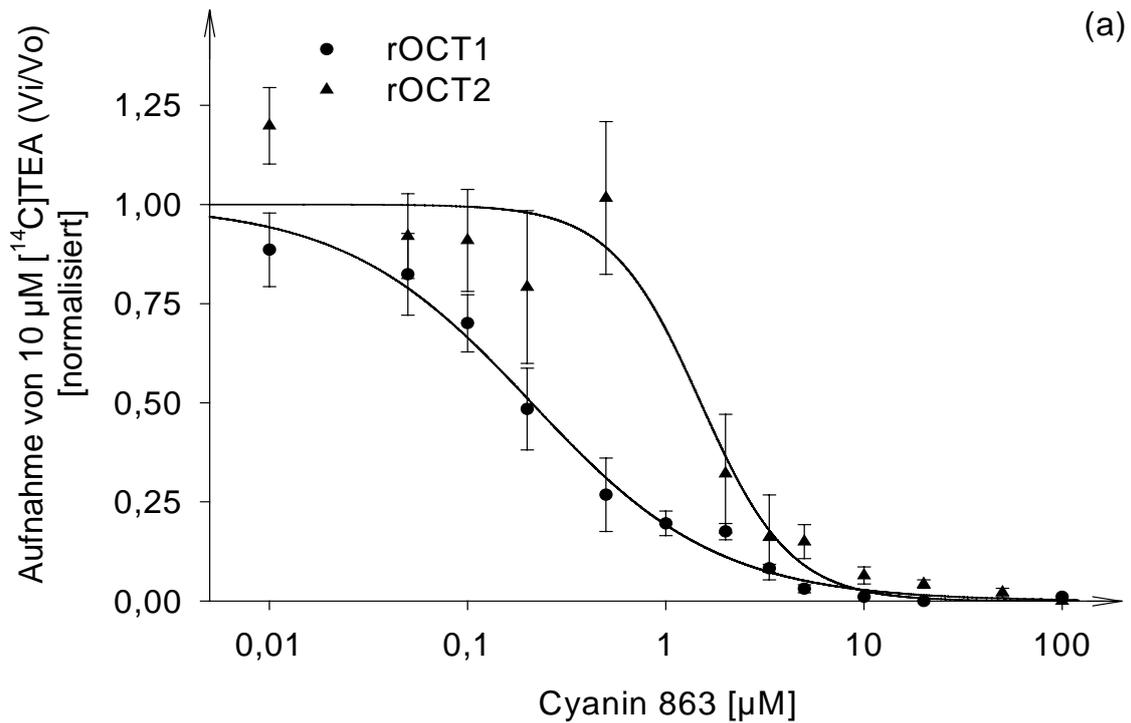


Abb.3.12a/b: Aufnahme von 10 μM [^{14}C]TEA in Abhängigkeit zur Hemmstoffkonzentration von Cyanin 863 für rOCT1 und rOCT2 (a) und die Chimären A und B (b). Dargestellt sind die Mediane mit Standardfehler aus 8-10 Einzelmessungen. IC_{50} [μM]: rOCT1 $0,21 \pm 0,03$; rOCT2 $1,8 \pm 0,2$; Chimäre A $1,4 \pm 0,4$; Chimäre B $0,57 \pm 0,08$

Die Messungen zeigten unterschiedliche Affinitäten von Guanidin und Cyanin 863 zu den Transportern rOCT1 und rOCT2 und zu den beiden Chimären. Die von mir gewonnenen Daten für die Transporter rOCT1 und rOCT2 wurden publiziert (Arndt et al., 2001).

Die in Abbildung 3.11 gezeigten Ergebnisse für das Guanidin konnten in einer weiteren Messung bestätigt werden und sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst (Tab. 3.3):

Transporter/Chimäre	IC ₅₀ in µM	n
rOCT1	4134 ± 1210	1,0 ± 0,3
rOCT2	417 ± 65	0,9 ± 0,1
Chimäre A	362 ± 73	1,0 ± 0,2
Chimäre B	11060 ± 2275	1,5 ± 0,5
rOCT1	5205 ± 1285	1,0 ± 0,3
rOCT2	195 ± 80	0,8 ± 0,2
Chimäre A	163 ± 25	0,7 ± 0,1
Chimäre B	9033 ± 2587	0,8 ± 0,2

Tab. 3.3: Hemmung der Aufnahme von 10 µM TEA durch Guanidin. Dargestellt sind die halbmaximalen Hemmkonzentrationen (IC₅₀) und der Hill-Koeffizient (n) jeweils mit Standardfehler.

Ähnlich wie schon bei den Substanzen Corticosteron, Darstin, o-Methyl-Isoprenalin und Procainamid scheinen die IC₅₀-Werte der Chimären gegenüber Guanidin im Prinzip dem Transportergrundgerüst zu entsprechen. Allerdings sind die IC₅₀-Werte für die Chimäre B in den zwei Versuchen deutlich höher als die des rOCT1-Grundgerüsts. Da ein derartiger Unterschied bei Corticosteron, Darstin, o-Methyl-Isoprenalin und Procainamid nicht zu beobachten war, deutet dieser Befund auf eine Beeinflussung der Substratselektivität durch die große Schleife hin. Bei der Untersuchung auf eine signifikante Abweichung wurde P=0,07 für eine solche Abhängigkeit ermittelt.

Zudem fand sich, dass Guanidin genau wie Corticosteron an rOCT2 in niedrigerer Konzentration bindet als an rOCT1. Guanidin ist also das bislang

einziges entdeckte Substrat der organischen Kationentransporter mit höherer Affinität zu rOCT2 im Vergleich zu rOCT1.

Die in der Abbildung 3.12 gezeigten Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle mit den Ergebnissen aus weiteren Hemmversuchen mit Cyanin 863 (*Tab. 7.4 im Anhang*) zusammengefasst (*Tab. 3.4*).

Hemmstoff	IC ₅₀ [μ M] \pm Standardabweichung			
	rOCT1	rOCT2	Chimäre A	Chimäre B
Cyanin 863	0,51 \pm 0,08	2,56 \pm 0,51	1,12 \pm 0,30	0,46 \pm 0,28

Tabelle 3.4: Hemmung der Aufnahme von 10 μ M TEA durch Cyanin 863. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus 4 Parallelmessungen jeweils zwischen den Wildtypen rOCT1 und rOCT2 und den Chimären A und B und jeweils mit Standardabweichung. Es bestehen hoch signifikante ($P < 0,01$) Affinitätsunterschiede zwischen rOCT1 und rOCT2 und signifikante ($P < 0,05$) Affinitätsunterschiede zwischen den Chimären A und B.

Bei der Betrachtung der vorliegenden Daten lässt sich eine fünffach höhere Affinität von rOCT1 gegenüber Cyanin 863 als von rOCT2 erkennen ($P < 0,01$). Die Affinität der Chimäre B entsprach exakt der des rOCT1-Grundgerüsts. Interessanterweise war die Chimäre A gegenüber Cyanin 863 signifikant höher affin ($P < 0,05$) als rOCT2, dem Grundgerüst dieser Chimäre. Ähnlich wie bei Guanidin könnte dies Ausdruck einer durch den Schleifenaustausch verursachten Affinitätsänderung sein.

4 Diskussion

4.1 Interpretation der erhobenen Daten

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob der Austausch der großen extrazellulären Schleife zwischen den OCT-Subtypen rOCT1 und rOCT2, dem Anionentransporter rOAT1 und dem Glucosetransporter hGLUT1 zu Veränderungen der Affinitäten von Substraten und Hemmstoffen führt.

Es zeigte sich, dass die große extrazelluläre Schleife offensichtlich für die Expression und/oder die Funktion der OCT essentiell ist. So ließ sich nach Einbau der kleineren extrazellulären Schleife des hGLUT1-Transporters in rOCT1 (Chimäre C) kein signifikanter Transport mehr nachweisen. Auch bei Einbau der Schleife des näher verwandten rOAT1 in rOCT1 (Chimäre D) kam es zu drastisch reduzierten Transportraten.

Nach Austausch der nahezu homologen großen extrazellulären Schleife zwischen rOCT1 und rOCT2 entsprachen die Affinitäten der meisten untersuchten Substrate und Hemmstoffe dem Transportergrundgerüst. Dies traf für die Substrate Mepiperphenidol (Darstin), *o*-Methyl-Isoprenalin, Procainamid und den Hemmstoff Corticosteron zu.

Für das Substrat Guanidin war die Affinität gegenüber der Chimäre B (rOCT1-Grundgerüst mit der Schleife von rOCT2) allerdings deutlich niedriger als gegenüber rOCT1, was auf eine Beeinflussung der Substratselektivität hindeutet.

Auch die Ergebnisse aus den Hemmversuchen mit Cyanin 863 legen einen Einfluss der großen extrazellulären Schleife auf die Eigenschaften der Substratbindung der organischen Kationentransporter nahe. Die Affinität von Cyanin 863 gegenüber der Chimäre A (rOCT2-Grundgerüst mit der Schleife von

rOCT1) war signifikant höher als gegenüber rOCT2. Obwohl sich in den Untersuchungen von Isabel Ulzheimer-Teuber aus unserer Arbeitsgruppe die Hemmwirkung von Cyanin 863 an rOCT1 nicht durch kleine Substrate kompetitiv aufheben ließ, wird angenommen, dass der hochaffine kationische Hemmstoff Cyanin 863 in Bereich der Substratbindungsregion der organischen Kationentransporter bindet.

Detaillierte Untersuchungen der Interaktion von Hemmstoffen und Substraten der polyspezifischen organischen Kationentransporter haben zu der Vorstellung geführt, dass die organischen Kationentransporter große Substratbindungstaschen besitzen, an welcher Substrate und Hemmstoffe unterschiedlicher Struktur binden können. Nach diesem Denkmodell haben die Liganden der Substratbindungstasche teilweise überlappende Interaktionsdomänen und können sich teilweise oder vollständig verdrängen. Liganden mit kaum oder nicht überlappenden Interaktionsdomänen können sich dabei wie nicht kompetitive Hemmstoffe verhalten (*Volk et al., 2003; Koepsell, 2003*).

Die hier vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich die große extrazelluläre Schleife nur wenig oder indirekt an der Bildung der Substratbindungstasche beteiligt. Vielmehr wird angenommen, dass die große extrazelluläre Schleife eine wichtige strukturbildende bzw. stabilisierende Funktion inne hat. Möglicherweise ist sie aber auch direkt an Transportvorgängen bestimmter Substrate beteiligt.

Für beide Sichtweisen einer Interpretation, einmal in Annahme einer eher strukturbildenden Funktion als auch der direkten Ligandenbindung, gibt es unterstützende Forschungsergebnisse.

So untersuchte eine amerikanische Arbeitsgruppe eine Splicevariante rOCT1A in der Rattenniere mit einer Deletion von 104 Basenpaaren am 5'-Ende des Wildtyps rOCT1, was unter anderem den Verlust der großen extrazellulären Schleife zwischen den Transmembrandomänen 1 und 2 bedeutet. Die

Aufnahmerate der Splicevariante von [^{14}C]TEA verringerte sich gegenüber rOCT1 um etwa das 16fache, grundlegende Transportfunktionen fanden sich aber identisch mit denen von rOCT1. Insbesondere der K_m -Wert von $42 \pm 11 \mu\text{M}$ lag im Bereich des von verschiedenen Arbeitsgruppen ermittelten K_m -Wertes von rOCT1. Auf eine ausführliche Charakterisierung wurde in der Arbeit verzichtet, dennoch zeigte sich, dass ein Transport auch ohne die große extrazelluläre Schleife noch möglich ist und wesentliche Eigenschaften des Proteins unbeeinflusst zu bleiben scheinen (*Zhang et al., 1997*).

Untersuchungen bei Vertretern der verwandten Major-Facilitator-Superfamilie (insbesondere an den Zuckertransportern und den Antibiotika-Antiportern) lassen die Substratbindungsregion im Bereich des C-terminalen Endes vermuten (*Carruthers, 1990; Paulsen et al., 1996*). Neue Erkenntnisse brachte aber insbesondere die Röntgenstrukturanalyse einer Lactose-Permease-Mutante von *Escherichia coli*, einer der Vertreter der MFS (*Abramson et al., 2003[a]*). Die Lactose-Permease war durch die Mutation in einwärts gewandter Konformation arritiert und zeigte eine Substratbindung in einer Bindungstasche, an der mehrere Bereiche der insgesamt 12 Transmembrandomänen beteiligt waren, was die Annahme einer großen Bindungstasche auch bei den Transportern der OCT-Familie unterstützen würde und auch einen Einfluss der großen extrazellulären Schleife zulässt. Allerdings ist die Struktur des Proteins insgesamt doch recht abweichend von den OCT, insbesondere die lange Schleife zwischen den Transmembrandomänen 6 und 7 mit der deutlichen Teilung des Transporters in zwei sich ähnelnde Abschnitte (*Abramson et al., 2003[b]*).

Bei den ebenfalls gut charakterisierten GLUT-Transportern als weitere Vertreter der MFS konkurrieren zwei weitere Modellvorstellungen. Zum einen wird angenommen, dass die zwölf Transmembrandomänen von GLUT3 eine Art Ringstruktur mit einer zentralen hydrophilen Pore ausbilden (*Dwyer, 2001*). Dem gegenüber wurde für den GLUT1-Transporter vorausgesagt, dass den die Substrate durchlassenden Kanal fünf Transmembrandomänen formen (*Zeng et*

al., 1996). Wesentlicher Bestandteil einer durch Anteile des Proteins gebildeten Pore müssten bei den organischen Kationentransportern negativ geladene Aminosäurereste sein - womöglich zwischen den Spezies stark konserviert. Derzeit wird in verschiedenen Forschungsgruppen in Punktmutationsexperimenten nach den Aminosäuren gesucht, die möglicherweise an der Bildung der Substratbindungsstelle beteiligt sind.

In unserer Forschungsgruppe konnte im Bereich der elften putativen Transmembrandomäne bei einer Mutation von Aspartat 475 in Glutamat entdeckt werden, dass die Aufnahmeraten von TEA, MPP, N-Methylnikotinamid und Cholin drastisch eingeschränkt waren. Zudem ließ sich beobachten, dass die Km-Werte für TEA, N-Methylnikotinamid und Cholin, nicht aber für MPP erniedrigt waren. Dies deutet auf die Lokalisation von Aspartat 475 in der Substratbindungstasche hin. Aspartat 475 bildet offensichtlich einen Kontaktpunkt für die Bindung von TEA, N-Methylnikotinamid und Cholin, aber nicht für MPP (*Gorboulev et al.*, 1999). Hinweise auf eine große Bindungstasche mit potentialabhängiger Struktur und unterschiedlicher Affinität für intrazellulär gegenüber extrazellulär angebotenen Substraten ergaben sich zudem bei Transportmessungen unter Hemmung mit Corticosteron und Tetrabutylammonium (*Volk et al.*, 2003).

Neuere Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe unterstreichen die Relevanz der großen extrazellulären Schleife für die Transportfunktion der OCT. So führten Punktmutationen sämtlicher Cysteine auf der großen extrazellulären Schleife von rOCT1 zum Erliegen des Transportes. Dieser Effekt konnte aber nicht bei Cysteinmutationen in den anderen Bereichen des Transporters erzielt werden (bislang unveröffentlichte Daten).

Häufig dienen Cysteine in den Aminosäuresequenzen von Proteinen der Stabilisierung und Strukturbildung durch Aufbau von Disulfidbrücken. In hOCT1 ließ sich durch gezielte bzw. als Polymorphismus - durch Änderung von Cystein 88 zu Arginin - existente Punktmutationen in unserer Arbeitsgruppe ein deutlich

erniedrigter, zum Teil fast vollständig fehlender Transport aufzeigen. Die sechs Cysteinmutanten der großen extrazellulären Schleife nahmen kaum noch Tetraethylammonium auf (*Kerb et al., 2002*). In wie weit strukturelle Stabilisierung durch Disulfidbrücken besteht und welche Partnerschaften dabei von den Cysteinen untereinander eingegangen werden, ließe sich beispielsweise durch den Einbau von Endopeptidaseschnittstellen klären.

4.2 Beispiele für andere extrazelluläre Schleifen und deren Bedeutung

Würde man die Erkenntnisse und Vorstellungen von den GLUT-Transportern auf die OCT-Familie übertragen, wäre allerdings eine Rolle der großen extrazellulären Schleife direkt bei der Substratbindung weniger wahrscheinlich. Theoretisch kann aber eine Mitwirkung der Substratbindung im Zusammenspiel mit anderen Regionen des Transporters erfolgen, modellhaft, wenn die Schleife bzw. extrazellulär gelegene Regionen zur Substratbindung oder Struktur verändernd in das Protein bzw. die Zellmembran eintaucht, wie es beispielsweise für die hydrophile Schleife zwischen den Transmembrandomänen sieben und acht der α -Untereinheit der Natrium/Kalium-ATPase (*Fiedler et al., 1996*) oder für extrazelluläre Anteile einiger spannungsabhängigen Natrium- und Kaliumkanäle angenommen wird (*Kirsch et al., 1995; Guy et al., 1995; Tomaselli et al., 1995*). Die extrazellulären Areale der Kanäle formen nach den bestehenden Vorstellungen eine porenbildende Schleife, die sogenannte P-Loop, die in die Zellmembran hineinragt und einzelne Aminosäurereste sich an der Bindung und Leitung der Ionen mit beteiligen. Ein interessanter Nebenaspekt ist der hohe Grad der Homologie zwischen der eintauchenden Schleife der Na^+/K^+ -ATPase und der P-Loop der spannungsabhängigen Ionenkanäle (*Scheiner-Bobis und Schneider, 1997*)

Es gibt weitere interessante Aspekte und Untersuchungen, die eine wichtige Rolle der großen extrazellulären Schleife unterstützen. So finden sich auf der

großen extrazellulären Schleife der OCT-Familie zwei stark konservierte putative Glycosilierungsstellen (bei den meisten Vertretern der Familie sogar drei) und gleichermaßen eine mit fast 70% hohe Konservierung der Aminosäuresequenz (*Koepsell et al., 1998; Koepsell, 1998*). Diese „genetisch determinierte Beständigkeit“ ist in der Natur allermeist mit Funktion bzw. Wirkprinzip verbunden. Lediglich „lückenfüllende“ Funktion innerhalb des Proteins durch die extrazelluläre Schleife macht keinen Sinn. Untersuchungen an den großen extrazellulären Schleifen der OAT-Subfamilie, die zwischen zwei bis sechs putative Glycosylierungsstellen aufweisen, legen die Vermutung nahe, dass die Schleife zum Membraneinbau wichtig ist. Man beobachtete bei Hemmung der Glycosylierung durch Tunicamycin in mOAT1-exprimierenden COS-7 Zellen eine intrazelluläre Akkumulation neu synthetisierter Transporter (*Kuze et al., 1999*).

4.3 Klinische Relevanz der organischen Kationentransporter

Die Charakterisierung der OCT-Familie und im weitesten Sinn sämtlicher körpereigenen Proteine zielt hin auf eine wesentlich bessere Beeinflussbarkeit der Körperfunktionen, Krankheitsverläufe und Pharmakokinetiken.

Im Falle der OCT-Familie bestünde die klinische Anwendbarkeit insbesondere in der Regulierung der Verbleibdauer eines von den OCT transportierten Kations im Körper und teilweise auch der metabolischen Wirkung desselben. Bei genetischen Varianten könnte man Pharmaka gezielter dosieren oder Arzneistoffe so modifizieren, dass eine Nebenwirkung oder eine fehlende Wirksamkeit umgangen würde.

Wichtige Erkenntnisse konnten durch die Zucht einer knock out - Maus für rOCT1 gewonnen werden (*Jonker et al., 2001*). Während innerhalb der OCT-Subfamilie zunächst die Funktionsfähigkeit eines fehlerhaften bzw. fehlenden OCT durch die anderen Familienmitglieder oder andere Transporter

kompensiert scheint - so weist die knock out - Maus für rOCT1 keinerlei phänotypische Veränderungen auf - , lässt sich in diesen Tieren dennoch eine stark veränderte Pharmakokinetik für organische Kationen insbesondere durch Reduzierung der hepatischen Aufnahme und der intestinalen Exkretion nachweisen (*Jonker et al., 2001*).

Als klinisch relevantes Beispiel soll die pharmakologische und pharmakokinetische Einflussnahme der organischen Kationentransporter auf Biguanide dienen. Insbesondere bei dem häufig bei Typ II- Diabetikern und darüber hinaus in den letzten Jahren bei der Therapie des Syndroms der polyzystischen Ovarien (*Velazquez, 1994; Nestler, 2001*) eingesetzten Biguanids Metformin imponierte nur noch eine marginale Aufnahme in die Hepatozyten und die Mukosazellen der rOCT1 knock out - Maus und bei einer rOCT1-transfizierten Hamster-Ovarialzelllinie (*Wang et al., 2002*). Damit spielen die OCT möglicherweise eine entscheidende Rolle sowohl in der Aufnahme des Metformin an den Wirkungsort als auch zumindest partiell bei dessen Elimination. So ist beschrieben, dass die Exkretionsrate des Metformin beim Menschen sehr viel höher als die glomeruläre Filtrationsrate liegt (*Pentikainen et al., 1979*). Metformin, dessen genauer Wirkmechanismus bis heute nicht gänzlich erklärt ist, ist aber zur Erzielung seiner pharmakologischen Wirkung bei der Diabetesbehandlung neben dem direkten Angriff an den peripheren Körperzellen gerade von der Aufnahme in die Hepatozyten und Enterozyten abhängig (*Caspary und Creutzfeldt; 1971*). Möglicherweise sind durch solcherart veränderte Wirkmechanismen Medikamentennebenwirkungen wie die Laktatazidose bei Metforminmedikation zu erklären (*Koepsell et al., 2003*).

Bislang unbeantwortet bleibt auch die Frage, ob und wie weitere von den OCT nachgewiesen transportierten Stoffe, die in der Klinik zum Teil, wie das Verapamil, starke Anwendung finden, in ihrem Wirkungs-, Wechselwirkungs- und Nebenwirkungsprofil durch die OCT-Funktion beeinflusst werden. Das Gleiche gilt auch für bekannte in der Klinik verwendete, die OCT hemmende Substanzen wie das Corticosteron. Ungeklärt ist bis dato ebenfalls, ob die

wichtigste Funktion der organischen Kationentransporter in der Elimination endogener Substanzen besteht, deren Metabolismus man nach näherer Kenntnis der OCT-Familie beeinflussen könnte.

4.4 Ausblick

Diese Arbeit konnte einen kleinen Beitrag zum näheren Verständnis der Arbeitsweise von Transportproteinen, insbesondere der OCT-Familie leisten. Die weiteren Ergebnisse und daraus erwachsenden Fragestellungen bleiben spannend.

Um die Aufgabe der großen extrazellulären Schleife weiter aufzuklären, wäre eine Reinigung der isolierten Schleife denkbar, um damit eine Röntgenstrukturanalyse durchzuführen. Als technisch besonders schwierig erweist sich dabei vor allem die Kristallisation im Vorfeld der Analyse. Es könnte sich dabei als Problem erweisen, die nativen Disulfidbrücken in der Schleife zu erzeugen.

Es wäre denkbar, dass die Funktion der großen extrazellulären Schleife in der Stabilisierung oder Ausbildung der Tertiärstruktur der Transporter besteht. Hierbei wäre interessant zu erfahren, ob die Schleife bei Kontakt mit hochaffinen Hemmstoffen die Konformation des Proteins ändert und dadurch vielleicht eine Blockierung des Transports bewirkt. Immunhistochemische Untersuchungen mit Schleifen-Antikörpern in An- oder Abwesenheit von Inhibitoren könnten helfen, eine derartige Funktion der Schleife wahrscheinlicher zu machen. Im Falle des rOCT1 wurde in unserer Forschungsgruppe ein Antikörper gegen die Schleifenregion entwickelt, den man für derartige Untersuchungen verwenden könnte (*Meyer-Wentrup et al., 1998*).

5 Zusammenfassung

Die OCT-Transporterfamilie spielt bei der Ausscheidung von Arzneimitteln und Neurotransmittern in Leber und Niere eine wichtige Rolle. Sie enthält unter anderem polyspezifische organische Kationentransporter (OCT-Subfamilie) und organische Anionentransporter (OAT-Subfamilie). Die Transporter der OCT-Familie weisen neben 12 membranspannenden α -Helices eine große extrazelluläre Schleife zwischen der ersten und der zweiten Transmembrandomäne auf.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Versuch unternommen, die Funktion der großen extrazellulären Schleife aufzuklären. Es wurden Chimären charakterisiert, bei denen die großen extrazellulären Schleifen von zwei Subtypen der organischen Kationentransporter der Ratte (rOCT1 und rOCT2) ausgetauscht wurden. Außerdem wurde untersucht, ob die Transportfunktion erhalten bleibt, wenn die entsprechende extrazelluläre Schleife eines organischen Anionentransporters (rOAT1) oder eines Glucosetransporters der gleichen Superfamilie (hGLUT1) an die Position der großen extrazellulären Schleife von rOCT1 eingefügt wird.

Bei den Transportmessungen an den Chimären wurde die essentielle Bedeutung der großen extrazellulären Schleife für die Expression bzw. die Funktion der OCT gezeigt. Nach dem Einbau der entsprechenden Schleife des hGLUT1-Transporters in rOCT1 konnte kein Transport mehr gemessen werden. Die Transportraten der Chimäre mit der eingebauten Schleife des näher verwandten organischen Anionentransporters rOAT1 waren drastisch reduziert.

Dagegen waren bei dem Austausch der großen extrazellulären Schleife zwischen den nahe verwandten Kationentransportern rOCT1 und rOCT2 keine wesentlichen Veränderungen des Transportes von Tetraethylammonium (TEA), einem gemeinsamen Substrat beider Subtypen, beobachtet worden.

Um festzustellen, ob die große Schleife die Affinitäten von Hemmstoffen und Substraten mitbestimmt, wurden Messungen in Form von Hemmkinetiken von Substanzen durchgeführt, die eine deutliche unterschiedliche Affinität gegenüber rOCT1 und rOCT2 haben. Für Mepiperphenidol (Darstin), *o*-Methyl-Isoprenalin, Procainamid und Corticosteron wurde gefunden, dass die Affinität vom Transportergrundgerüst bestimmt wurde und durch den Austausch der großen extrazellulären Schleife zwischen rOCT1 und rOCT2 nicht verändert wurde. Für den nicht kompetitiven Hemmstoff Cyanin 863 konnte hingegen gezeigt werden, dass die IC₅₀-Werte der Aufnahme von TEA zum Teil durch die große Schleife mitbestimmt wurden.

Die Daten deuten darauf hin, dass die große extrazelluläre Schleife der organischen Kationentransporter eine strukturelle Funktion besitzt. Sie sprechen nicht für eine direkte Beteiligung an der Substratbindungstasche dieser Transporter, legen aber nahe, dass die Schleife die Konformation der Substratbindungstasche beeinflusst.

6 Literaturverzeichnis

Abramson J., Smirnova I., Kasho V., Verner G., Kaback H.R., Iwata S., Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*, *Science*, vol. 301(5633), pp. 610-615, 2003

Abramson J., Smirnova I., Kasho V., Verner G., Iwata S., Kaback H.R., The lactose permease of *Escherichia coli*: overall structure, the sugar-binding site and the alternating access model for transport, *FEBS Letters*, vol. 555, pp. 96-101, 2003

Ali M.F., Soto A., Knoop F.C., and Conlon J.M., Antimicrobial peptides isolated of the diploid frog, *Xenopus tropicalis* (Pipidae), *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1550, pp. 81-89, 2001

Arndt P., Volk C., Gorboulev V., Budiman T., Popp C., Ulzheimer-Teuber I., Akhoundova A., Koppatz S., Bamberg E., Nagel G., and Koepsell H., Interaction of cations, anions, and weak base quinine with rat renal cation transporter rOCT2 compared with rOCT1, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 281, pp.454-468, 2001

Brady K.P., Dushkin H., Fornzler D., Koike T., Magner F., Her H., Gullans S., Segre G., Green R.M., and Beier D.R., A novel putative transporter maps to the osteosclerosis (oc) mutation and is not expressed in the oc mutant mouse, *Genomics*, vol. 56, pp. 254-261

Breidert T., Spitzenberger F., Gründemann D., and Schömig E., Catecholamine transport by the organic cation transporter type 1 (OCT1), *Brit. J. Pharmacol.*, vol. 125, pp. 218-224

- Burckhardt G., and Wolff N.A.**, Structure of renal organic anion and cation transporters, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 278, pp. F853-F866, 2000
- Burwinkel B., Kreuder J., Schweitzer S., Vorgerd M., Gempel K., Gerbitz K.D., and Kilimann M.W.**, Carnitine transporter OTH2 mutations in systemetic primary carnitine deficiency: a novel Arg169Gln mutation and a recurrend Arg282ter mutation associated with an unconventional splicing abnormality, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, vol. 261, pp. 484-487, 1999
- Busch A.E., Quester S., Ulzheimer J.C., Gorboulev V., Akhoundova A., Waldegger S., Lang F., and Koepsell H.**, Monoamine neurotransmitter transport mediated by the polyspecific cation transporter rOCT1, *FEBS Lett.*, vol. 395, pp. 153-156, 1996
- Busch A.E., Quester S., Ulzheimer J.C., Waldegger S., Gorboulev V., Arndt P., Lang F., and Koepsell H.**, Electrogenic properties and substrate specificity of the polyspecific cation transporter rOCT1, *J. Biol. Chem.*, vol. 271, pp. 32599-32604, 1996
- Busch A.E., Karbach U., Miska D., Gorboulev V., Akhoundova A., Volk C., Arndt P., Ulzheimer J.C., Sonders M.S., Baumann C., Waldegger S., Lang F., and Koepsell H.**, Human Neurons express the polyspecific cation transporter hOCT2, which translocates monoamine neurotransmitters, amantadine, and memantine, *Mol. Pharmacol.*, vol. 54, pp. 342-352, 1998
- Carruthers A.**, Facilitated diffusion of glucose, *Physiol. Rev.*, vol. 70, pp. 1135-1176, 1990

- Caspary W.F, and Creutzfeldt W.**, Analysis of the inhibitory effect of biguanides on glucose absorption: inhibition of active sugar transport, *Diabetologia*, vol. 7, pp. 379-385, 1971
- Cha S.H., Sekine T., Kusuhara H., Yu E., Kim D.K., Sugiyama Y., Kanai Y., and Endou H.**, Molecular cloning and characterization of multispecific organic anion transporter 4 expressed in the placenta, *J. Biol. Chem.*, vol. 275, pp. 4507-4512, 2000
- Dascal N.**, The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, vol. 22, pp. 317-387, 1987
- Dresser M.J., Gray A.T., and Giacomini K.M.**, Kinetic and selectivity differences between rodent, rabbit, and human organic cation transporters (OCT1), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 292, pp. 1146-1152, 2000
- Dumont J.N.**, Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin), 1. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals, *J. Morphol.*, vol. 136, pp. 153-180, 1972
- Dwyer D.S.**, Model of the 3-D structure of the GLUT3 glucose transporter and molecular dynamics simulation of glucose transport, *Proteins*, vol. 42, pp. 531-541, 2001
- Enomoto A., Kimura H., Chairoungdua A., Shigeta Y., Jutabha P., Cha S.H., Hosoyamada M., Takeda M., Sekine T., Igarashi T., Matsuo H., Kikuchi Y., Oda T., Ichida K., Hosoya T., Shimokada K., Niwa T., Kanai Y., and Endou H.**, Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels, *Nature*, vol. 393, p. 395, 2002

- Enomoto A., Wempe M.F., Tsuchida H., Shin H.J., Cha S.H., Anzai N., Goto A., Sakamoto A., Niwa T., Kanai Y., Anders M.W., and Endou H.,** Molecular identification of a novel carnitine transporter specific to human testis. Insights into the mechanism of carnitine recognition, *J. Biol. Chem.*, vol. 277, pp. 36262-36271, 2002
- Eraly S.A., and Nigam S.K.,** Novel human cDNAs homologous to Drosophila Orct and mammalian carnitine transporters, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 297, pp. 1159-1166, 2002
- Eraly S.A., Hamilton B.A., and Nigam S.K.,** Organic anion and cation transporters occur in pairs of similar and similarly expressed genes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 300, pp. 333-342, 2003
- Eriksson B.O., Lindstedt S., and Nordin I.,** Hereditary defect in carnitine membrane transport is expressed in skin fibroblasts, *Europ. J. Pediat.*, vol. 147, pp. 662-663, 1988
- Fiedler B., and Scheiner-Bobis G.,** Transmembrane topology of alpha- and beta-subunits of Na⁺, K⁺-ATPase derived from beta-galactosidase fusion proteins expressed in yeast, *J. Biol. Chem.*, vol. 271, pp. 29312-29320, 1996
- George R.L., Wu X., Huang W., Fei Y.J., Leibach F.H., and Ganapathy V.,** Molecular cloning and functional characterization of a polyspecific organic anion transporter from *Caenorhabditis elegans*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 291, pp.596-603, 1999
- Gerok W., Huber C., Meinertz, T., Zeidler H. (Hrsg.),** Die innere Medizin, Erkrankungen der Skelettmuskulatur, Enzymdefektmyopathien, Carnitinmangelmyopathie, *F.K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH*, ISBN 3-7945-2000-9, pp. 890-891, 2000

Gorboulev V., Ulzheimer J.C., Akhoundova A., Ulzheimer-Teuber I., Karbach U., Quester S., Baumann C., Lang F., Busch A.E., and Koepsell H., Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters, *DNA Cell Biol.*, vol. 16, p. 881, 1997

Gorboulev V., Volk C., Arndt P., Akhoundova A., and Koepsell H., Selectivity of the polyspecific cation transporter rOCT1 is changed by mutation of aspartate 475 to glutamate, *Mol. Pharmacol.*, vol. 56, pp. 1254-1261, 1999

Green R.M., Lo K., Sterritt C., and Beier D.R., Cloning and functional expressing of a mouse liver organic cation transporter, *Hepatology*, vol. 29, pp. 1556-1562, 1999

Griffith J.K., Baker M.E., Rouch D.A. Page M.G., Skurrey R.A., Paulsen I.T., Chater K.F., Baldwin S.A., and Henderson P.J., Membrane transport proteins: implications of sequence comparisons, *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 4, pp. 684-695, 1992

Gründemann D. and Koepsell H., Ethidium bromide staining during denaturation with glyoxal for sensitive detection of RNA in agarose gel electrophoresis, *Analytical Biochemistry*, vol. 216, pp. 459-461, 1993

Gründemann D., Gorboulev V., Gambaryan S., Veyhl M., and Koepsell H., Drug excretion mediated by a new prototyp of polyspecific transporter, *Nature*, vol. 372, pp. 549-552, 1994

Gründemann D., Babin-Ebell J., Martel F., Örding N., Schmidt A., and Schömig E., Primary structure and functional expression of the apical organic cation transporter from kidney epithelial LLC-PK1 cells, *J. Biol. Chem.*, vol. 272, pp. 10408-10413, 1997

- Gründemann D., Köster S., Kiefer N., Breidert T., Engelhardt M., Spitzenberger F., Obermüller N., and Schömig E.**, Transport of monoamin transmitters by the organic cation transporter type 2 (OCT2), *J. Biol. Chem.*, vol. 273, pp. 30915-30920, 1998
- Gründemann D., Schechinger B., Rappold G.A., and Schömig E.**, Molecular identification of the corticosteron-sensitive extraneuronal catecholamine transporter, *Nature Neuroscience*, vol. 1, pp. 349-351, 1998
- Gurdon J.B., Lane C.D., Woodland H.R., and Marbaix G.**, Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells, *Nature*, vol. 233, pp. 177-182, 1971
- Guy H.R., and Durell S.R.**, Structural models of Na⁺, Ca²⁺, and K⁺ channels, *Soc. Gen. Physiol. Ser.*, vol. 50, pp. 1-16, 1995
- Hosoyamada M., Sekine T., Kanai Y., and Endou H.**, Molecular cloning and functional expressing of a multispecific organic anion transporter from human kidney, *Am. J. Physiol.*, vol. 276, pp. F122-F128, 1999
- Henderson P.J., Roberts P.E., Martin G.E., Seamon K.B., Walmsley A.R., Rutherford N.G., Varela M.F., and Griffith J.K.**, Homologous sugar-transport proteins in microbes and man, *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 21, pp. 1002-1006, 1993
- Jonker J.W., Wagenaar E., Mol C.A., Buitelaar M., Koepsell H., Smit J.W., and Schinkel A.H.**, Reduced hepatic uptake and intestinal excretion of organic cations in mice with a targeted disruption of the organic cation transporter 1 (OCT1 [Slc22a1]) gene, *Mol. Cell Biol.*, vol. 21, pp. 5471-5477, 2001

- Karbach U., Kricke J., Meyer-Wentrup F., Gorboulev V., Volk C., Loffing-Cueni D., Kaissling B., Bachmann S., and Koepsell H.,** Localization of the organic cation transporters OCT1 and OCT2 in rat kidney, *Am. J. Physiol.*, vol. 279, pp. F679-F687, 2000
- Karpati G., Carpanter S., Engel A.G., Watters G., Allen J., Rothman S., Klassen G., and Mamer O.A.,** The syndrome of systemic carnitine deficiency. Clinical, morphologic, biochemical, and pathophysiologic features, *Neurology*, vol. 25, pp. 16-24, 1975
- Kekuda R., Prasad P.D., Wu X., Wang H., Fei Y.J., Leibach F., and Ganapathy V.,** Cloning and functional characterization of a potential-sensitive, polyspecific organic cation transporter (OCT3) most abundantly expressed in the placenta, *J. Biol. Chem.*, vol. 273, pp. 15971-15979, 1998
- Kerb R., Brinkmann U., Chatskaia N., Gorbunov D., Gorboulev V., Mornhinweg E., Keil A., Eichelbaum M., and Koepsell H.,** Identification of genetic variations of the human organic cation transporter hOCT1 and their functional consequences, *Pharmacogenetics*, vol. 12, pp. 591-595, 2002
- Kirsch G.E., Pascual J.M., and Shieh C.C.,** Functional role of a conserved aspartate in the external mouth of voltage-gated potassium channels, *Biophys. J.*, vol. 68, pp. 1804-1813, 1995
- Koepsell H.,** Organic cation transporters in intestine, kidney, liver and brain, *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 60, pp. 243-266, 1998
- Koepsell H., Busch A., Gorboulev V., and Arndt P.,** Structure and function of organic cation transporters, *News Physiol. Sci.*, vol. 13, pp. 11-16, 1998

- Koepsell H., Gorboulev V., and Arndt P.**, Molecular pharmacology of organic cation transporters in kidney, *J. Membrane Biol.*, vol. 167, pp. 103-117, 1999
- Koepsell H., Schmitt B.M., and Gorboulev V.**, Organic cation transporters, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, vol. 150, pp. 36-90, 2003
- Koepsell H., and Endou H.**, The SLC22 drug transporter family, *Eur. J. Physiol.*, vol. 447(5), pp. 666-676, 2003
- Koizumi A., Nozaki J., Ohura T., Kayo T., Wada Y., Nezu J., Ohashi R., Tamai I., Shoji Y., Takada G., Kibira S., Matsuishi T., and Tsuji A.**, Genetic epidemiology of the carnitine transporter OCTN2 gene in a Japanese population and phenotypic characterization in Japanese pedigrees with primary systemic carnitine deficiency, *Hum. Mol. Genetics*, vol. 8, pp. 2247-2254, 1999
- Kuze K., Graves P., Leahy A., Wilson P., Stuhlmann H., and You G.**, Heterologous expression and functional characterization of a mouse renal organic anion transporter in mammalian cells, *J. Biol. Chem.*, vol. 274, pp. 1519-1524, 1999
- Kusuhara H., Sekine T., Utsunomiya-Tate N., Tsuda M., Kojima R., Cha S.H., Sugiyama Y., Kanai Y., and Endou H.**, Molecular cloning and characterization of a new multispecific organic anion transporter from rat brain, *J. Biol. Chem.*, vol. 274, pp. 13675-13680, 1999
- Lopez-Nieto C., You G., Bush K., Barros E., Beier D., and Nigam S.**, Molecular cloning and characterization of NKT, a gene product related to the organic cation transporter family that is almost exclusively expressed in the kidney, *J. Biol. Chem.*, vol. 272, pp. 6471-6478, 1997

- Lu K., Nishimori H., Nakamura Y., Shima K., and Kuwajima M.,** A missense mutation of mouse OCTN2, a sodium-dependent carnitine transporter, in the juvenile visceral steatosis mouse, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 252, pp. 590-594, 1998
- Marger M.D., and Saier M.H.,** A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport, and antiport, *Trend Biochem. Sci.*, vol. 18, pp. 13-20, 1993
- Martel F., Vetter T., Russ H., Gründemann D., Azevedo I., Koepsell H., and Schömig E.,** Transport of small organic cations in the rat liver. The role of organic cation transporter rOCT1, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, vol. 354, pp. 320-326, 1996
- Martel F., Ribeiro L., Calhau C., and Azevedo I.,** Comparison between uptake2 and OCT1: effects of catecholamines, metanephrines and corticosterone, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, vol. 359, pp. 303-309, 1999
- Meyer-Wentrup F., Karch U., Gorboulev V., Arndt P., and Koepsell H.,** Membrane localisation of the electrogenic cation transporter rOCT1 in rat liver, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 248, pp. 673-678, 1998
- Mooslehner K.A, and Allen N.D.,** Cloning of the mouse organic transporter 2 gene, Slc22a2, from an enhancer-trap transgene integration locus, *Mamm. Genome*, vol. 10, pp. 218-242, 1999
- Mori K., Ogawa Y., Ebihara K., Aoki T., Tamura N., Sugawara A., Kuwahara T., Ozaki S., Mukoyama M., Tashiro K., Tanaka I., and Nakao K.,** Kidney-specific expression of a novel mouse organic cation transporter-like protein, *FEBS Lett.*, vol. 417, pp. 371-374, 1997

- Nagel G., Volk C., Friedrich T., Ulzheimer J.C., Bamberg E., and Koepsell H.**, A reevaluation of substrate specificity of the rat cation transporter rOCT1, *J. Biol. Chem.*, vol. 272, pp. 31953-31956, 1997
- Nestler J.E.**, Metformin and the polycystic ovary syndrome, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 86, p. 1430, 2001
- Nezu J., Tamai I., Oku A., Ohashi R., Yabuuchi H., Hashimoto N., Nikaido H., Sai Y., Koizumi A., Shoji Y., Takada G., Matsuishi T., Yoshino M., Kato H., Ohura T., Tsujimoto G., Hayakawa J., Shimane M., and Tsuji A.**, Primary systemic carnitine deficiency is caused by mutations in a gene encoding sodium ion-dependent carnitine transporter, *Nature Genetics*, vol. 21, pp. 91-94, 1999
- Nishiwaki T., Daigo Y., Tamari M., Fujii Y., and Nakamura Y.**, Molecular cloning mapping, and characterization of two novel human genes, ORCTL3 and ORCTL4, bearing homology to organic cation transporters, *Cytogenet. Cell Genet.*, vol. 83, pp. 251-255, 1998
- Ohsiro N., Kobayashi Y., Tokuyama S., Sekine T., Endou H., and Yamamoto T.**, Molecular mechanism of drug transport, *Jpn. J. Pharmacol.*, vol. 82, p. 155P, 2000
- Okuda M., Saito H., Urakami Y., Takano M., and Inui K.-I.**, cDNA cloning and functional expression of a novel rat kidney cation transporter, rOCT2, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 224, pp. 500-507, 1996
- Okuda M., Urakami Y., Saito H., and Inui K.-I.**, Molecular mechanisms of organic cation transport in OCT2-expressing *Xenopus* oocytes, *Biochem. Biophys. Acta*, vol. 1417, pp. 224-231, 1999

Pao S.S., Paulsen I.T., Saier M.H. Jr., Major facilitator superfamily, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 62, pp. 1-34, 1998

Paulsen I.T., Skurray R.A., Tam R., Saier M.H. Jr., Turner R.J., Weiner J.H., Goldberg E.B., and Grinius L.L., The SMR family: a novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs, *Mol. Microbiol.*, vol. 19, pp. 1167-1175, 1996

Pentikainen P.J., Neuvonen P.J., and Penttila A., Pharmacokinetics of metformin after intravenous and oral administration to man, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 16, pp. 195-202, 1979

Race J.E., Grassl S.M., Williams W.J., and Holtzman E.J., Molecular cloning and characterization of two novel human renal organic anion transporters (hOAT1 and hOAT3), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 255, pp. 508-514, 1999

Reid G., Wolff N.A., Dautzenberg F.M., and Burckhardt G., Cloning of a human renal p-amminohippurate transporter, hROAT1, *Kidney Blood Press. Res.*, vol. 21, pp. 233-237, 1998

Rennick B.R., Moe G.K., Lyons R.H., Hoobler S.W., and Neligh R., Absorption and renal excretion of the tetraethylammonium ion, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 91, pp. 210-217, 1947

Rennick B.R., and Moe G.K., Stop-flow localization of renal tubular excretion of tetraethylammonium, *Am. J. Physiol.*, vol. 198, pp. 1267-1270, 1960

Saier M.H. Jr., Beatty J.T., Goffeau A., Harley K.T., Heijne W.H., Huang S.C., Jack D.L., Jahn P.S., Lew K., Liu J., Pao S.S., Paulsen I.T., Tseng T.T., and Virk P.S., The major facilitator superfamily, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 1, pp. 257-279, 1999

- Scaglia F., Wang Y., Singh R.H., Dembure P.P., Pasquali M., Fernhoff P.M., and Longo N.**, Defective urinary transport in heterozygotes for primary carnitine deficiency, *Genet. Med.*, vol. 1, pp. 34-39, 1998
- Schneider-Bobis G., and Schneider H.**, Palytoxin-induced channel formation within the Na⁺/K⁺-ATPase does not require a catalytically active enzyme, *Eur. J. Biochem.*, vol. 248, pp. 717-723, 1997
- Schömig E., Spitzenberger F., Engelhardt M., Martel F., Örding N., and Gründemann D.**, Molecular cloning and characterization of two novel transport proteins from rat kidney, *FEBS Lett.*, vol. 425, pp. 79-86, 1998
- Schweifer N., and Barlow D.P.**, The Lx1 gene maps to mouse chromosome 17 and codes for a protein is homologous to glucose and polyspecific transmembrane transporters, *Mamm. Genome*, vol. 7, pp. 735-740, 1996
- Sekine T., Watanabe N., Hosoyamada M., Kanai Y., and Endou H.**, Expression cloning and functional characterization of a novel multispecific organic anion transporter, *J. Biol. Chem.*, vol. 272, pp. 18526-18529, 1997
- Sekine T., Kusuhara H., Utsunomiya-Tate N., Tsuda M., Sugiyama Y., Kanai Y., and Endou H.**, Molecular cloning and characterization of high-affinity carnitine transporter from rat intestine, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 251, pp. 586-591, 1998
- Sekine T., Cha S.H., Tsuda M., Apiwattanakul N., Nakajima N., Kanai Y., and Endou H.**, Identification of multispecific organic anion transporter 2 expressed predominantly in the liver, *FEBS Lett.*, vol. 429, pp. 179-182, 1998

- Sekine T., Cha S.H., Endou H.**, The multispecific organic anion transporter (OAT) family, *Eur. J. Physiol.*, vol. 440, pp. 337-350, 2000
- Sigel E.**, Use of *Xenopus* oocytes for the functional expression of plasma membrane proteins, *J. Membr. Biol.*, vol. 117, pp. 201-221, 1990
- Simonson G., Vincent A., Roberg K., Huang Y., and Iwanij V.**, Molecular cloning and characterization of a novel liver specific transport protein, *J. Cell. Sci.*, vol. 107, pp. 1065-1072, 1994
- Singer S.J., and Nicholson G.L.**, The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science*, vol. 175, pp. 720-731, 1972
- Sperber I.**, The mechanism of renal excretion of some detoxication products in the chicken, *Proc. Int. Congr. Physiol.*, vol. 17, pp. 217-218, 1947
- Sun W. Wu R.R., van Poelje P.D., and Erion M.D.**, Isolation of a family of organic anion transporters from human liver and kidney, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 283, pp. 417-422, 2001
- Sweet D.H., Walsh R.C., and Pritchard J.**, Expression cloning and characterization of a novel organic cation transporter from rat kidney, *FASEB J.*, vol. 10, p. A127, 1996
- Sweet D.H., Wolff N.A., and Pritchard J.**, Expression cloning and characterization of ROAT1, the basolateral organic cation transporter in rat kidney, *J. Biol. Chem.*, vol. 272, pp. 30088-30095, 1997
- Tamai I., Yabuuchi H., Nezu J., Sai Y., Oku A., Shimane M., and Tsuji A.**, Cloning and characterization of a novel pH-dependent organic cation transporter, OCTN1, *FEBS Lett.*, vol. 419, pp. 107-111, 1997

- Tamai I., Ohashi R., Nezu J., Yabuuchi H., Oku A., Shimane M., Yoshimichi S., and Tsuji A.**, Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2, *J. Biol. Chem.*, vol. 273, pp. 20378-20382, 1998
- Taylor C.A., Stanley K.N., and Shirras A.D.**, The Orct gene of *Drosophila melanogaster* codes for a putative organic cation transporter with six or twelf transmembrane domains, *Gene*, vol. 201, pp. 69-74, 1997
- Tein I., De Vito D.C., Bierman F., Pulver P., De Meileir L.J., Cvitanovic-Sojat L., Pagon R.A., Bertini E., Dionisi-Vici C., Servidei S., and Dimauro S.**, Impaired skin fibroblast carnitine uptake in primary systemic carnitine deficiency manifested by childhood carnitin-responsive cardiomyopathy, *Pediat. Res.*, vol. 28, pp. 247-255, 1990
- Terashita S., Dresser M.J., Zhang L., Gray A.T., Yost S.C., and Giacomini K.M.**, Molecular cloning and characterization of a rabbit renal organic cation transporter, *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1369, pp. 1-6, 1998
- Tomaselli G.F., Chiamvimonvat N., Nuss H.B., Balsler J.R., Perez-Garcia M.T. Xu R.H., Orias D.W., Backx P.H., and Marban E.**, A mutation in the pore of the sodium channel alters gating, *Biophys. J.*, vol. 68, pp. 1814-1827, 1995
- Treem W.R., Stanley C.A., Finegold D.N., Hale D.E., and Coates P.M.**, Primary carnitine deficiency due to a failure of carnitine transport in kidney, muscle and fibroblasts, *New Eng. J. Med.*, vol. 319, pp. 1331-1336, 1988
- Urakami Y., Okuda M., Masuda S., Saito H., and Inui K.-I.**, Functional characteristics and membrane localization of rat multispecific organic

transporters, OCT1 and OCT2, mediating tubular secretion of cationic drugs, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 287, pp. 800-805, 1998

Velazquez E.M., Mendoza S., Hamer T., Sosa F., and Glueck C.J., Metformin therapy in polycystic ovary syndrome reduces hyperinsulinemia, insulin resistance, hyperandrogenemia, and systolic blood pressure, while facilitating normal menses and pregnancy, *Metabolism*, vol. 43, pp. 647-654, 1994

Verhaag S., Schweifer N., Barlow D.P., and Zwart R., 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*, vol. 55, pp. 209-218, 1999

Volk C., Gorboulev V., Budiman T., Nagel G., Koepsell H., Different affinities of inhibitors to the outwardly and inwardly directed substrate binding site of organic cation transporter 2, *Mol. Pharmacol.*, vol. 64, pp. 1037-1047, 2003

Wang D.S., Jonker J.W., Kato Y., Kusuhara H., Schinkel A.H., and Sugiyama Y., Involvement of organic cation transporter 1 in hepatic and intestinal distribution of metformin, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 302, pp. 510-515, 2002

Wessler I., Roth E., Deutsch C., Brockerhoff P., Bittinger F., Kirkpatrick C.J., and Kilbinger H., Release of non-neuronal acetylcholine from the isolated human placenta is mediated by organic cation transporters, *Br. J. Pharmacol.*, vol. 134, pp. 951-956, 2001

- Wolff N.A., Werner A., Burckhardt S., and Burckhardt G.,** Expression cloning and characterization of a renal organic anion transporter from winter flounder, *FEBS Lett.*, vol. 417, pp. 287-291, 1997
- Wu X., Prasad P.D., Leibach F., and Ganapathy V.,** cDNA sequence, transport function, and genomic organization of human OCTN2, a new member of the organic cation transporter family, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 246, pp. 589-595, 1998
- Wu X., Fei Y.J., Huang W., Chancy C., Leibach F.H., and Ganapathy V.,** Identity of the F52F12.1 gene product in *Caenorhabditis elegans* as an organic cation transporter, *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1418, pp. 239-244, 1999
- Wu X., Huang W., Prasad P.D., Seth P., Rajan D.P., Leibach F.H., Chen J., Conway S.J., and Ganapathy V.,** Functional characteristics and tissue distribution pattern of organic cation transporter 2 (OCTN2), an organic cation/carnitine transporter, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 290, pp. 1482-1492, 1999
- Wu X., George R.L., Huang W., Wang H., Conway S.J., Leibach F.H., and Ganapathy V.,** Structural and functional characteristics and tissue distribution pattern of rat OCTN1, an organic cation transporter, cloned from placenta, *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1466, pp. 315-327, 2000
- Zasloff M.,** Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 84, pp. 5449-5453, 1987

Zeng H., Parthasarathy R., Rampal A.L., and Jung C.Y., Proposed structure of putative glucose channel in GLUT1 facilitative glucose transporter, *Biophys. J.*, vol. 70, pp. 14-21, 1996

Zhang L., Dresser M.J., Chun J.K., Babbitt P.C., and Giacomini K.M., Cloning and functional characterization of a rat renal organic cation transporter isoform (rOCT1A), *J. Biol. Chem.*, vol. 272, pp. 16548-16554, 1997

Zhang L., Dresser M.J., Gray A.T, Yost S.C., Terashita S., and Giacomini K.M., Cloning and functional expression of a human liver organic cation transporter, *Mol. Pharmacol.*, vol. 51, pp. 913-921, 1997

Zhang L., Brett C.M., and Giacomini K.M., Role of organic cation transporters in drug absorption and elimination, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 38, pp. 431-460, 1998

Zhang L., Gorset W., Dresser M.J., and Giacomini K.M., The interaction of n-tetraethylammonium compounds with a human organic cation transporter, hOCT1, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 288, pp. 1192-1198, 1999

7 Anhang

7.1 Einige Vertreter der OCT-Familie

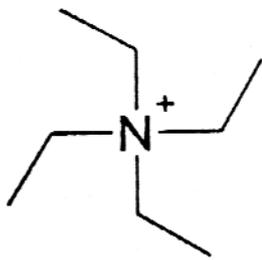
Name	Referenz	Genbank	Spezies	Gewebe(v.a.)
rOCT1	Gründemann et al., 1994	X78855	Ratte	Leber, Niere
rOCT2	Gorboulev et al., 1995 n. p. Okuda et al., 1996	D83044 JC4884	Ratte	Niere
rOCT3	Kekuda et al., 1998	AF055286	Ratte	Plazenta, Darm
hOCT1	Gorboulev et al., 1997 Zhang et al., 1997[b]	X98332 U77086	Mensch	Leber
hOCT2	Gorboulev et al., 1997	X98333	Mensch	Niere
hOCT3	Gründemann et al., 1998 (hier EMT benannt)	AJ001417	Mensch	Leber, Herz, Muskulatur, Placenta, Lunge, Hirn
mOCT1 (Lx1)	Schweifer und Barlow, 1996 Green et al., 1999	U38652 AF010259	Maus	z.B. Leber
mOCT2	Mooslehner und Allen, 1999	AJ006036	Maus	Leber, Niere
mOCT3	Wu et al., 1998 n. p. Verhaag et al., 1999	AF082566 AF078750	Maus	Niere, Plazenta
rbOCT1	Terashita et al., 1998	AF015958	Kaninchen	Niere
ceOCT1	Wu et al., 1999	AF110415	Caenorhab- ditis elegans	
drOCT	Taylor et al., 1997	Y12399	Drosophila melanogaster	
rOCTN1	Wu et al., 2000	AF169831	Ratte	mehrere
rOCTN2 (rUST2)	Sekine et al., 1998[a] Schömig et al., 1998	AB017260 AJ001933	Ratte	mehrere
hOCTN1	Tamai et al., 1997	AB007448	Mensch	Niere, Herz, Muskulatur, Plazenta, Prostata
hOCTN2	Wu et al., 1998	AF057164	Mensch	mehrere

mOCTN1	Nezu et al., 1999 n. p.	AB016257	Maus	z.B. Niere
mOCTN2	Lu et al., 1998	AB015800	Maus	z.B. Niere
mOCTN3	Nezu et al., 1998 n. p.	AB018436	Maus	z.B. Testis
rUST1	Schömig et al., 1998	Y09945	Ratte	Niere
mRST	Mori et al., 1997	AB005451	Maus	Niere
hOCTL1	Nishiwaki et al., 1998 (hier ORCTL3 benannt)	AB26898	Mensch	
hOCTL2	Nishiwaki et al., 1998 (hier ORCTL4 benannt)	NM04803	Mensch	
rOAT1	Sekine et al., 1997 Sweet et al., 1997	AB004559 AF008221	Ratte	Niere, Hirn
rOAT2 (rNLT)	Simonson et al., 1994 Sekine et al., 1998[b]	L27651	Ratte	Leber, Niere
rOAT3	Kusuhara et al., 1999	AB017446	Ratte	Leber, Niere, Hirn
hOAT1	Hosoyamada et al., 1999 (hOAT1-1, hOAT1-2), Reid et al., 1998 (hROAT1)	AF057039	Mensch	Niere, Hirn, Plazenta
hOAT2	Ohsiro et al., 2000	AF210455 AF097518 AY050498	Mensch	Niere, Leber
hOAT3	Race et al., 1999	AF097491	Mensch	Niere, Hirn, Muskulatur, wachsender Knochen
hOAT4	Cha et al., 2000	AB026116	Mensch	Niere, Plazenta
hOAT5	Sun et al., 2001	AA705512	Mensch	Leber
mOAT1	Lopez-Nieto et al., 1997 (hier mNKT benannt)	U52842	Maus	Niere, Hirn
mOAT3	Brady et al., 1999	AF078869	Maus	Niere
rbOAT1	Bahn et al., 1999 n. p.	AJ242871	Kaninchen	Niere
fIOAT1	Wolff et al., 1997	Z97028	Flunder	Niere
ceOAT	George et al., 1999		Caenorhab- ditis elegans	
hURAT1	Enomoto et al., 2002[a]	AB071863	Mensch	Niere

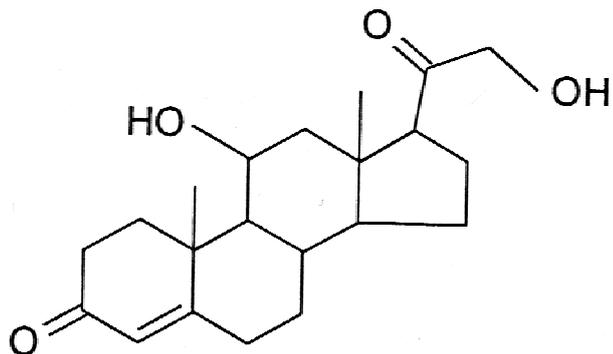
hCT2	Enomoto et al., 2002b]	AB055798 AF268892 AY145502	Mensch	Testis, Knochen- mark, Niere, Leukozyten
hUST3	Sun et al., 2001	AB062418	Mensch	Leber
FLIPT1	Eraly und Nigam, 2002	AY145501	Mensch	Niere, Hirn, Leber, Herz, Muskulatur, Plazenta, Milz, Lunge

Tab. 7.1: Einige Vertreter aus dem Stammbaum der OCT-Familie. Zusammenstellung nach Burckhardt und Wolff, 2000, Eraly et al., 2003 und Koepsell und Endou, 2003.

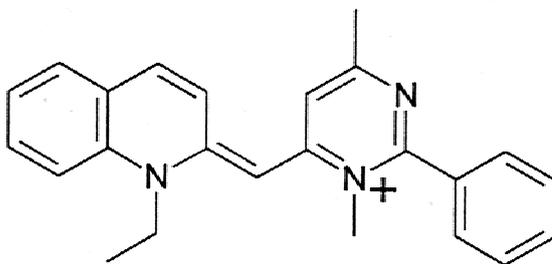
7.2 Formelzeichen



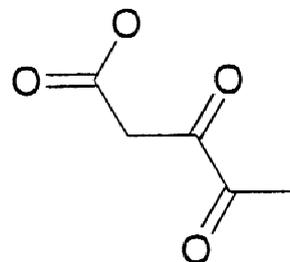
Tetraethylammonium



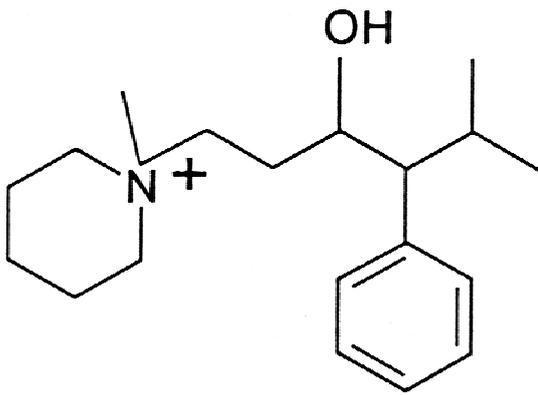
Corticosteron



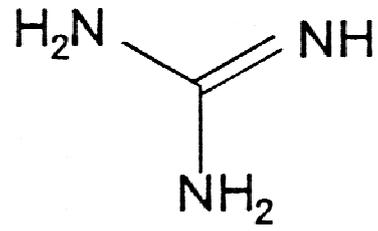
Cyanin 863



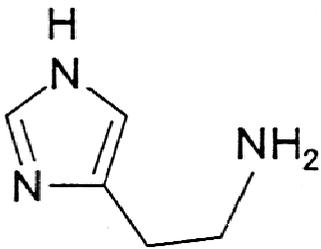
Ketoglutarat



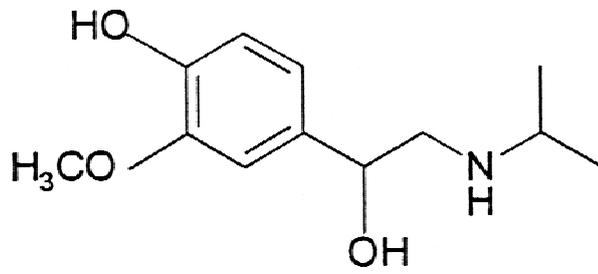
Darstin



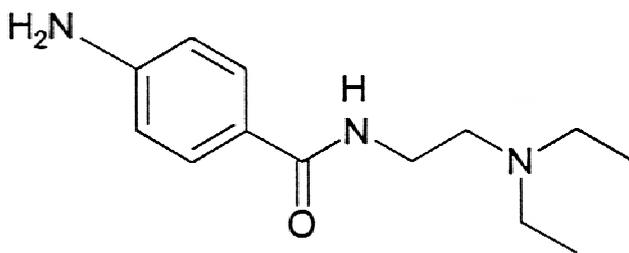
Guanidin



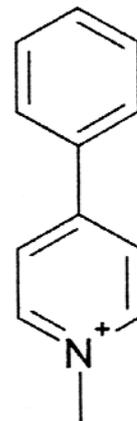
Histamin



O-Methyl-Isoprenalin



Procainamid



1-Methyl-4-Phenylpyridinium

7.3 Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
cpm	Counts (Zählungen) pro Minute
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpm	Zerfälle pro Minute
DTT	Dithiotreitol
GentORi	Oozyten-Ringerlösung mit Gentamycin
GLUT	Glucosetransporter
IC ₅₀	halbmaximale Hemmkonzentration
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
KuIORi	Oozyten-Ringerlösung mit Penicillin und Streptomycin
MFS	Major-Facilitator-Superfamily
MOPS	3-(N-Morpholino-) Propansulfonsäure
MPP	1-Methyl-4-phenylpyridinium
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
OAT	organische Anionentransporter
OCT	organische Kationentransporter
OCTN	organischer Kationen-/Zwitterionentransporter
OMI	3- <i>o</i> -Methyl-Isoprenalin
ORi	Oozyten-Ringerlösung
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	reverse transkriptase – polychainreaction
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SE	Standardfehler
TEA	Tetraethylammonium
V _{max}	maximale Aufnahmegeschwindigkeit

7.4 Zusammenfassung aller Hemmkinetiken von rOCT1, rOCT2 und den Chimären A und B

Nachfolgend sind jeweils die halbmaximalen Hemmkonzentrationen (IC_{50}) mit Standardfehler und die Hill-Koeffizienten (n) mit Standardfehler aus allen vergleichenden Hemmkinetiken mit den Substanzen Guanidin, *o*-Methyl-Isoprenalin, Corticosteron, Procainamid, Darstin und Cyanin 863 tabellarisch dargestellt. Die Werte sind aus nach Hillgleichung gefitteten Hemmkinetiken mit mindestens 8 unterschiedlichen Hemmkonzentrationen und Medianen aus 8 bis 10 Einzelmessungen am *Xenopus laevis* - Expressionssystem ermittelt. Voneinander unabhängige Messungen sind jeweils durch einen Freiraum in der Tabelle getrennt.

	IC_{50} in μM	n
rOCT1	131 ± 36	$1,6 \pm 0,6$
rOCT2	$3,8 \pm 1,4$	$0,7 \pm 0,1$
ChimäreA	$1,1 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,1$
ChimäreB	143 ± 17	$2,0 \pm 0,4$
rOCT1	101 ± 45	$0,9 \pm 0,4$
ChimäreA	$1,9 \pm 0,5$	$0,9 \pm 0,2$
ChimäreB	78 ± 9	$1,1 \pm 0,1$

Tab. 7.2: Corticosteron

	IC_{50} in μM	n
rOCT1	4134 ± 1210	$1,0 \pm 0,3$
rOCT2	417 ± 65	$0,9 \pm 0,1$
ChimäreA	362 ± 73	$1,0 \pm 0,2$
ChimäreB	11060 ± 2275	$1,5 \pm 0,5$
rOCT1	5205 ± 1285	$1,0 \pm 0,3$
rOCT2	195 ± 80	$0,8 \pm 0,2$
ChimäreA	163 ± 25	$0,7 \pm 0,1$
ChimäreB	9033 ± 2587	$0,8 \pm 0,2$

Tab. 7.3: Guanidin.

	IC ₅₀ in µM	n
rOCT1	0,21 ± 0,03	0,9 ± 0,1
rOCT2	1,80 ± 0,23	5,8 ± 4,6
ChimäreA	1,43 ± 0,44	1,3 ± 0,4
ChimäreB	0,57 ± 0,08	1,5 ± 0,3
rOCT1	0,35 ± 0,04	1,0 ± 0,1
rOCT2	1,96 ± 0,74	1,1 ± 0,4
rOCT1	0,51 ± 0,11	0,9 ± 0,2
rOCT2	2,04 ± 0,44	1,1 ± 0,2
ChimäreA	0,70 ± 0,09	1,6 ± 0,3
ChimäreB	0,13 ± 0,02	0,8 ± 0,1
rOCT1	0,29 ± 0,12	0,7 ± 0,2
ChimäreA	0,34 ± 0,15	0,8 ± 0,2
ChimäreA	1,16 ± 0,31	1,3 ± 0,4
ChimäreB	0,36 ± 0,05	1,4 ± 0,2
ChimäreA	1,17 ± 0,45	1,3 ± 0,7
ChimäreB	0,77 ± 0,15	1,1 ± 0,2
rOCT1	0,54 ± 0,11	1,1 ± 0,2
rOCT2	3,44 ± 0,59	1,1 ± 0,2

Tab. 7.4: *Cyanin 863*

	IC ₅₀ in µM	n
rOCT1	26 ± 2	0,9 ± 0,1
rOCT2	764 ± 89	1,2 ± 0,2
ChimäreA	507 ± 56	1,6 ± 0,3
ChimäreB	19 ± 2	0,8 ± 0,1
ChimäreA	458 ± 54	1,3 ± 0,2
ChimäreB	22 ± 3	1,1 ± 0,1
rOCT1	8,0 ± 2,2	0,9 ± 0,2
rOCT2	229 ± 31	1,0 ± 0,1
ChimäreB	13 ± 3	0,8 ± 0,1
rOCT1	8,2 ± 1,3	0,7 ± 0,1
rOCT2	326 ± 184	0,5 ± 0,1

Tab. 7.5: *Procainamid*

	IC ₅₀ in µM	n
rOCT1	9,4 ± 3,2	0,7 ± 0,1
rOCT2	177 ± 64	0,7 ± 0,2
ChimäreA	146 ± 23	1,9 ± 0,5
ChimäreB	11 ± 2	0,8 ± 0,1
ChimäreA	162 ± 48	0,9 ± 0,2
ChimäreB	19 ± 3	1,1 ± 0,1

Tab. 7.6: *Mepiperphenidol (Darstin)*

	IC ₅₀ in µM	n
rOCT1	57 ± 8	0,9 ± 0,1
rOCT2	2696 ± 328	1,9 ± 0,4
ChimäreA	1849 ± 422	1,6 ± 0,5
ChimäreB	38 ± 6	1,1 ± 0,2
ChimäreA	4904 ± 1310	1,5 ± 0,6
ChimäreB	82 ± 18	1,0 ± 0,2

Tab. 7.7: *o-Methyl-Isoprenalin*

Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Name: Stefan Koppatz
Geburtsdatum / -ort: 23. Mai 1975 in Dresden
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Anschrift: Bonnaskenstraße 25, 03044 Cottbus

Ausbildung:

09/1981 – 08/1983 Grundschohahusbildung in Heidenau/Sachsen
09/1983 – 06/1991 Besuch einer Begabtenförderungskhass mit
erweitertem Russischunterricht in Heidenau
28. Juni 1991 Abschlussprüfung zur Mittleren Reife
09/1991 – 07/1994 Gymnasialausbildung am Pestalozzi-Gymna-
sium Heidenau und am Wirsberg-Gymnasium
in Würzburg
01. Juli 1994 Allgemeine Hochschulreife
11/1995 – 05/2002 Humanmedizin-Studium an der Bayerischen
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
seit 11/1998 Beginn der Promotion zur Erlangung der
Doktorwürde am Institut für Anatomie und
Zellbiologie, Prof. Dr. med. Koepsell

Beschäftigungsverhältnisse:

10/2002 – 03/2004 Arzt im Praktikum in der HNO-Klinik des
städtischen Carl-Thiem-Klinikums Cottbus
seit 04/2004 Assistenzarzt in Weiterbildung zum Facharzt
für HNO-Erkrankungen an der HNO-Klinik der
Carl-Thiem-Klinikum gGmbH Cottbus

Cottbus, 19.01.2005



Danksagung

Gern möchte ich mich zum Abschluss dieser Dissertation bei den Menschen bedanken, die mich bei meiner Arbeit unterstützt und mir mit gutem Rat und Hilfestellung zur Seite gestanden haben.

In aller erster Linie danke ich Herrn Professor Dr. med. Koepsell, der mir als mein Doktorvater die Forschung und die Charakterisierung der organischen Kationentransporter schmackhaft gemacht hatte. Sehr dankbar bin ich dafür, dass er meine Arbeit von Anfang an mit großem Interesse begleitete und mir zur rechten Zeit Motivation und Hilfestellung gab. Zudem durfte ich in seinem Forschungsteam, welches mich sehr rasch integriert hatte, nähere Einblicke in wissenschaftliches Arbeiten erhalten und neue Fertigkeiten erlernen.

Aus seinem Team darf ich vor allem Herrn Dr. Volk herzlich danken, welcher mich in die Techniken der Oozytengewinnung bis hin zu den Aufnahmemessungen und auch bei den statistischen Auswertungen unterwies.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Frau Irina Schatz, mit deren Hilfestellung ich mir die Techniken zur DNA- und RNA-Gewinnung aneignen durfte.

Namentlich danke ich auch Herrn Dr. Valentin Gorboulev, Herrn Dr. Bernhard Schmitt und Frau Dr. Meike Veyhl für ihre Unterstützung, insbesondere hinsichtlich der Einarbeitung in das Thema der organischen Kationentransporter. Herzlichen Dank auch an Professor Gekle, der sich als Koreferent dieser Arbeit bereit erklärt hat.

Anschließend darf ich meinen Eltern herzlich danken, die mir zu dieser Doktorarbeit Mut gemacht haben und die mich seit Kindesbeinen an in meinen Fähigkeiten, Talenten und auch Träumen in jeglicher Hinsicht unterstützt haben.