

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. H. Koepsell

**Identifikation zweier für Regulation,
Substratspezifität und
Transportgeschwindigkeit bedeutsamer
Cysteine des organischen
Kationen-Transporters rOCT1**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Alexander Sturm

aus Hüttenheim

Würzburg, 22.12.2005

Referent: Prof. Dr. med. H. Koepsell
Institut für Anatomie und Zellbiologie

Koreferent: Prof. Dr. med. U. Walter
Institut für klin. Biochemie und Pathobiochemie

Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl
Medizinische Klinik und Poliklinik I

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2007

Der Promovend ist Assistenzarzt

Vorwort

"Wer sich der Praxis hingibt ohne Wissenschaft ist wie der Steuermann, der ein Schiff ohne Ruder und Kompass besteigt und nie weiss, wohin er fährt" (Leonardo da Vinci). Mit diesem Zitat beschreibt Leonardo da Vinci sehr zutreffend, dass das wissenschaftliche Arbeiten Grundlage einer jeden praktischen bzw. klinischen Anwendung sein muss. Zunehmend wird in der Zukunft die sogenannte "evidence based medicine" Anwendung finden.

Um aber das Funktionieren des menschlichen Organismus im Ganzen Stück für Stück zu verstehen, ist es unerlässlich, auch neue Erkenntnisse zu gewinnen, aus denen keine unmittelbare klinische oder sonstige praktische Anwendung hervorgeht. Ohne diese Erkenntnisse wäre der Menschheit ihr enormer Fortschritt auf vielen Gebieten der Wissenschaft nicht gelungen.

Diese Arbeit liefert einen Beitrag zum Verständnis von Funktion und Struktur organischer Kationentransporter, welche viele Pharmaka und endogene Substrate transportieren, und die daher große Bedeutung für die klinische Pharmakologie erlangen könnten. Solange diese Vermutungen aber spekulativ bleiben, möge man sich bei der Erforschung dieser Proteine stets an folgendes Zitat des griechischen Philosophen Aristoteles erinnern, welches, in die heutige Zeit übertragen, die grosse Bedeutung der Grundlagenforschung unterstreicht:

"Offenbar müssen wir die Wissenschaft von den ersten Ursachen gewinnen; denn erst dann können wir sagen, dass wir etwas verstehen, wenn wir die erste Ursache zu kennen glauben." (Aristoteles)

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	DIE ORGANISCHEN KATIONENTRANSPORTER	1
1.2	STRUKTUR UND TRANSPORTMECHANISMUS VON rOCT1	6
1.3	DIE REGULATION DER OCTS	8
1.4	DIE ROLLE VON CYSTEINEN IN DER PROTEINFORSCHUNG.....	9
1.5	ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT, CYSTEINE VON rOCT1	13
2	MATERIAL UND METHODEN	15
2.1	cRNA-ERSTELLUNG DER WILDYPEN UND MUTANTEN.....	15
2.1.1	<i>Erstellung von Plasmid- und linearer DNA.....</i>	<i>15</i>
2.1.2	<i>cRNA-Synthese</i>	<i>17</i>
2.2	DAS XENOPUS-LAEVIS-OOZYTEN-EXPRESSIONSSYSTEM.....	19
2.2.1	<i>Xenopus laevis.....</i>	<i>19</i>
2.2.2	<i>Gewinnung und Vorbereitung der Oozyten</i>	<i>20</i>
2.2.3	<i>Injektion von mRNA und Expression</i>	<i>21</i>
2.3	TRACER-AUFNAHME-MESSUNGEN	21
2.3.1	<i>Durchführung des Flux-Experiments.....</i>	<i>21</i>
2.3.2	<i>Auswertung</i>	<i>22</i>
2.4	ELEKTROPHYSIOLOGISCHE MESSUNGEN.....	24
2.4.1	<i>Technische Voraussetzungen.....</i>	<i>25</i>
2.4.2	<i>Messlösungen</i>	<i>26</i>
2.4.3	<i>Durchführung der Experimente.....</i>	<i>26</i>
2.4.4	<i>Messungen im Efflux-Mode</i>	<i>28</i>
2.4.5	<i>Bestimmung des Strom-Flux-Verhältnisses</i>	<i>28</i>
2.5	MTS-REAGENZIEEN UND DEREN ANWENDUNG	30
2.5.1	<i>Chemie.....</i>	<i>30</i>
2.5.2	<i>Anwendung der Reagenzien.....</i>	<i>32</i>
3	ERGEBNISSE	34
3.1	CHARAKTERISIERUNG DES MMTS-EFFEKTS.....	34
3.1.1	<i>Veränderung der Influx- und Effluxströme</i>	<i>34</i>
3.1.2	<i>Zeitverlauf der Aktivierung bzw. Hemmung (50 μM MMTS)</i>	<i>36</i>
3.1.3	<i>Veränderung der K_M-Werte von Cholin.....</i>	<i>37</i>
3.1.4	<i>Spannungsabhängigkeit von rOCT1 und rOCT2.....</i>	<i>39</i>
3.1.5	<i>Einfluss von MMTS auf v_{max}, K_M und K_i-Werte anderer Substanzen</i>	<i>39</i>
3.1.6	<i>Der MMTS-Effekt auf rOCT1 im Tracer-flux</i>	<i>43</i>

3.1.7	<i>Messung der Transportstöchiometrie</i>	44
3.1.8	<i>Veränderung der Membrangesamtkapazität durch MMTS</i>	45
3.1.9	<i>Messung von cholininduzierten Kapazitätsänderungen</i>	46
3.1.10	<i>Beeinflussung anderer OCTs durch MMTS</i>	48
3.2	VERSUCHE ZUR LOKALISATION DER MMTS-BINDUNGSSTELLE	50
3.2.1	<i>Versuche mit anderen MTS-Derivaten</i>	50
3.2.2	<i>MMTS-Effekt an Cysteinmutanten von rOCT1</i>	51
3.2.3	<i>Mutanten von rOCT2</i>	54
4	DISKUSSION	55
4.1	EFFEKTE VON MMTS AUF DIE WILDTYPEN ROCT1 UND 2	55
4.2	DIE CYSTEINE 322 UND 451 DES ROCT1	60
4.2.1	<i>Identifikation der für den MMTS-Effekt relevanten SH-Gruppen</i>	60
4.2.2	<i>Die Proteinregionen um C322 und C451</i>	61
4.3	DER MMTS-EFFEKT AN OCTS ANDERER SPEZIES	63
4.4	WICHTIGE OFFENE FRAGEN.....	64
4.5	KLINISCHER AUSBLICK	65
5	ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY	68
5.1	DEUTSCHE VERSION	68
5.2	ENGLISH VERSION.....	69
6	LITERATURVERZEICHNIS	70
7	ANHANG	84
7.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	84
7.2	STRUKTURFORMELN	86
7.3	VORBEREITENDE VERSUCHE FÜR DAS CYSTEINSCANNING.....	86
7.3.1	<i>Einleitende Gedanken</i>	86
7.3.2	<i>Effekte bestimmter MTS-Derivate auf den rOCT1</i>	88
7.3.3	<i>Cysteinmutanten von rOCT1</i>	92
7.3.4	<i>Die 9xΔC-Mutante von rOCT1</i>	94
7.3.5	<i>Die Cysteininsertionsmutanten 9xΔC, I479C und 9xΔC, F486C</i>	95
7.3.6	<i>Diskussion</i>	96
7.4	WEITERE EXPERIMENTE.....	99
7.4.1	<i>Substitution extrazellulärer Ionen</i>	99
7.4.2	<i>Experimente mit Chimären zwischen rOCT1 und rOCT2</i>	101
7.4.3	<i>Experimente mit TCEP</i>	102
7.4.4	<i>Cys-mutanten von rOCT1, Hemmung durch MMTS</i>	103

1 Einleitung

1.1 Die organischen Kationentransporter

Transportproteine und Ionenkanäle spielen in der Physiologie und Pharmakokinetik des Menschen eine wichtige Rolle. Die gezielte pharmakologische Beeinflussung dieser Proteine gehört heute zur klinischen Routine. Die Entdeckung und die Charakterisierung funktioneller und regulativer Mechanismen von Kanälen und Transportern haben einen wichtigen Beitrag zum Verständnis physiologischer Abläufe, aber auch zur Aufklärung der Pathogenese bestimmter Erkrankungen geleistet. So liegt z. B. der Defekt der häufigsten zum Tode führenden rezessiven Erbkrankheit in Deutschland, der zystischen Fibrose, in der Mutation des CFTR-Gens, welches einen membranständigen Chloridionenkanal codiert.

Die meisten beschriebenen Transportproteine sind hochspezifisch für ein einziges Substrat oder eine Gruppe chemisch verwandter Moleküle wie z. B. Monoamine. Daneben existieren aber auch Transporter, welche eine Vielzahl von Substraten mit unterschiedlicher Affinität und Transportrate transportieren können wie z. B. „multidrug resistance“-Proteine (MDR) oder organische Anionentransporter (OATPs). [Fromm, 2000; Koepsell, 1998; Rappa et al., 1999] Zu diesen polyspezifischen Transportern zählen auch jene der sog. OCT-Familie, der Familie der organischen Kationentransporter, die etwas neutraler vom „Human Genome Nomenclature Committee“ (HGNC) als SLC22 (solute carrier family 22) bezeichnet wurde und die der „major facilitator“ Superfamilie (MFS) angehört. Als erster Transporter dieser Familie wurde 1994 der organische Kationentransporter der Ratte (rOCT1) in der Niere identifiziert und kloniert. [Grundemann et al., 1994] Die OCT-Familie untergliedert sich in vier Subfamilien: 1. Die elektrogenen Kationentransporter OCT1-3; 2. die Na⁺-Carnitin-Kotransporter und Kationentransporter (OCTN1-3); 3. die organischen Anionentransporter (OAT1-6) und 4. die ORCTL-Kationentransporter. [Koepsell et al., 1999 und 2003]

Diese Arbeit widmet sich vor allem zwei Mitgliedern der ersten Subfamilie, den elektrogenen Kationentransportern rOCT1 und rOCT2, die 1994 [Grundemann et al., 1994] und 1996 [Okuda et al., 1996] kloniert wurden. Daneben werden auch noch wenige Experimente mit folgenden Transportern durchgeführt: rOCT3 [Kekuda et al.,

1998], hOCT1, hOCT2 [Zhang et al., 1997; Gorboulev et al., 1997] und mOCT1 [Schweifer und Barlow, 1996]. Die Gene für die menschlichen Transporter konnten auf Chromosom 6 (6q26) lokalisiert werden. [Koehler et al., 1997] Abbildung 1.1-1 zeigt den genetischen Stammbaum der OCT-Transporterfamilie.

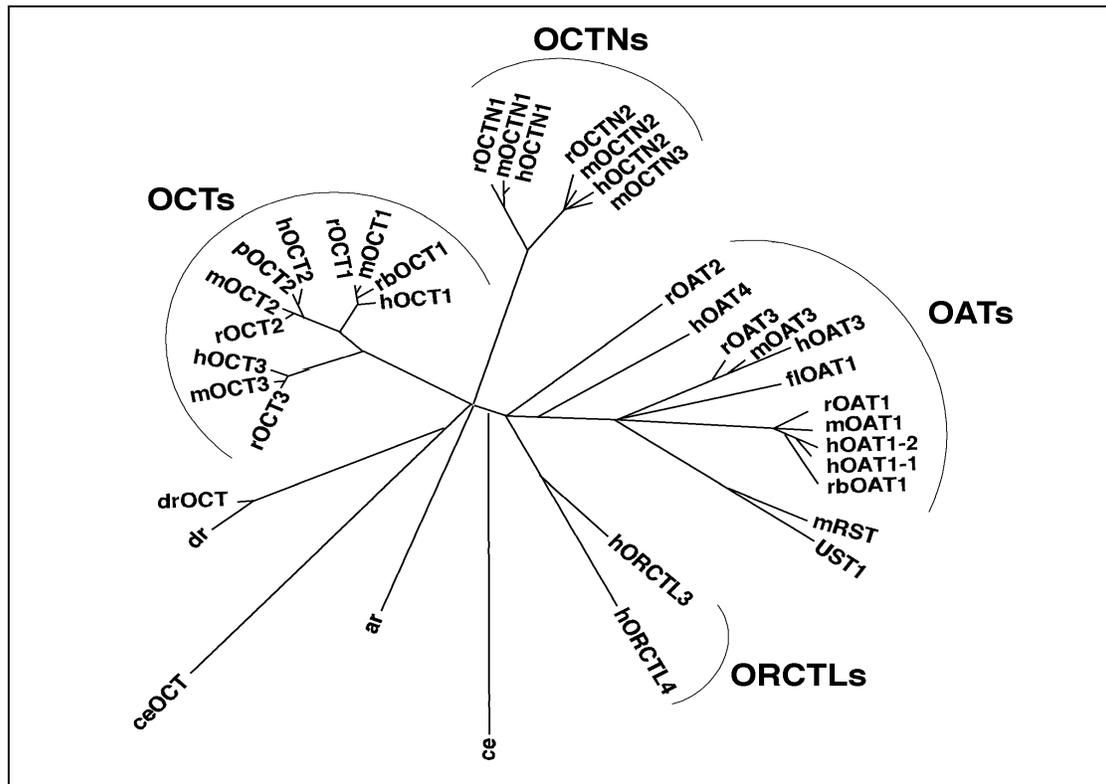


Abbildung 1.1-1: Phylogenetischer Stammbaum der SLC22-Transporterfamilie

OCT1 konnte, u. a. auch beim Menschen, vor allem in der Leber nachgewiesen werden; rOCT1 kommt zudem auch in der Niere, im Dünndarm und in anderen Organen vor. OCT2 wird offensichtlich in grösseren Mengen nur in der Niere und dort vor allem in der basolateralen Membran proximaler Tubulozyten exprimiert, obgleich mRNA auch in anderen Organen nachweisbar ist. OCT3 wurde in verschiedensten Organen gefunden, u. a. auch in der Brustdrüse und in der Placenta. Auch in Neuronen des zentralen Nervensystems und im Plexus choroideus ließen sich OCTs nachweisen, wo sie möglicherweise für die Cholinomöostase verantwortlich sein könnten. Kürzlich konnte rOCT1, 2 und 3 im respiratorischen Epithel der Lunge nachgewiesen werden. [Kekuda et al., 1998; Koepsell, 1998; Sweet et al., 2001; Gerk et al., 2001; Koepsell et al., 2003; Wessler et al., 2001; Lips et al., 2005]

Es konnte also gezeigt werden, dass OCTs u. a. in allen pharmakokinetisch relevanten Organen exprimiert werden. Schätzungsweise 50% der klinisch bedeutsamen Pharmaka sind organische Kationen oder bei physiologischem pH protonierte Basen. [Dresser et al., 2000] Dazu gehören beispielsweise Muskelrelaxantien, β -Blocker, Antihistaminika (z. B. Cimetidin), Antiarrhythmika, Opiate und das Biguanid Metformin. Daneben transportieren OCTs eine ganze Reihe endogener Substanzen wie z. B. Cholin, Guanidin, Creatinin und Thiamin. Ausserdem spielen die OCTs eine Rolle beim Monoamin-Neurotransmitterstoffwechsel. [Busch et al., 1996 und 1998; Takeda et al., 2002; Wu et al., 1998] Aber auch Anionen interagieren mit OCTs als Inhibitoren (z. B. p-Aminohippurat) oder sogar als Substrate (Prostaglandine mit hOCT1). [Khamdang et al., 2002; Kimura et al., 2002; Arndt et al., 2001]

Zur funktionellen Charakterisierung der Transporter wurden v.a. Modellsubstrate wie Tetraethylammonium (TEA), Cholin, Guanidin, N-Methylnikotinamid (NMN) und 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP) in Tracer-Aufnahme- (siehe 2.3), Voltage-Clamp- (siehe 2.4) und Giant Patch-Experimenten [Budimann et al., 2002] verwendet. (Strukturformeln der in dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten Substrate Cholin, TEA und Guanidin sowie der Inhibitoren Cyanin 863 und Tetrapentylammonium siehe Anhang 7.2)

Für diese Arbeit relevante bekannte K_M - und IC_{50} -Werte aus Tracer-Flux-Experimenten sind in Tabelle 1.1-1 zusammengestellt. V_{max} des ^{14}C -TEA-Aufnahmes von rOCT2 war etwa dreifach höher als von rOCT1. [Arndt et al., 2001; Gorboulev et al., 1999]

Substrat (Inhibitor)	K_M (IC ₅₀), rOCT1	K_M (IC ₅₀), rOCT2
Guanidin	1.660 ± 670 µM	172 ± 57 µM
Cholin	370 ± 120 µM	604 ± 102 µM
TEA	129 ± 17 µM	91 ± 10 µM
(Cyanin 863)	(0,51 ± 0,08 µM)	(2,56 ± 0,51 µM)
(Tetrapentylammonium)	(0,53 ± 0,04 µM)	(0,84 ± 0,33 µM)

Tabelle 1.1-1: K_M -Werte ausgewählter Substrate von rOCT1 und rOCT2 gemessen in Tracer-Aufnahme-Versuchen und in Klammern IC₅₀-Werte verschiedener Hemmstoffe (Hemmung des Aufnahmes von 10µM ¹⁴C-TEA) ± SD

Unter Verwendung der „Two-Electrodes-Voltage-Clamp-Technique“ konnten in rOCT1 und rOCT2-injizierten Oozyten zB. mit 10 mM Cholin Einwärtsströme induziert werden, die mit Cyanin 863 vollständig hemmbar waren. Es handelt sich bei den OCTs also um elektrogene Transporter. In mit Cholin vorbeladenen Oozyten konnten Effluxströme nach Entfernung von Cholin aus der extrazellulären Superfusionslösung gesehen werden, die ca. 3 bis 4 mal höher waren als die Influxströme. Dies bedeutet, dass die OCTs bei ausreichendem chemischen Gradienten hervorragend gegen den elektrischen Gradienten arbeiten können.

Weiterhin konnte die Spannungsabhängigkeit der Transporter gezeigt werden, wobei bei positiveren Membranpotentialen (z. B. 0 mV) die maximal induzierbaren Ströme und die Affinität der Substrate abnahm (Zunahme beider Parameter bei -90 mV). [Arndt et al., 2002; Budimann et al., 2002; Busch et al., 1996; Nagel et al., 1997]

Zusammenfassend ist rOCT1 ein elektrogener und spannungsabhängiger polyspezifischer Transporter organischer Kationen, der sowohl im Influx- als auch im Effluxmode arbeiten kann. Der Transport erfolgt unabhängig von pH und extrazellulärer Ionenzusammensetzung. [Busch et al., 1996]

Nach der funktionellen Charakterisierung der Transporter ex vivo stellt sich natürlich die Frage nach der physiologischen und besonders nach der klinischen Relevanz. In einer OCT1-knock-out-Maus konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von OCT1 mit einem normalen gesunden und reproduktionsfähigen Leben vereinbar

ist. Es konnten aber pharmakokinetische Veränderungen im Organismus nachgewiesen werden. [Jonker et al., 2001] Weitere interessante Daten weisen darauf hin, dass die OCTs vor allem im Fachgebiet der Pharmakologie grosse Bedeutung erlangen könnten. 2002 konnte ebenfalls an der OCT1-knock-out-Maus gezeigt werden, dass Metformin, ein weltweit häufig eingesetztes Antidiabetikum, nur noch stark vermindert in seine beiden Hauptzielorgane, die Leber und die Dünndarmmukosa, aufgenommen wird. [Wang et al., 2002] Da OCTs auch in der Placenta und der Brustdrüse exprimiert werden, könnten sich interessante Erkenntnisse für die Geburtshilfe und die Pädiatrie ergeben.

Der für die meisten Pharmaka wichtigste Eliminationsweg ist die renale Exkretion, woran die OCTs als eine ihrer wichtigsten Aufgaben im Organismus beteiligt sind. Beispiele solcher Pharmaka, für die eine renale Sekretion gezeigt wurde, sind das Antihistaminikum Cimetidin oder der β -Blocker Pindolol. [Bendayan, 1996] Vor allem im proximalen Tubulus wurden unterschiedliche Transportmechanismen für solche organischen Kationen beschrieben wie z. B. ein potentialabhängiges Transportsystem in der basolateralen und ein Protonen-Kationen-Austauscher in der apikalen Zellmembran. [Pritchard und Miller, 1993 und 1996] Da rOCT1 in der basolateralen Zellmembran im proximalen Tubulus nachgewiesen werden konnte, ist naheliegend, dass der erste Schritt der renalen Kationensexkretion, der basolaterale spannungsabhängige Influx in die Tubulozyten, durch rOCT1 und auch durch rOCT2 mediiert wird. [Dresser et al., 2001; Urakami, 2002] Die beiden Transportersubtypen ergänzen sich bei der renalen Kationensexkretion, da sich ihre Substratspezifitäten überlappen. [Urakami et al., 2001] Einige Befunde deuten darauf hin, dass die OCTs nicht die einzigen Kationentransporter im proximalen Tubulus sind. [Goralski et al., 2002]

Ein wichtiges Krankheitsbild als Endstrecke vieler Nierenerkrankungen ist die chronische Niereninsuffizienz, die im Tiermodell durch 5/6 Nephrektomie erzeugt werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass bei Ratten mit 5/6 Nephrektomie rOCT2 in der Niere herunterreguliert ist. Dies kann die veränderte Pharmakokinetik von z. B. Cimetidin mit erklären. [Ji et al., 2002] In jüngster Zeit gibt es weitere wichtige Hinweise darauf, dass die OCTs bei der Pathophysiologie bzw. Pharmakotherapie wichtiger Erkrankungen eine Rolle spielen. Bei Ratten mit induziertem Diabetes

mellitus konnte eine Herunterregulation von rOCT1 und rOCT2 gezeigt werden. [Grover et al., 2004] Auch konnte der Transport von Acetylcholin ins Bronchiallumen durch hOCT2 gezeigt werden. Diese Acetylcholinfreisetzung ist durch das inhalative Glucocorticoid Budesonid, einem Standardtherapeutikum beim Asthma bronchiale, hemmbar [Lips et al., 2005].

Neben der Funktion der OCTs in und ex vivo und die Regulation der Transporter ist die Struktur und der Transportmechanismus dieser Proteine von grossem Interesse. Trotz intensiver Forschung auf diesem Gebiet ist derzeit noch bei weitem nicht verstanden, wie diese polyspezifischen Transporter funktionieren.

1.2 Struktur und Transportmechanismus von rOCT1

Abbildung 1.2-1 zeigt ein Membrantopologiemodell von rOCT1. [Koepsell et al., 1998] Nach diesem Modell ist rOCT1 ein Protein mit 12 Transmembrandomänen und je einer grossen extrazellulären und intrazellulären Schleife. Die extrazelluläre Schleife besitzt mehrere Glycosylierungsstellen, die intrazelluläre mehrere Phosphorylierungsstellen für Proteinkinasen.

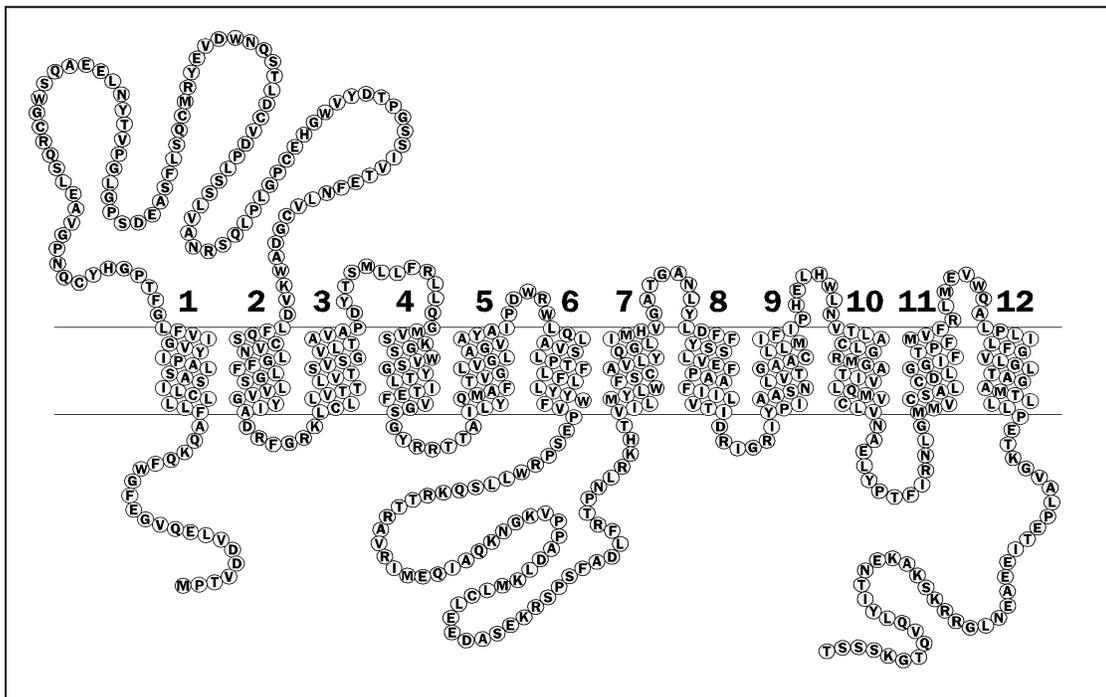


Abbildung 1.2-1: Membrantopologiemodell von rOCT1 (oben: extrazellulär)

Vor allem die Arbeitsgruppe Koepsell hat sich seit der Klonierung intensiv mit der Erforschung der Struktur und des Transportmechanismus von rOCT1 beschäftigt. Dazu wurde vor allem die Charakterisierung von Wildtyp und Mutanten durch Tracer-Aufnahme-Messungen und moderne elektrophysiologische Verfahren eingesetzt.

Der erste bahnbrechende Erfolg gelang 1999 durch Mutation des Aspartats 475 in der 11. Transmembrandomäne zu Glutamat. Die D475E-Mutante von rOCT1 zeigte eine stark verminderte Aufnahme verschiedener Substrate und eine selektive Zunahme der Affinität für TEA, NMN, Cholin und Tetrapentylammonium bei konstanten Affinitäten von MPP und Cyanin 863. [Gorboulev et al., 1999] TMD11 scheint somit an der Bildung einer Substratbindungsregion beteiligt zu sein. Durch Bildung chimärer Proteine von rOCT1 und rOCT2 konnte auch die 10. TMD als entscheidend wichtig für das Bindungsverhalten von Liganden identifiziert werden. Durch Punktmutationen wurden drei Aminosäuren (an Position 443, 447 und 448) identifiziert, die neben D475 an der postulierten Substratbindungsregion beteiligt sein müssen. [Gorboulev et al., 2005] Durch Mutationen von Aminosäuren in der 4. TMD, die bei den OCTs (nicht aber bei den OATs) konserviert sind, konnten drei weitere Aminosäuren der Substratbindungsregion identifiziert werden. In dieser Arbeit wurde ein Modell der Tertiärstruktur des rOCT1 mit Hilfe der kürzlich aufgeklärter Tertiärstruktur der Lactosepermease von *E. coli* berechnet. Dies war möglich, da rOCT1 und die Lactosepermease zur gleichen Proteinsuperfamilie gehören. Dieses Modell unterstützt die Vermutung, dass verschiedene Substrate und Inhibitoren erstens an unterschiedlichen, sich teilweise überlappenden Stellen der Bindungsregion binden können und dass die Bindungsregion zweitens gleichzeitig mit mehreren Liganden besetzt sein kann. [Popp et al., 2005]

Wahrscheinlich handelt es sich bei den OCTs um Transporter mit einer nach außen und innen gerichteten Konformation der Substratbindungsstelle. Es konnte gezeigt werden, daß bestimmte Inhibitoren unterschiedliche Affinitäten zu der nach innen bzw. nach außen gerichteten Bindungsregion besitzen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Bindungstasche bei der Umorientierung auf die andere

Plasmamembranseite ihre Konformation und somit die Affinitäten zu bestimmten Liganden verändert. [Volk et al., 2003; Koepsell et al., 2003]

Erst kürzlich publizierte Daten unterstreichen den Aspekt, dass Substratbindung und Substrattransport auf grundsätzlich unterschiedlichen Mechanismen beruhen können. Am rOCT2 konnte gezeigt werden, dass Caesium ein hervorragendes Substrat, aber ein schlechter Ligand ist. In dieser Arbeit wird ein Modell für OCTs vorgeschlagen, das neben der in zwei Konformationen vorliegenden Substratbindungsregion zusätzlich einen Selektivfilter annimmt, welchen die Substrate beim Transport passieren müssen [Schmitt und Koepsell, 2005].

1.3 Die Regulation der OCTs

Die Regulation der organischen Kationentransporter ist abhängig vom jeweiligen Subtyp, vom exprimierenden Gewebe und der Spezies. Es sind zahlreiche Einflüsse auf die Transkription der OCT-Gene nachgewiesen worden. Auf diese Regulationsmechanismen auf DNA/mRNA-Ebene soll aber hier nicht näher eingegangen werden, stattdessen wird die posttranslationale Regulation ausführlicher beschrieben:

Am besten charakterisiert ist die Regulation von rOCT1 durch die Proteinkinase C. Vier der fünf Phosphorylierungsstellen des rOCT1 für die PKC liegen in der großen intrazellulären Schleife. Es konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit aller fünf PKC-Phosphorylierungsstellen für die vorbeschriebene Aktivierung der ASP-Aufnahme notwendig ist. Die Beteiligung eines vermehrten Membraneinbaus des Transporters durch PKC-Aktivierung kann aber nicht definitiv ausgeschlossen werden.

Nach Phosphorylierung von rOCT1 durch die Proteinkinase C konnte auch eine Zunahme der Affinität für unterschiedliche Substrate und Inhibitoren (u. a. TEA) gezeigt werden, wobei sich die Selektivität veränderte. Die Affinitäten für TEA und TPeA änderten sich in fünf Mutanten (mit knock-out jeweils einer PKC-Phosphorylierungsstelle) auf unterschiedliche Weise. Dies lässt den Schluss zu, dass die intrazelluläre Schleife entweder selbst an der Bindungstasche beteiligt ist oder dass sich die tertiäre Struktur der Bindungstasche nach Phosphorylierung von OH-

Gruppen der intrazellulären Schleife ändert. [Grundemann et al., 1994; Mehrens et al., 2000; Ciarimboli et al., 2005]

Weiterhin konnten zahlreiche andere Regulationswege der OCTs identifiziert werden. cGMP führte zu einer verminderte Transportrate von rOCT1 nur bei Expression in HEK-Zellen. Die Abwesenheit dieses Effekts in *Xenopus*-Oozyten läßt auf ein nur in HEK-Zellen exprimiertes mediierendes Regulatorprotein schließen. [Schlatter et al., 2002] Auch die Proteinkinase A, die p56^{lck} Tyrosinkinase u. vor allem regulieren des OCTs auf teils gegensinnige Weise. Zu Details wird auf die entsprechende Literatur verwiesen. [Cetinkaya et al, 2003; Pietig et al., 2001; Ciarimboli und Schlatter 2004]

Da insgesamt noch viele Fragen über die Struktur, Transport- und Regulationsmechanismen der OCTs offen sind, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, welche Rolle die Cysteinreste in den organischen Kationentransportern für die Transportfunktion und Regulation spielen. Im Folgenden soll an Hand einiger Beispiele erläutert werden, wie die Funktion von Cysteinresten in Proteinen untersucht werden kann.

1.4 Die Rolle von Cysteinen in der Proteinforschung

Die Aminosäure Cystein mit ihrem -CH₂-SH-Rest verdankt Ihre herausragende Rolle in der Proteinforschung im Wesentlichen zwei Aspekten:

Erstens können zwischen zwei Cysteinresten in folgender Redox-Reaktion Disulfidbrücken entstehen, die wesentlich zur Stabilität der Sekundärstruktur eines Proteins beitragen:



Ein Schlüsselexperiment zu diesem Thema wurde 1960 durchgeführt. Es wurde gezeigt, dass die Ribonuclease nach Reduktion der Disulfidbrücken ihre enzymatische Aktivität verlor, welche nach Dialyse und Reoxidation durch Luftsauerstoff langsam zurückkehrte. [Hirs et al., 1960] Häufig zur Reduktion von Disulfidbrücken eingesetzte Reagenzien sind Dithiotreitol (DTT) und Triscarboxyethylphosphin (TCEP).

Durch verschiedene experimentelle Methoden, z. B. das Einführen von Spaltungsstellen für Proteasen können Disulfidbrücken identifiziert werden. Bei dieser Methode werden die Fragmentgrößen des Proteins nach Hydrolyse z. B. mit Trypsin untersucht. Für Beispiele zur Identifikation von Disulfidbrücken am humanen vesikulären Monoamintransporter VMAT2, dem Natrium-Phosphat-Kotransporter der Ratte u. a. wird auf die entsprechende Literatur verwiesen. [Thiriot et al., 2002; Lambert et al., 2000; Sur et al., 1997]

Zweitens ist es möglich, Cysteine im posttranslational gefalteten Protein kovalent zu modifizieren, was zu einer Veränderung der Funktion oder der Regulation des Proteins führen kann. In den oben genannten Arbeiten wurden teilweise auch SH-gruppen-modifizierende Reagenzien eingesetzt. Die wichtigsten sind z. B. Maleimid oder die etwas neueren MTS-Derivate (siehe 2.5), die auch in dieser Arbeit eingesetzt wurden. Wichtige Vertreter sind: MTSET (unpermeables Kation), MTSES (unpermeables Anion), MMTS (permeabel, elektroneutral).

Es sind grundsätzlich drei Mechanismen der Beeinflussung von Transportproteinen durch MTS-Reagenzien denkbar, auf die wegen der hohen Relevanz für diese Arbeit detailliert eingegangen wird:

1. SH-Gruppen-unabhängige Interaktion mit der Bindungstasche:

An einem Transporter für verschiedene Prostaglandine und Thromboxan B₂ wurde gezeigt, dass eine SH-Gruppe durch Coinkubation mit dem Substrat Prostaglandin E₂ vor der kovalenten Modifikation mit MTSES (und damit vor Inhibition des Transportes) geschützt werden kann. Dies bedeutet, dass die beiden anionischen Verbindungen Prostaglandine und MTSES um die Bindungsstelle kompetitieren und dass die reaktive SH-Gruppe innerhalb oder in unmittelbarer Nachbarschaft der Substratbindungsstelle liegt. Das kationische MTSEA hatte keinen Effekt auf die Transportrate, da es die Bindungsstelle aufgrund der positiven Ladung nicht erreichen kann. [Chan et al., 1999]

Es ist auch denkbar, dass ein MTS-Derivat einen kompetitiven Inhibitor oder ein Substrat eines Transporters darstellt ohne mit einer SH-Gruppe kovalent zu reagieren.

Um SH-Gruppen in Substratbindungsstellen zu identifizieren, wurden substratanaloge SH-Gruppenreagenzien wie z. B. MTS-Verapamil zur Untersuchung der Substratbindungsregion eines Multidrug-resistance-Proteins, dessen Membrantopologie 1999 aufgeklärt wurde, eigens für diesen Zweck synthetisiert. [Loo et al, 2001]

2. Änderung der Funktion von Proteinen durch Modifikation einer SH-Gruppe:

Hierbei handelt es sich um die häufigste Folge der Modifikation von SH-Gruppen. Die funktionellen Eigenschaften eines Proteins können sich durch eine durch das SH-Gruppenreagenz induzierte Konformationsänderung, durch die Blockade der Substratbindungsregion bzw. durch die Blockade der substratinduzierten Konformationsänderung oder die Modifikation von regulatorischen Domänen ändern.

Als Beispiel für die Modifikation regulatorischer Domänen sei erwähnt, dass sich die Öffnungskinetik des spannungsabhängigen Kaliumkanals Kv2.1 durch Modifikation mit MMTS stark veränderte. Die kaliuminduzierten Ströme entwickelten sich im Vergleich zum nichtmodifizierten Protein mit starker Verzögerung. Die Regulation der spannungsabhängigen Öffnung des Kanals konnte durch Cysteinmutationsanalyse dem N-Terminus des Proteins zugeschrieben werden. [Pascual et al., 1997]

Als Beispiel für eine Blockade der Substratbindungstasche können die schon oben beschriebenen Experimente am Prostaglandintransporter genannt werden, bei dem die Bindungstasche durch das kovalent gebundene anionische MTSES blockiert werden konnte. Das positiv geladene MTSEA hatte keinen Effekt auf den Transport. Durch Mutationsanalysen konnte das Cystein 530 als verantwortliche SH-Gruppe identifiziert werden [Chan et al., 1999]. Es wurde hier auf elegante Weise gezeigt, dass dieses Cystein in einer nur für Anionen zugänglichen Bindungstasche liegen musste. Wäre der Transport durch alle MTS-Derivate hemmbar, so müssten die Daten mit großer Vorsicht interpretiert werden, da wie schon erwähnt auch eine Konformationsänderung des Proteins durch Modifikation eines Cysteins fernab der Bindungstasche zu einer Veränderung der Bindung des Liganden oder der Translokation eines Substrates führen kann. Da MTSES als Substrat des Prostaglandintransporters reversibel in der Substratbindungstasche bindet, kann davon

ausgegangen werden, dass auch die kovalente Reaktion mit einer SH-Gruppe in der Substratbindungstasche erfolgt.

Als Beispiel für eine Konformationsänderung durch SH-Gruppenmodifikation können Experimente am mitochondrialen ADP/ATP-Carrier des bovinen Herzens genannt werden. Die Modifikation des Cysteins 56 führte zum Einfrieren des Transporters in der m-Konformation und inhibierte damit die ADP-Translokation ohne die ADP-Bindung zu beeinflussen. [Hashimoto et al., 2000] Es konnte außerdem auch gezeigt werden, dass die Modifizierbarkeit von Cysteinen innerhalb eines Proteins (hier des GABA-Transporters GAT-1) auch von dessen Konformationszustand abhängig sein kann. [Golovanevsky und Kanner, 1999] Es gibt auch Beispiele dafür, dass die Modifizierbarkeit von Cysteinen vom extrazellulären Ionenmilieu abhängt. [Chen et al., 1997; Grunewald et al., 2002]

3. Modifikation des Effektes eines regulatorischen Proteins:

Die Ca^{2+} -ATPase im sarcoplasmatischen Reticulum von Cardiomyozyten der Ratte wird durch das Regulatorprotein Regucalcin aktiviert. Diese Aktivierung blieb in Gegenwart von N-ethylmaleimid aus, was als eine fehlende Interaktion des Regulatorproteins mit SH-Gruppen der ATPase interpretiert wurde. [Yamaguchi et al., 2002] Ebenso wäre aber auch eine Modifikation von SH-Gruppen des Regulatorproteins selbst denkbar, was für einen postulierten inhibitorischen Faktor eines cardialen Na^+ - Ca^{2+} -Austauschers zutreffen könnte. Durch Injektion von 5 pmol MTSET in Oozyten konnte das Protein und auch seine cysteinlose Mutante aktiviert werden. [Nicoll et al., 1999]

In den beschriebenen Experimenten wurde oftmals die Strategie des sog. Cysteinscannings angewandt. Dies ist eine Methode, bei der idealerweise eine weitgehend cysteinfreie Mutante eines Proteins erstellt wird, in die dann gezielt Cysteine neu eingeführt werden. Diese Cysteine können dann auf vielfältige Art und Weise auf ihre Modifikation durch SH-Gruppenreagenzien untersucht werden. Für Details wird auf den Anhang dieser Arbeit verwiesen.

Wie auf den letzten Seiten anhand vieler Beispiele beschrieben wurde, sind die Möglichkeiten der Erforschung von Proteinen unter Zuhilfenahme der Aminosäure Cystein vielseitig und häufig erfolgreich, was die Motivation schaffte, die oben beschriebenen Methoden auf die organischen Kationentransporter und vor allem den rOCT1 anzuwenden.

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit, Cysteine von rOCT1

Die Zielsetzung dieser Arbeit läßt sich wie folgt formulieren: Die unter 1.4 beschriebenen Methoden sollten auf organische Kationentransporter, v.a. den rOCT1 angewandt werden, um neue Erkenntnisse über Struktur, Funktion oder Regulation der organischen Kationentransporter zu gewinnen.

Wie Abbildung 1.5-1 zeigt, befinden sich unter den 554 Aminosäuren von rOCT1 16 Cysteine an den Positionen 26, 50, 62, 89, 103, 122, 143, 155, 179, 322, 358, 418, 437, 451, 470 und 474. Sechs dieser Cysteine sind in der großen extrazellulären Schleife lokalisiert und hochkonserviert. C62 und C103 sind durch alle OCTs, die restlichen vier sogar durch die gesamte Transporterfamilie konserviert, was schon auf deren wichtige Aufgabe für Funktion oder Struktur der Proteine hinweist. Tabelle 1.5-1 zeigt die Präsenz der 16 Cysteine von rOCT1 an den entsprechenden Positionen der anderen rOCTs. [Kekuda et al., 1998; Koepsell et al., 1999]

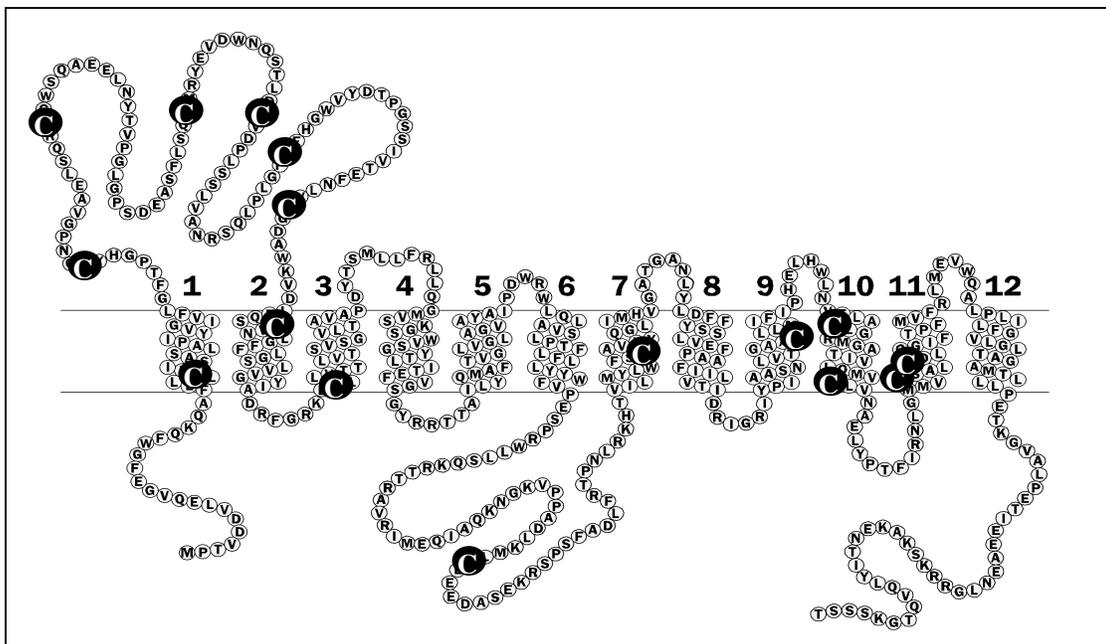


Abbildung 1.5-1: Die Cysteine von rOCT1

Pos.:	26	50	62	89	103	122	143	155
rOCT1	+	+	+	+	+	+	+	+
rOCT2	-	+	+	+	+	+	+	-
rOCT3	+	+	+	+	(+)*	+	+	-

Pos.:	179	322	358	418	437	451	470	474
rOCT1	+	+	+	+	+	+	+	+
rOCT2	+	-	-	+	+	+	+	+
rOCT3	-	-	-	+	-	-	+	+

Tabelle 1.5-1: Präsenz der 16 Cysteine von rOCT1 an der entsprechenden Positionen der anderen rOCTs; *: um eine Position verschoben

Zum Erreichen der gesetzten Ziele sollte folgende Strategie verfolgt werden: Es sollten die Effekte eines anionischen (MTSES), eines neutralen (MMTS) sowie, da es sich um einen Kationentransporter handelt, dreier kationischer (MTSMT, MTSET, MTSPT) MTS-Derivate auf rOCT1 untersucht werden, um diese dann je nach Relevanz der ermittelten Daten detailliert zu charakterisieren.

Um Informationen über die Rolle der 16 Cysteine zu erlangen, sollten zunächst alle Cysteine einzeln zu Alanin oder Serin mutiert und die Veränderungen der Funktion beschrieben werden. Im Folgenden sollte über mehrfach cysteinlose Mutanten eine soweit wie möglich cysteinfreie Form des Transporters untersucht werden, der als Basis für Cysteinscanningexperimente eingesetzt werden sollte. Auch bei diesem Ansatz sollten interessante Mutanten detaillierter charakterisiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 cRNA-Erstellung der Wildtypen und Mutanten

2.1.1 Erstellung von Plasmid- und linearer DNA

Da die Plasmid-DNA aller in dieser Arbeit verwendeten Mutanten und Wildtypen von Mitarbeitern des Institutes (vor allem Dr. Valentin Gorboulev) zur Verfügung gestellt wurde, wird auf die molekulargenetischen Methoden nur kurz eingegangen. Um cRNA für die Expression in *Xenopus laevis* Oozyten zu synthetisieren, wurde das rOCT1 Gen in den pRSSP-Vektor kloniert, welcher eine untranslatierte Region des Xenopus β -Globin-Gens, eine Mlu-I-Schnittstelle, ein Ampicillinresistenzgen und eine Promotorregion für die SP6-RNA-Polymerase enthält [Busch et al., 1996]. Dieser Vektor wurde als Ausgangsprodukt für die cRNA-Synthese und die Herstellung von rOCT1-Mutanten verwendet.

In Abbildung 2.1-1 ist das Prinzip der Fusions-PCR-Methode zur Erstellung von Mutanten dargestellt. Es wurden für die ersten beiden PCRs zwei mutagene Primer M₁ und M₂ (jeweils forward und reverse), die das nach der Mutation gewünschte Codon bzw. Anticodon enthielten, und zwei flankierende Primer L und R verwendet. PCR1 wurde mit R/M₁ und PCR2 mit L/M₂ durchgeführt, und damit zwei sich um die Länge der M-Primer überlappende DNA-Abschnitte hergestellt. Anschließend wurde die Fusions-PCR mit beiden DNA-Abschnitten mit den Primern R und L durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden durch DNA-Gele wie unten beschrieben kontrolliert.

Anschließend wurde aus dem Wildtypplasmid das DNA-Fragment ausgeschnitten, das die zu mutierende Stelle enthielt. Aus dem Produkt der Fusions-PCR wurde ein entsprechender Abschnitt mit enthaltener Mutation mit den gleichen Restriktionsenzymen ausgeschnitten. Die DNA-Abschnitte wurden im präparativen DNA-Gel isoliert, ligiert und in *E. coli* transfiziert (siehe Abbildung 2.1-2).

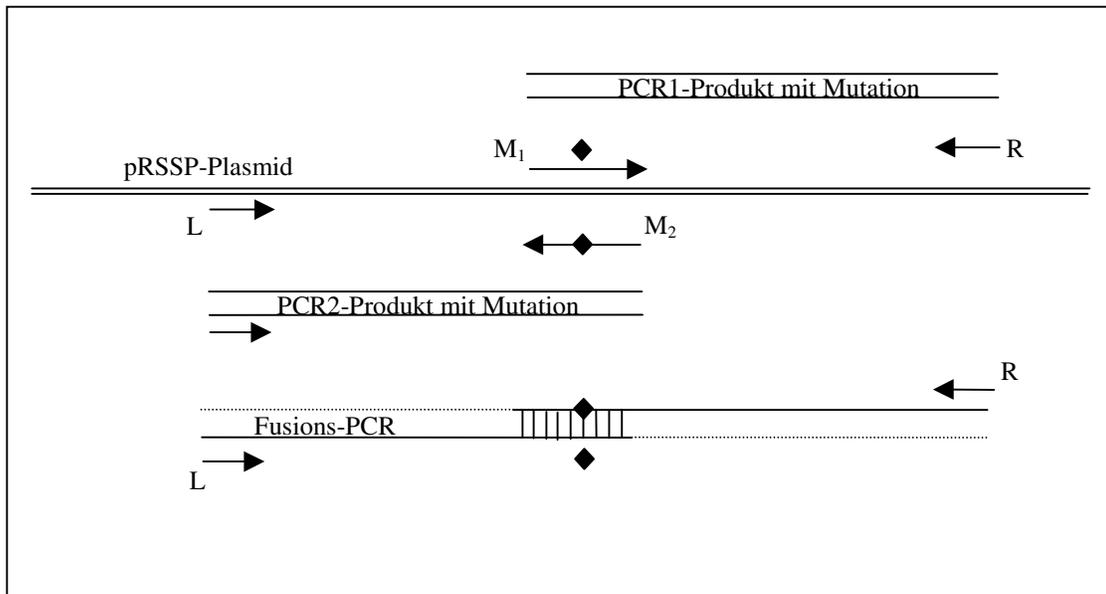


Abbildung 2.1-1: Schematische Darstellung der PCRs zur Erstellung von Punktmutationen im rOCT1-Gen

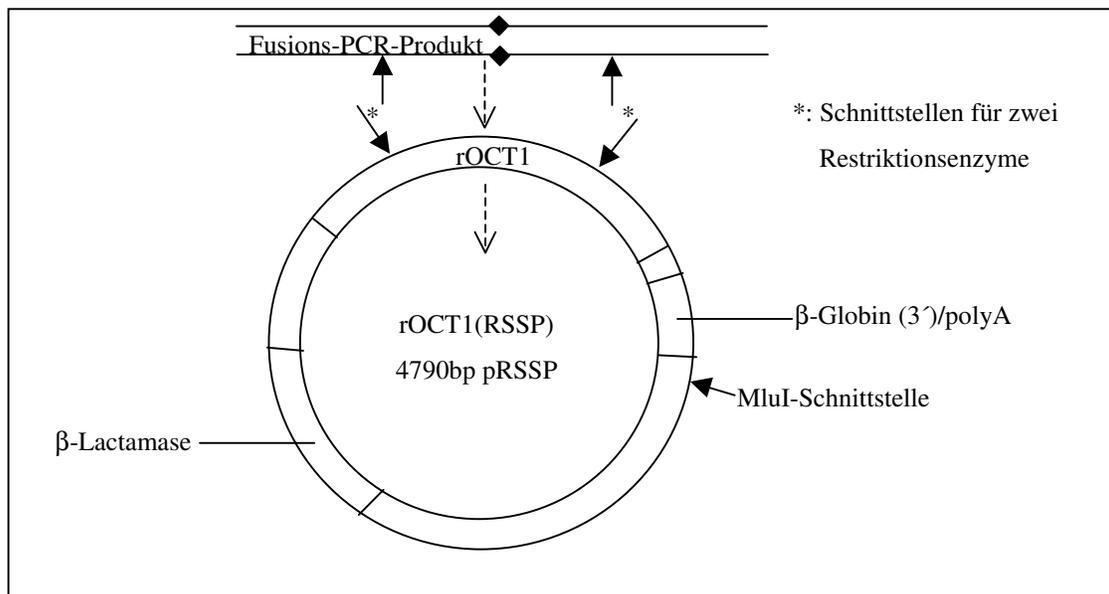


Abbildung 2.1-2: Einklonierung des mutierten DNA-Segments in den pRSSP-Vektor durch Schneiden mit Restriktionsenzymen und anschließendes Ligieren.

Die Plasmid-DNA (10 µg) wurde dann mit MluI von MBI Fermentas (Vilnius, Litauen) nach Herstellerangaben geschnitten. Zur Trennung der nun linearisierten DNA von Proteinen wurden die Proben mit gleichem Volumen einer Phenol/Chloroform und anschließend mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) bei

Raumtemperatur ausgeschüttelt und jeweils für 5 min bei 10.000 g zentrifugiert. Zur DNA-Präzipitation mit Natriumacetat wurden je 100 µl der so entstandenen DNA-Lösung mit 10 µl 3 M NaAc pH 5,2 und 250 µl Ethanol versetzt und mindestens eine Stunde bei -20 °C gelagert. Danach wurden die Proben bei 10.000 g für 20 min zentrifugiert, das Sediment mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 10 µl Wasser gelöst. [Wallace, 1987]

Die Konzentration der so entstandenen DNA-Lösungen wurde photometrisch unter Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes durch Absorption von UV-Licht der Wellenlänge 260 nm (A_{260}) bestimmt. Die Reinheit der Probe ließ sich durch Bestimmung des Quotienten $A_{260}:A_{280}$ abschätzen. Der Quotient sollte zwischen 1,6 und 2,0 liegen.

Zur exakten Beurteilung der DNA-Qualität wurde 0,5 µl DNA-Lösung mit 1 µl Loading-buffer (30% Glycerin, 0,25% Bromphenolblau) und 4 µl H₂O versetzt und auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen. Das Gel bestand aus 1% Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0) mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid. Nach Elektrophorese bei 6 - 8 V/cm wurde die DNA (nach Interkalation des Ethidiumbromids) durch UV-Licht auf einem Transilluminator sichtbar gemacht und abfotografiert. [Sambrook et al., 1989] Abbildung 2.1-3 zeigt ein Beispiel eines DNA-Agarose-Gels. Als Marker wurde eine 1kb DNA-Leiter von MBI Fermentas verwendet.

2.1.2 cRNA-Synthese

Zur Expression in Oozyten von *Xenopus laevis* wurde die DNA mit einem Kit der Firma Ambion (Huntington, Grossbritannien) unter Verwendung der SP6-RNA-Polymerase in cRNA transkribiert. Dazu wurden 1 µg linearisierte DNA, 2 µl 10x Transkriptionspuffer, 10 µl 2x Ribonukleotidmix und 2 µl 10x SP6-RNA-Polymerase in ein Volumen von 20 µl aufgenommen und der Ansatz zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde durch Zugabe von RNase-freier DNase (1 µl) und 15 minütige Inkubation bei 37 °C die DNA hydrolysiert. Zur Präzipitation der cRNA wurden dem Ansatz (20 µl) 30 µl H₂O und 25 µl 7,5M LiCl zugefügt und dieser für mindestens 30 Minuten bei -20 °C gelagert. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei

10.000 g wurde das Pellet mit 200 μ l 75%-igen Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 μ l H₂O gelöst.

Zur Abschätzung der Quantität und Qualität der hergestellten cRNAs wurde je 1 μ l cRNA-Lösung denaturiert und mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Zur Denaturierung wurde die cRNA in ein Gesamtvolumen von 4 μ l aufgenommen. Der Ansatz mit der zu bestimmenden Menge an cRNA (50 μ g/ μ l Ethidiumbromid, 50% DMSO und 1 M Glyoxal in Laufpuffer (10 mM BES, 0,1 mM EDTA, pH 6,7)) wurde eine Stunde lang bei 50 °C inkubiert. [Carmichael und McMaster, 1977 und 1980] Nach Zugabe von Glycerin/Bromphenolblau/Xylenecyanol (Endkonzentration 10%) konnten die Proben auf das Gel aufgetragen werden. Als Marker wurde eine RNA-Leiter von Life Technology (Karlsruhe) verwendet. Das Gel enthielt 1% Agarose und 5 mM Natriumiodacetat. Die Elektrophorese erfolgte bei 5 V/cm in 75 bis 90 Minuten, wobei zur Vermeidung eines pH-Gradienten der Laufpuffer langsam von der Anode zur Kathode gepumpt wurde. Nach Photographie auf dem Transilluminator konnte die cRNA-Konzentration der Proben durch Vergleich mit der Bandenstärke des Markers in etwa bestimmt werden. Zur Injektion in *Xenopus* Oozyten wurde die cRNA auf 0,2 μ g/ μ l verdünnt.

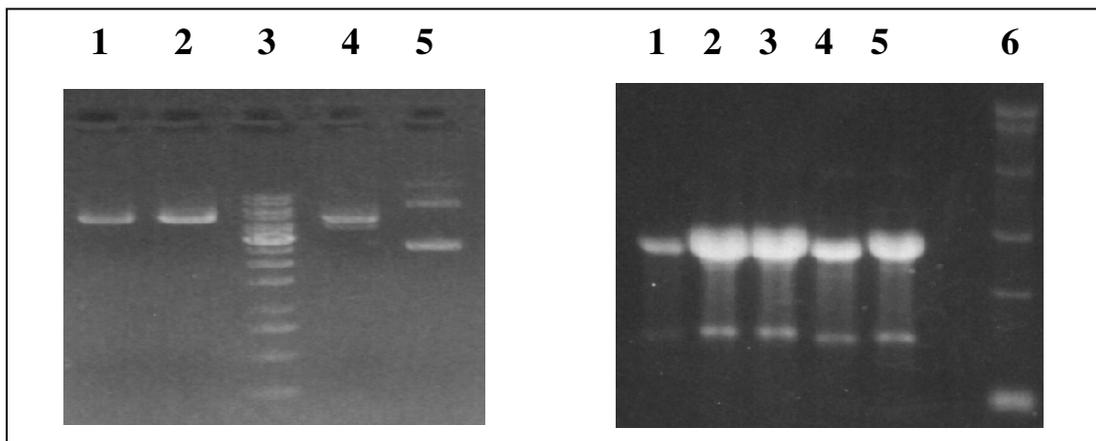


Abbildung 2.1-3: links: Banden auf einem DNA-Agarose-Gel; 1 C26S; 2 C179S; 3 Marker; 4 C451S; 5 ungeschnittene DNA
rechts: Banden auf einem RNA-Agarose-Gel: 1 C62S 0,5 μ g/ μ l; 2 C103S 2,0 μ g/ μ l; 3 C122S 2,0 μ g/ μ l; 4 C143S 1,0 μ g/ μ l; 5 rOCT1 Wildtyp 1,2 μ g/ μ l; 6 Marker (eine Bande = 0,25 μ g)

2.2 Das *Xenopus-laevis*-Oozyten-Expressionssystem

Die Oozyten von *Xenopus laevis* sind wegen ihrer Größe und ihrer Undifferenziertheit besonders gut geeignet, um *Xenopus*-fremde Proteine, wie z. B. den rOCT1, in ihnen zu exprimieren und funktionell zu untersuchen. Hierzu wird cRNA in die Oozyten injiziert, die Expression des Proteins abgewartet und anschließend die Funktion über unterschiedliche Methoden gemessen bzw. sonstige Experimente mit dem Protein durchgeführt. [Gurdon et al., 1971]

2.2.1 *Xenopus laevis*

Der glatte Krallenfrosch *Xenopus laevis* gehört der Klasse der Amphibia, der Ordnung der Anura und der Familie der Pipidae an. Der natürliche Lebensraum der Krallenfrösche ist der afrikanische Kontinent südlich der Sahara. Früher wurde *X. laevis* zu Schwangerschaftstests verwendet: Die Injektion von β -HCG-haltigem Urin in *Xenopus*-Weibchen führte zur spontanen Eiabgabe. Heute erfreuen sich die Oozyten von *X. laevis* in der Kanal- und Transporterforschung großer Beliebtheit. Die in dieser Arbeit verwendeten Tiere wurden von Kähler (Hamburg), Nasco (USA) und African Xenopus Facilities (Südafrika) bezogen.

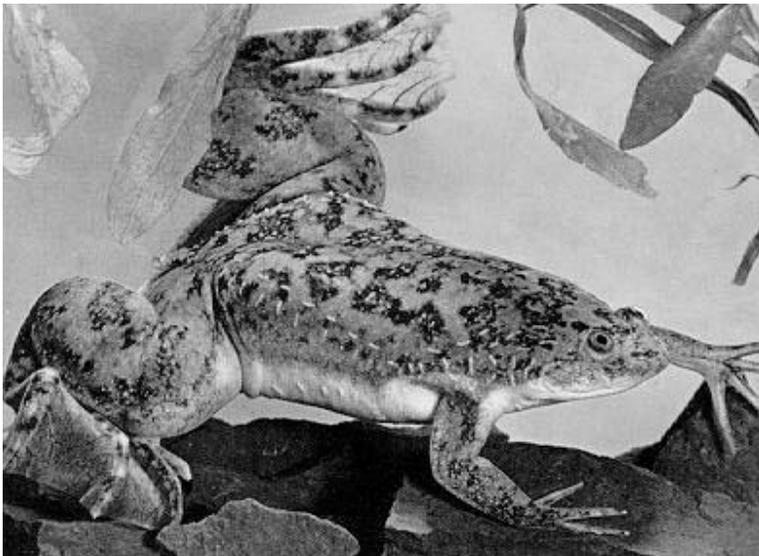


Abbildung 2.2-1: Weibliches Exemplar von *Xenopus laevis*

In den Ovarien der Tiere kommen Oozyten in den Stadien I-VI nach Dumont vor. Die für Experimente hauptsächlich verwendeten Oozyten befinden sich im Stadium V. Ihr Durchmesser beträgt ca. 1,2 mm und ihr Volumen von 0,9-1,2 μ l. Sie

besitzen eine animale, dunkel pigmentierte Hemisphäre, unter der sich der Zellkern mit großen Nucleoli aufhält. Die andere, vegetative Hemisphäre enthält vor allem Dotterpartikel und ist weiß bis gräulich, also unpigmentiert. [Dumont, 1972]

2.2.2 Gewinnung und Vorbereitung der Oozyten

Nach Anästhesie in Eiswasser wurde das Tier in Rückenlage auf Eis gelagert. Zum Schutz der peripheren Abdominalarterie und des Ovarialstamms wurde 1-2 cm paramedian im kaudalen Abdomen laparotomiert und die Oozyten entnommen. Die Wunde wurde mit zwei bis drei Stichen mit Nahtmaterial (Seide 4/0, weiß, sterilisiert) von Vömel, Kronberg versorgt. Die Anästhesie wurde durch Umspülen des Tieres mit lauwarmem Leitungswasser beendet.

Die gewonnenen Oozyten wurden in vitro im sog. Oozyten-Ringer (ORI) aufbewahrt. ORI enthält 100 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM MOPS, der pH wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt. ORI wurde als zehnfach konzentrierte Lösung angesetzt, dann 1:10 verdünnt und anschließend autoklaviert. Für längerfristige Lagerung der Oozyten zur Expression oder während Kollagenasebehandlung wurde 50 mg/l Gentamicin zugesetzt, um dem Bakterienwachstum entgegen zu wirken.

Nach Entnahme wurden die von reichlich Bindegewebe umgebenen Oozytenaggregate zerkleinert und über Nacht in 1mg/ml Kollagenase (von *C. histolyticum*, Aktivität 220 U/mg) von ICN Biomedicals (deutscher Sitz in Eschwege) gelöst in ORI inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Oozyten zur Entfernung des Follikelepithels (bzw. zur Eröffnung ihrer Zonulae occludentes) ausgiebig in Ca²⁺-freiem ORI gewaschen.

Die Oozyten wurden unter einem Zoom-Stereo-Mikroskop unter Beleuchtung durch eine zweiarmige Kaltlichtquelle von 150 W Leistung inspiziert. Für die Experimente wurden Oozyten des Stadium V ausgesucht unter Beachtung folgender Kriterien ausgewählt: Homogene Verteilung des Pigments am animalen Pol, samtige Beschaffenheit der Oberfläche, kugelfunde Form der Oozyten und ausreichender Turgor.

2.2.3 Injektion von mRNA und Expression

Vor der Injektion wurden Glaskapillaren (World Precision Instruments, Inc., USA) mit Innendurchmesser 0,5 mm und Außendurchmesser 1,0 mm in einem Mikroelektrodenausziehgerät der Firma Sutter Instrument Co., USA dünn ausgezogen. Anschließend wurde die Kapillare mit Mineralöl luftfrei gefüllt und in eine mit einem Manipulator versehene Mikroinjektionspumpe von World Precision Instruments, USA eingespannt und mit einer feinen Pinzette aufgebrochen. Die selektierten Oozyten wurden in einer Sylgard-Rinne unter ORI mit Gentamicin angeordnet.

Sämtliche RNAs wurden vor Injektion auf 0,2 µg/µl verdünnt. Die gewünschte Menge, in der Regel 1-3 µl, wurde in ein kleines Gefäß mit Mineralöl pipettiert, um Konzentrierung durch Verdunstung und Kontaminationen zu vermeiden. Nach Aufsaugen der Lösung wurden die Oozyten senkrecht punktiert und mit einem Volumen von 50 nl RNA-Lösung injiziert.

Anschließend wurden die Oozyten zur Expression des Proteins 2-3 Tage in ORI mit Gentamicin bei 16 °C aufbewahrt. In Oozyten ist wegen ihrer Größe und ihrer Translationsaktivität selbst bei Injektion von 1 pg RNA eine detektierbare Proteinmenge zu erhalten. Der Translationsapparat ist mit ca. 20 ng RNA/Oozyten gesättigt. [Colman, 1984] Die injizierten 10 ng reichten aber für eine gute Translation aus.

Wichtig ist, dass die Oozyte zu posttranslationalen Modifikationen wie Phosphorylierung, Glykosylierung, Acetylierung u. a. befähigt ist, Signalsequenzen korrekt abzuspalten vermag und oligomere Proteine richtig zusammensetzen kann. Außerdem wird das Protein in das richtige zelluläre Kompartiment transportiert. Die RNA wird, sofern das entstehende Protein nicht die Physiologie der Oozyten extrem stört, über lange Zeit exprimiert. [Huez et al., 1986; Soreq, 1985]

2.3 Tracer-Aufnahme-Messungen

2.3.1 Durchführung des Flux-Experiments

Je 8-15 Oozyten wurden z. T. nach Vorbehandlung mit MTS-Reagenzien (siehe dort) in mit Magermilchpulverlösung oberflächenbeschichtete Fluxgefäße aus Polystyrol gegeben, die zwischen 170 und 190 µl ORI enthielten. Diese Menge ORI

wurde so gewählt, das das Volumen der Lösung nach Zugabe aller Reagenzien incl. radioaktiv markiertem Substrat 200 µl betrug. Anschließend wurde zu den dafür vorgesehenen Ansätzen 2 µl Cyanin 863 der Konzentration 10 mM (entsprechend 100 µM Cyanin im Fluxansatz) pipettiert und die Oozyten 10-15 min im Hemmstoff vorinkubiert.

Danach wurde im 30 Sekundentakt 10 µl der radioaktiven Substratlösung zugegeben und nach Durchmischung durch vorsichtige Kreisbewegungen zwei mal je 10 µl der Lösung des Fluxgefäßes (im Folgenden als Überstand bezeichnet) abgenommen und in Zählröhrchen mit 100 µl 5 %-iger SDS-Lösung gefüllt. Anschließend wurden die Oozyten i. d. R. eine Stunde lang bei 18 °C inkubiert.

Die Menge an Radioaktivität in der Substratlösung soll so eingestellt sein, dass die Counts pro Minute (cpms) im Überstand zwischen 10.000 und 15.000 betragen. ¹⁴C-markiertes TEA-Bromid (i. d. R. 1 mCi/ml und 55 mCi/mmol) wurde von American Radiolabeled Chemicals, Inc, USA bezogen.

Nach einer Stunde wurde die Reaktion durch Zugabe von 0 °C-ORI gestoppt und die Oozyten aus dem Fluxgefäß in ein neues Gefäße mit 0 °C-ORI überführt, vier mal gewaschen und in Zählröhrchen mit 100 µl 5 %-iger SDS-Lösung überführt.

Nach Lyse der Oozyten (nach ca. 30 min auf dem Schüttler) wurde 1 ml Szintilationscocktail der Firma Lumac LSC B.V., Niederlande zugegeben, die Zählröhrchen verschlossen, beschriftet und die Proben mit einem Flüssigszintilationszähler der Firma Packard, Canberra ausgewertet.

2.3.2 Auswertung

Die Berechnung der cyanininhibierbaren Aufnahme erfolgt nach folgender Verhältnisgleichung:

$$\frac{\text{Stoffmenge in der Oozyte [mol]}}{\text{Stoffmenge im Fluxgefäß}} = \frac{\text{cpm in der Oozyte}}{\text{cpm im gesamten Fluxgefäß}}$$

$$\text{Aufnahme [pmol/h]} = \frac{\text{cpm in Oozyte} \times \text{Substratkonz.} \times 200 \mu\text{l}^a}{\text{cpm in } 10 \mu\text{l Überstand} \times 20^b} \times \frac{60}{\text{Fluxdauer in Minuten}}$$

Gleichung 2.3-1: Berechnung der Substrataufnahme pro Stunde;

^a: Gesamtvolumen im Fluxgefäß

^b: Verhältnis von Gesamtvolumen zu gemessenem Überstandsvolumen

Als cpm in den Oozyten wurde der Mittelwert von 8 bis 15 Oozyten eingesetzt und davon der Aufnahme von mit Cyanin gehemmten Oozyten subtrahiert. Die daraus resultierende Größe, die cyanininhibierbare Aufnahme, wurde für die weiteren Auswertungen verwendet.

Die Berechnungen wurden mit Hilfe des Programms Microsoft Excel 97 durchgeführt.

Für die Erstellung von Kinetiken wurde die Aufnahme für jede Oozyte einzeln berechnet und die Mittelwerte mit Standardabweichungen geplottet. Anschließend wurden die Messwerte nach Michaelis-Menten gefittet und der Graph der entstandenen Funktion in denselben Plot eingezeichnet. Gleichung 2.3-2 zeigt die Formel der Michealis-Menten-Gleichung und die Formel einer modifizierten Gleichung für Hemmkinetiken (Substrataufnahme in Abhängigkeit von der Hemmstoffkonzentration).

$$V = V_{\max} \cdot \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad V = V_{\max} \cdot \left(1 - \frac{[I]}{IC_{50} + [I]} \right)$$

Gleichung 2.3-2: links: Michealis-Menten-Gleichung und rechts: modifizierte Gleichung für kompetitive Hemmkinetiken; [S]: Substratkonzentration; [I]: Hemmstoffkonzentration; v: Substrataufnahme; v_{\max} : maximale Substrataufnahme; K_M : Michealis-Menten-Konstante; IC_{50} : siehe unten

Da die Michaelis-Menten-Gleichung für Enzymkinetiken entwickelt wurde, muss man sich dessen bewusst sein, dass es sich bei der Verwendung für Transporter nur um eine (allerdings sehr gute) Näherung handelt. K_M - bzw. IC_{50} -Werte dürfen mit ihr aber nur berechnet werden, wenn man von einer vollständigen Kompetition um die Bindungsstelle ausgehen kann. Dies ist näherungsweise bei allen Substraten der Fall. Vollständige Kompetition durch Hemmstoffe ist gegeben, wenn die tatsächlichen K_i -Werte (siehe unten) bei Verwendung unterschiedlicher Substratkonzentrationen ungefähr gleich bleiben.

Zur Berechnung der IC_{50} -Werte nicht vollständig kompetitiver Hemmstoffe wurde in dieser Arbeit die Hill-Gleichung (modifiziert für Hemmkinetiken) verwendet.

$$V = V_{\max} \cdot \left(1 - \frac{[I]^P}{IC_{50}^P + [I]^P} \right)$$

Gleichung 2.3-3: *modifizierte Hill-Gleichung; P: Hill-Koeffizient, zur Bedeutung der restlichen Variablen siehe Gleichung 2.3-2*

Alle Kinetiken wurden mit Sigmaplot für Windows, SPSS Inc. nach obigen Gleichungen gefittet und geplottet.

Unter dem IC_{50} -Wert (oder auch apparenter K_i -Wert genannt) versteht man diejenige Hemmstoffkonzentration, bei der die Substrataufnahme bei einer bestimmten Substratkonzentration auf die Hälfte reduziert wird. Da dieser Wert bei der kompetitiven Hemmung stark von der Substratkonzentration abhängt, ist er nur bedingt aussagekräftig. Deshalb wurde er für kompetitive Hemmstoffe nach folgender Beziehung in den tatsächlichen K_i umgerechnet. (Gleichung 2.3-4) [Cheng und Prusoff, 1973]

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_M}}$$

Gleichung 2.3-4: *Berechnung des K_i -Wertes aus dem IC_{50} -Wert, der Substratkonzentration [S] und dem K_M -Wert des Substrates*

2.4 Elektrophysiologische Messungen

Die elektrophysiologischen Messungen wurden nach einem im Labor etablierten Standardverfahren durchgeführt. [Arndt et al., 2001] Allerdings wurde an einem neuen Stand mit anderer Hardware und Software gemessen.

2.4.1 Technische Voraussetzungen

Für Two-Electrodes-Voltage-Clamp-Experimente wurde ein TEC-05-Verstärker der Firma NPI electronics, Tamm, Deutschland verwendet, welcher über den Analog-Digital-Wandler ITC-16 von Instrutech, New York, USA an einen PC angeschlossen war. Die Spannungsklemme wurde nach einem Algorithmus [Polder und Swandulla, 2001] mittels proportionaler und integraler Gainkontrolle erreicht und anhand eines rechteckförmigen Kontrollpulses optimiert. Die unter Klemmbedingungen gemessenen Halteströme wurden bei 20 Hz gefiltert [Kordas et al., 1989].

Zur Steuerung des Verstärkers und zum Aufzeichnen der Messungen wurden die Programme PULSE und X-CHART, beide von HEKA Elektronik, Deutschland verwendet. Mittels bestimmter Techniken konnte mit der Messanordnung nicht nur der Haltestrom, sondern auch die Membrankapazität ermittelt werden.

Die Kapazität ist definiert als Quotient aus Ladungsverschiebung und Spannungsveränderung, sie trägt die Einheit Farad ($1\text{F} = 1\text{C} : 1\text{V}$). Die Membrankapazität wird bestimmt durch die Oberfläche und die Dielektrizitätskonstante der Zellmembran, aber auch durch Ladungsverschiebungen innerhalb von Membranproteinen (z. B. durch Konformationsänderung) und durch Ladungsverschiebungen durch Binden und Dissoziieren geladener Moleküle, wie z.B. die Substrate und Hemmstoffe der OCTs [Schmitt und Koepsell, 2002 und 2005].

Für die Messungen wurde die Oozyte vorsichtig in eine Messkammer aus Teflon gesetzt, welche mit verschiedenen Lösungen durchstößt werden konnte, die am anderen Kammerende wieder abgesaugt wurden. Die Messkammer konnte mit einer Kaltlichtquelle beleuchtet und mit einem Stereomikroskop in Vergrößerung betrachtet werden. Als Erdungs- und Referenzelektroden wurden AgCl-beschichtete Silberdrähte in der Messkammer so angeordnet, dass die Referenzelektrode dem Oozyt nahe und die Erdungselektrode eher fern lag, außerdem wurde darauf geachtet, dass die Referenzelektrode nicht zwischen Oozyt und Erdungselektrode lag. Als Messelektroden wurden Glaskapillaren vom Typ GP150F-8P, Science Products, Deutschland verwendet, die mit dem unter 2.2.3 angegebenen Ausziehgerät fein ausgezogen wurden, so dass die Spannungselektrode einen Widerstand von 1 bis 5 $\text{M}\Omega$ und die Stromelektroden einen von 0,5-2,0 $\text{M}\Omega$ hatten. Die Mikroelektroden

wurden anschließend mit 3 M KCl-Lösung luftfrei gefüllt, in die wiederum chlorierte Silberdrähte eintauchten. Die Silberdrähte wurden in 3 M KCl-Lösung unter Standardbedingungen mit einem Gerät von NPI electronics chloriert. Die Mikroelektroden waren an Mikromanipulatoren von Narishige, Japan, befestigt.

2.4.2 Messlösungen

Da es sich bei der Referenzelektrode um ein Ag-AgCl-Elektrode handelt, wurde darauf geachtet, die Chlorid-Konzentration in den Messlösungen konstant zu halten. Als Referenzlösung wurde ORI verwendet, dem noch 10 mM NaCl zugesetzt waren (also insgesamt 110 mM NaCl), im folgenden NaCl-ORI genannt. Alle Substrat- und Hemmstofflösungen wurden so angesetzt, dass die Chloridkonzentration stets 110 mM betrug.

Für kombinierte Flux-Strom-Messungen (siehe 2.4.5) wurden zu 50 ml einer 500 μ M TEA-Lösung 50 μ l einer 14 C-markierten TEA-Lösung (1 mCi/ml, 55 mCi/mmol) gegeben, so dass die Endlösung ca. 25.000 dpm / 10 μ l und damit etwa doppelt so viel Radioaktivität enthielt, wie die Überstände in normalen Flux-Messungen.

2.4.3 Durchführung der Experimente

Morphologisch optimale Oozyten wurden nach zwei bis drei Tagen Expression ausgewählt und in die Messkammer mit NaCl-ORI gesetzt. Der Offset für die Elektroden wurde nach Eintauchen in NaCl-ORI auf 0 justiert und anschließend X-CHART gestartet. Die Oozyte wurde nun zunächst mit der Spannungs- und danach mit der Stromelektrode vorsichtig punktiert, was i.d.R. zu einer mehr oder minder stark ausgeprägten Depolarisation führte (siehe Abbildung 2.4-1).

Nach der Punktion wurde die Kammer mit NaCl-ORI perfundiert. Nach Erholung des Spontanpotentials wurde die Oozyte bei meist -50 mV geklemmt und die Klemme optimiert (s.o.). Sobald der Haltestrom weitgehend konstant blieb, konnte mit den Messungen begonnen werden.

Die Substratlösungen wurden i. d. R. nach Abstellen der Perfusion mit NaCl-ORI direkt in die Kammer pipettiert, um einen schnellen Wechsel zu erreichen. Gelegentlich wurde auch mit Substratlösungen perfundiert. Die durch Substrat induzierte Veränderung des Haltestroms war die entscheidene Messgröße dieser Versuche und wurde für die Auswertungen herangezogen (siehe Abbildung 2.4-2).

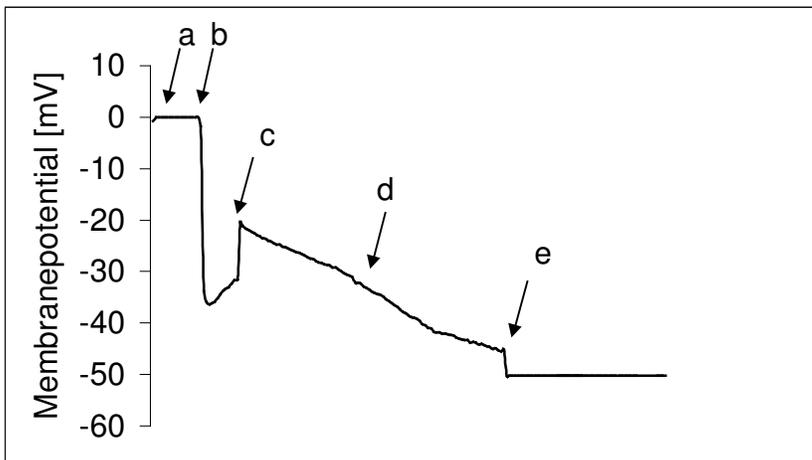


Abbildung 2.4-1: *Typischer Verlauf des Membranpotentials der Oozyten am Beginn der elektrophysiologischen Experimente. a) Elektroden befinden sich extrazellulär b) Punction mit der Spannungselektrode c) Punction mit der Stromelektrode d) Erholung des Spontanpotentials e) Voltage-Clamp bei -50 mV*

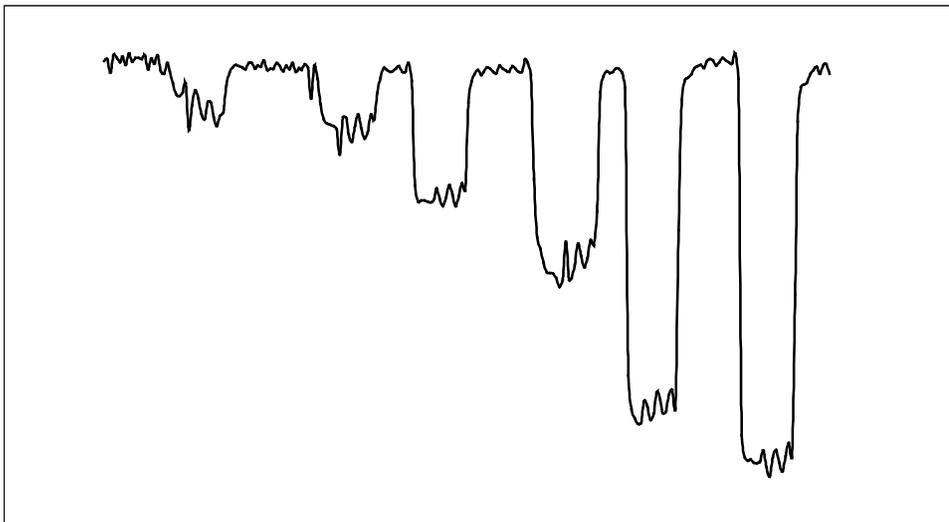


Abbildung 2.4-2: *Beispiel für eine mit X-CHART aufgezeichnete Stromkurve. Abhängigkeit der induzierten Ströme von der Substratkonzentration am rOCT1, Substrat: Cholin*

Die Daten wurden mit Microsoft Excel 97 bzw. mit Sigmaplot für Windows, SPSS, Inc. ganz ähnlich ausgewertet, wie unter 2.3.2 schon für die Fluxexperimente beschrieben wurde.

2.4.4 Messungen im Efflux-Mode

Um Effluxströme zu messen, wurden die Oozyten über Nacht in 10 mM Cholin vorinkubiert und in der Messkammer mit 10 mM Cholin in ORI superfundiert. Effluxpulse wurden durch Superfusion mit NaCl-ORI generiert, wobei die vollständige Veränderung des Haltestroms wesentlich länger dauerte als bei Influxpulsen. In Kontrolloozyten konnte kein Effluxstrom nachgewiesen werden. [Arndt et al., 2001]

2.4.5 Bestimmung des Strom-Flux-Verhältnisses

Die Idee dieser Methode ist es, die tatsächlich aufgenommene Substratmenge im „Tracer-Flux“ und die aufgenommene Ladung in der elektrischen Messung (also die Transportstöchiometrie) simultan zu bestimmen. Aus beiden Größen kann dann das Verhältnis von Tracer-Aufnahme zu Ladungsaufnahme, oder das Strom-Flux-Verhältnis (im Folgenden CFR, „current-flux-ratio“) bestimmt werden.

Die Messungen wurden mit einer Lösung von 500 μM TEA durchgeführt, welche ca. 25.000 cpm / 10 μl und damit ca. doppelt so viel Radioaktivität wie Lösungen für normale Tracer-Flux-Messungen enthielt. Zur Durchführung der Messung wurde das Absaugsystem der Kammer so modifiziert, dass man zwischen einem radioaktiven und nicht-radioaktiven Abfallbehälter umschalten konnte. Bei den Experimenten wurde je eine Oozyte während der Messung für 240 s in 500 μM ^{14}C -TEA inkubiert. Anschließend wurde die Oozyte zur Hemmung des TEA-Effluxes, welcher die Berechnung der aufgenommenen Ladungsmenge enorm verfälschen würde, mit Tetrabutylammonium (10 - 100 μM) umspült. Nach Waschen in eiskaltem ORI wurde die Oozyte in 100 μl 5%-igem SDS lysiert und die Radioaktivität gemessen, aus der die TEA-Aufnahme errechnet werden konnte (vgl. 2.3).

Zur Berechnung der aufgenommenen Ladung in nC muss das Integral des induzierten Stroms über die Zeit gebildet werden ($Q = \int I dt$). Dieses Integral wurde mit Microsoft Excel durch Summierung von Flächenstücken der Breite 1 s gebildet (siehe Abbildung 2.4-3).

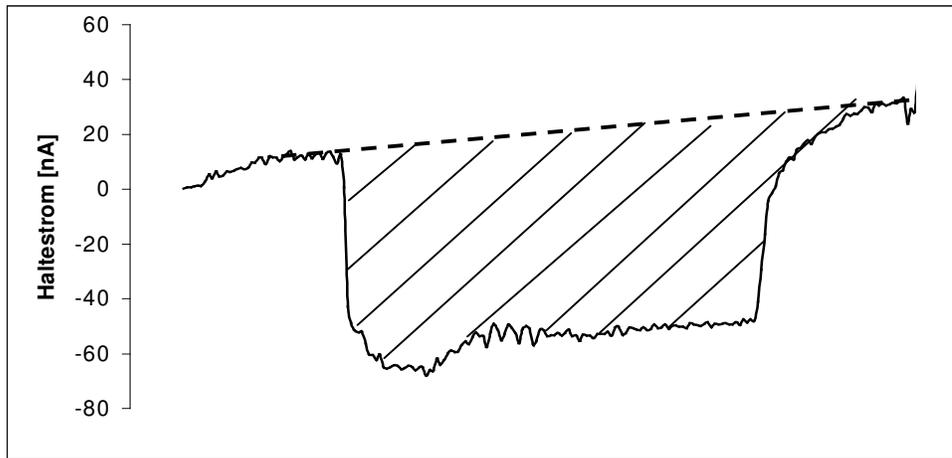


Abbildung 2.4-3: *Veränderung der Halteströme bei -50 mV induziert durch $500 \mu\text{M}$ ^{14}C -TEA, Expositionsdauer 240 s. Die schraffierte Fläche entspricht dem zu bildenden Integral (Ladung in nC)*

Aus der aufgenommenen Ladung in nC kann durch eine einfache Umformung die Aufnahme an Elementarladungen in pmol berechnet werden (Gleichung 2.4-1).

$$\text{Elementarladungsaufnahme} = \frac{Q}{e \cdot N_A}$$

Gleichung 2.4-1: *Berechnung der Aufnahme an Elementarladung in pmol aus der aufgenommenen Ladung Q , der Elementarladung $e=1,602 \cdot 10^{-19}$ C und der Avogadrokonstante $N_A=6,022 \cdot 10^{23}$ / mol*

Die CFR ist der Quotient aus aufgenommener Ladung und aufgenommener Stoffmenge.

2.5 MTS-Reagenzien und deren Anwendung

Die Methanthiosulfonatderivate werden derzeit in einer Fülle von Variationen synthetisiert. Ihr Hauptcharakteristikum ist die kovalente Modifikation von SH-Gruppen in Proteinen.

2.5.1 Chemie

Die folgenden Informationen sind im Internet unter <http://www.trc-canada.com/paper/index.html> erhältlich.

Folgende Abbildung zeigt die allgemeine Strukturformel von MTS-Derivaten. Mit R wird der in den Derivaten variable Rest bezeichnet.

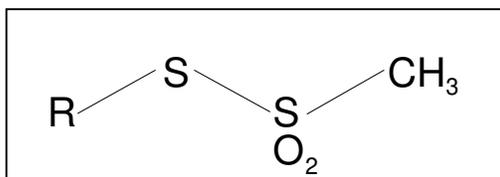


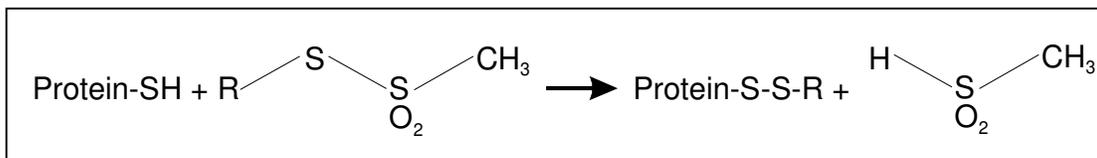
Abbildung 2.5-1: *Strukturformel von MTS-Derivaten*

In dieser Arbeit wurde im Wesentlichen mit fünf Derivaten von MTS gearbeitet, deren Reste in Abbildung 2.5-2 zu sehen sind. Die ersten vier MTS-Derivate sind geladen und membranimpermeabel, während MMTS neutral und gut membranpermeabel ist. [Akabas et al., 1992; Holmgren et al., 1996; Lambert et al., 2000; Smith et al., 1975; Stauffer und Karlin, 1994]

Derivat	ausgeschriebener Name	Rest
MTSMT	[2-(Trimethylammonium)-methyl]methanthiosulfonat	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{---CH}_2\text{---N}^+\text{---CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
MTSET	[2-(Trimethylammonium)-ethyl]methanthiosulfonat	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{---(CH}_2\text{)}_2\text{---N}^+\text{---CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
MTSPT	[2-(Trimethylammonium)-propyl]methanthiosulfonat	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{---(CH}_2\text{)}_3\text{---N}^+\text{---CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
MTSES	(2-sulfonatoethyl)methanthiosulfonat	$\text{---(CH}_2\text{)}_2\text{---SO}_3^-$
MMTS	Methylmethanthiosulfonat	---CH_3

Abbildung 2.5-2: Reste von *MTSES*, *MTSMT*, *MTSET*, *MTSPT*, *MMTS*

Die hygroskopischen MTS-Derivate wurden bei -20 °C gelagert. Die MTS-Derivate in Lösung hydrolysieren bei Raumtemperatur mit Halbwertszeiten zwischen 10 und 20 Minuten, deshalb wurden die Lösungen unmittelbar vor jedem Experiment frisch angesetzt und bis zu ihrer Verwendung bei +4 °C aufbewahrt. Auf DMSO, wie es von manchen Arbeitsgruppen zum Lösen von MTS-Derivaten verwendet wird, konnte verzichtet werden [Javitch, 1998]. Die MTS-Derivate reagieren in einer Redox-reaktion mit den SH-Gruppen des Proteins zu einem kovalent an das Protein gebundenen Rest und Sulfinsäure [Kenyon und Bruice, 1977; Smith et al., 1975] nach folgender Reaktionsgleichung (Gleichung 2.5-1):



Gleichung 2.5-1: Reaktionsgleichung von MTS-Derivaten mit SH-Gruppen

In der Literatur ist allerdings auch eine Reaktion von MMTS mit Aminogruppen beschrieben [Kluger und Tsui, 1980]. Es wird empfohlen, routinemässig mit 1 mM MTSET und 10 mM MTSES zu arbeiten, da MTSET ca. 10 mal reaktiver ist als MTSES. [Stauffer und Karlin, 1994] Die in der Literatur beschriebenen MMTS-Konzentrationen liegen zwischen 10 μM und 10 mM. [Fu und Kirk, 2001; Lambert et al., 2000] In dieser Arbeit wurde in der Regel 5 mM MMTS als Standardkonzentration eingesetzt. Der maximale Effekt einer Reaktion mit MTSES wurde nach 80 bis 120 s gesehen [Lo und Silverman, 1998], so dass die meisten Arbeitsgruppen eine MTS-Expositionsdauer von 5 min wählen [Golovanevsky und Kanner, 1999; Lambert et al., 2000]. Die Disulfidbindung zwischen MTS-Derivat und Protein kann mit Reduktionsmitteln wie beispielsweise DTT wieder gespalten werden. [Holmgren et al., 1996]

2.5.2 Anwendung der Reagenzien

Alle Lösungen von MTS-Derivaten wurden vor den Aufnahmemessungen frisch in 20-fach höherer Konzentration als die gewünschte maximale Inkubationskonzentration angesetzt und unmittelbar bis zur Verwendung bei +4 °C gelagert. Die Oozyten wurden in Gefäße mit 380 μl ORI gegeben, zu denen dann in 30-sekündigem Abstand 20 μl der MTS-Lösung pipettiert wurde. Nach 5 min wurde die MTS-Lösung durch Zugabe von ca. 3 ml ORI stark verdünnt. Kurz darauf wurden die Oozyten 4 mal in ORI gewaschen und in die Fluxgefäße gegeben.

Bei Aufnahmemessungen in Anwesenheit von MTS-Derivaten wurden 10 μl der 20-fach-konzentrierten Lösung ca. 20 s vor Substratzugabe in 180 μl ORI gegeben, so dass nach Substratzugabe ein Endvolumen von 200 μl resultierte und damit die gewünschte MTS-Konzentration eingestellt war.

Für elektrophysiologische Messungen wurden die MTS-Derivate am Morgen in der gewünschten Konzentration in NaCl-ORI (bzw. in ORI mit 10 mM Cholinchlorid) gelöst und während des Messtages bei +4 °C aufbewahrt.

Die Lösungen wurden direkt in die Messkammer pipettiert, wie unter 2.4.3 für Substratlösungen beschrieben.

3 Ergebnisse

Zu Beginn der Arbeit wurde versucht, die Aufnahme von radioaktivem TEA in rOCT1-exprimierenden Oozyten durch MTS-Derivate zu verändern und Cysteinmutanten von rOCT1 zu charakterisieren. Da diese Experimente keine interessanten Ergebnisse lieferten, werden sie im Anhang beschrieben. Bei elektrophysiologischen Messbedingungen mit kurzer Inkubationszeit der MTS-Derivate konnte schließlich ein hochinteressanter Effekt des ungeladenen MTS-Derivats MMTS auf rOCT1 identifiziert werden. Diese Substanz änderte nach kurzer Expositionszeit die funktionellen Eigenschaften von rOCT1 und auch rOCT2 deutlich. Diese Veränderungen werden im Folgenden dargestellt. Falls andere Angaben fehlen, wurden die Experimente bei einer Klemmspannung von -50 mV mit einer MMTS-Konzentration von 5 mM und einer Inkubationszeit von 30 Sekunden durchgeführt.

3.1 Charakterisierung des MMTS-Effekts

3.1.1 Veränderung der Influx- und Effluxströme

Nach der Entdeckung des Effekts am rOCT1 wurde rOCT1 und rOCT2 sowohl im Influx- als auch im Effluxmode auf ihre Modifizierbarkeit durch MMTS hin überprüft. Abbildung 3.1-1 zeigt repräsentative Pulse an injezierten und nichtinjizierten Oozyten. Die jeweils linken Haltestromkurven zeigen die bereits bekannte Tatsache, dass durch rOCT2 deutlich höhere Einwärtsströme entstehen als durch rOCT1. Nach Modifikation durch MMTS kam es in rOCT1-injizierten Oozyten zu einer deutlichen Aktivierung des Einwärtsstroms, während dieser nach MMTS-Gabe in rOCT2-exprimierenden Oozyten gehemmt wurde. Für das Aufzeichnen dieser Haltestromkurven wurde eine MMTS-Konzentration von 500 μ M verwendet, da diese Konzentration im Gegensatz zu 5 mM nicht zu einem vorübergehenden Abknicken der Stromkurve bis in den Milliamperebereich führte.

Analog zum Einwärtsstrom konnte auch der Auswärtsstrom (jeweils rechte Stromkurven in der Abbildung 3.1-1) bei rOCT1 durch MMTS deutlich aktiviert und bei rOCT2 gehemmt werden. Bei rOCT1 im Effluxmode konnte eine Verschiebung der Baseline während MMTS-Gabe um $-53 \pm 7,6$ nA ($n=3$) gesehen werden, die durch

eine Aktivierung des Cholin-influxes erklärt werden kann. Kontrollloozyten (untere Spuren) zeigten weder vor noch nach MMTS-Exposition Einwärts- oder Auswärtsstrom durch 10 mM Cholin.

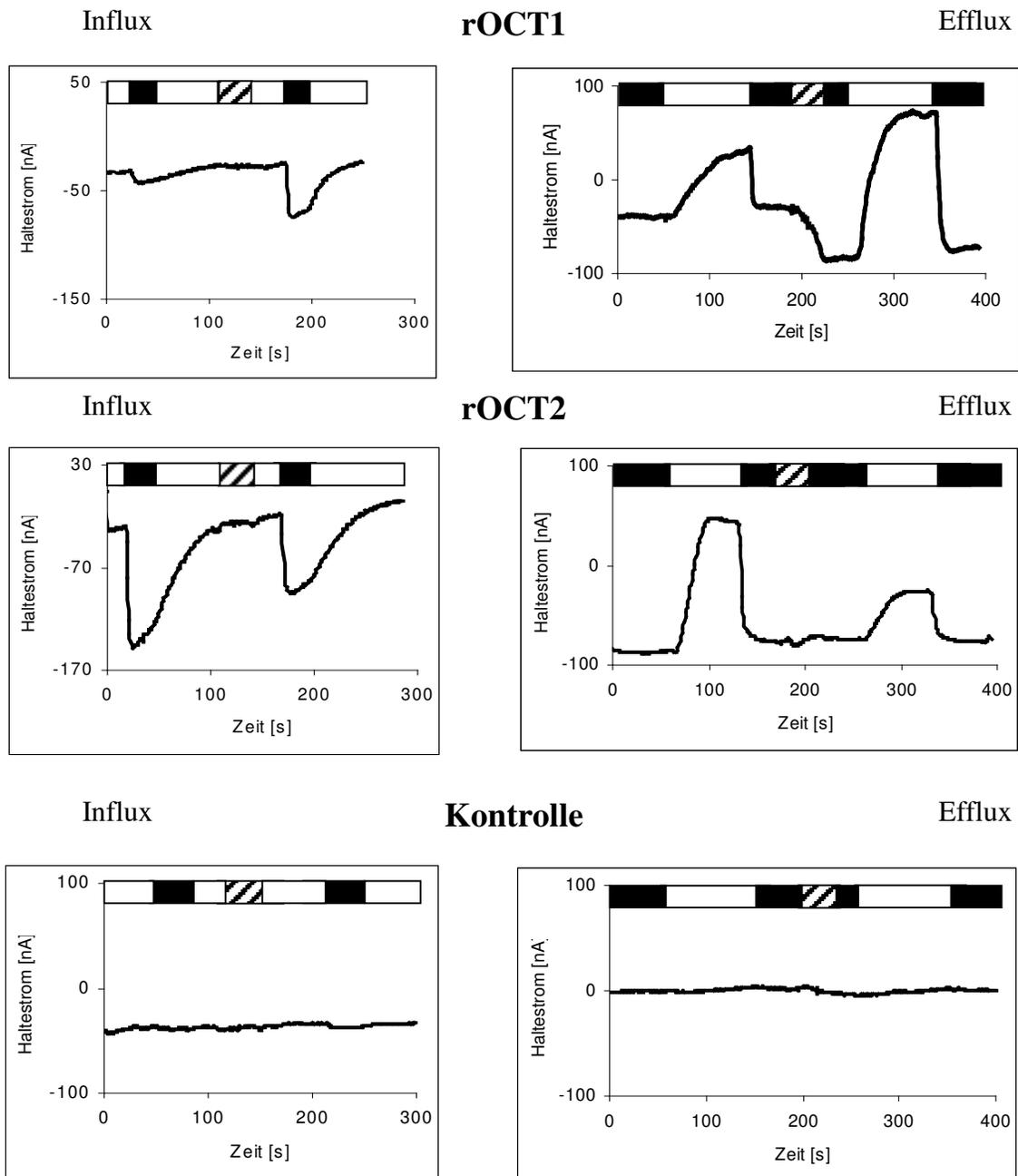


Abbildung 3.1-1: Influx- und Effluxstimpulse vor und nach Modifikation von rOCT1 und rOCT2 mit MMTS (500 μM, 30 sec) sowie an Kontrollloozyten;
 ORI: 10 mM Cholin: 500 μM MMTS:

Die Veränderung des Stromes durch MMTS wird im Folgenden als Aktivierungsfaktor angegeben, der sich aus dem Verhältnis des substratinduzierten Stromes nach und vor MMTS-Exposition errechnet. D. h. die Aktivierungsfaktoren für rOCT1 liegen über eins, die für rOCT2 darunter. Die jeweiligen Aktivierungsfaktoren können der Tabelle 3.1-1 entnommen werden. Wie durch die relativ großen Standardabweichungen angedeutet wird, unterlagen die Aktivierungsfaktoren starken Schwankungen.

Messung	Strom vor MMTS	Strom nach MMTS	Aktivierungsfaktor	Anzahl n
rOCT1, Influx	- 18 ± 13 nA	- 107 ± 82 nA	7,6 ± 3,7	46
rOCT1, Efflux	+ 75 ± 32 nA	+ 197 ± 143 nA	2,5 ± 1,2	5
rOCT2, Influx	- 211 ± 130 nA	- 61 ± 42 nA	0,30 ± 0,17	21
rOCT2, Efflux	+ 160 ± 56 nA	+ 56 ± 12 nA	0,22 ± 0,10	5

Tabelle 3.1-1: Ausgewertete Daten der im Influx- und Effluxmode gemessenen Cholinpulse (Daten als MW ± SD), 5 mM MMTS 30''

3.1.2 Zeitverlauf der Aktivierung bzw. Hemmung (50 µM MMTS)

Um den zeitlichen Verlaufs diese Effektes zu charakterisieren, wurden Oozyten mit einer geringen MMTS-Konzentration von 50 µM superfundiert. Die Strompulse wurden durch 10 mM Cholin in ORI erzeugt, der ebenfalls 50 µM MMTS beinhaltetete, so dass kontinuierliche MMTS-Exposition der Oozyten möglich war. Abbildung 3.1- zeigt die Originalmesskurven der beschriebenen Experimente.

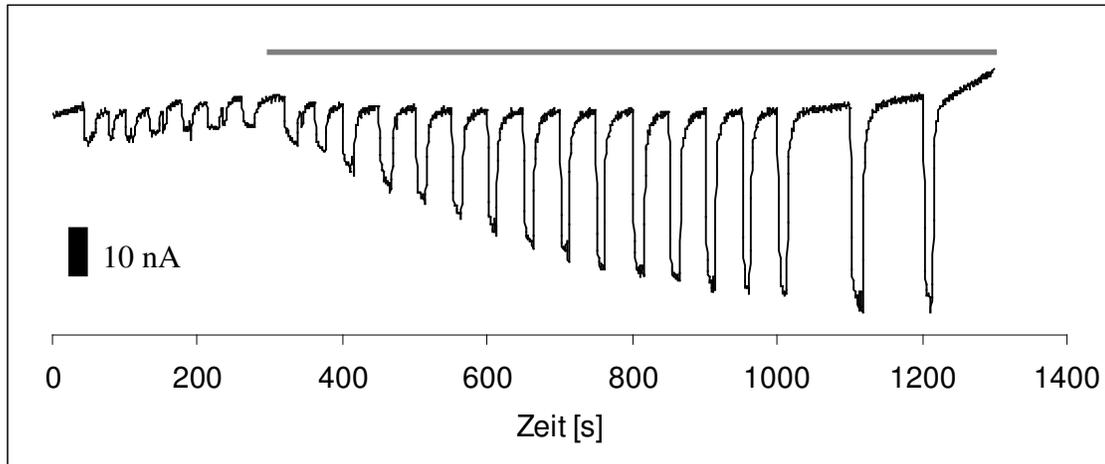


Abbildung 3.1-2a: Zeitverlauf der Aktivierung von cholininduzierten Strömen (10 mM) an rOCT1-injizierten Oozyten mit 50 μ M MMTS (—)

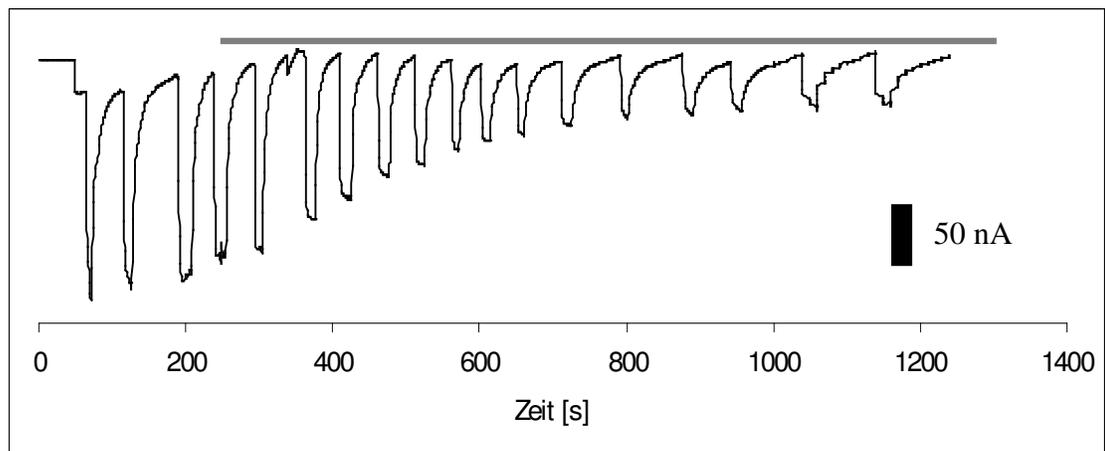


Abbildung 3.1-2b: Zeitverlauf der Hemmung von cholininduzierten Strömen (10 mM) an rOCT2-injizierten Oozyten mit 50 μ M MMTS (—)

3.1.3 Veränderung der K_M -Werte von Cholin

Nachdem ein starker Effekt von MMTS auf die maximal induzierbaren Ströme gezeigt werden konnte, stellte sich natürlich die Frage, ob auch andere Eigenschaften des Transporters geändert wurden. Ein noch relativ einfach zu bestimmender Parameter ist die Affinität bzw. der K_M -Wert. Zu dessen Bestimmung wurden die Oozyten nacheinander mit 100, 200, 500, 1.000, 5.000 und 10.000 μ M Cholin superfundiert. Sowohl für rOCT1 als auch für rOCT2 konnte eine starke Abnahme der Affinität beobachtet werden wie Abbildung 3.1-2 zeigt.

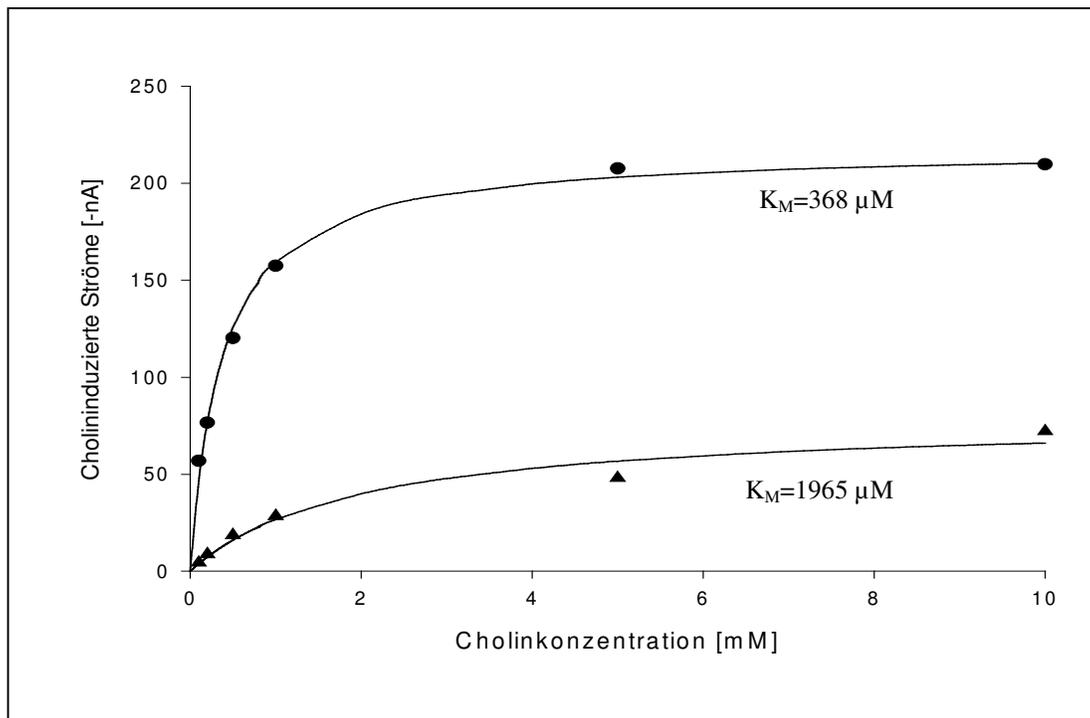
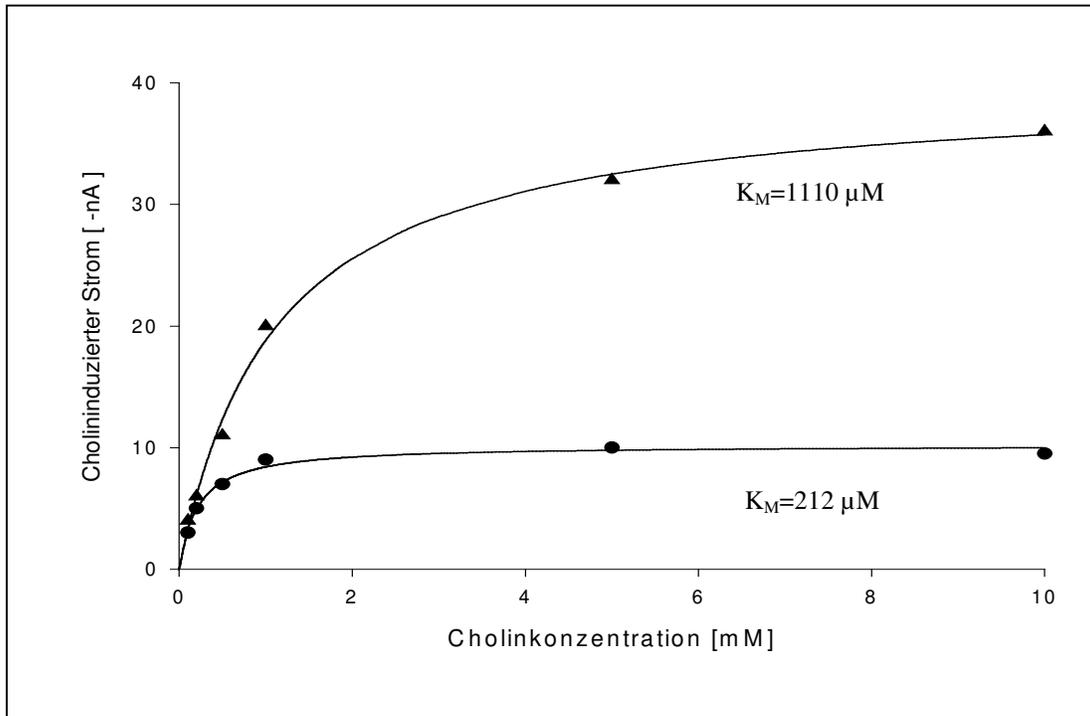


Abbildung 3.1-2: Induzierbare Ströme in Abhängigkeit von der angebotenen Cholin-konzentration an rOCT1 (oben)- und rOCT2 (unten)-injizierten Oozyten vor (●) und nach (▲) MMTS-Exposition. (Gezeigt ist eine repräsentative Messkurve eines Experiments)

Bei rOCT1 veränderte sich der K_M -Wert durch MMTS-Exposition von $286 \pm 176 \mu\text{M}$ zu $1573 \pm 379 \mu\text{M}$ ($n=6$, $p<0,001$). Bei rOCT2 von $383 \pm 136 \mu\text{M}$ zu $1592 \pm 565 \mu\text{M}$ ($n=7$, $p<0,0001$). Diese Experimente zeigen eine deutliche Änderung der funktionellen Eigenschaften der Transporter.

3.1.4 Spannungsabhängigkeit von rOCT1 und rOCT2

Neben den unter 3.1.3 ermittelten K_M -Werten bei -50 mV wurden auch Kinetiken bei -10 mV und -90 mV vor und nach MMTS-Exposition erstellt. Es konnte gezeigt werden, dass die Spannungsabhängigkeit von rOCT1 durch MMTS im Wesentlichen unbeeinflusst bleibt (siehe Tabelle 3.1-2 und -3). Die Spannungsabhängigkeit von rOCT2 scheint nach MMTS-Modifikation z. T. verloren zu gehen; die K_M -Werte vor MMTS-Exposition sind bei den verschiedenen Spannungen signifikant unterschiedlich ($p < 0,01$). Dieser Unterschied lässt sich nach MMTS-Exposition nicht mehr nachweisen.

	-10 mV	-50 mV	-90 mV
vor MMTS	$463 \pm 102 \mu\text{M}$	$286 \pm 176 \mu\text{M}$	$166 \pm 43 \mu\text{M}$
MMTS (5 mM, 30 s)	$2.534 \pm 761 \mu\text{M}$	$1.573 \pm 379 \mu\text{M}$	$1.302 \pm 816 \mu\text{M}$

Tabelle 3.1-2: K_M -Werte von Cholin, gemessen an rOCT1-injezierten Oozyten bei Membranpotentialen von -10 mV , -50 mV und -90 mV . $n \geq 5$

	-10 mV	-50 mV	-90 mV
vor MMTS	$736 \pm 116 \mu\text{M}$	$383 \pm 136 \mu\text{M}$	$126 \pm 67 \mu\text{M}$
MMTS (5 mM, 30 s)	$802 \pm 789 \mu\text{M}$	$1592 \pm 565 \mu\text{M}$	$1207 \pm 805 \mu\text{M}$

Tabelle 3.1-3: K_M -Werte von Cholin, gemessen an rOCT2-injezierten Oozyten bei Membranpotentialen von -10 mV , -50 mV und -90 mV . $n \geq 4$

3.1.5 Einfluss von MMTS auf v_{max} , K_M und K_i -Werte anderer Substanzen

Bei den starken Änderungen der Transportereigenschaften für das Substrat Cholin, war natürlich naheliegend, dass auch die Kinetiken mit anderen Substraten und Hemmstoffen durch MMTS verändert werden könnten. Diese Versuche wurden im Wesentlichen an rOCT1-injezierten Oozyten durchgeführt. Für rOCT2 wurde nur

gezeigt, dass TEA-Ströme von initial 38 ± 13 nA durch MMTS gehemmt werden konnten (Aktivierungsfaktor: $0,42 \pm 0,35$; $n=4$).

Die Ergebnisse verschiedener Substrate von rOCT1 sind in Tabelle 3.1-4 dargestellt.

Substrat	I_{\max} vor MMTS	I_{\max} nach MMTS	Faktor	n =
TEA	$- 6,4 \pm 5,2$ nA	$- 44,4 \pm 23,8$ nA	$8,4 \pm 3,2$	10
Guanidin	$- 10,6 \pm 2,1$ nA	$- 85,9 \pm 14,9$ nA	$8,3 \pm 2,0$	5
Acetylcholin	$- 7,1 \pm 5,2$ nA	$- 76,7 \pm 19,9$ nA	$16,4 \pm 13,5$	5
Cholin	$- 18 \pm 13$ nA	$- 107 \pm 82$ nA	$7,6 \pm 3,7$	46

Tabelle 3.1-4: I_{\max} in rOCT1-injizierten Oozyten vor und nach MMTS-Exposition (5 mM, 30 s) bei Verwendung von 1 mM TEA, 50 mM Guanidin, 3 mM Acetylcholin (und nochmals 10 mM Cholin) als Substrate. Rechts Aktivierungsfaktoren und Anzahl der Experimente. Alle Maximalströme waren signifikant unterschiedlich ($p < 0,001$).

Auch die Affinitäten anderer Substrate zu rOCT1 verminderten sich nach Modifikation mit MMTS. In Tabelle 3.1-5 sind die gemessenen K_M -Werte aufgelistet. Gemessen wurde mit folgenden Konzentrationen: TEA: 20, 50, 100, 200, 500, 1.000 μM ; Guanidin: $\frac{1}{2}$, 1, 2, 5, 10, 20, 50 mM; Acetylcholin: 50, 100, 200, 500, 1.000, 2.000, 3.000 μM ; Cholin: 100, 200, 500, 1.000, 5.000, 10.000 μM .

Substrat	K_M vor MMTS	K_M nach MMTS	p =	n =
TEA	30 ± 6 μM	55 ± 12 μM	0,004	5
Guanidin	$4,2 \pm 1,2$ mM	$10,0 \pm 2,4$ mM	0,002	5
Acetylcholin	10 ± 2 μM	31 ± 15 μM	$<0,001$	5
Cholin	286 ± 176 μM	1.573 ± 379 μM	$<0,001$	6

Tabelle 3.1-5: Veränderungen der Affinitäten von TEA, Guanidin, Acetylcholin (und nochmals Cholin) zu rOCT1 vor und nach MMTS-Exposition (5 mM, 30 s).

Für alle vier gemessenen Substrate nehmen die K_M -Werte also hochsignifikant zu. Es lässt sich berechnen, dass die Faktoren der K_M -Wertzunahme für Cholin ($5,5 \pm$

0,8) signifikant unterschiedlich zu den Faktoren für TEA ($1,8 \pm 0,3$) und Guanidin ($2,4 \pm 0,4$) sind ($p < 0,001$).

Da für alle gemessenen Substrate eine starke Veränderung der Affinität beobachtet wurde, wurden zwei selbst nicht transportierte hochaffine Inhibitoren von rOCT1, Tetrabutylammonium (TPEA) und Cyanin 863, untersucht. Gemessen wurde die Inhibition von cholininduzierten Strömen (10 mM) durch unterschiedliche Inhibitorkonzentrationen. Eine Hemmkinetik ist exemplarisch in Abbildung 3.1-3: gezeigt.

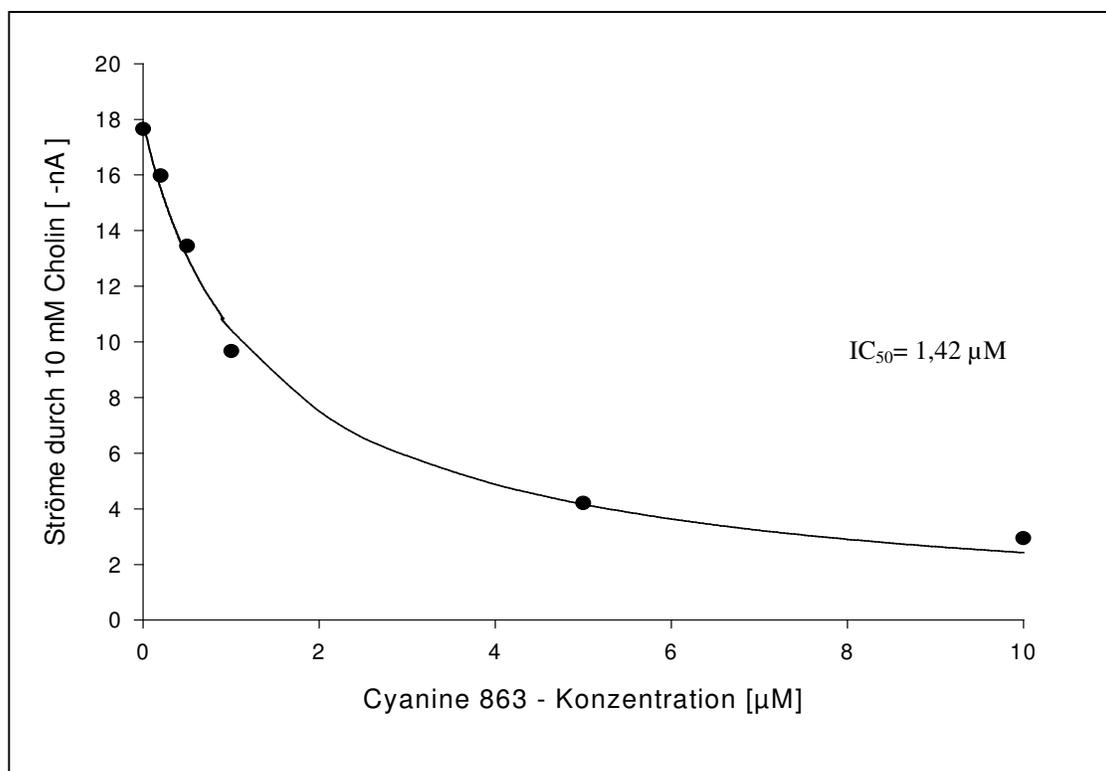


Abbildung 3.1-3: Hemmung der durch 10 mM Cholin induzierten Ströme durch steigende Cyanin 863-Konzentrationen an rOCT1 ohne Aktivierung mit MMTS

Die entsprechenden nach der Hill-Gleichung ermittelten IC_{50} -Werte sind in Tabelle 3.1-6 dargestellt. Da beide Inhibitoren schlecht auswaschbar sind, konnten die Experimente vor und nach MMTS-Exposition nicht an der gleichen Oozyte

durchgeführt werden. Die verwendeten Konzentrationen waren für beide Inhibitoren 0; 0,2; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0 μM .

Inhibitor	IC ₅₀ vor MMTS-Exposition	IC ₅₀ nach MMTS-Exposition
Cyanin 863	1,1 ± 0,4 μM	0,8 ± 0,1 μM
Tetrapentylammonium	2,4 ± 0,9 μM	0,4 ± 0,2 μM

Tabelle 3.1-6: IC₅₀-Werte bei Hemmung von durch 10 mM Cholin induzierten Strömen in rOCT1-injizierten Oozyten durch Cyanin und TPeA vor und nach MMTS-Exposition (5 mM, 30 s); $n \geq 5$

Der direkte Vergleich der IC₅₀-Werte vor und nach MMTS-Exposition ist nur bei vollständig nicht-kompetitiver Hemmung zulässig, da sich bei kompetitiver Hemmung der apparente IC₅₀-Wert wegen der drastischen Erhöhung des K_M-Wertes von Cholin nach MMTS-Exposition in jedem Fall verändern würde. In Tracer-Aufnahme-Experimenten wurde die nichtkompetitive Hemmung durch die beiden Inhibitoren nachgewiesen. [Arndt et al., 2001]

Um eine nichtkompetitive Hemmung unter diesen elektrophysiologischen Messbedingungen zu verifizieren, dürften sich die IC₅₀-Werte bei Messung mit 5 mM Cholin nicht verändern. Deshalb wurde die Hemmung der Ströme durch 5 mM Cholin an jeweils drei Oozyten (ohne MMTS) gemessen. Der so erhaltene IC₅₀-Wert für Cyanin 863 liegt mit 0,7 ± 0,2 μM in der gleichen Größenordnung wie der Wert mit 10 mM Cholin, so dass von einer nichtkompetitiven Hemmung ausgegangen werden kann. Für TPeA konnte ein Wert von 1,3 ± 0,2 ermittelt werden, so dass eine nur teilweise nichtkompetitive Hemmung angenommen werden muss. Unter der Voraussetzung einer vollständig kompetitiven Hemmung lassen sich für TPeA K_i-Werte von 0,07 μM vor MMTS und 0,06 μM nach MMTS errechnen.

Zusammenfassend können diese Daten so interpretiert werden, dass die Affinität von Cyanin durch MMTS nicht verändert wird, die TPeA-Affinität aber zunimmt, wobei der genaue Wert der Zunahme aus diesen Daten nicht ohne weiteres zu ermitteln ist.

3.1.6 Der MMTS-Effekt auf rOCT1 im Tracer-flux

Abbildung 3.1-5 zeigt den Effekt von MMTS im Tracerflux. Bei der Inkubationszeit von 5 Minuten ist die TEA-Aufnahme stark gehemmt. Dies ist am ehesten auf einen unspezifischen Effekt möglicherweise durch Veränderungen des Gluthationstoffwechsels und damit des Redoxpotentials zu erklären. Die Beeinflussung von Transportern durch Gluthation ist beschrieben. [Hammond et al., 2001] Wählt man die gleiche Inkubationszeit wie in elektrophysiologischen Experimenten, so kommt es auch im Flux zu einer Aktivierung der Aufnahme, die aber wesentlich geringer ausgeprägt ist. Es gibt hierfür prinzipiell zwei mögliche Erklärungen: Zum einen findet die Aufnahme in Flux-Experimenten nicht unter kontrolliertem Membranpotential statt, welches selbstverständlich Einfluss auf die Aufnahme hat. Zum anderen ist es aber auch möglich, dass sich substratinduzierte Ströme und Substrataufnahme nicht um den gleichen Faktor verändern. Um diese Frage zu klären, wurde die Methode der simulatanten Messung von Strom und Flux unter geklemmtem Membranpotential angewandt.

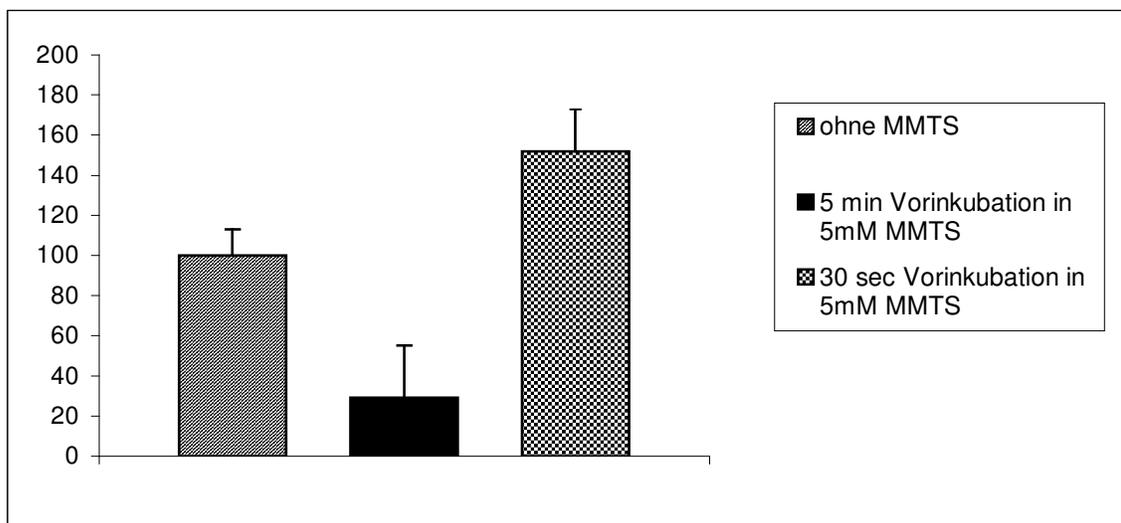


Abbildung 3.1-4: *Effekt von 5mM MMTS auf den ^{14}C -TEA-Aufnahme ($10\mu\text{M}$) von rOCT1 bei unterschiedlicher Vorinkubationsdauer. Fluxdauer: 60 min bei 5 min Vorinkubation, 15 min bei 30 sec Vorinkubation. Angabe in % relativ zum Aufnahme ohne MMTS-Exposition (\pm SD). $n \geq 10$; $p < 0,01$.*

3.1.7 Messung der Transportstöchiometrie

Zur Klärung der Frage, ob sich durch MMTS der substratinduzierte Strom und der Aufnahme an Substrat in gleicher Weise verändern, wurde die Transportstöchiometrie (die sog. CFR) von rOCT1 und rOCT2 jeweils vor und nach MMTS-Exposition gemessen wie unter 2.4.5 beschrieben. Die Daten sind in folgendem Diagramm zusammengestellt:

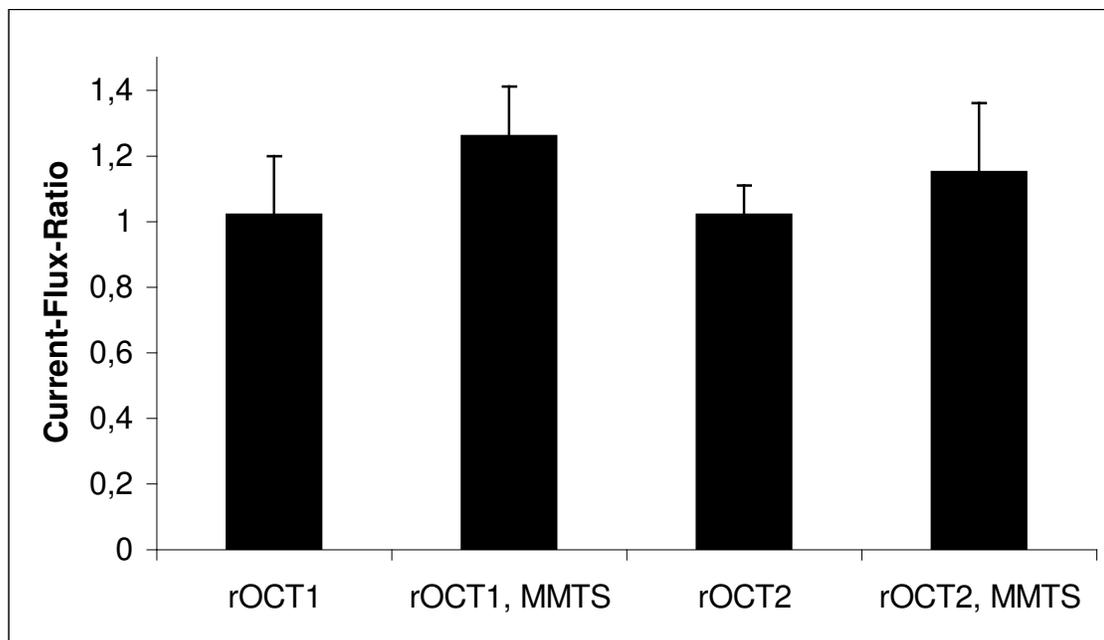


Abbildung 3.1-5: CFR von rOCT1 und rOCT2 jeweils vor und nach MMTS-Exposition (5 mM, 30s), $n \geq 8$ *

	vor MMTS	n =	nach MMTS	n =
rOCT1	$1,02 \pm 0,18$	10	$1,26 \pm 0,15$	8
rOCT2	$1,02 \pm 0,09$	8	$1,15 \pm 0,21$	10

Tabelle 3.1-7: CFR von rOCT1 und rOCT2 jeweils vor und nach MMTS-Exposition (5 mM, 30 s) $\pm SD$ *

Die Daten zeigen eine Stöchiometrie von 1 : 1 für die Translokation von ^{14}C -TEA und positiver Ladung, die nicht durch MMTS verändert wird.

* Der Großteil dieser Daten stammt aus Experimenten von Dr. B. Schmitt und P. Schlachtbauer.

3.1.8 Veränderung der Membrangesamtkapazität durch MMTS

Neben den schon gezeigten Veränderungen der rOCTs durch MMTS konnte durch eine erst neu im Labor etablierte Methode der Membrankapazitätsmessung an Oozyten [Schmitt und Koepsell, 2002] auch der Einfluss von MMTS auf die Gesamtkapazität der Oozytenmembran untersucht werden. Bei diesen Experimenten wurde die Membrankapazität kontinuierlich aufgezeichnet und zur Vermeidung von Artefakten durch Baselineschwankungen die MMTS-Konzentration auf 200 μM reduziert. Tabelle 3.1-88 zeigt die wichtigsten Daten dieser Experimente: Bei rOCT-injizierten Oozyten verändert MMTS im Gegensatz zu Kontrolloozyten signifikant die Membrankapazität. In Abbildung 3.1-6 sind drei repräsentative Messkurven (rOCT1, rOCT2 und Kontrolle) gegenübergestellt. Die durch 10 mM Cholin induzierten Ströme vor und nach MMTS-Exposition betragen für rOCT1 $-20,6 \pm 13,8$ nA und $-81,3 \pm 55,2$ nA sowie für rOCT2 $-101,2 \pm 14,2$ nA und $-58,9 \pm 8,1$ nA (MW \pm SD). Die Daten zeigen eine jeweils signifikante Zunahme der Kapazitäten an rOCT1- und eine Abnahme an rOCT2-injizierten Oozyten.

	ΔC [nF]	C_0 [nF]	n =	p=
Kontrolle	$0,26 \pm 0,51$	$213,64 \pm 34,94$	7	0,22
rOCT1	$1,21 \pm 0,94$	$186,44 \pm 16,10$	9	0,005
rOCT2	$-1,02 \pm 0,28$	$162,69 \pm 16,38$	5	0,001

Tabelle 3.1-8: Änderungen (ΔC) der Ausgangsmembrankapazität (C_0) nach MMTS-Inkubation (200 μM , 50 s), MW \pm SD; n: Anzahl der Experimente; p: Signifikanzniveau (gepaarter t-Test);

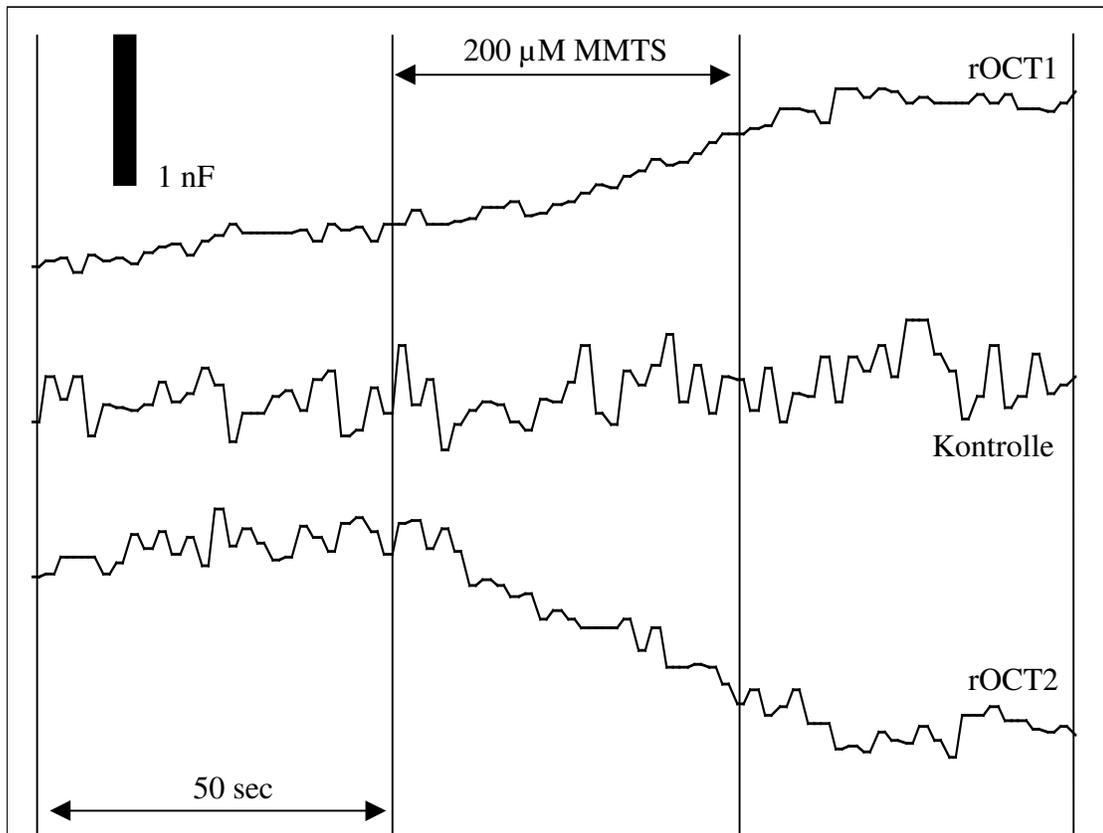


Abbildung 3.1-6: Originalmesskurven der Membrankapazität vor, während und nach Inkubation von Oozyten (rOCT1, rOCT2, Kontrolle) mit 200 µM MMTS (50 s)

3.1.9 Messung von cholininduzierten Kapazitätsänderungen

Wie unter 2.4.1 beschrieben, hat auch die Ladungsverschiebung von geladenen Molekülen durch Bindung und Dissoziation z. B. an rOCT1 Einfluss auf die Größe der Membrankapazität. In der Tat konnte in OCT-injizierten Oozyten eine Abnahme der Membrankapazität durch Superfusion mit Substraten (wie Cholin) oder Hemmstoffen (wie Tetrabutylammonium) gesehen werden. [Schmitt und Koepsell, 2005]

Diese Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit zur weiteren Charakterisierung des MMTS-Effekts genutzt. Tabelle 3.1-9 zeigt die erhobenen Daten.

	rOCT1	n =	rOCT2	n =
ΔC vor MMTS	$0,5 \pm 0,3$ nF	23	$3,7 \pm 1,9$ nF	20
ΔC nach MMTS	$1,4 \pm 0,8$ nF	22	$1,7 \pm 1,3$ nF	16
Faktor ΔC	$2,9 \pm 1,6$	22	$0,40 \pm 0,18$	16
Strom vor MMTS	-25 ± 14 nA	23	-192 ± 83 nA	20
Strom nach MMTS	-117 ± 57 nA	22	-75 ± 38 nA	16
Aktivierungsfaktor Strom	$5,0 \pm 2,2$	22	$0,39 \pm 0,20$	16
Quotient Strom : ΔC vor	57 ± 38 -nA/nC	23	59 ± 28 -nA/nC	20
und nach MMTS	112 ± 97 -nA/nC	22	60 ± 41 -nA/nC	16

Tabelle 3.1-9: *Änderung der Membrankapazität ΔC und des Strom induziert durch 10 mM Cholin und zugehörige (Aktivierungs-)faktoren sowie Quotienten aus substratinduzierter Strom- und Kapazitätsänderung vor und nach MMTS-Exposition (5 mM, 30 s). Strom: ΔC bei rOCT2 bleibt unverändert. Alle anderen erkennbaren Veränderungen von Parametern sind hochsignifikant ($p < 0,01$).*

Die substratinduzierte Kapazitätsänderung und der substratinduzierte Einwärtsstrom ändert sich nach MMTS-Exposition gleichsinnig (Zunahme bei rOCT1, Abnahme der rOCT2). Allerdings bleiben die Aktivierungsfaktoren für Strom und Kapazitätsänderung in rOCT2-injezierten Oozyten gleich, was sich in unveränderten Strom : ΔC -Quotienten ausdrückt. Der Strom : ΔC -Quotient für rOCT1 vor MMTS-Exposition liegt in der gleichen Größenordnung, ändert sich aber nach MMTS-Gabe signifikant. Auf die komplizierten Schlussfolgerungen, die möglicherweise aus diesen Daten abgeleitet werden können, wird im Diskussionsteil der Arbeit noch näher eingegangen. Die Kapazitätsänderung kann u. a. durch die Bindung von Substrat (Cholin) an den Transporter bedingt sein.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Veränderung der Membrankapazität ein konzentrationsabhängiger Effekt ist und nach Michaelis-Menten gefittet werden kann. Die ermittelten K_M -Werte lagen in der gleichen Größenordnung wie die K_M -Werte für cholininduzierte Ströme. Der Kapazitäts- K_M -Wert für Cholin beträgt für

rOCT1 $91 \pm 25 \mu\text{M}$ vs $760 \pm 210 \mu\text{M}$ (vor vs. nach MMTS-Exposition) und für rOCT2 $195 \pm 43 \mu\text{M}$ vs $350 \pm 60 \mu\text{M}$ ($n \geq 3$). Sie unterscheiden sich somit nicht wesentlich von den K_M -Werten für den substratinduzierten Einwärtstrom. Ein Teil dieser Messungen wurde von Dr. B. Schmitt und P. Schlachtbauer durchgeführt. Folgende Abbildungen zeigen exemplarisch jeweils ein Experiment an rOCT1- und rOCT2-injizierten Oozyten.

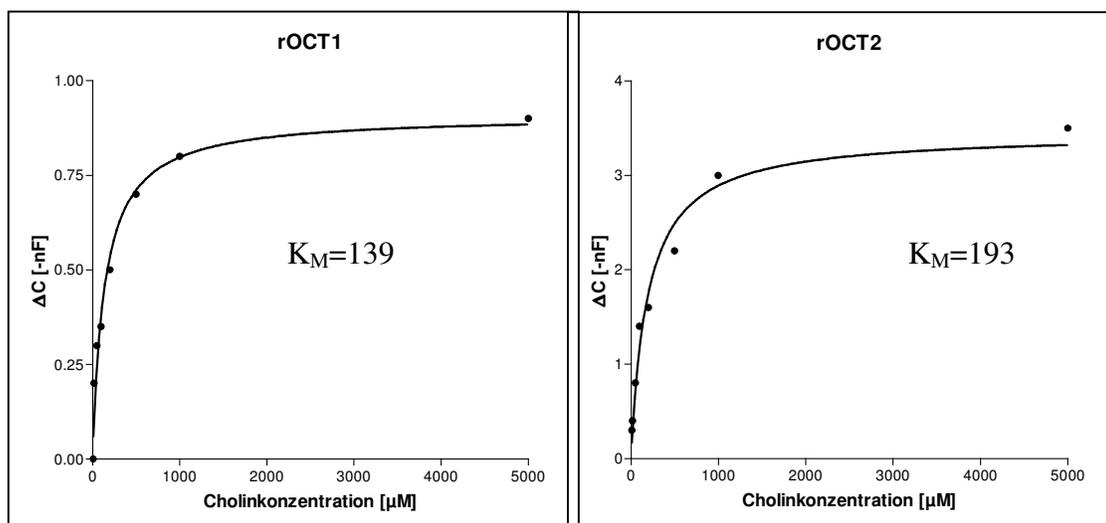


Abbildung 3.1-7: *Beispielkurven für die Bestimmung der Kapazitäts- K_M -Werte an rOCT1 und rOCT2-injizierten Oozyten*

3.1.10 Beeinflussung anderer OCTs durch MMTS

Die bisherigen Ergebnisse zeigen eine gleichsinnige Veränderung der Affinitäten (Strom und Kapazitätsmethode) und gegensinnige Veränderungen der Maximalströme und substratinduzierter Kapazitätsänderungen nach Modifikation rOCT1- bzw. rOCT2-injizierter Oozyten durch MMTS. Die Spannungsabhängigkeit sowie die Transportstöchiometrie werden durch MMTS nicht verändert.

Da einige Cysteine in den OCTs konserviert sind, stellt sich natürlich die Frage, ob auch andere Transporter dieser Familie durch MMTS verändert werden können. Als Screeningexperimente wurden im Rahmen dieser Arbeit substratinduzierte Ströme (10 mM Cholin) vor und nach Inkubation mit MMTS (5 mM, 30 s) verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1-10 zusammengestellt.

Transporter		I_{\max} vor MMTS	I_{\max} nach MMTS	Akt.-fakt.	n
rOCT1	↑	- 18 ± 13 nA	- 107 ± 82 nA	7,6 ± 3,7	46
rOCT2	↓	- 211 ± 130 nA	- 61 ± 42 nA	0,30 ± 0,17	21
rOCT3	→	- 1,8 ± 0,7 nA	- 1,7 ± 0,8 nA	0,92 ± 0,08	3
rOCT3 Guanidin	→	- 2,6 ± 1,2 nA	- 2,7 ± 1,2 nA	1,1 ± 0,1	4
hOCT1	→	- 4,6 ± 0,9 nA	- 4,5 ± 1,0 nA	0,97 ± 0,05	3
hOCT2	→	- 15 ± 14 nA	- 14 ± 13 nA	1,1 ± 0,2	4
mOCT1	↑	- 0,8 ± 0,7 nA	- 6,8 ± 8,0 nA	6,6 ± 3,7	3

Tabelle 3.1-10: *Effekt von MMTS (5 mM, 30 s) auf unterschiedliche Transporter der OCT-Familie (Substrat 10 mM Cholin, rOCT3 auch 50 mM Guanidin)*

Die Daten zeigen, dass die humanen OCTs durch MMTS nicht beeinflussbar sind. Die substratinduzierbaren Ströme von rOCT3 und der mOCTs waren so klein, dass sie mit der Two-Electrodes-Voltage-Clamp-Technik nur bei optimalen Messbindungen gerade noch auflösbar waren. Es konnte aber für rOCT3 klar gezeigt werden, dass sich Ströme vor und nach MMTS-Exposition nicht verändern. mOCT1 ist durch MMTS aktivierbar. Ströme von mOCT2 und mOCT3 waren nicht mehr klar auflösbar. Für die beiden hOCTs konnte auch keine signifikante Änderung TEA-induzierter Ströme nachgewiesen werden.

Nachdem der MMTS-Effekt auf eine ganze Reihe von Messparametern mit unterschiedlichen Methoden charakterisiert und der Effekt auch an anderen Transportern der OCT-Familie untersucht wurde, konnte die funktionelle Charakterisierung als abgeschlossen betrachtet werden. Die nächste Frage, die sich natürlich stellte, war, welche SH-Gruppe(n) für diese unterschiedlichsten Effekte verantwortlich ist (sind). Experimente, die zur Klärung dieser Frage beitrugen, werden im Folgenden beschrieben.

3.2 Versuche zur Lokalisation der MMTS-Bindungsstelle

Nach gründlicher Literaturrecherche (siehe 1.3) mussten folgende Hypothesen Eingang in die Planung der nachfolgenden Experimente, die im Wesentlichen an rOCT1 durchgeführt werden sollten, finden:

1. Es handelt sich bei der SH-Gruppe um eine der 16 SH-Gruppen von rOCT1
2. Es sind mehrere SH-Gruppen von rOCT1 für den Effekt nötig
3. Es handelt sich um SH-Gruppen eines *Xenopus*-eigenen Regulatorproteins

3.2.1 Versuche mit anderen MTS-Derivaten

Zunächst sollte geklärt werden, ob sich die verantwortlichen Cysteine intra- oder extrazellulär befinden. Dazu wurden zunächst die extrazellulären Cysteine mit dem nichtpermeablen MTSES blockiert, welches selbst keinen Einfluss auf rOCT1 hat. Nach Blockade war rOCT1 immer noch mit MMTS (5 mM, 30 s) aktivierbar. Die verantwortlichen SH-Gruppen liegen also nicht extrazellulär.

Weiterhin wurden Experimente durchgeführt, die zwar mit Vorsicht zu interpretieren sind, die aber Indizien dafür erbrachten, dass die gesuchten SH-Gruppen nicht im Zytoplasma, sondern eher in der Plasmamembran oder membrannah liegen. Es konnte wegen technischer Schwierigkeiten dieses Experiments an nur einer Oozyte gezeigt werden, dass durch Injektion von 51 nl MMTS (5 mM) während der Messung keine Aktivierung von guanidininduzierten Strömen zu erzielen war. Bei Zugrundelegung eines Oozytenvolumens von 1 μ l entspricht dies einer intrazellulären MMTS-Konzentration von ca. 250 μ M. Bei einer weiteren Oozyte wurde die gleiche Menge MMTS vor der Messung injeziert, die substratinduzierten Ströme lagen in der Größenordnung des Wildtyps vor Aktivierung. Außerdem konnte an 3 Oozyten gezeigt werden, dass nach Injektion von 23 nl einer Lösung mit 500 mM Cystein, 515 mM KCl, pH 7 (mit KOH) zur Erhöhung der intrazellulären SH-Gruppendichte eine Aktivierung mit MMTS (500 μ M) von aussen immer noch möglich war. Bei Koinkubation mit Cystein und MMTS extrazellulär konnte rOCT1 nicht aktiviert werden.

Diese Ergebnisse sind höchstwahrscheinlich so zu interpretieren, dass MMTS in der Plasmamembran selbst oder zumindest membrannah wirken muss, da es nach

Injektion durch intrazelluläre SH-Gruppen abgefangen wird und bei Gabe von außen bei intrazellulärem SH-Gruppenüberschuss keinen Effekt zeigt.

3.2.2 MMTS-Effekt an Cysteinmutanten von rOCT1

Zur Identifikation der verantwortlichen SH-Gruppen wurden einzel- und mehrfachcysteinlose Mutanten von rOCT1 erstellt und diese auf Aktivierbarkeit durch MMTS untersucht. Da Mutanten nach Ersetzen eines Cysteins der extrazellulären Schleife weitgehend funktionslos waren, konnten elektrophysiologische Messungen mit diesen nicht durchgeführt werden. Da diese Cysteine aber aller Voraussicht nach extrazellulär liegen und möglicherweise sogar Disulfidbrücken bilden könnten, sind sie für den MMTS-Effekt weniger interessant.

Es konnte gezeigt werden, dass alle anderen Einfach- oder Mehrfachmutanten von rOCT1, bei denen Cystein zu Alanin oder Serin mutiert war, ausreichend aktiv waren, um elektrophysiologische Messungen durchzuführen. Bis auf einige Ausnahmen lagen die maximalen substratinduzierbaren Ströme im Bereich derer des Wildtys. Alle Einzelmutanten konnten durch MMTS aktiviert werden. Tabelle 3.2-1 zeigt die Ausgangsströme und die Aktivierungsfaktoren der Mutanten. In der 9xΔC-Mutante sind alle Cysteine mit Ausnahme der Schleifencysteine und des Cysteins 451 zu Alanin oder Serin mutiert. Die 10xΔC-Mutante ist das Cystein 451 der 9xΔC-Mutante zu Alanin mutiert. Da elektische Messungen an der 10xΔC-Mutante schwierig sind, wurden der K_M -Wert von Cholin und die CFR an 9xΔC-Mutante auf Veränderungen durch MMTS untersucht. Für den K_M -Wert zeigte sich keine signifikante Veränderung von 353 ± 183 auf 582 ± 353 ($n \geq 5$; $p=0,1$).

Transporter	I_{\max} vor MMTS	Akt.-fakt.	n	p^*
rOCT1-WT	- 18 ± 13 nA	7,6 ± 3,7	46	-
C26A	- 17,7 ± 4,0 nA	6,4 ± 0,6	3	0,08
C155A	- 6,4 ± 1,9 nA	6,4 ± 1,9	5	0,26
C179A	- 16,6 ± 13,2 nA	4,9 ± 3,1	4	0,35
C322S	- 17,3 ± 4,5 nA	2,9 ± 0,6	9	< 0,01
C358A	- 9,3 ± 5,0 nA	4,2 ± 1,6	3	0,14
C418A	- 7,5 ± 4,4 nA	5,6 ± 1,3	3	0,12
C437S	- 1,6 ± 0,6 nA	12,1 ± 3,5	3	0,19
C451A	- 2,4 ± 2,1 nA	1,14 ± 0,09	3	< 0,01
C451A Guanidin	- 3,5 ± 3,1 nA	1,06 ± 0,11	7	-
C470A	- 3,6 ± 1,1 nA	5,9 ± 1,6	3	0,36
C474A	- 20,6 ± 17,3 nA	6,0 ± 2,1	5	0,19
9 x ΔC	- 53,7 ± 83,0 nA	1,7 ± 0,5	11	< 0,01
10 x ΔC	- 1,9 ± 1,1 nA	1,07 ± 0,13	6	< 0,01
10 x ΔC Guanidin	- 3,6 ± 2,0 nA	1,3 ± 0,3	6	-

Tabelle 3.2-1: *Substratinduzierte Ströme (10 mM Cholin bzw. 50 mM Guanidin) und Aktivierungsfaktoren durch MMTS (5 mM, 30 s) an einfach- oder mehrfachcysteinlosen Mutanten von rOCT1; n: Anzahl der Experimente; p: Ergebnis des t-Tests (Aktivierungsfaktor des Wildtyps vs. Mutante)*

Die Aktivierungsfaktoren für cholininduzierte Ströme unterscheiden sich in vier Mutanten signifikant von dem des Wildtyps. All diesen Mutanten ist gemeinsam, dass entweder C322 oder C451 oder beide fehlen. Aus diesem Grund wurden noch weitere Mutanten von rOCT1 erstellt. Methionin wurde eingesetzt, da diese Aminosäure strukturell dem mit MMTS modifizierten Cystein sehr ähnlich ist. Man erhoffte sich

damit deutlich höhere Ströme auch bei C451-Mutanten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.2-2 zu sehen. Tatsächlich ist der Einwärtsstrom in C451M-Mutanten höher als im Wildtyp. Die C451M/C322S-Mutante konnte durch MMTS nicht mehr aktiviert werden. Die Aktivierungsfaktoren lagen mit $p < 0,001$ hochsignifikant unter denen der jeweiligen Einzelmutanten und unterschieden sich nicht von 1,0.

Transporter	I_{\max} vor MMTS	Akt.-fakt.	n	p *
rOCT1-WT	- 18 ± 13 nA	7,6 ± 3,7	46	-
C451M	- 29 ± 13 nA	2,1 ± 0,6	14	< 0,01
C322S	- 17,3 ± 4,5 nA	2,9 ± 0,6	9	< 0,01
C451M/322S	- 66 ± 36 nA	1,0 ± 0,1	12	< 0,01

Tabelle 3.2-2: *Substratinduzierte Ströme (10 mM Cholin) und Aktivierungsfaktoren durch MMTS (5 mM, 30 s) an einfach- oder mehrfachcysteinlosen Mutanten von rOCT1; n: Anzahl der Experimente; p: Ergebnis des t-Tests (Aktivierungsfaktor des Wildtyps vs. Mutante)*

Aufgrund dieser Experimente konnten die Cysteine 451 und 322 als ursächlich für den MMTS-Effekt identifiziert werden. Nachdem diese Mutanten identifiziert waren, wurden auch andere Parameter hinsichtlich des MMTS-Effektes untersucht (Daten Dr. B. Schmitt, P. Schlachtbauer und des Autors). In der C451M-Mutante waren die K_M -Werte für Cholin durch MMTS nicht signifikant zu verändern ($210 \pm 40 \mu\text{M}$ vor und $180 \pm 50 \mu\text{M}$ nach MMTS, $n \geq 3$). Der Aktivierungsfaktor für ΔC lag für C451M mit $1,7 \pm 0,2$, $n=3$, ähnlich wie der des Stromes. Dies deutet darauf hin, dass die Menge von rOCT1 in der Membran erhöht wurde. Der Strom : ΔC -Quotient der C451M-Mutante lag im Bereich des Wildtyps ($57 \pm 32 \text{ -nA/nF}$, $n=3$) und blieb nach MMTS-Exposition unverändert.

In der C322S-Mutante wurden konstante Strom : ΔC -Quotienten ermittelt ($59 \pm 12 \text{ -nA/nF}$ vs. $45 \pm 8 \text{ -nA/nF}$ vor und nach MMTS-Gabe, $n=4$). Die K_M -Werte für Cholin waren nicht signifikant zu verändern ($400 \pm 140 \mu\text{M}$ vs. $780 \pm 100 \mu\text{M}$, $p < 0,01$, $n=4$).

Die Cysteine an Position 322 und 451 sind für die Entstehung des MMTS-Effektes essentiell. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich die Modifikationen beider Cystein additiv ergänzen, um alle am Wildtyp gezeigten Veränderungen nach MMTS zu induzieren. Die Veränderung der Affinitäten und des Strom : ΔC -Quotienten kann nur durch Modifikation beider Cysteine erreicht werden. Eine Aktivierung der Einwärtsströme, wahrscheinlich durch einen vermehrten Membraneinbau, ist auch in den jeweiligen Einzelmutanten zu sehen.

3.2.3 Mutanten von rOCT2

Da diese Arbeit sich hauptsächlich mit rOCT1 befassen sollte, wurde an rOCT2 nur die interessante Position 451 näher untersucht und ebenfalls eine C451M hergestellt (Tabelle 3.2- 3). Das Cystein 322 fehlt in rOCT2. Durch das Einführen von Methionin an der Position 451 konnte (ähnlich wie durch MMTS) eine Hemmung des maximalen substratinduzierbaren Stroms gesehen werden.

Transporter	I_{\max} vor MMTS	Akt.-fakt.	n	p
rOCT2	- 211 \pm 130 nA	0,30 \pm 0,17	21	-
C451M	- 120 \pm 59 nA	0,98 \pm 0,09	17	< 0,01

Tabelle 3.2- 3: *Substratinduzierte Ströme (10 mM Cholin) und Aktivierungsfaktoren durch MMTS (5 mM, 30 s) an rOCT2 und dessen C451M-Mutante; n: Anzahl der Experimente; p: Ergebnis des t-Tests (Aktivierungsfaktor des Wildtyps vs. Mutante)*

Die K_M -Werte für Cholin der C451M-Mutante von rOCT2 (617 \pm 41 μ M vor und 787 \pm 111 μ M nach MMTS) waren nicht signifikant unterschiedlich ($p=0,34$; $n \geq 6$). Da das Cystein 322 in rOCT2 nicht existiert (vgl. 1.5), war zu erwarten, dass der MMTS-Effekt an rOCT2 ausschließlich durch die Modifikation von C451 bedingt ist. Durch die fehlende Änderung des substratinduzierbaren Stromes und der Affinitäten nach MMTS-Exposition der C451M-Mutante von rOCT2 wird diese These bestätigt.

4 Diskussion

4.1 Effekte von MMTS auf die Wildtypen rOCT1 und 2

Am Beginn dieser Arbeit wurden die Effekte verschiedener MTS-Reagenzien auf die SH-Gruppen von rOCT1 untersucht. Dabei wurde mit MMTS eine Substanz gefunden, welche durch Modifikation von SH-Gruppen die funktionellen Eigenschaften von rOCT1 und rOCT2 grundlegend verändert. Zur Charakterisierung dieses MMTS-Effektes wurden cRNAs der Transporter und Mutanten in *Xenopus laevis*-Oozyten injiziert und die „Two-Electrodes-Voltage-Clamp-Technique“ in allen Variationen eingesetzt. Außerdem erfolgte erstmals an den OCTs die simultane Messung von Strom und Tracer-Aufnahme.

Es konnte für den rOCT1 eine starke Aktivierung der maximalen substratinduzierbaren Einwärtsströme für Cholin, Guanidin, TEA und Acetylcholin gezeigt werden. Ebenso waren Efflux-Ströme durch Cholin stark aktivierbar. Die Affinitäten aller getesteten (relativ kleinen) Substrate nahmen nach Modifikation mit MMTS stark ab, wohingegen die Affinitäten der (eher großen) Hemmstoffe Cyanin 863 und Tetrapentylammonium konstant blieben oder eher zunahmen. Die Stöchiometrie von Ladungs- und Teilchenaufnahme (gemessen mit TEA) lag bei 1 : 1 und wurde durch MMTS nicht verändert. Weiterhin konnte eine Zunahme der Membrankapazität rOCT1-injektierter Oozyten durch MMTS nachgewiesen werden. Weiterhin wurden die substratinduzierten Kapazitätsänderungen durch Cholin untersucht. Dabei zeigte sich eine deutliche Zunahme von ΔC nach MMTS-Gabe. Allerdings lag der Faktor für die Aktivierung von ΔC deutlich niedriger als der für den Strom, was in einer deutlichen Zunahme des Strom: ΔC -Quotienten zum Ausdruck kam. Die K_M -Werte für die Kapazitätsänderungen lagen im Bereich der Werte für den Strom.

Auch die Eigenschaften von rOCT2 waren durch MMTS stark zu verändern. Die Substrataffinität war der einzige Parameter, der an rOCT1 und rOCT2 in die gleiche Richtung verändert wurde. Auch am rOCT2 konnte eine starke Abnahme der Cholinaffinität gezeigt werden. Die CFR (Strom-Flux-Verhältnis) lag ebenso konstant bei 1 : 1. Alle anderen untersuchten Größen verändern sich bei rOCT2 in

entgegengesetzter Richtung: Es kam zu einer Hemmung der maximal induzierbaren Ströme sowohl im Influx als auch im Effluxmode. Ebenso kam es zu einer Reduktion der Membrankapazität an rOCT2-exprimierenden Oozyten. Auch die substratinduzierten Kapazitätsveränderungen wurden nach MMTS kleiner. Im Gegensatz zu rOCT1 war der Faktor für ΔC identisch mit dem Faktor für den Strom, d. h. der Strom : ΔC -Quotient, der vor MMTS im Bereich von rOCT1 liegt, änderte sich im Gegensatz zu rOCT1 nach MMTS-Exposition nicht.

Vor allem die Änderung von Substrataffinitäten lässt auf eine Veränderung der funktionellen Eigenschaften der untersuchten Transporter schließen. Am ehesten ist hierfür eine Konformationsänderung der Transporter mit einer geringfügigen strukturellen Veränderung der Substratbindungsregion ursächlich. Unterstützt wird diese These zum einen durch die Tatsache, dass sich die Substratspezifität der Transporter nach MMTS-Exposition ändert. So kommt es zu einer Zunahme des K_M -Wertes für Cholin um den Faktor $8,51 \pm 5,32$ und für TEA um den Faktor $1,87 \pm 0,47$ ($n=5$). Diese beiden Faktoren sind gerade noch signifikant unterschiedlich ($p=0,05$). Zum anderen bleibt die Affinität des Inhibitors Cyanin 863 gleich und die Affinität von Tetrapentylammonium nimmt nach MMTS-Exposition eher zu.

Bislang ist nicht komplett geklärt, wie polyspezifische Transporter auf der einen Seite strukturell sehr unterschiedliche Moleküle transportieren und zum anderen aber eine kleine Veränderung der Molekülstruktur ein Substrat zum Inhibitor werden lässt. Die gängige und zunehmend wahrscheinlichere Hypothese ist, dass die OCTs eine Substratbindungsregion besitzen, die über mehrere Bindungsstellen für Substrate und Inhibitoren z. T. an unterschiedlichen Stellen verfügt [Arndt et al., 2001; Dresser et al., 2001; van Monfoort et al., 2001; Volk et al., 2003; Popp et al., 2005]. Durch Modifikation mit MMTS könnten diese unterschiedlichen Substrat- und Inhibitorbindungsstellen mehr oder weniger stark verändert werden. Das Modell wird in Abbildung 4.1-1 verdeutlicht.

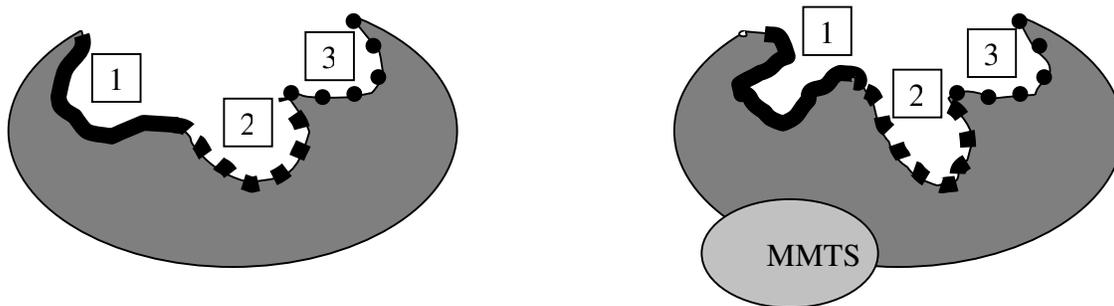


Abbildung 4.1-1: Modell der postulierten Substrat- und Inhibitorbindungstasche von rOCT1. 1: Die Bindungsstelle für Cholin erfährt nach MMTS-Exposition eine starke Konformationsänderung. 2: Die Bindungstasche für TEA ändert auch die Konformation, aber weniger ausgeprägt. 3: Die Bindungsregion für Cyanin 863 bleibt weitgehend unverändert.

Neben der Änderung des K_M -Wertes, also eines eindeutig funktionellen Parameters, lassen die Änderungen der maximal induzierbaren Ströme mehrere Schlüsse zu: Zum einen kann wiederum durch Änderung funktioneller Transportereigenschaften die Translokation des Substrates über die Membran beschleunigt erfolgen (Turnoverrate). Zum anderen kann sich aber auch die Anzahl der Transportermoleküle in der Membran verändern, was auch eine Zunahme des Maximalstromes, aber ohne Veränderung der Transporterfunktion, zur Folge hätte. Die Kapazitätsmessungen im Rahmen dieser Arbeit waren ein Ansatz, der zur Klärung dieser offenen Frage beitragen kann.

In die apparente Membrankapazität einer Oozyte gehen mehrere Variablen ein. Wie in einem einfachen Kondensator mit konstanter Dielektrizitätskonstante ist die Membrankapazität proportional der Membranoberfläche. Damit kann die Membrankapazität zur Untersuchung von Endo- und Exocytoseprozessen genutzt werden. Natürlich gibt es aber in einer lebenden Zelle mit verschiedensten Membranproteinen und elektrischen Prozessen an der Membranoberfläche noch andere Einflussfaktoren auf die Kapazität. Kapazitätveränderungen kommen u. a. auch durch Ladungsverschiebung im elektrischen Feld zustande. Für solche Ladungsverschiebungen kommen im Wesentlichen zwei Mechanismen in Betracht:

Erstens die Bindung und Dissoziation von geladenen Molekülen an Membranproteine und zum anderen die Translokation von Ladung über die Membran z. B. durch Konformationsänderung von Proteinen mit Verschiebung geladener Aminosäurereste. Solch eine Konformationsänderung könnte u. a. auch durch eine Substratbindung verursacht sein. [Schmitt und Koepsell, 2002 und 2005]

Es muss angenommen werden, dass für die starke Aktivierung der maximal induzierbaren Ströme an rOCT1 neben einer erhöhten Turnoverrate auch eine Translokation von rOCT1-Molekülen auf die Membranoberfläche verantwortlich ist. Gestützt wird diese These durch die Zunahme der (substratunabhängigen) Membrankapazität von rOCT1-injizierten Oozyten nach Superfusion mit MMTS. Diese Beobachtung ist am ehesten durch Exozytosevorgänge zu erklären. Eine Veränderung der Dielektrizitätskonstante der Membran durch Eindiffundieren des lipophilen MMTS scheidet als Erklärung aus, da an Kontrolloozyten kein Effekt und an rOCT2-injizierten Oozyten eine Abnahme der Membrankapazität beobachtet wurde. Der zweite Befund innerhalb dieser Arbeit, der die Hypothese des vermehrten Membraneinbaus stützt, ist die Zunahme der substratinduzierten Kapazitätsänderungen durch Cholin. Die Prozesse, die zu einer substratinduzierten Änderung der Membrankapazität führen, sind komplex und nur unvollständig verstanden. Wie bereits erwähnt, sind Ladungsverschiebungen durch Bindung bzw. Dissoziation von Substraten oder durch Konformationsänderung von Proteinen ursächlich. Eine Zunahme von ΔC , die sich alleine aus der Zunahme des induzierbaren Stromes erklärt ist unwahrscheinlich, da auch Inhibitoren, die keinen Strom erzeugen, eine deutliche Membrankapazitätsveränderung zur Folge haben. [Schmitt und Koepsell, 2005]

Allerdings können diese Kapazitätsbefunde auch anders diskutiert werden: Möglich wäre auch eine Konformationsänderung des Proteins im Rahmen des MMTS-Effektes, welche durch Verschiebung von Ladungen im Protein zu einer Änderung der absoluten Membrankapazität führt. Auch könnten diese verschobenen Ladungen für eine Zunahme der substratinduzierten Kapazitätsänderungen verantwortlich sein.

Abbildung 4.1-2 und -3 zeigen die postulierten Mechanismen, die zu einer Aktivierung des substratinduzierten Stroms und der substratinduzierten

Kapazitätsänderungen beitragen könnten. Bis ins Detail konnten diese jedoch innerhalb dieser Arbeit nicht geklärt werden. Insbesondere ist nicht geklärt, ob die in Abbildung 4.1-2 erwähnte Konstanz der substratinduzierten Kapazitätsänderung am einzelnen Transporter der Wirklichkeit entspricht.

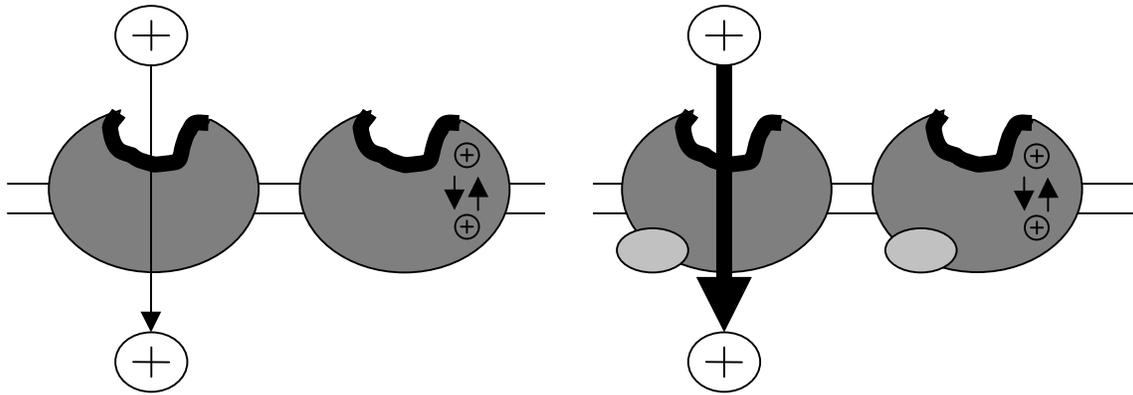


Abbildung 4.1-2: Links: vor MMTS-Exposition entsteht ein bestimmter substrat-induzierter Einwärtsstrom und eine bestimmte substratinduzierte Kapazitätsänderung. Rechts: nach MMTS-Gabe ändert sich die Turnoverrate des einzelnen Transporters resultierend in einer Aktivierung des Einwärtsstromes. Die substratinduzierte Kapazitätsänderung ändert sich nicht oder nur geringfügig.

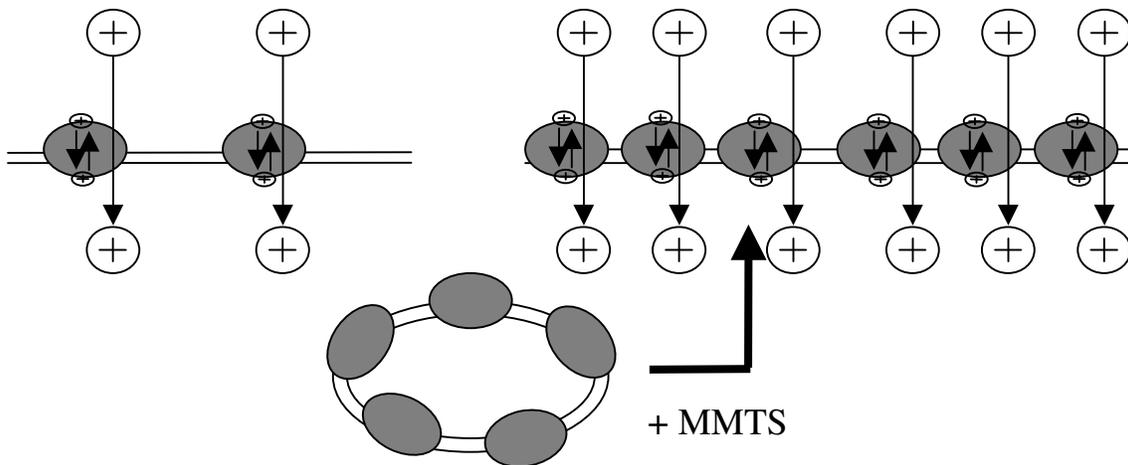


Abbildung 4.1-3: Nach MMTS-Exposition kommt es zu einer Zunahme der Transportermoleküle in der Plasmamembran und damit sowohl zu einer Aktivierung des substratinduzierten Stroms als auch der substrataktivierten Kapazitätsänderung

4.2 Die Cysteine 322 und 451 des rOCT1

4.2.1 Identifikation der für den MMTS-Effekt relevanten SH-Gruppen

Für die Entstehung der beschriebenen und diskutierten funktionellen Veränderungen kommen v. a. zwei Mechanismen in Frage: Erstens könnte eine Modifikation einer oder mehrerer SH-Gruppen von rOCT1 selbst und zweitens die Modifikation von regulatorischen Proteinen zu dem MMTS-Effekt führen.

Obwohl MMTS seit über 20 Jahren in der Proteinchemie eingesetzt wird, gibt es nur vergleichsweise wenige Arbeiten mit MMTS an *Xenopus laevis* Oozyten. Dies hängt möglicherweise mit der unspezifischen Hemmung von Proteinen in den Oozyten bei Anwendung von MMTS mit den für MTS-Derivaten üblichen Konzentrationen und Inkubationszeiten zusammen. Ähnlich wie in dieser Arbeit wurde auch am Natrium/Phosphat-Cotransporter der Ratte (NaPi IIa) eine Hemmung des ³²P-Aufnahmes durch 1 mM MMTS bei 5 min Inkubationszeit gesehen, die auch an allen Cysteineinzelmutanten nachgewiesen werden konnte und höchstwahrscheinlich als unspezifisch einzuordnen ist. [Lambert et al., 2000]

Für beide mögliche Mechanismen zur Entstehung des MMTS-Effektes existieren Beispiele in der Literatur: Bereits 1988 konnte die CO₂-Hydratationsaktivität der Carboanhydrase von bovinen Myozyten durch MMTS stark aktiviert werden, was auf die Modifikation proteineigener SH-Gruppen zurückgeführt wurde. [Ren et al., 1988] Es ist aber auch bekannt, dass der cardiale sarcolemmale Na⁺-Ca²⁺-Austauscher durch Injektion von 5 pmol MTSET in *Xenopus* Oozyten aktiviert werden kann, wobei diese Aktivierung nicht durch eine Modifikation proteineigener Cysteine zustande kommt. Es war auch die cysteinfreie Mutante des Transporters aktivierbar. Es wurde die Existenz eines inhibitorischen Faktors postuliert, der durch Reaktion mit dem MTS-Reagenz inaktiviert wird. [Nicoll et al., 1999]

Da der Effekt aufgrund von Modifikation einer OCT-eigenen SH-Gruppe wahrscheinlicher schien, wurden zunächst alle Cysteine zu Alanin oder Serin mutiert. Die Schleifencysteine konnten dabei nicht berücksichtigt werden, da nach ihrer Mutation weitgehend inaktive Mutanten entstanden. Außerdem ist die Beteiligung der

Schleifencysteine am MMTS-Effekt (wie im Ergebnisteil erwähnt) eher unwahrscheinlich. Nachdem alle Mutanten auf ihre Aktivierbarkeit durch MMTS untersucht waren, war klar, dass nicht eine einzige SH-Gruppe für den Effekt verantwortlich sein konnte. Allerdings fiel auf, dass die Aktivierungsfaktoren der Mutanten C451A und C322S signifikant kleiner waren als die des Wildtyps. Da die C451A-Mutante nur geringe Ströme zeigte, wurde eine C451M-Mutante hergestellt, die elektrophysiologisch gut gemessen werden konnte.

Schließlich konnte bestätigt werden, dass die Doppelmutante C322S/C451M keine Veränderungen des Stromes nach MMTS-Exposition mehr zeigt. Am wahrscheinlichsten liegt dem Effekt also die kovalente Modifikation dieser Cysteine selbst zugrunde. Allerdings ist auch eine veränderte Regulation der doppelcysteinfreien Mutante durch ein *Xenopus*-eigenes Regulatorprotein denkbar. Der fehlende MMTS-Effekt an hOCT1 trotz Präsenz einer zu C451 homologen Cysteingruppe und eine möglicherweise persistierende K_M -Wert-Änderung der C322S/C451M-Doppelmutante von rOCT1 nach MMTS-Exposition sprechen für die letztere Hypothese. Ebenso wird die These der Existenz eines Regulatorproteins durch den fehlenden MMTS-Effekt an rOCT1, exprimiert in HEK-Zellen, und an in Liposomen rekonsituiertem rOCT1. [Keller et al., 2005] Auch die Notwendigkeit einer Modifikation dieses postulierten *Xenopus*-eigenen Regulatorproteins durch MMTS für das Zustandekommen des MMTS-Effektes ist nicht ausgeschlossen.

Zweifelsfrei sind mit den Cysteinen 322 und 451 Aminosäuren in funktionell bedeutsamen Regionen der OCTs identifiziert worden.

4.2.2 Die Proteinregionen um C322 und C451

Das Cystein an Position 451 ist das einzige Cystein außerhalb der großen extrazellulären Schleife, das nach Mutation zu Alanin oder Serin eine stark verminderte Transportaktivität von rOCT1 zur Folge hatte. In der C451S-Mutante ist lediglich ein Schwefel- durch ein Sauerstoffatom ausgetauscht. Wurde aber an dieser Stelle eine größere Aminosäure, nämlich Methionin, eingeführt, resultierte eine deutliche Zunahme der maximalen substratinduzierten Ströme. Wie schon beschrieben, zeigt diese Arbeit auch eine herausragende Rolle des Cysteins 451 für den MMTS-Effekt an rOCT1 und rOCT2, unabhängig davon, durch welche

Mechanismen er genau zustande kommt. Das Cystein 451 liegt zwischen der TMD 10 und der kurzen Schleife, die TMD 10 und 11 verbindet. Die Aminosäuren 451 bis 460 sind in allen organischen Kationentransportern konserviert. Fünf davon (ELYPT) sogar in der gesamten SLC22-Familie. [Koepsell et al., 2003] Beim Recherchieren in der Literatur finden sich weitere Daten, die die große funktionelle Relevanz dieser Region belegen. Es konnte gezeigt werden, dass drei Aminosäuren in unmittelbarer Nachbarschaft in der 10. TMD (A443, L447 und Q448) über die Affinität von rOCT1 oder rOCT2 zu Corticosteron entscheiden [Gorboulev et al., 2005].

Auch am Natrium-Carinitin-Kotransporter hOCTN2 konnten verschiedene funktionell sehr wichtige Aminosäuren in der besagten Region identifiziert werden. Die V446F- und E452K-Mutante zeigen keinen bzw. einen stark reduzierten Karnitintransport [Mayatepek et al., 1999; Wang et al., 2000]. Verschiedene Mutationen von E452 zeigten weiterhin eine stark veränderte Natriumkonzentration zur halbmaximalen Stimulation des Karnitintransportes [Wang et al., 2000].

Die beschriebenen Mutationen liegen in unmittelbarer Nachbarschaft zum Cystein 451 von rOCT1 und rOCT2. Nach MMTS-Behandlung von C451M-injizierten Oozyten kommt es zu keiner Veränderung des K_M -Wertes für Cholin (unpub. Daten Dr. B. Schmitt) und zu keiner Veränderung des Strom : ΔC -Quotienten. Hieraus lässt sich schließen, dass die beschriebene Region im Rahmen des MMTS-Effektes zu einer Veränderung der Affinitäten und der Substratspezifität sowie für einen möglicherweise vermehrten Membraneinbau essentiell ist. Dieses wichtige Cystein 451 liegt genau 4 Positionen von L447 entfernt, was im Modell der α -Helix eine unmittelbare Nachbarschaft bedeutet. Damit ist C451 entweder in der Substratbindungsregion oder in unmittelbarer Nähe lokalisiert. Es scheint entscheidend am Erhalt einer funktionsfähigen Bindungstasche beteiligt zu sein, da bereits eine kleine Veränderung (wie in der C451A-Mutante) zu einer starken Hemmung des Transportes führt.

Die zweite interessante Proteinregion befindet sich in der großen intrazellulären Schleife, dem Bereich, dem das Cystein 322 angehört. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach Mutation von C322 zu Serin der MMTS-Effekt nicht mehr in voller Ausprägung auftrat. Zwar konnten substratinduzierter Strom und Kapazitätsänderung

in einem geringeren Ausmaß als beim Wildtyp noch aktiviert werden. Der Strom : ΔC -Quotient blieb jedoch konstant. Auch ein Effekt auf die Affinität von Cholin konnte noch nachgewiesen werden. Da sowohl in der C322S- als auch in der C451M-Mutante von rOCT1 aber auch im rOCT2-Wildtyp (in dem C322 fehlt) der Strom : ΔC -Quotient nach MMTS-Exposition unverändert blieb, kann daraus auf eine Interaktion der Cysteine 322 und 451 innerhalb der Tertiärstruktur des Proteins geschlossen werden. Offensichtlich ist das Vorhandensein beider für die Änderung des Quotienten und damit für die Veränderung der Turnoverrate des einzelnen Transportermoleküls notwendig.

Es gibt bislang nur wenige Daten in der Literatur über die Bedeutung der intrazellulären Schleife für die organischen Kationen- und Anionentransporter. Es befinden sich dort vor allem Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase C. [Ciarimboli und Schlatter, 2004] Das Serin an Position 328 ist nur wenige Aminosäuren von C322 entfernt. In dieser Arbeit nachfolgenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von rOCT1 mittels Dioctanoylglycerol über die Proteinkinase C nach Mutation von C322 nicht mehr stattfand und sich nach Mutation von C451 sogar in eine Inhibition umkehrte. Dies lässt wiederum den Schluss auf eine konformationelle Interaktion zwischen den beiden Cysteinen zu, welche für die Regulation durch die Proteinkinase C wichtig ist. Möglicherweise befinden sich also Teile dieser intrazellulären Schleife in struktureller Nähe zu C451 und damit zur Substratbindungsregion. Diese Vermutung steht in Einklang mit den in der Einleitung erwähnten Experimenten mit Mutanten mit fehlenden PKC-Phosphorylierungsstellen.

4.3 Der MMTS-Effekt an OCTs anderer Spezies

Neben rOCT1 und rOCT2 wurden auch maximal induzierbare Ströme anderer Transporter der OCT-Familie auf ihre Aktivierbarkeit bzw. Hemmbarkeit durch MMTS untersucht. Ströme durch 10 mM Cholin und 50 mM Guanidin an rOCT3-injizierten Oozyten waren durch MMTS nicht zu verändern. Allerdings konnten die bei [Kekuda et al., 1998] beschriebenen Ströme von weit über 10 nA mit 5 mM TEA mit der in dieser Arbeit verwendeten cRNA nicht erreicht werden. Ein weiterer Nagetier-OCT, mOCT1 der Maus war ebenso wie der rOCT1 der Ratte durch MMTS

aktivierbar, wohingegen die menschlichen Vertreter hOCT1 und hOCT2 von MMTS unbeeinflusst blieben.

Der letzte Befund war überraschend, da das Cystein 451 auch in menschlichen OCTs vorkommt. Sollte es sich bei dem MMTS-Effekt um einen direkt aus SH-Gruppenmodifikation der OCTs entstehenden Effekt handeln, so kann der Befund folgendermaßen erklärt werden: Für den MMTS-Effekt ist neben der Modifikation von C451 eine Interaktion mit einer anderen Domäne des OCT-Moleküls notwendig, in der das Cystein 322 vorkommen kann, aber nicht muss. Wenn diese Interaktion in menschlichen OCTs nicht stattfindet, kann auch kein Effekt durch MMTS auftreten. Ein anderer Grund für den fehlenden MMTS-Effekt an hOCT1 wäre, dass der Effekt durch Modifikation eines *Xenopus*-eigenen Regulatorproteins entsteht, welches für seine Interaktion mit rOCT1 auf die Cysteine 322 und 451 angewiesen ist. Das Regulatorprotein mag aber nicht in der Lage dazu sein, auch menschliche OCTs zu regulieren.

4.4 Wichtige offene Fragen

In dieser Arbeit konnten interessante Funktionsänderungen und möglicherweise auch ein vermehrter Membraneinbau von rOCT1 in MMTS-inkubierten *Xenopus laevis*-Oozyten gezeigt werden. Weiterhin konnten wichtige Hinweise auf die Mechanismen auf molekularer Ebene, die zur Entstehung des MMTS-Effektes beitragen, identifiziert werden. Ein wichtige Frage aus dem funktionellen Teil der Arbeit, die nicht abschließend diskutiert werden kann, ist die Bedeutung einer Veränderung des Quotienten aus maximalem substratinduzierbarem Strom und der maximalen substratinduzierbaren Membrankapazitätsveränderung. Am ehesten ist tatsächlich davon auszugehen, dass die Kapazitätsänderung durch Bindung (und Dissoziation) des Substrates oder Inhibitors an die OCTs zustande kommt und somit in erster Linie von der Anzahl der exprimierten Moleküle auf der Membranoberfläche abhängt. Zum Beweis dieser These ist es notwendig, die Zunahme von rOCT1-Molekülen in der Oozytenmembran nach MMTS-Exposition mit mindestens einer zweiten unabhängigen Methode zu zeigen. Hierfür kommen die Oberflächenbiotinylierung, die Immunfluoreszenz- und die Elektronenmikroskopie in

Frage. Wie bereits ausführlich diskutiert, ist auch eine Veränderung von substratinduziertem ΔC am Einzeltransporter nicht auszuschließen.

Obwohl eine direkte SH-Gruppen-Modifikation von C322 und C451 als Ursache des MMTS-Effektes am plausibelsten erscheint, ist diese Hypothese nicht bewiesen. Es existieren auch Daten, die gegen diese These sprechen. Weitere Experimente z. B. auch in anderen Expressionssystemen müssen diese offene Frage klären.

Und selbstverständlich konnte diese Arbeit nur einen kleinen Beitrag zum Verständnis von Struktur, Funktionsmechanismen und Regulation der organischen Kationentransporter liefern. Bis zu deren definitiven Aufklärung muss noch sehr viel Forschung betrieben werden.

4.5 Klinischer Ausblick

Im Diskussionsteil einer humanmedizinischen Dissertation aus dem Bereich der biochemischen Grundlagenforschung darf natürlich ein Ausblick auf die klinische Relevanz der Daten nicht fehlen. Die Arbeit muss in diesem Zusammenhang als kleiner Beitrag zum molekularen Verständnis von polyspezifischen Transportern der SLC22-Genfamilie und v.a. der Kationentransporter gesehen werden.

Da die OCTs eine ganze Reihe von Medikamenten transportieren (vgl. 1.1), ist der wichtigste Diskussionspunkt die Bedeutung der OCTs für die Pharmakokinetik und die Wechselwirkung von Medikamenten.

Die Tatsache, dass die rOCT1-knock-out-Maus keine phänotypischen Veränderungen zeigt [Jonker et al., 2001] ist nicht überraschend, da viele Transporter mit sich überlappendem Substratspektrum existieren, die die Funktion des rOCT1 teilweise übernehmen können. Allerdings konnte in den Tieren eine z. T. stark veränderte Pharmakokinetik bestimmte Pharmaka nachgewiesen werden. Beim Menschen existieren Polyphorphismen des hOCT1 mit zum Teil erheblicher Reduktion der Transportaktivität und es ist wahrscheinlich, daß die betroffenen Individuen auch einen veränderten Arzneimittelmetabolismus aufweisen. [Kerb et al., 2002] Dieser veränderte Metabolismus könnte zu erhöhten Medikamentenspiegeln im Serum und damit zu stärkeren Nebenwirkungen führen, wie z.B. Verwirrung durch Cimetidin oder Laktatazidose durch Metformin. [Koepsell et al., 2003]

Da sich unter den Substraten und Hemmstoffen der OCTs eine ganze Reihe von Medikamenten befinden, welche häufig und auch als Dauermedikation eingesetzt werden, müssen v.a. bei der Entwicklung neuer kationischer Pharmaka Wechselwirkungen bedacht werden. Beispiele sind das sehr häufig eingesetzte Antidiabetikum Metformin, der Calciumkanalblocker Verapamil oder das Antidepressivum Imipramin. Bei Ratten mit Diabetes mellitus ist eine Herunterregulation von OCTs beschrieben. [Grover et al., 2004] Ähnliche Mechanismen könnten beim menschlichen Diabetes zu einer veränderten Pharmakokinetik des bei diesen Patienten nicht selten eingesetzten Medikaments Metformin führen.

Neben einer Erhöhung von Wirkspiegeln und damit von Nebenwirkungen ist aber auch der umgekehrte Fall denkbar. Mutationen in den OCT-Genen bzw. Wechselwirkungen mit anderen Pharmaka können auch zu einer verminderten Resorption von Medikamenten und einer reduzierten Aufnahme in ihre Zielorgane führen. Die dadurch ausbleibende Wirkung kann mehr oder weniger schwerwiegende Folgen haben. An der eben schon erwähnten knock-out-Maus konnte beispielsweise gezeigt werden, daß Metformin nur noch stark vermindert in seine beiden Hauptzielorgane, die Dünndarmmukosa und die Hepatozyten, aufgenommen wird. [Wang et al., 2002]

Durch die molekulare Charakterisierung der am Arzneimittelmetabolismus beteiligten Transporter könnte es irgendwann möglich werden, z.B. durch Drug Design, den Metabolismus von Medikamenten selektiv zu modifizieren, um damit eine bessere Wirkung oder geringere Nebenwirkungen zu erreichen. Es gibt wenige Beispiele für die derzeitige klinische Anwendung dieses Konzeptes. Eines ist der Einsatz von peripheren DOPA-Decarboxylasehemmern zur Erhöhung der Wirkung von L-DOPA im zentralen Nervensystem beim Morbus Parkinson.

Erst kürzlich erhobene Daten zeigen, dass hOCT2 möglicherweise ein (bislang unbewusstes) Ziel der Pharmakotherapie des Asthma bronchiale mit inhalativen Steroiden darstellt. Budenosid hemmt den Efflux von Acetylcholin, einem Bronchokonstriktor, ins Bronchiallumen. [Lips et al., 2005]

Ebenso wie die rOCT1-knock-out-Maus gesund und fertil ist, sind auch keine phänotypischen Erscheinungen am Menschen beschrieben, die durch einen OCT-Gendefekt bedingt sind. Allerdings wurde vor einigen Jahren bekannt, dass Mutationen in einem genetisch sehr nah verwandten Protein, dem hOCTN2, für das klinische Bild des systemischen Karnitinmangels, einer rezessiven Erbkrankheit, verantwortlich sind. [Burwinkel et al., 1999; Koizumi et al., 1999; Nezu et al., 1999] Das Krankheitsbild, 1975 erstmals beschrieben [Karpati et al., 1975], manifestiert sich durch Enzephalopathie, Myopathie, Cardiomyopathie, Hepatopathie, Hypoglycämien u.v.a. Die Symptome entstehen durch verminderte zelluläre Aufnahme und erhöhte renale Ausscheidung von Karnitin. [Eriksson et al., 1988; Scaglia et al., 1998; Tein et al., 1990; Treem et al., 1988] Es wurden zahlreiche Mutationen des OCTN2-Gens beschrieben, die zum Teil selektiv mit einem verminderten Karnitintransport einhergehen. Es existieren beispielsweise Mutationen in der TMD 4 und TMD 11, die zu einer Inhibition des Karnitin-, nicht aber des TEA-Transportes führen. [Ohashi et al., 2002; Seth et al., 1999] Diese Mutationen liegen in Regionen, die auch bei den OCTs entscheidend für die Proteinfunktion sind. [Gorboulev et al., 1999; Popp et al., 2005]

Durch die Entdeckung und Charakterisierung des MMTS-Effektes und der C451M-Mutanten von rOCT1 und rOCT2 konnte in dieser Arbeit ein kleiner Beitrag zum Verständnis der Transporter geleistet werden. Dennoch muss klargestellt bleiben, dass bis zur vollständigen Charakterisierung von Struktur und Transportmechanismus der organischen Kationentransporter und auch des hOCTN2 noch einige Zeit vergehen wird. Manche Ergebnisse dieser Arbeit können möglicherweise nach weiterführenden Experimenten, nach dem Entdecken neuer Mutationen und der Aufklärung der Proteinstruktur in einem neuen Kontext erst vollständig interpretiert werden.

5 Zusammenfassung / Summary

5.1 Deutsche Version

Zur SLC22-Genfamilie von Karnitin- und organischen Ionentransportern gehören u. a. auch die organischen Kationentransporter der Ratte rOCT1 und rOCT2 sowie deren humane Analoga. Diese funktionell bereits gut charakterisierten Proteine werden in verschiedenen Geweben exprimiert und transportieren endogene und pharmakologisch relevante Substanzen. Die Aufklärung des Transportmechanismus und der Regulation sind Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen.

In dieser Arbeit wurde durch elektrophysiologische Methoden, die modifiziert auch zur Messung von Membrankapazitäten und des Strom-Teilchen-Aufnahmeverhältnisses (CFR) eingesetzt wurden, der Effekt des ungeladenen, membranpermeablen SH-Gruppenregenz MMTS auf den in *Xenopus laevis*-Oozyten exprimierten rOCT1 untersucht. Durch MMTS kam es zu einer Aktivierung von substratinduzierten Strömen und Kapazitätsänderungen, einer unterschiedlichen Veränderung von Substrat- und Inhibitoraffinitäten sowie einer Zunahme der absoluten Oozytenmembrankapazität. Die CFR und die Spannungsabhängigkeit änderten sich nicht. An rOCT2 konnten teils gleich-, teils gegensinnige Veränderungen nach MMTS-Exposition gezeigt werden. Diese Phänomene können am ehesten durch eine Konformationsänderung der polyvalenten Substratbindungsregion, einen verstärkten Membraneinbau der Transportermoleküle und eine gesteigerte Transportrate des Einzeltransporters erklärt werden.

Durch die Untersuchung von Mutanten konnten die Cysteine 322 und 451 als essentiell für den MMTS-Effekt identifiziert werden. Die Daten deuten darauf hin, dass die Modifikation dieser Cysteine für die Effekte zwingend erforderlich ist. Möglicherweise ist aber ein *Xenopus*-eigenes Regulatorprotein an der Entstehung der Effekte beteiligt, welches in die entsprechenden Proteinregionen des rOCT1 eingreift. Mit der Identifikation von Cystein 451 konnte ein weiterer Beweis für die wichtige Bedeutung der 10. Transmembrandomäne erbracht werden. Mit dem Cystein 322 wurde eine weitere wichtige Aminosäure für die Funktion und möglicherweise auch die Regulation von rOCT1 identifiziert.

5.2 English Version

rOCT1 and rOCT2 are functionally well characterised members of the SLC22-transporter family. It includes carnitine and organic cation and anion transporters. OCTs are expressed in a variety of tissues and transport a number of drugs and endogenous substrates. Their transport mechanism and regulation are currently intensively being investigated.

MMTS is an uncharged and membrane-permeable SH-reactive substance. Using electrophysiological methods the effect of MMTS on rOCT1 expressed in *X. laevis*-oocytes was investigated. These methods were modified to measure membrane capacitance and current-flux-ratios. MMTS-exposure induced an activation of substrate-induced currents and capacitance changes, a differing alteration of substrate and inhibitor affinities and an increase in the absolute oocyte membrane capacitance. The transport stoichiometry and voltage dependence were not influenced by MMTS exposure. Properties of rOCT2 were partially altered in the same and partially in the opposite way. The effects can most likely be explained by a conformational change of the polyvalent substrate binding region, an increased membrane insertion of OCT molecules and an increased substrate turnover number of the single transporter.

Investigating mutants the cysteines 322 and 451 could be identified to be essential for the MMTS-effect. The data suggest that the modification of both cysteines is absolutely necessary to create the seen effects. However the participation of a *Xenopus* regulatory protein for the induction of the MMTS-effect interfering with the mentioned OCT regions must be taken into account. The identification of cysteine 451 proves once more the importance of the 10th TMD within the OCT family. Cysteins 322 might be another important amino acid for functional properties and the regulation of organic cation transporters.

6 Literaturverzeichnis

1. **Akabas M.**, Stauffer D.A., Xu M. und Karlin A. (1992): Acetylcholine receptor channel structure probed in cysteine-substitution mutants. *Science*, vol. 258, pp. 307-310.
2. **Arndt P.**, Volk C., Gorboulev V., Budiman T., Popp C., Ulzheimer-Teuber I., Akhoundova A., Koppatz S., Bamberg E., Nagel G. und Koepsell H. (2001): 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.
3. **Bendayan R.** (1996): Renal drug transport: a review. *Pharmacother*, vol. 16, pp. 971-985.
4. **Budiman T.**, Bamberg E., Koepsell H. und Nagel G. (2002): Mechanism of electrogenic cation transport by the cloned organic cation transporter 2 from rat. *J Biol Chem*, vol. 275, pp. 29413-29420.
5. **Burwinkel B.**, Kreuder J., Schweitzer S., Vorgerd M., Gempel K., Gerbitz K.D. und Kilimann M.W. (1999): Carnitine transporter OCTN2 mutations in systemic primary carnitine deficiency: a novel Arg169Gln mutation and a recurrent Arg282ter mutation associated with an unconventional splicing abnormality. *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 261, pp. 484-487.
6. **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. und Koepsell H. (1998): Human neurons express the polyspecific cation transporter hOCT2, which translocates monoamine neurotransmitters, amantadine, and memantine. *Mol Pharmacol*, vol. 54, pp. 342-352.
7. **Busch A.E.**, Quester S., Ulzheimer J.C., Gorboulev V., Akhoundova A., Waldegger S., Lang F. und Koepsell H. (1996): Monoamine neurotransmitter

- transport mediated by the polyspecific cation transporter rOCT1. *FEBS Letter*, vol. 395, pp. 153-156.
8. **Busch A.E.**, Quester S., Ulzheimer J.C., Wessler I., Gorboulev V., Arndt P., Lang F. und Koepsell H. (1996): Electrogenic properties and substrate specificity of the polyspecific rat cation transporter rOCT1 *J Biol Chem*, vol. 271, pp. 32599-32604.
 9. **Carmichael G.G.** und McMaster G.K. (1980): The analysis of nucleic acids in gels using glyoxal and acridine orange. In: *Methods in Enzymology 65: nucleic acids part 1. Academic Press*, vol. pp. 380-391.
 10. **Cetinkaya I.**, Ciarimboli G., Yalcinkaya G., Mehrens T., Velic A., Hirsch J.R., Gorboulev V. und Koepsell H. (2003): Regulation of human organic cation transporter hOCT2 by PKA, PI3K, and calmodulin-dependent kinases. *Am J Physiol Renal Physiol*, vol. 284 (3), pp. 293-302.
 11. **Chan B.S.**, Satriano J.A. und Schuster V.L. (1999): Mapping the substrate binding site of the prostaglandin transporter PGT by cysteine scanning mutagenesis. *J Biol Chem*, vol. 274, pp. 25564-25570.
 12. **Chen J.G.**, Liu-Chen S. und Rudnick G. (1997): External cysteine residues in the serotonin transporter. *Biochemistry*, vol. 36, pp. 1479-1486.
 13. **Chen J.G.**, Liu-Chen S. und Rudnick G. (1998): Determination of external loop topology in the serotonin transporter by site-directed chemical labelling. *J Biol Chem*, vol. 273, pp. 12675-12681.
 14. **Cheng Y.** und Prusoff W.H. (1973): Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol*, vol. 22, pp. 3099-3108.
 15. **Ciarimboli G.**, Koepsell H., Iordanova M., Gorboulev V., Durner B., Lang D., Edemir B., Schroter R., Van Le T. und Schlatter E. (2005): Individual PKC-phosphorylation sites in organic cation transporter 1 determine substrate selectivity and transport regulation. *J Am Soc Nephrol.*, vol. 16, pp. 1562-1570.

16. **Ciarimboli G.** und Schlatter E.(**2004**): Regulation of organic cation transport. *Eur J Physiol*, vol. 449, pp. 423-441.
17. **Colman A. (1984)**: Translation of eukaryotic messenger RNA in *Xenopus* oocytes. In: Transcription and translation - a practical approach. *IRL Press*, vol. pp. 271-302.
18. **Dresser M.J.**, Leabman M.K. und Giacomini K.M. (**2001**): Transporters involved in the elimination of drugs in the kidney: Organic anion transporters and organic cation transporters. *J Pharm Sci*, vol. 90, pp. 397-421.
19. **Dresser M.J.**, Gray A.T. und Giacomini K.M. (**2000**): Kinetic and selectivity differences between rodent, rabbit and human organic cation transporters (OCT1). *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 292, pp. 1146-1152.
20. **Dumont J.N. (1972)**: Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). 1. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol*, vol. 136, pp. 153-180.
21. **Eriksson B.O.**, Lindstedt S. und Nordin I. (**1988**): Hereditary defect in carnitine membrane transport in expressed in skin fibroblasts. *Europ J Pediat*, vol. 147, pp. 662-663.
22. **Fromm M.F. (2000)**: P-glycoprotein: a defense mechanism limiting oral bioavailability and CNS accumulation of drugs. *Int J Clin Pharmacol*, vol. 38, pp. 69-74.
23. **Fu J.** und Kirk L. (**2001**): Cysteine substitutions reveal dual functions of the amino-terminal tail in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel gating. *J Biol Chem*, vol. 276, pp. 35660-35668.
24. **Gerk P.M.**, Oo C.Y., Paxton E.W., Moscow J.A. und McNamara P.J. (**2001**): Interactions between cimetidine, nitrofurantoin, and probenecid active transport into rat milk. *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 296, pp. 175-180.

25. **Golovanevsky V.** und Kanner B.I. (1999): The reactivity of the γ -aminobutyric acid transporter GAT-1 towards sulfhydryl reagents is conformationally sensitive. *J Biol Chem*, vol. 274, pp. 23020-23026.
26. **Goralski K.B.**, Lou G., Prowse M.T., Gorboulev V., Volk C., Koepsell H. und Sitar D.S. (2002): The cation transporters rOCT1 and rOCT2 interact with bicarbonate but play only a minor role for amantadine Aufnahme into rat renal proximal tubules. *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 303, pp. 959-968.
27. **Gorboulev V.**, Volk C., Arndt P., Akhoundova A. und Koepsell H. (1999): Selectivity of the polyspecific cation transporter rOCT1 is changed by mutation of aspartate 475 to glutamate. *Mol Pharmacol*, vol. 56, pp. 1254-1261.
28. **Gorboulev V.**, Shatskaya N., Volk C. und Koepsell H. (2005): Subtype-specific affinity for corticosterone of rat organic cation transporters rOCT1 and rOCT2 depends on three amino acids within the substrate binding region. *Mol Pharmacol*, vol. 67, pp. 1612-1619.
29. **Grover B.**, Buckley D., Buckley A.R. und Cacini W. (2004): Reduced expression of organic cation transporters rOCT1 and rOCT2 in experimental diabetes. *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 308, pp. 949-956.
30. **Grundemann D.**, Gorboulev V., Gambaryan S., Veyhl M. und Koepsell H. (1994): Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. *Nature*, vol. 372, pp. 549-552.
31. **Grunewald M.**, Bendahan A. und Kanner B.I. (1998): Biotinylation of single cysteine mutants of the glutamate transporter GLT-1 from rat brain reveals its unusual topology *Neuron*, vol. 21, pp. 623-632.
32. **Grunewald M.**, Menaker D. und Kanner B.I. (2002): Cystein-scanning mutagenesis reveals a conformationally sensitive reentrant pore-loop in the glutamate transporter GLT-1. *J Biol Chem*, vol. 277, pp. 26074-26080.

33. **Gurdon J.B.**, Lane C.D., Woodland H.R. und Marbaix G. (1971): Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature*, vol. 233, pp. 177-182.
34. **Hammond C.L.**, Lee T.K. und Ballatori N. (2001): Novel roles for glutathione in gene expression, cell death, and membrane transport of organic solutes. *J Hepatol*, vol. 34, pp. 946-954.
35. **Hashimoto M.**, Majima E., Hatanaka T., Shinohara Y., Onishi M., Goto S. und Terada H. (2000): Irreversible extrusion of the first loop facing the matrix of the bovine heart mitochondrial ADP/ATP carrier by labeling the Cys (56) residue with the SH-reagent methyl methanethiosulfonate. *J Biochem*, vol. 127, pp. 443-449.
36. **Hirs C.H.**, Moore S. und Stein W.H. (1960): The Sequence of the Amino Acid Residues in Performic Acid-oxidized Ribonuclease. *J Biol Chem*, vol. 235, pp. 633-647.
37. **Holmgren M.**, Liu Y., Xu Y. und Yellen G. (1996): On the use of thiol-modifying agents to determine channel topology. *Neuropharmacol*, vol. 35, pp. 797-804.
38. **Huez G.** und Marbaix G. (1986): Microinjection of mRNA into *Xenopus* oocytes. In: Microinjection and organelle transplantation techniques. *Academic press, London*, pp. 327-350.
39. **Javitch J.A.** (1998): Probing structure of neurotransmitter transporters by substituted-cysteine accessibility method. *Methods Enzymol*, vol. 296, pp. 331-346.
40. **Ji L.**, Masuda S., Saito H. und Inui K.I. (2002): Down-regulation of rat organic cation transporter rOCT2 by 5/6 nephrectomy. *Kidney Int*, vol. 62, pp. 514-524.

41. **Jonker J.W.**, Wagenaar E., MOL C.A., Buitelaar M., Koepsell H., Smit J.W. und Schinkel A.H. (2001): Reduced hepatic Aufnahme 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.
42. **Karpati G.**, Carpenter S., Engel A.G., Watters G., Allen J., Rothman S., Klassen G. und Mamer O.A. (1975): The syndrome of systemic carnitine deficiency. Clinical, morphologic, biochemical, and pathophysiologic features. *Neurology*, vol. 25, pp. 16-24.
43. **Kekuda R.**, Prasad P.D., Wu X., Wang H., Fei Y.J., Leibach F. und Ganapathy V. (1998): Cloning and functional characterization of a potential-sensitive, poyspecific organic cation transporter (OCT3) most abundantly expressed in placenta *J Biol Chem*, vol. 273, pp. 15971-15979.
44. **Keller T.**, Elfeber M., Gorboulev V., Reiländer H., Koepsell H. (2005): Purification and functional reconstitution of the rat organic cation transporter OCT1. *Biochemistry*, vol. 44, pp. 12253-12263.
45. **Kenyon G.L.** und Bruice T.W. (1977): Novel sulfhydryl reagents. *Methods Enzymol*, vol. 47, pp. 407-430.
46. **Kerb R.**, Brinkmann U., Chatskaia N., Gorbunov D., Gorboulev V., Mornhinweg E., Keil A., Eichelbaum M. und Koepsell H. (2002): Identification of genetic variations of the human organic cation transporter hOCT1 and their functional consequences. *Pharmacogenetics*, vol. 12, pp. 591-595.
47. **Khamdang S.**, Takeda M., Noshiro R., Narikawa S., Enomoto A., Anzai N., Piyachaturawat P. und Endou H. (2002): Interactions of human organic anion transporters and human organic cation transporters with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 303, pp. 534-539.

48. **Kimura H.**, Takeda M., Narikawa S., Enomoto A., Ichida K. und Endou H. (2002): Human organic anion transporters and human organic cation transporters mediate renal transport of prostaglandins. *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 301, pp. 293-298.
49. **Kluger R.** und Tsui W.C. (1980): Amino group reactions of the sulfhydryl reagent methyl methanesulfonylthioate. Inactivation of D-3-hydroxybutyrate dehydrogenase and reaction with amines in water. *Can J Biochem*, vol. 58, pp. 629-632.
50. **Koehler M.R.**, Wissinger B., Gorboulev V., Koepsell H. und Schmid M. (1997): The two human organic cation transporter genes SLC22A1 and SLC22A2 are located on chromosome 6q26. *Cytogenet Cell Genet*, vol. 79, pp. 198-200.
51. **Koepsell H.** (1998): Organic cation transporters in intestine, kidney, liver and brain. *Annu Rev Physiol*, vol. 60, pp. 243-266.
52. **Koepsell H.**, Busch A., Gorboulev V. und Arndt P. (1998): Structure and function of organic cation transporters. *News Physiol Sci*, vol. 13, pp. 11-16.
53. **Koepsell H.**, Gorboulev V. und Arndt P. (1999): Molecular pharmacology of organic cation transporters in kidney. *J Membrane Biol*, vol. 167, pp. 103-117.
54. **Koepsell H.**, Schmitt B.M. und Gorboulev V. (2003): Organic Cation Transporters. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, vol. 150, pp. 36-90.
55. **Koizumi A.**, Nozaki J., Ohura T., Kayo T., Wada Y., Nezu J., Ohashi R., Tamai I., Shoji Y., Takada G., Kibira S., Matsuishi T. und Tsuji A. (1999): 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 Genet*, vol. 8, pp. 2247-2254.
56. **Kordas M.**, Melik Z., Peterec D. und Zorec R. (1989): The voltage-clamp apparatus assisted by a 'current pump'. *J Neurosci Methods*, vol. 26, pp. 229-232.

57. **Lambert G.**, Forster I.C., Biber J. und Murer H. (2000): Cysteine residues and the structure of the rat renale proximal tubular type II sodium phosphate cotransporter (rat NaPi IIa). *J Membrane Biol*, vol. 176, pp. 133-141.
58. **Lambert G.**, Forster I.C., Stange G., Biber J. und Murer H. (1999): Properties of the mutant Ser-460-Cys implicate this site in a functionally important region of the type IIa Na⁺/P_i cotransporter protein. *J Gen Physiol*, vol. 114, pp. 637-651.
59. **Lambert G.**, Traebert M., Biber J. und Murer H. (2000): Cleavage of disulfide bonds leads to inactivation and degradation of the type IIa, but not type IIb sodium phosphate cotransporters expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J Membrane Biol*, vol. 176, pp. 143-149.
60. **Lips K.S.**, Volk C., Schmitt B.M., Pfeil U., Arndt P., Miska D., Ermert L., Kummer W. und Koepsell H. (2005): Polyspecific cation transporters mediate luminal release of acetylcholine from bronchial epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. 33, pp 79-88.
61. **Lo B.** und Silverman M. (1998): Cysteine scanning mutagenesis of the segment between putative transmembrane helices IV and V of the high affinity Na/glucose cotransporter SGLT1. *J Biol Chem*, vol. 273, pp. 29341-29351.
62. **Loo T.W.** und Clarke D.M. (2001): Defining the drug-binding site in the human multidrug resistance P-glycoprotein using a methanethiosulfonate analog of verapamil, MTS-verapamil. *J Biol Chem*, vol. 276, pp. 14972-14979.
63. **Loo T.W.** und Clarke D.M. (1999): Determining the structure and mechanism of the human multidrug resistance P-glycoprotein using cysteine-scanning mutagenesis and thiol-modification techniques. *BBA*, vol. 1461, pp. 315-325.
64. **Mayatepek E.**, Nezu J., Tamai I., Oku A., Katsura M., Shimane M. und Tsuji A. (1999): Two novel missense mutations of the OCTN2 gene (W283R and V446F) in a patient with primary systemic carnitine deficiency. *Hum Mutat*, vol. 15, p. 118.

65. **McMaster G.K.** und Carmichael G.G. (1977): Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, vol. 74, pp. 4835-4838.
66. **Mehrens T.**, Lelleck S., Cetinkaya I., Knollmann M., Hohage H., Gorboulev V., Boknik P., Koepsell H. und Schlatter E. (2000): The affinity of the organic cation transporter rOCT1 is increased by protein kinase C-dependent phosphorylation. *J Am Soc Nephrol*, vol. 11, pp. 1216-1224.
67. **Nagel G.**, Volk C., Friedrich T., Ulzheimer J.C., Bamberg E. und Koepsell H. (1997): A reevaluation of substrate specificity of the rat cation transporter rOCT1. *J Biol Chem*, vol. 272, pp. 31953-31956.
68. **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. und Tsuji A. (1999): Primary systemic carnitine deficiency is caused by mutations in a gene encoding sodium ion-dependent carnitine transporter. *Nat Genet*, vol. 21, pp. 91-94.
69. **Nicoll D.A.**, Ottolia M., Lu L., Lu Y. und Philipson K.D. (1999): A new topological model of the cardiac sarcolemmal Na^+ - Ca^{2+} -Exchanger. *J Biol Chem*, vol. 274, pp. 910-917.
70. **Ohashi R.**, Tamai I., Inano A., Katsura M., Sai Y., Nezu J. und Tsuji A. (2002): Studies on functional sites of organic cation/carnitine transporter OCTN2 (SLC22A5) using a Ser467Cys mutant protein. *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 302, pp. 1286-1294.
71. **Okuda M.**, Saito H., Urakami Y., Takano M. und Inui K. (1996): cDNA cloning and functional expression of a novel rat kidney organic cation transporter, OCT2. *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 224, pp. 500-507.
72. **Pascual J.M.**, Shieh C.C., Kirsch G.E. und Brown A.M. (1997): Contribution of the NH_2 terminus of Kv2.1 to channel activation. *Am J Physiol*, vol. 273, pp. 1849-1858.

73. **Pietig G.**, Mehrens T., Hirsch J.R., Cetinkaya I., Piechota H. und Schlatter, E. (2001): Properties and regulation of organic cation transport in freshly isolated human proximal tubules. *J Biol Chem*, vol. 276, pp. 33741-33746.
74. **Polder H.R.** und Swandulla D. (2001): The use of control theory for the design of voltage clamp systems: a simple and standardized procedure for evaluating system parameters. *J Neurosci Methods*, vol. 109, pp. 97-109.
75. **Popp C.**, Gorboulev V., Muller T., Gorbunov D., Shatskaya N. und Koepsell H. (2005): Amino acids critical for substrate affinity of rat organic cation transporter 1 line the substrate binding region in a model derived from the tertiary structure of lactose permease. *Mol Pharmacol*, vol. 67, pp. 1600-1611.
76. **Pritchard J.B.** und Miller D.S. (1993): Mechanisms mediating renal secretion of organic anions and cations. *Physiol Rev*, vol. 73, pp. 765-796.
77. **Pritchard J.B.** und Miller D.S. (1996): Renal secretion of organic anions and cations. *Kidney Int*, vol. 49, pp. 1649-1654.
78. **Rappa G.**, Finch R.A., Sartorelli A.C. und Lorico A. (1999): New insights into the biology and pharmacology of the multidrug resistance protein (MRP) from gene knockout models. *Biochem Pharmacol*, vol. 58, pp. 557-562.
79. **Ren X.**, Jonssen B.H., Millqvist E. und Lindskog S. (1988): A comparison of the kinetic properties of native muscle carbonic anhydrase and an activated derivative with modified thiol groups. *Biochem Biophys Acta*, vol. 953, pp. 79-85.
80. **Ren X.**, Kasir J. und Rahamimoff H. (2001): The transport activity of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger NCX1 expressed in HEK 293 cells is sensitive to covalent modification of intracellular cysteine residues by sulfhydryl reagents. *J Biol Chem*, vol. 276, pp. 9572-9579.
81. **Sambrook E.**, S. Fritsch und Maniatis T. (1989): Molecular cloning, a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

82. **Scaglia F.**, Wang Y., Singh R.H., Dembure P.P., Pasquali M., Fernhoff P.M. und Longo N. (1998): Defective urinary carnitine transport in heterozygotes for primary carnitine deficiency. *Genet Med*, vol. 1, pp. 34-39.
83. **Schlatter E.**, Monnich V, Cetinkaya I., Mehrens T., Ciarimboli G., Hirsch J.R., Popp C. und Koepsell H. (2002): The organic cation transporters rOCT1 and hOCT2 are inhibited by cGMP. *J Membr Biol*, vol 189, pp. 237-244.
84. **Schmitt B.M.** und Koepsell H. (2002): An Improved Method For Real-Time Monitoring of Membrane Capacitance in *Xenopus laevis* Oocytes. *Biophysical Journal*, vol. 82, pp. 1345-1357.
85. **Schmitt B.M.** und Koepsell H. (2005): Alkali cation binding and permeation in the rat organic cation transporter rOCT2. *J Biol Chem.*, vol. 280, pp. 24481-24490.
86. **Schweifer N.** und Barlow D.P. (1996): The Lx1 gene maps to mouse chromosome 17 and codes for a protein that is homologous to glucose and polyspecific transmembrane transporters. *Mammal Genome*, vol. 7, pp. 735-740.
87. **Seth P.**, Wu X., Huang W., Leibach F. und Ganapathy V. (1999): Mutations in novel organic cation transporter (OCTN2), an organic cation/carnitine transporter, with differential effects on the organic cation transport function and the carnitine transport function. *J Biol Chem*, vol. 274, pp. 33388-33392.
88. **Smith D.J.**, Maggio E.T. und Kenyon G.L. (1975): Simple alkanethiol groups for temporary blocking of sulfhydryl groups of enzymes. *Biochemistry*, vol. 14, pp. 766-771.
89. **Soreq H.** (1985): The biosynthesis of biologically active proteins in mRNA-microinjected *Xenopus* oocytes. *Critical Reviews Biochem*, vol. 18, pp. 199-238.

90. **Spura A.**, Russin T.S., Freedman N.D., Grant M., McLaughlin J.T. und Hawrot E. (1999): Probing the agonist domain of the nicotinic acetylcholine receptor by cysteine scanning mutagenesis reveals residues in proximity to the α -bungarotoxin binding site. *Biochemistry*, vol. 38, pp. 4912-4921.
91. **Stauffer D.A.** und Karlin A. (1994): Electrostatic potential of the acetylcholine binding sites in the nicotinic receptor probed by reactions of binding-site cysteines with charged methanethiosulfonates. *Biochemistry*, vol. 33, pp. 6840-6849.
92. **Sur C.**, Schloss P. und Betz H. (1997): The rat serotonin transporter: identification of cysteine residues important for substrate transport. *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 241, pp. 68-72.
93. **Sweet D.H.**, Miller D.S. und Pritchard J.B. (2001): Ventricular choline transport: A role for organic cation transporter 2 expressed in choroid plexus. *J Biol Chem*, vol. 276, pp. 41611-41619.
94. **Takeda M.**, Khamdang S., Narikawa S., Kimura H., Kobayashi Y., Yamamoto T., Cha S.H., Sekine T. und Endou H. (2002): Human organic anion transporters and human organic cation transporters mediate renal antiviral transport. *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 300, pp. 918-924.
95. **Tein I.**, De Vivo D.C., Bierman F., Pulver P., De Meleir L.J., Cvitanovic-Sojat L., Pagon R.A., Bertini E., Dionisi-Vici C., Servidei S. und Dimauro S. (1990): Impaired skin fibroblast carnitine Aufnahme in primary systemic carnitine deficiency manifested by childhood carnitine-responsive cardiomyopathy. *Pediat Res*, vol. 28, pp. 247-255.
96. **Thiriot D.S.**, Sivert M.K. und Ruoho A.E. (2002): Identification of human vesicle monoamine transporter (VMAT2) luminal cysteines that form an intramolecular disulfide bond. *Biochemistry*, vol. 41, pp. 6346-6353.

97. **Treem W.R.**, Stanley C.A., Finegold D.N., Hale D.E. und Coates P.M. (1988): Primary carnitine deficiency due to a failure of carnitine transport in kidney, muscle and fibroblasts. *New Eng J Med*, vol. 319, pp. 1331-1336.
98. **Urakami Y.** (2002): Molecular diversity of organic cation transporter (OCT) mediating renal excretion of drugs. *Yakugaku Zasshi*, vol. 122, pp. 957-965, 2002.
99. **Urakami Y.**, Okuda M., Masuda S., Akazawa M., Saito H. und Inui K.I. (2001): Distinct characteristics of organic cation transporters, OCT1 and OCT2 in the basolateral membrane of renal tubules. *Pharmaceutical Research*, vol. 18, pp. 1528-1534.
100. **Urakami Y.**, Okuda M., Saito H. und Inui K.I. (2000): Hormonal regulation of organic cation transporter rOCT2 expression in rat kidney. *FEBS Lett*, vol. 473, pp. 173-176.
101. **Volk C.**, Gorboulev V., Budiman T., Nagel G. und Koepsell H. (2003): 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.
102. **van Montfoort J.E.**, Muller M., Groothuis G.M., Meijer D.K., Koepsell H. und Meier P.J. (2001): Comparison of "type I" and "type II" organic cation transport by organic cation transporters and organic anion-transporting polypeptides. *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 298, pp. 110-115.
103. **Wagner C.A.**, Broer A., Albers A., Gamper N., Lang F. und Broer S. (2000): The heterodimeric amino acid transporter 4F2hc/LAT1 is associated in *Xenopus* oocytes with a non-selective cation channel that is regulated by the serine/threonine kinase sgk-1. *J Physiol*, vol. 526, pp. 35-46.
104. **Wallace D.M.** (1987): Large- and small-scale phenol extractions. In: *Methods in Enzymology 152: guide to molecular cloning techniques*. *Academic Press, Orlando*, vol. pp. 33-41.

105. **Wang D.S.**, Jonker J.W., Kato Y., Kusuhara H., Schinkel A.H. und Sugiyama Y. (2002): Involvement of organic cation transporter 1 in hepatic and intestinal distribution of metformin. *Pharmacol Exp Ther*, vol. 302, pp. 510-515.
106. **Wang Y.**, Kelly M.A., Cowan T.M. und Longo N. (2000): A missense mutation in the OCTN2 gene associated with residual carnitine transport activity. *Hum Mutat*, vol. 15, pp. 238-245.
107. **Wang Y.**, Meadows T.A. und Longo N. (2000): Abnormal sodium stimulation of carnitine transport in primary carnitine deficiency. *J Biol Chem*, vol. 275, pp. 20782-20786.
108. **Wessler I.**, Roth E., Deutsch C., Brockerhoff P., Bittinger F., Kirkpatrick C.J. und Kilbinger H. (2001): Release of non-neuronal acetylcholine from the isolated human placenta is mediated by organic cation transporters. *Br J Pharmacol*, vol. 134, pp. 951-956.
109. **Wu X.**, Kekuda R., Huang W., Fei Y.J., Leibach F., Chen J., Conway S.J. und Ganapathy V. (1998): Identity of the organic cation transporter rOCT3 as the extraneuronal monoamine transporter (Aufnahme₂) and evidence for the expression of the transporter in the brain. *J Biol Chem*, vol. 273, pp. 32776-32786.
110. **Yamaguchi M.** und Najajima R. (2002): Role of regucalcin as an activator of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase activity in rat heart muscle. *J Cell Biochem*, vol. 86, pp. 184-193.
111. **Zhang L.**, Dresser M., Chun J.K., Babbitt P.C. und Giacomini K.M. (1997): Cloning and functional characterization of a rat renal organic cation transporter isoform (rOCT1A). *J Biol Chem*, vol. 272, pp. 16548-16554.
112. **Zhang L.**, Dresser M.J., Gray A.T., Yost S.C., Terashita S. und Giacomini K.M. (1997): Cloning and functional expression of a human liver organic cation transporter. *Mol Pharmacol*, vol. 51, pp. 913-921, 1997

7 Anhang

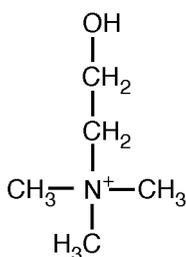
7.1 Abkürzungsverzeichnis

9x Δ C	9-fach cysteinlose Mutante von rOCT1
Δ C	Veränderung der Membrankapazität von Oozyten
C62	das Cystein an Position 62
CFR	Current-Flux-ratio; Verhältnis von LadungsAufnahme zu SubstratAufnahme
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
cpm	Counts pro Minute im einem Szintillationszählröhrchen
DMSO	Dimethylsulfoxid
HEK	Human embryonal kidney (Zellen)
i.d.R.	in der Regel
IC ₅₀	Konzentration eines Hemmstoffes bei halbmaximaler Inhibition
I _{max}	maximaler substratinduzierter Strom
K _i	Inhibitionskonstante eines Hemmstoffes (nach Michealis-Menten)
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
Konz.	Konzentration
Lys-Tris-ORI	Na und K-freier ORI für spezielle elektrophysiologische Messungen
MMTS	Methylmethanthiosulfonat
MPP	1-Methyl-4-phenylpyridinium
mRNA	mesenger-Ribonucleinsäure
MTS	Methanthiosulfonat
MTSCE	2-Carboxyethyl-MTS
MTSEA	2-Aminoethyl-MTS
MTSES	2-Sulfonatoethyl-MTS
MTSET	2-(Trimethylammonium)ethyl-MTS
MTSMT	2-(Trimethylammonium)methyl-MTS
MTSPT	2-(Trimethylammonium)propyl-MTS
MW	Mittelwert
NaCl-ORI	Oozyten-Ringer, der 10mM NaCl mehr enthielt, als der normale ORI

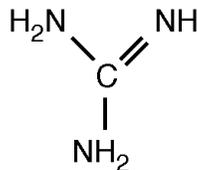
NMN	N-Methylnicotinamid
OAT	organic anion transporter
OCT	organic cation transporter
ORI	Oozyten-Ringer
PAH	p-Aminohippurat
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
s.o.	siehe oben
SCAM	substituted cysteine assessibility method
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	Standardfehler (standard error)
SLC22A	solute carrier family 22A
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)phosphine
TEA	Tetraethylammonium
TEVC	Two-Electrodes-Voltage-Clamp-Technique
TPeA	Tetrapentylammonium
v.a.	vor allem
V_{\max}	maximaler Aufnahme von radioaktiv markiertem Substrat
Vol.	Volumen
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

7.2 Strukturformeln

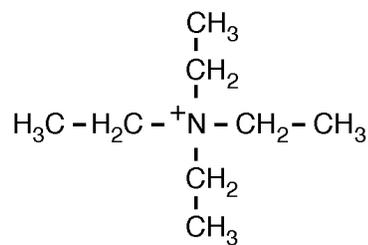
Substrate der OCTs



Cholin

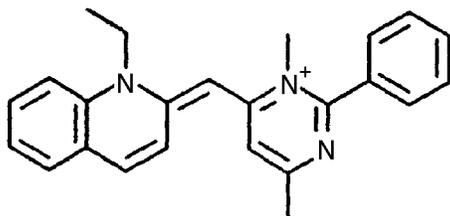


Guanidin

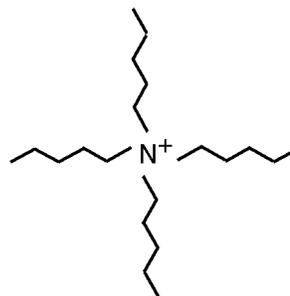


Tetraethylammonium

Inhibitoren der OCTs



Cyanin 863



Tetrapentylammonium

7.3 Vorbereitende Versuche für das Cysteinscanning

7.3.1 Einleitende Gedanken

In den bereits unter 1.3 beschriebenen Experimenten wurde oftmals die Strategie des sog. Cysteinscannings angewandt, auf die jetzt auch unter Beschreibung von weiteren Beispielen etwas näher eingegangen wird. Voraussetzung für diesen Ansatz ist im Idealfall ein Protein, dessen Funktion nicht durch SH-Gruppenreagenzien verändert wird. In dieses Protein werden neue Cysteine eingeführt, die selbst die Funktion des Proteins nur wenig beeinflussen. Durch funktionelle Veränderungen

nach Modifikation mit einem SH-Gruppenreagenz können dann Rückschlüsse auf die Beteiligung dieses neuen Cysteins an der Bindungstasche oder einer regulatorischen Domäne gezogen werden. Der Vorteil dieses Vorgehens (im Vergleich zum Einführen großer neuer Aminosäuren, die dann zum Funktionsverlust führen) ist die Sicherstellung einer korrekten Faltung des Proteins, da ja die Funktion vor SH-Gruppenmodifikation gewährleistet war. Ein Kritikpunkt dieser Methode ist, dass durch das Einführen des neuen Cysteins eine Konformationsänderung des Proteins stattfinden könnte, die ein anderes Cystein für eine Modifikation exponiert. Die Abhängigkeit der Modifizierbarkeit von Cysteinen von der Konformation eines Proteins konnte wie oben beschrieben gezeigt werden. [Golovanevsky et al., 1999] Daher ist es noch eleganter, eine cysteinlose oder weitgehend cysteinfreie Mutante des Proteins herzustellen, die selbst aber noch gut funktionsfähig sein muss, und dann das Cysteinscanning an dieser Mutante durchzuführen.

Als klassisches Beispiel für ein Cysteinscanning konnten im nicotinergen Acetylcholinrezeptor Aminosäuren identifiziert werden, die an der Bindungsstelle von α -Bungarotoxin beteiligt sind, einem Schlangengift, das als potentes Neurotoxin die neuromuskuläre Übertragung hemmt. Es wurden Aminosäuren, die im Verdacht standen, an der Bindungsstelle beteiligt zu sein, einzeln zu Cysteinen mutiert und dann das Bungarotoxinbindungsverhalten vor und nach Inkubation mit verschiedenen MTS-Reagenzien untersucht. Es zeigte sich, dass nur MTSET, das selbst ein quartäres Stickstoffatom enthält, die Bungarotoxinbindung verminderte. Es handelt sich also auch hier (vgl. Prostaglandintransporter unter 1. und 2.) sowohl um eine SH-Gruppen-abhängige als auch SH-Gruppen-unabhängige Interaktion. [Spura et al., 1999]

Eine andere Anwendungsmöglichkeit von neu eingeführten Cysteinen besteht in dem gezielten Einführen positiver oder negativer Ladungen in bestimmte Proteinbereiche zur Bestimmung deren Einflusses auf die Funktion. So wurden z. B. zwei Cysteine in den aminoterminalen Schwanz des CFTR-Proteins eingeführt, um zu beurteilen, ob negative Ladungen in dieser Region die Öffnungsdauer des Proteins beeinflussen. Diese Zeitspanne ließ sich durch Modifikation der Cysteine mit dem

negativen MTSCE verlängern, mit neutralen MMTS nicht verändern und mit dem positiven MTSET verkürzen. [Fu und Kirk, 2001]

Eine weitere Spezialisierung des Cysteinscannings ist die sog. SCAM (substituted cysteine assessibility method). Mit dieser Methode lässt sich klären, ob ein proteineigenes oder ein neu eingeführtes Cystein von extrazellulär zugänglich ist oder nicht. Daraus können Rückschlüsse auf die Membrantopologie von Proteinen gezogen werden. Zu Details bezüglich dieser Methode wird auf die Literatur verwiesen. [Nicoll et al., 1999; Grunewald et al., 1998; Chen et al., 1998; Lambert et al., 1999; Loo und Clarke, 1999]

Wie beschrieben sollten also vor Beginn der eigentlichen Scanningexperimente die Effekte der zu verwendenden SH-Gruppenreagenzien auf den Transporter beschrieben werden. Weiterhin sollte eine (zumindest weitgehend) cysteinfreie Mutante des Transporters hergestellt werden. Die auf dem Weg zu dieser Mutante hergestellten Zwischenprodukte, sowie die weitgehend cysteinfreien Mutanten selbst wurden auch zur Lokalisation der MMTS-Bindungsstelle herangezogen und unter 3.2 schon kurz erwähnt. Im Folgenden wird über die vorbereitenden Experimente berichtet, die größtenteils im Tracer-flux durchgeführt wurden.

7.3.2 Effekte bestimmter MTS-Derivate auf den rOCT1

Neben MMTS, dessen Effekt bereits ausführlich erläutert wurde, wurden in dieser Arbeit auch noch andere MTS-Derivate am rOCT1 untersucht. Ihre Strukturformeln sind unter 2.5 aufgeführt.

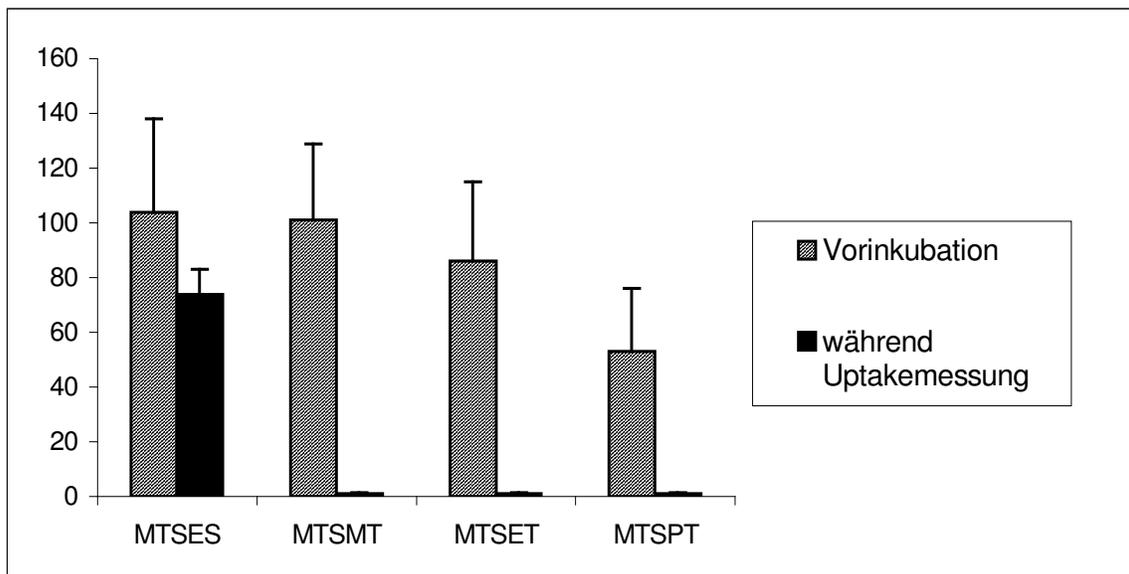


Abbildung 7.3-1: Effekte von 5 mM MTSES, 1 mM MTSMT, 1 mM MTSET und 1 mM MTSPT auf den WT von rOCT1; jeweils linke Säule: Vorinkubation für 5 min; jeweils rechte Säule: Anwesenheit des MTS-Derivats während Aufnahme-Messung; Substrat: $10\mu\text{M}$ ^{14}C -TEA, $n \geq 8$

Wie Abbildung 7.3-1 zeigt, führte eine fünfminütige Vorinkubation in 5 mM MTSES und 1 mM MTSMT nicht zu einer Hemmung von rOCT1, auch die angedeutete Hemmung durch MTSET war nicht signifikant ($p=0,3$). Nur mit MTSPT konnte eine deutliche Hemmung nach Vorinkubation gesehen werden. Interessant ist allerdings, dass die Anwesenheit aller drei kationischen MTS-Derivate zu einer vollständigen Hemmung des TEA-Aufnahmes führte, während MTSES nur zur einer geringen Hemmung führte. Die Messzeit für diese Experimente betrug 5 Minuten.

Da die Struktur der kationischen MTS-Derivate an das Substrat Cholin erinnert (siehe 7.2), lag die Vermutung nahe, es könne sich um kompetitive Hemmstoffe oder um Substrate des Transporters handeln. Um die Frage der Konkurrenz zu beantworten, wurden Hemmkinetiken erstellt, deren Ergebnisse aus den folgenden drei Abbildungen ersichtlich werden:

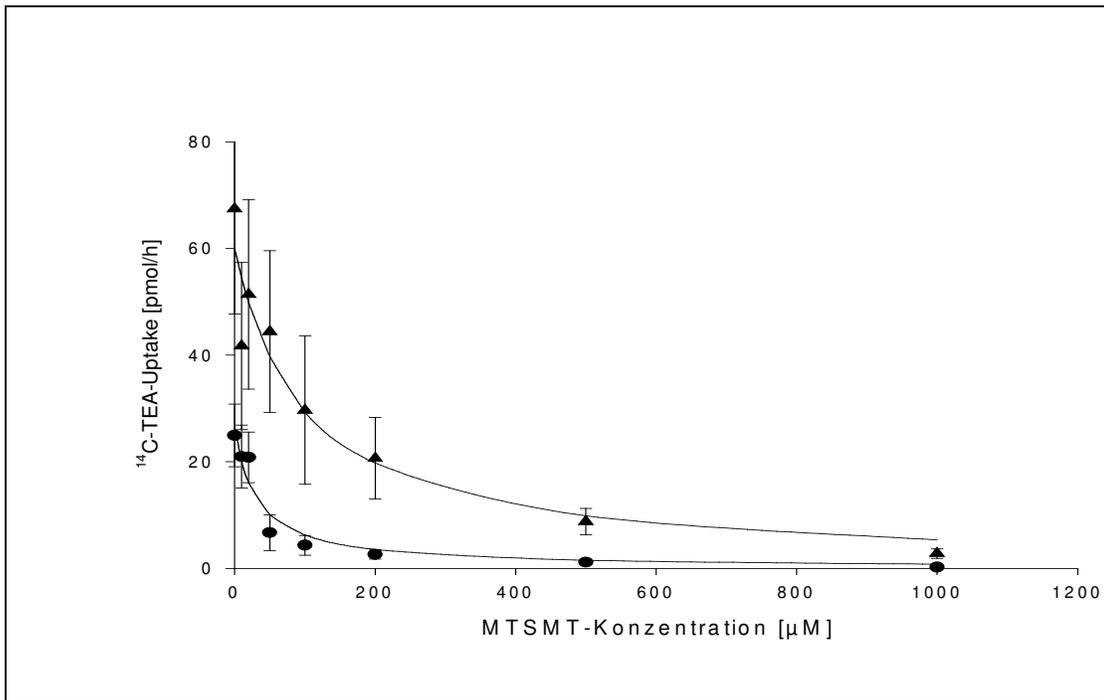


Abbildung 7.3-2: ¹⁴C-TEA-Aufnahme bei steigenden MTSMT-Konzentrationen
 • : 10µM TEA; ▲ : 150µM TEA; (Mittelwerte ±SD, n ≥ 7)

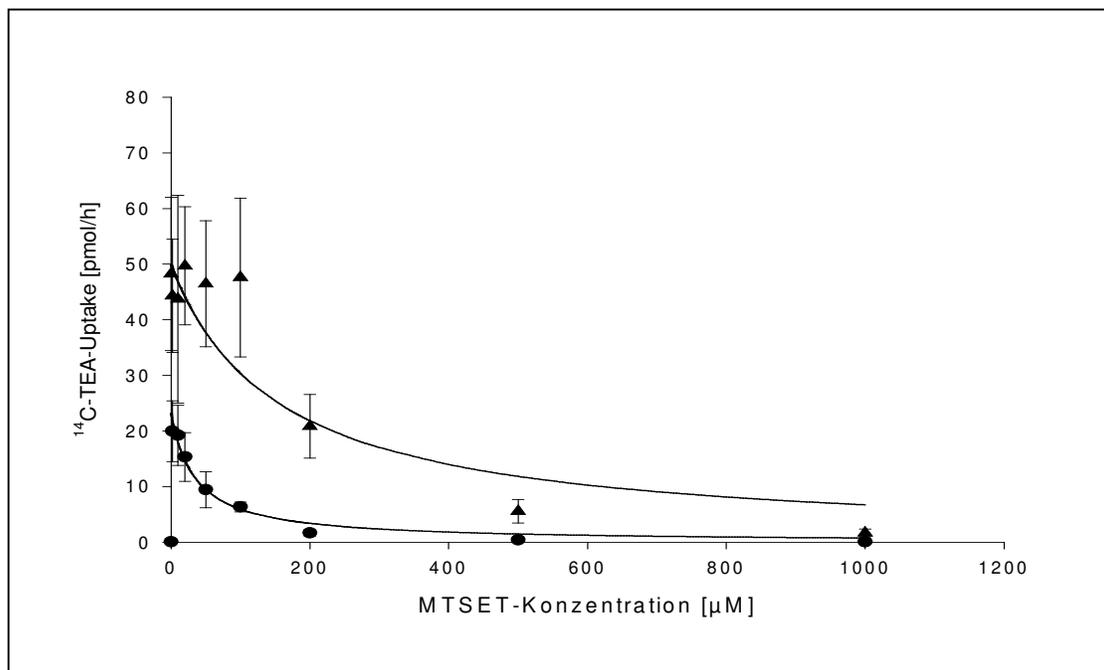


Abbildung 7.3-3: ¹⁴C-TEA-Aufnahme bei steigenden MTSET-Konzentrationen
 • : 10µM TEA; ▲ : 150µM TEA; (Mittelwerte ±SD, n ≥ 7)

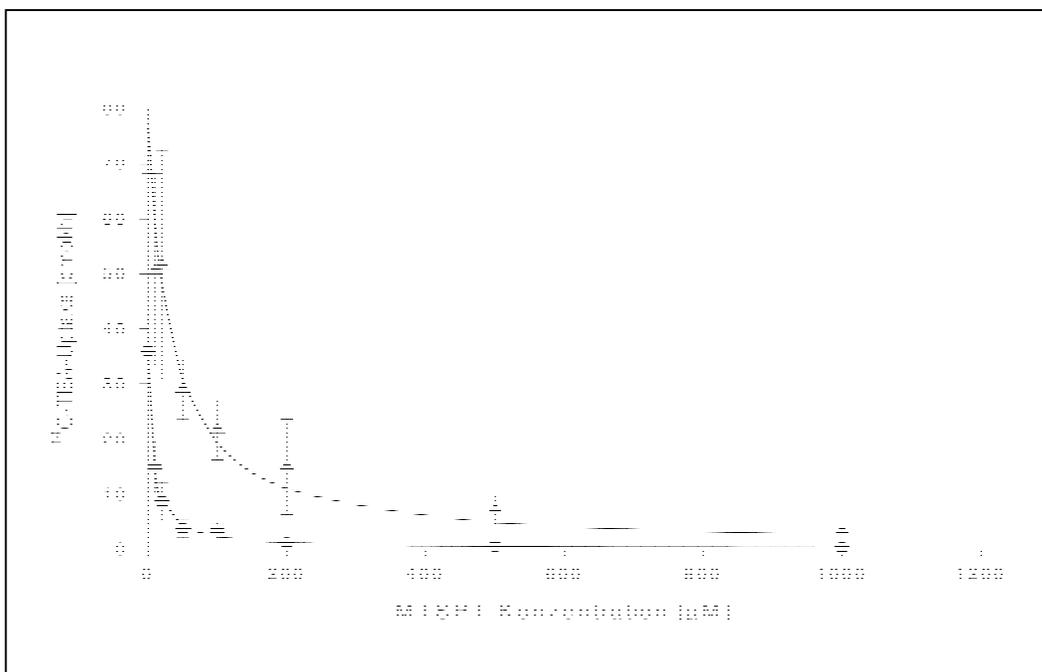


Abbildung 7.3-4: ^{14}C -TEA-Aufnahme bei steigenden MTSPT-Konzentrationen
 • : 10 μM TEA; ▲ : 150 μM TEA; (Mittelwerte \pm SD, $n \geq 7$)

Um eine kompetitive Hemmung zu bestätigen, wurden die IC_{50} -Werte in die tatsächlichen K_i -Werte umgerechnet (siehe 2.3.2). Wenn diese Werte für beide TEA-Konzentrationen in etwa gleich sind, bedeutet dies, dass es sich bei den MTS-Derivaten um zumindest weitestgehend kompetitive Hemmstoffe handelt. In Tabelle 7.3-1 werden die IC_{50} -Werte (\pm SE) und die K_i -Werte der drei MTS-Derivate bei den beiden TEA-Konzentrationen aufgelistet. Für die Umrechnung wird ein K_M -Wert für TEA von 50 μM zugrunde gelegt, der sich in methodische gleichen Experimenten von C. Popp gezeigt hatte.

Hemmstoff	10 μM TEA		150 μM TEA	
	$\text{IC}_{50} \pm \text{SE}$	K_i	$\text{IC}_{50} \pm \text{SE}$	K_i
MTSMT	31 \pm 10 μM	26 μM	98 \pm 21 μM	25 μM
MTSET	34 \pm 6 μM	29 μM	156 \pm 34 μM	39 μM
MTSPT	7 \pm 1 μM	6 μM	33 \pm 5 μM	8 μM

Tabelle 7.3-1: IC_{50} - und K_i -Werte von MTSMT, MTSET und MTSPT bei Hemmung des TEA-Aufnahme bei TEA-Konzentrationen von 10 μM und 150 μM ;

Für alle drei Hemmstoffe waren die K_i -Werte bei den unterschiedlichen TEA-Konzentrationen relativ ähnlich, so dass von einer kompetitiven Hemmung ausgegangen werden kann.

Die eben beschriebenen Daten stellen eine hervorragende Voraussetzung für Cysteinscanningexperimente dar, da neben einem MTS-Derivat, das keinen Einfluss auf rOCT1 hat, auch Derivate gefunden wurden, die selbst unabhängig von SH-Gruppen eine Affinität zur Bindungstasche besitzen, möglicherweise sogar Substrate von rOCT1 sind.

7.3.3 Cysteinmutanten von rOCT1

Um die Rolle der einzelnen Cysteine zu ergründen, wurden diese einzeln zu Alanin in eher hydrophoben und Serin in eher hydrophilen Proteinbereichen mutiert. Die Restaktivität dieser Mutanten im Tracer-Aufnahme bei einer TEA-Konzentration von 10 μ M für eine Stunde gemessen. Für jede Mutante wurden mindestens drei Messungen durchgeführt. Anschließend wurden mehrere Cysteine gleichzeitig mutiert, bis schließlich eine 9x Δ C und 10x Δ C-Mutante entstanden war. Die Ergebnisse sind in Abbildungen 7.3-5 und 6 dargestellt.

Augenscheinlich sind alle sechs Cysteine in der großen extrazellulären Schleife des Proteins essentiell für die Funktion, die Struktur oder den Membraneinbau des Proteins. Alle transmembranen und intrazellulären Cysteinmutanten wiesen eine Transportaktivität von mindestens 50% auf mit Ausnahme der C451A-Mutante. Aus diesem Grunde wurde die C451S-Mutante generiert und getestet, die allerdings auch keine höhere Aktivität besitzt. Auch bei der einzigen Mehrfachmutante mit schlechter Transportaktivität ist an Position 451 kein Cystein mehr vorhanden. So wird auch bei diesen sehr einfachen Experimenten deutlich, dass die Position 451 eine wichtige Rolle spielt.

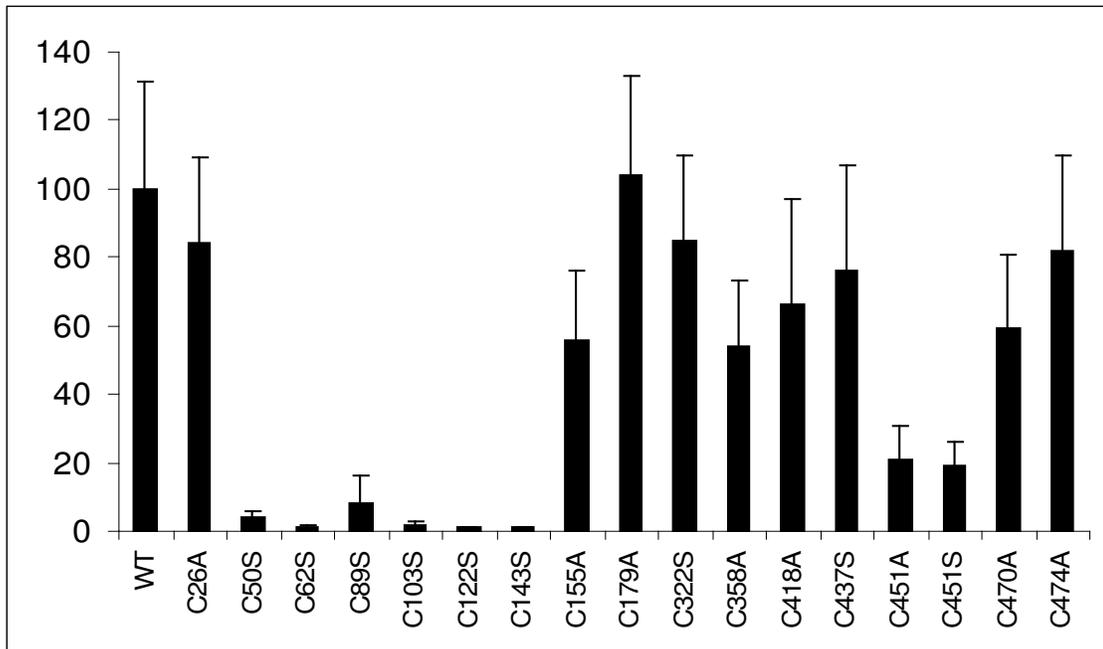


Abbildung 7.3-5: Aufnahme von 10 μ M TEA im Tracer-Flux von Mutanten des rOCT1 relativ zum Wildtyp (Mittelwert in % \pm SD)

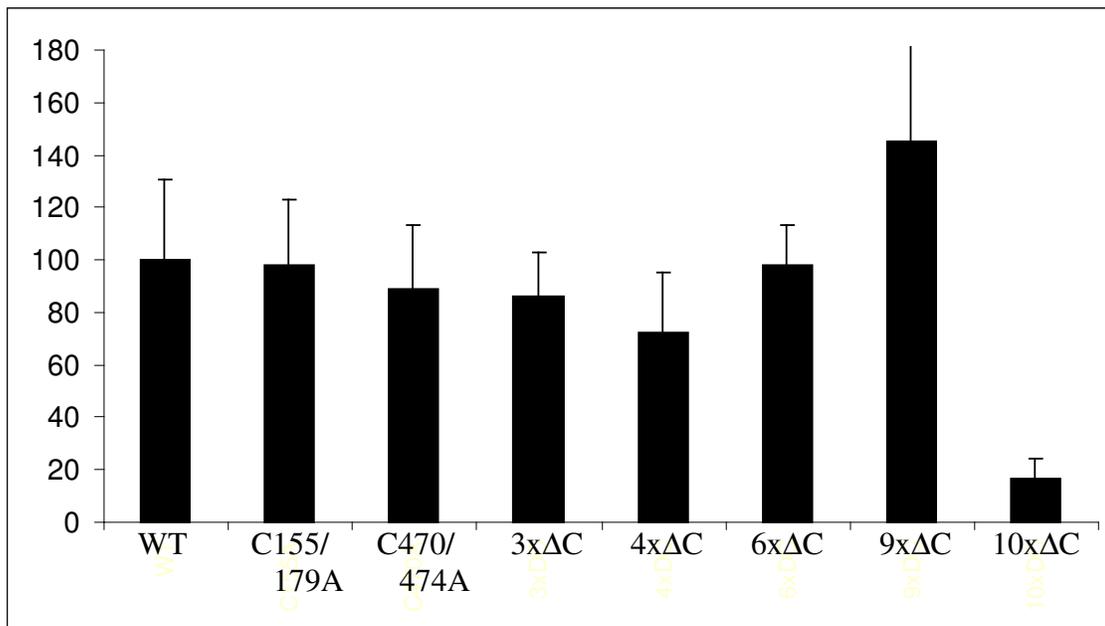


Abbildung 7.3-6: Aufnahme von 10 mM TEA im Tracer-Flux von mehrfach-cysteinlosen Mutanten von rOCT1 relativ zum Wildtyp (Mittelwert in % \pm SD) 3xΔC= C155A, C179A, C322S; 4xΔC= plus C26A; 6xΔC=plus C358A, C418A; 9xΔC=alle (Cystein aus TMD und der intrazellulären) außer C451; 10xΔC= 9xΔC plus C451A

Durch die beschriebenen Experimente wurde der Weg für ein Cysteinscanning am rOCT1 gebahnt. Mit MTSES und MTSET hat man zwei MTS-Derivate zur Verfügung, von denen eines Affinität zur Substratbindungsregion besitzt und welche optimal für das Cysteinscanning eingesetzt werden können. Außerdem wurde mit der 10x Δ C (451M) eine gute Ausgangsmutante für Scanningexperimente gefunden, die aber noch näher charakterisiert werden muß.

Da aber vor Entdeckung der C451M-Mutation mit der 9x Δ C eine sehr interessante Mutante von rOCT1 gefunden war, deren Transportaktivität höher war als die des Wildtyps, sollte ursprünglich diese als Basis für ein Cysteinscanning dienen. Daher wurden an ihr einige weitergehende charakterisierende Experimente durchgeführt.

7.3.4 Die 9x Δ C-Mutante von rOCT1

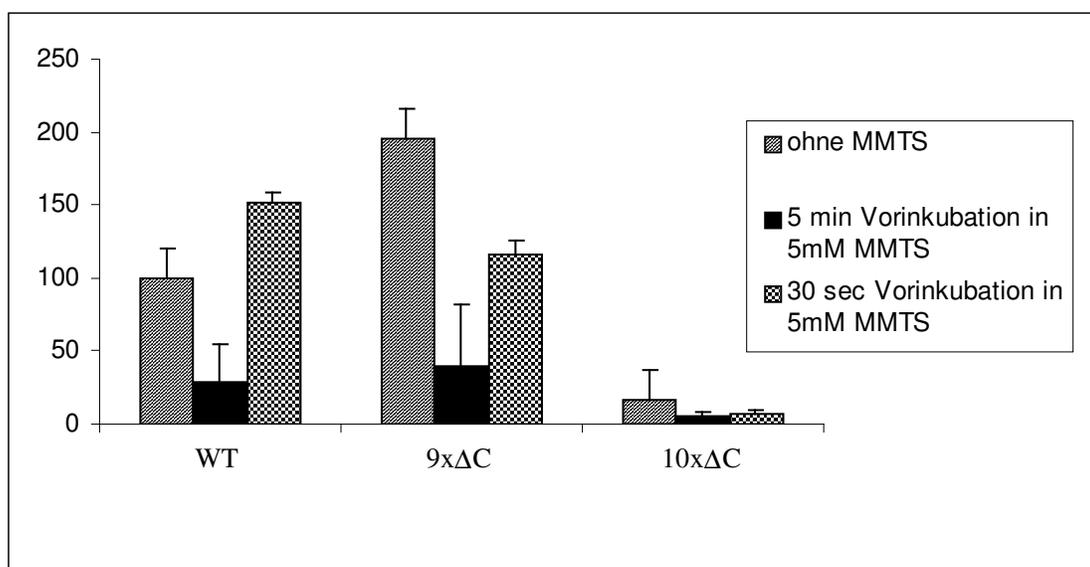


Abbildung 7.3-7: *Effekt von 5 mM MMTS auf den WT, die 9x Δ C und 10x Δ C-Mutante relativ zum WT-Aufnahme; Substrat: 10 μ M 14 C-TEA
jeweils linke Säule: Aktivität ohne MMTS
jeweils mittlere Säule: 5 mM MMTS, 5 min, Fluxdauer: 60 min
jeweils rechts Säule: 500 μ M MMTS, 30 s, Fluxdauer: 15 min*

Die ersten wichtigen Ergebnisse der 9x Δ C-Mutante waren eine Steigerung der TEA-Aufnahme im Tracerflux auf 196 ± 42 % des WT und eine Steigerung Cholin- und TEA-induzierter Ströme auf -24 ± 15 nA (236% des WT, n=14) und -35 ± 29 nA

(553% des WT, n=6). Abbildung 7.3-7 zeigt die Transportaktivität sowie die Aktivierung bzw. Hemmung durch MMTS der 9xΔC und 10xΔC (451A)-Mutante im Tracer-Flux. Weiterhin wurden elektrophysiologisch die K_M -Werte für Cholin und TEA ermittelt: Für Cholin: $353 \pm 183 \mu\text{M}$ (n=7); für TEA: $41,2 \pm 13,7$ (n=3). Für den K_M -Wert von Cholin zeigte sich nach MMTS keine Veränderung (353 ± 183 und nach MMTS 582 ± 353 , n≥5; p=0,1). Der K_M -Wert für TEA wurde zusätzlich auch im Tracer-Flux zu $83,7\mu\text{M} \pm 17,6\mu\text{M}$ (SE) bestimmt und lag damit im Bereich der für den Wildtyp ermittelten K_M -Werte in diesem Labor.

Wie zu erwarten waren auch die beiden Mutanten 9xΔC und 10xΔC durch MTSES nicht signifikant hemmbar (Restaktivität nach fünfminütiger Vorinkubation in MTSES: $90 \pm 29 \%$ für 9xΔC und $109 \pm 41 \%$ für 10xΔC). An der 9xΔC-Mutante wurde bei einer TEA-Konzentration von $10\mu\text{M}$ in IC_{50} -Wert von $31,7 \mu\text{M}$ (SE=4,1 μM) für MTSET gefunden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass 9xΔC durch $100 \mu\text{M}$ MTSMT und $100 \mu\text{M}$ MTSET nicht, aber durch $50 \mu\text{M}$ MTSPT signifikant hemmbar war (gleiches Verhalten wie der WT bei 5 min Vorinkubation und anschliessendem Waschen).

Die Veränderung der Membrankapazität wurde an der 10xΔC-Mutante überprüft. ΔC betrug $-0,23 \pm 0,47 \text{ nF}$ (n=4). Diese Veränderung war im Vergleich zu Kontrolloozyten nicht signifikant.

7.3.5 Die Cysteininsertionsmutanten 9xΔC, I479C und 9xΔC, F486C

Als Auftakt zu den Cysteinscanningexperimenten am rOCT1 wurden in die 9xΔC-Mutante zwei Cysteine an den Positionen 479 und 486 eingeführt. Die Positionen wurden ausgewählt, da sie unter Annahme einer α-Helixstruktur von TMD 11 dem wichtigen Aspartat 475 eng benachbart sind [Gorboulev et al., 1999]. Diese Experimente wurden aber zugunsten der Charakterisierung des MMTS-Effekts nicht weiter verfolgt. Folgende Ergebnisse konnten ermittelt werden, die aber ohne Reproduktion nicht interpretiert werden sollten:

	Kontrolle	100 μ M MTSMT	100 μ M MTSET	50 μ M MTSPT	5 mM MTSES
9x Δ C	176 \pm 14 %	157 \pm 13 %	168 \pm 13 %	129 \pm 16 %	168 \pm 16 %
9x Δ C, I479C	112 \pm 10 %	99 \pm 15 %	68 \pm 6 %	39 \pm 7 %	82 \pm 9 %
9x Δ C, F486C	52 \pm 14 %	29 \pm 9 %	35 \pm 9 %	33 \pm 6 %	57 \pm 9 %

Tabelle 7.3-1: 14 C-TEA.-Aufnahme von Cysteininsertionsmutanten ohne und nach 5-minütiger Vorinkubation in MTS-Derivaten in % vom WT \pm SD; TEA-Konz.: 10 μ M

7.3.6 Diskussion

Unter Cysteinscanning versteht man das Einführen neuer Cysteine in ein Protein und deren anschließende Modifikation mit SH-Gruppenreagenzien, sei es, um eine Funktionsänderung zu erzeugen oder um das Protein z.B. mit Biotin zu markieren. Die erste Voraussetzung für diese Experimente ist also die Charakterisierung der Wirkung solcher SH-Gruppenreagenzien auf das Wildtypprotein. Gerade bei Proteinen mit einer Substratbindungsregion ist es wünschenswert, über ein Reagenz zu verfügen, welches SH-Gruppen-unabhängig eine Affinität zur Bindungstasche besitzt, oder welches sogar ein Substrat des Transporters darstellt. Wie ebenfalls unter 7.3.1 schon erwähnt, könnte durch das Einführen eines neuen Cysteins eine Konformationsänderung des Proteins erfolgen, wodurch proteineigene Cysteine plötzlich einem SH-Gruppenreagenz zugänglich werden könnten. Daher ist eine weitere, zwar nicht unbedingt notwendige, aber wünschenswerte Voraussetzung die Schaffung einer zumindest weitgehend cysteinfreien Mutante des Proteins. Idealerweise sollte diese Mutante in ihren Eigenschaften möglichst dem Wildtyp entsprechen.

Auf dem Weg zu einer solchen Mutante wurden zunächst alle 16 Cysteine des Transporters einzeln zu Serin oder Alanin mutiert. Neun dieser Einzelmutanten zeigten einen 14 C-TEA-Aufnahme von ca. 50-100% des Wildtyps. Sowohl die C451S und die C451A-Mutante zeigten eine Restaktivität von nur ca. 20%. Die sechs Schleifenmutanten (mit Cysteinmutationen in der großen extrazellulären Schleife zwischen TMD1 und TMD 2) zeigten kaum noch TEA-Aufnahme.

Die Funktion dieser extrazellulären Schleife ist bisher noch weitgehend ungeklärt. Auf der einen Seite existiert eine Splicevariante von rOCT1 mit fehlendem N-Terminus (incl. der Schleife), welche noch Kationentransport zeigt [Zhang et al., 1997] sowie Schleifenchimären mit Austausch der Schleife von rOCT1 gegen die von rOCT2 (und umgekehrt), ohne dass sich Affinitäten bestimmter Substanzen verändern. [unpublizierte Daten, S. Kopatz] Auf der anderen Seite führen die genannten Punktmutationen, sowie die als Polymorphismus vorkommende Punktmutation im hOCT1 von Cystein 88 zu Arginin zum fast vollständigen Erliegen des Transports. [Kerb et al., 2002] Da sich die Schleife extrazellulär befindet, liegt die Vermutung nahe, ihre Cysteine könnten Disulfidbrücken ausbilden und somit das Protein strukturell stabilisieren. Bei Fehlen eines Cysteins, wie bei den Mutationen in dieser Arbeit oder des hOCT1, könnte eine Disulfidbrücke und damit die korrekte Proteinstruktur nicht mehr ausgebildet werden. Ein interessantes Projekt für die Zukunft ist die Identifikation der Disulfidbrückenpartner z.B. mittels Einbau von Endopeptidasenschnittstellen oder anderen Methoden.

Wie schon unter 4 erwähnt, wurde im Rahmen der Experimente zur Lokalisation der MMTS-Bindungsstelle das Cystein an Position 451 auch zu Methionin mutiert. Es entstand eine Mutante, deren Transportaktivität sogar höher lag, als diejenige des Wildtyps. Somit zeigten alle zehn transmembranen und intrazellulären Cysteinmutanten eine ausreichend hohe Transportaktivität, so dass es schrittweise möglich war, alle diese Aminosäuren zu ersetzen. So entstand die 10x Δ C-Mutante mit C451M, die als Basis für die Scanningexperimente verwendet werden kann, aber vorher noch genau charakterisiert werden muss.

Zur Modifikation von SH-Gruppen eignen sich besonders gut die Methanthiosulfonatderivate. Für das Cysteinscanning werden vor allem die drei kationischen Derivate MTSMT, MTSET und MTSPT sowie das anionische MTSES verwendet werden. Für weitere Informationen über diese Substanzen wird auf 2.5 verwiesen.

Es konnte festgestellt werden, dass MTSES sowohl bei Vorinkubation als auch bei Anwesenheit während der Messung den TEA-Aufnahme nicht bzw. nur

geringfügig reduzierte. Bei Vorinkubation mit den kationischen MTS-Derivaten konnte eine Hemmung des anschließend gemessenen Aufnahmes nur mit MTSPT gesehen werden. Allerdings inhibieren sowohl MTSPT, MTSET und MTSMT während der Aufnahmemessung die TEA-Aufnahme komplett. Aufgrund der Ähnlichkeit der Strukturformeln dieser Substanzen mit der des Substrates Cholin lag die Vermutung eines kompetitiven Inhibitionsmechanismus nahe. Die Konkurrenz konnte durch weitere Experimente schließlich bewiesen werden, wobei MTSPT mit einem K_i -Wert von ca. 7 μM relativ hochaffin ist. Die K_i -Werte der beiden anderen Moleküle liegen bei ca. 30 μM . Möglicherweise ist die hohe Affinität von MTSPT für die Hemmung des Aufnahmes auch bei Vorinkubation verantwortlich.

Mit diesen vier MTS-Derivaten hat man hervorragende Substanzen für das Cysteinscanning zur Verfügung. Zum einen drei unterschiedlich große Moleküle, welche eine SH-Gruppenunabhängige Affinität zur Bindungstasche des Proteins besitzen und zum anderen das negative MTSES, welches mit dieser selbst nicht interagiert. Die Synthese von MTS-Substrat-Verbindungen, wie bei anderen Arbeitsgruppen [Loo und Clarke, 2001], ist für ein Cysteinscanning in der Bindungstasche des rOCT1 nicht notwendig. In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, daß ^{14}C -MTSET von rOCT1 transportiert wird. [unpub. Daten, D. Gorbunov] Vor Beginn der Scanningexperimente müssen noch Wirkungen der MTS-Verbindungen auf die 10x ΔC -Mutante mit C451M untersucht werden, da diese als Basis für die Versuche verwendet werden sollte.

Ein zukünftiges Cysteinscanning am rOCT1 bietet ein breites Spektrum von Anwendungsmöglichkeiten. Die erste Möglichkeit besteht darin, Aminosäuren zu identifizieren, die an der Substratbindungsregion beteiligt sind. Die ersten für weitere Experimente ausgewählten Aminosäuren sind Isoleucin und Phenylalanin an den Positionen 479 und 486. Diese Positionen wurden ausgewählt, da sie in einer vermuteten α -Helix der TMD 11 in unmittelbarer Nachbarschaft zum Aspartat 475 liegen, dessen Beteiligung an der Bindungstasche unumstritten ist. [Gorboulev et al., 1999] Die Positionen wurden bereits in der 9x ΔC -Mutante einzeln zu Cystein mutiert. Die Beteiligung an der Substratbindungsstelle könnte als sicher gelten, wenn es nach Vorinkubation mit kationischen MTS-Derivaten, nicht aber mit dem negativen MTSES, zu einer starken Hemmung der Transportaktivität käme. Als Beispiel für ein

vergleichbares Experiment konnten am nicotinergen Acetylcholinrezeptor Aminosäuren identifiziert werden, die an der Bungarotoxinbindung beteiligt sind. Als ligandenanalogen SH-Gruppenreagenz wurde MTSET verwendet. [Spura et al., 1999]

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit ist die sog. SCAM (substituted cysteine accessibility method), vgl. 1.3, mit der die Membrantopologie von Proteinen untersucht werden kann. Extrazellulär eingefügte Cysteine können z. B. durch die Methode der Oberflächenbiotinylierung identifiziert werden. [Chen et al., 1998; Grunewald et al., 1998; Lambert et al., 1999; Loo und Clarke, 1999]

Eine dritte Anwendungsmöglichkeit für die fernere Zukunft ist das Einführen von Cysteinen in regulatorische Domänen von rOCT1, um die Mechanismen der Regulation des Proteins zu charakterisieren.

Durch die Entstehung der 10xΔC (451M)-Mutante und die Charakterisierung der MTS-Derivate am Wildtyp konnten in dieser Arbeit die wesentlichen Voraussetzungen für den unmittelbaren Beginn mit Experimenten zur Identifikation von Aminosäuren in der Bindungstasche geschaffen werden. Die Identifikation solcher Aminosäuren ist eine wichtige Voraussetzung zum Verständnis der Substratbindungs- und Transportmechanismen eines polyspezifischen Transporters. Erkenntnisse über die Funktionsweise der OCTs sind wichtig und interessant für das Verständnis der menschlichen Physiologie auf molekularer Ebene und könnten aber überdies auch Eingang in die klinische Pharmakologie finden.

7.4 Weitere Experimente

7.4.1 Substitution extrazellulärer Ionen

Für Untersuchungen der Stöchiometrie war es nötig, kleine Ionen wie Na⁺, K⁺ und Cl⁻ durch andere größere Ionen zu ersetzen, sowie die Protonenkonzentration (also den pH-Wert) zu verändern. Zur Einstellung des pH-Wertes wurde NaCl-ORI mit gesättigter NaOH-Lösung auf die gewünschten pH-Werte 8 und 9 eingestellt.

Schwieriger gestaltete sich die Substitution der kleinen Kationen. Das hierfür häufig verwendete N-Methyl-D-Glucamin (z. B. [Wagner et al., 2000]) induzierte in rOCT1-exprimierenden Oozyten selbst einen Strom und zeigte eine Hemmung auf

cholin-induzierte Ströme. Deshalb wurde in dieser Arbeit die positiv geladene Aminosäure Lysin verwendet. Die Titration der Lösung auf pH 7,4 musste mit 4 mM Tris-Puffer, das ebenso wie Lysin cholin-induzierte Ströme nicht hemmt, vorgenommen werden. In chloridfreien Puffern wurde Chlorid durch Glutamat ersetzt, indem eine Lösung mit 80 mM Natriumglutamat, 30 mM Glutaminsäure, 3 mM KOH, 2 mM $\text{Ca}(\text{OH})_2$, 1 mM $\text{Mg}(\text{OH})_2$ und 5 mM MOPS hergestellt wurde. Cholin wurde ggf. als freie Base zugesetzt. Anschließend wurde mit 5 M NaOH auf pH 7,4 titriert.

Da es sich bei den Erdungs- und Referenzelektroden um Cl^- -abhängige Elektroden handelt, musste die Kammer mit zwei Agarbrücken modifiziert werden. Hierfür wurden 15 ml 3 M KCl mit 0,3 g Agarose unter Rühren aufgekocht, mit einer Spritze in einen Schlauch von ca. 1 mm Durchmesser gezogen und erstarren lassen. Anschließend wurden zwei ca. 4-5 cm lange Stücke des KCl-Agar gefüllten Schlauches zugeschnitten und anstelle der Elektroden in der Messkammer plziert. Der Kontakt zu den Elektroden wurde in zwei kleinen Gefäßen neben der Messkammer, die mit 3 M KCl gefüllt waren, hergestellt.

Der Effekt der verwendeten Aminosäuren Lysin und Glutamat, sowie des alkalischen Titrationspuffers Tris auf cholininduzierte Ströme wurde an rOCT2 untersucht.

Durch 10 mM Cholin induzierte Ströme wurden in An- und Abwesenheit von 40 mM Lysin, 8 mM Tris und 10 mM Glutamat in NaCl-ORI gemessen.

Die folgenden Werte geben die Größe des Cholinpulses in Anwesenheit der jeweiligen Substanz rel. zu Größe in Abwesenheit in $\% \pm \text{SD}$ an ($n = 3$).

rOCT2: $97 \pm 4 \%$ für 40 mM Lysin, $100 \pm 2 \%$ für 8 mM Tris, $99 \pm 5 \%$ für 10 mM Glutamat.

Wie die Abbildung 7.4-1, wurde keine signifikante Änderung TEA (bzw. Cholin)-induzierter Ströme nach Substitution von Chlorid und Natrium/Kalium bzw. nach Reduktion der Protonenkonzentration gefunden. Die Experimente wurden an rOCT1 vor und nach MMTS-Exposition und an rOCT2 (nicht gezeigt) durchgeführt.

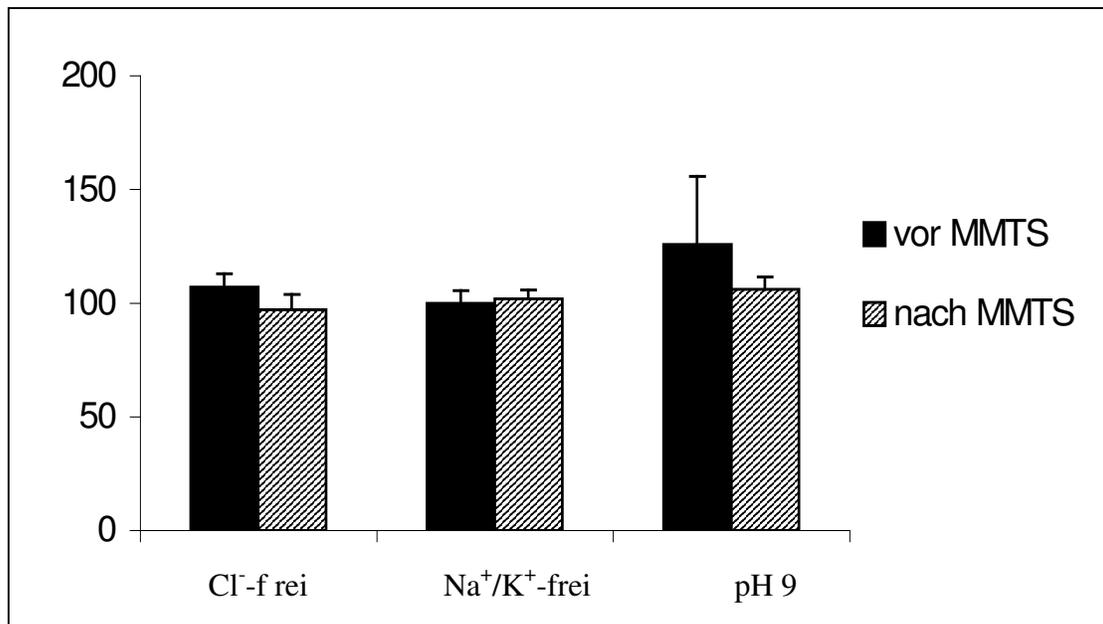


Abbildung 7.4-1: Links: Effluxpuls nach Vorinkubation in 10 mM Cholin in Cl⁻-freier Lösung rel. zum Puls in NaCl-ORI in % \pm SD (n=3). Mitte und rechts: durch 500 μ M TEA induzierte Ströme nach Substitution bzw. pH-Änderung relativ zu Strömen in NaCl-ORI in % \pm SD (n=3). Experimente an rOCT1-injezierten Oozyten vor und nach Inkubation in 500 μ M MMTS für 30 sec.

7.4.2 Experimente mit Chimären zwischen rOCT1 und rOCT2

Da die Maximalströme von rOCT1 und rOCT2 durch MMTS in gegensinniger Weise verändert werden, erschien es sinnvoll, einige Experimente an Chimären durchzuführen, die innerhalb der Arbeitsgruppe aus anderen Gründen hergestellt wurden. Die verwendeten chimären Transporter bestanden aus je einer Hälfte von rOCT1 N-terminal und rOCT2 C-terminal (im Folgenden rOCT1-2) und umgekehrt (rOCT2-1) sowie dem rOCT1, in dem die 10. TMD, welche auch das Cystein 451 beinhaltet, durch die von rOCT2 ersetzt war (TMD 10). Da die substratinduzierten Ströme z. T. sehr klein waren, wurden die Messungen mit 50 mM Guanidin durchgeführt. Die Aktivierungsfaktoren (\pm SD) waren für rOCT1-2 $1,6 \pm 0,5$, für rOCT2-1 $0,46 \pm 0,03$ und für TMD 10 $1,9 \pm 0,5$.

7.4.3 Experimente mit TCEP

Die Experimente mit Triscarboxyethylphosphin (TCEP) mit dem Versuch, Disulfidbrücken zu reduzieren, gestalteten sich schwierig und ihre Ergebnisse sehr variabel. Bei Inkubation in 10 mM TCEP wurden die Oozyten fragil und gingen zu bis zu 50% während des Experiments verloren. Dennoch werden die wenigen Daten zur Modifikation von rOCT1 mit TCEP hier erwähnt, da sie ein wichtiger Bestandteil der Untersuchung von Cysteinen sind. Mit der Ableitung definitiver Aussagen ist aber Vorsicht geboten!

In insgesamt 5 Versuchen konnte eine signifikante Hemmung nach 30-minütiger Vorinkubation in 10 mM TCEP auf eine Restaktivität von 68 ± 34 % gesehen werden ($p < 0,01$). Allerdings konnte eine einmal gesehene Hemmung durch niedrigere Konzentrationen an TCEP nicht reproduziert werden. In insgesamt je einem Versuch konnte für folgende Bedingungen keine Hemmung durch TCEP gefunden werden: 30 min 3 mM TCEP, 30 min 5 mM TCEP, 15 min 10 mM TCEP und in einem Versuch kam es nach 30 min 10mM TCEP zu keiner Hemmung.

Es gibt Arbeiten, die belegen, dass TCEP schon bei niedrigeren Konzentrationen als 10 mM zur Reduktion von Disulfidbrücken fähig ist. So wurde z. B. eine Hemmung des Natrium-Phosphat-Cotransporters Typ IIa bereites ab 30 min 1 mM TCEP gesehen und war bei 3 mM stark ausgeprägt. [Lambert et al., 2000] In einer anderen Arbeit konnten Disulfidbrücken schon unterhalb einer Konzentration von 1 mM TCEP reduziert werden. [Ren et al., 2001]

Die signifikante Hemmung durch 10 mM TCEP kann neben einer Reduktion von Disulfidbrücken auch auf einer vermehrten Proteindegradierung beruhen, wie sie bei Raumtemperatur für den Natrium-Phosphat-Cotransporters Typ IIa beschrieben ist. [Lambert et al., 2000]

7.4.4 Cys-mutanten von rOCT1, Hemmung durch MMTS

Zu Beginn der Arbeit wurden 5 mM MMTS mit einer Vorinkubationszeit von 5 Minuten in Tracer-Flux-Messungen verwendet. Dabei zeigten sowohl rOCT1 als auch alle cysteinlosen Mutanten eine deutliche Hemmung der TEA-Aufnahme. Nachdem aber ein aktivierender Effekt von MMTS bei anderen Inkubationsbedingungen gesehen werden konnte, musste diese Hemmung als sehr unspezifischen Effekt interpretiert werden. Da dies anfangs aber nicht bekannt war, wurde versucht, die für die Hemmung verantwortliche Aminosäure im Tracer-flux zu identifizieren. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7.4-3 dargestellt.

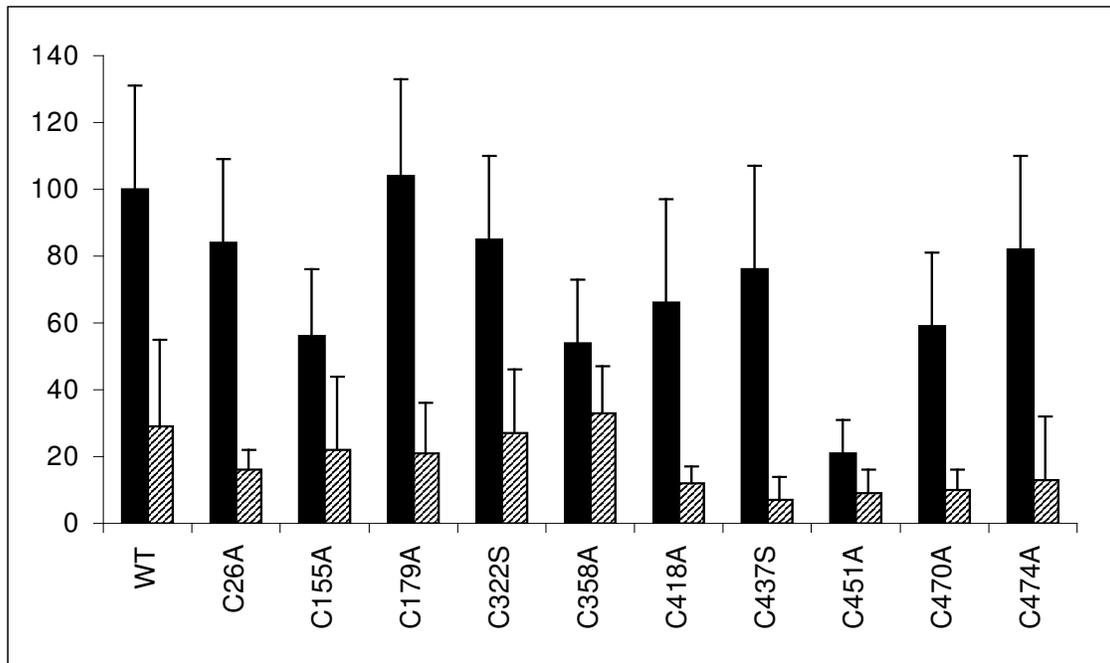


Abbildung 7.4-2: ^{14}C -TEA-Aufnahme von Cysteinmutanten von rOCT1 vor (■) und nach (▨) Inkubation mit 5 mM MMTS (5 min) in % vom WT \pm SD ($n=3$)

Danksagung

Am Ende dieser Dissertation möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Lehrstuhls von Prof. Dr. H. Koepsell am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Bayerischen Julius-Maximiliansuniversität Würzburg herzlich bedanken. Mein ganz besonderer Dank gilt den folgenden Personen:

Christian Popp danke ich für die Einweisung in den Umgang mit *Xenopus* Oozyten und in Tracer-Aufnahmemessungen.

Ein Dankeschön an **Dr. B. Schmitt** und **Dr. C. Volk** für die große Unterstützung beim Erlernen der Two-Electrodes-Voltage-Clamp-Technik und ihre Hilfe bei Problemlösungen.

Weiterhin möchte ich mich bei **Dr. V. Gorboulev** und **Irina Schatz** für die Erstellung und Überlassung der Cysteinmutanten von rOCT1 und rOCT2 sowie die Unterstützung beim Erlernen der RNA-Synthese bedanken. Auch ein Dankeschön für das Übernehmen des Arbeitsschrittes der RNA-Synthese am Ende der Arbeit, als die Zeit limitiert war.

Mein ganz besonderer Dank gilt **Prof. Dr. H. Koepsell**, der mich während der Arbeit im Labor stets hervorragend betreut hat und durch dessen Ideen und Planungen die interessanten Ergebnisse dieser Dissertation erst möglich geworden sind. Es ist mir bewusst, dass eine Betreuung dieser Art und Weise nicht selbstverständlich ist.

Neben der Unterstützung beim wissenschaftlichen Arbeiten möchte ich mich auch noch für die wunderschöne Zeit im Labor und darüber hinaus bedanken. Neben den oben genannten Personen richtet sich dieser Dank an: Marina Akimjanova, Maike Veyhl, Natalia Chatskaia, Dima Gorbunov, Daniela Scholz, Tina Oswald, Matthias Kroiss und die hier nicht genannten Mitarbeiter und Kollegen.

Nachwort

Irgendwann im Werdegang der meisten Medizinstudenten stellt sich die Frage, in welchem Institut und über welches Thema man wissenschaftlich arbeiten möchte, um das Ziel der Erlangung der Doktorwürde zu erreichen. Es besteht die Möglichkeit eine klinische Studie, i. d. R. mit relativ wenig Zeitaufwand, oder aber eine experimentelle Arbeit zu wählen. Unter letzteren gibt es wiederum die beiden Richtungen der klinisch-angewandten Forschung und der Grundlagenforschung.

Mir persönlich fiel die Wahl einer experimentellen Arbeit nicht schwer, da die Arbeit im Labor und die experimentelle Forschung unser Wissen auf dem Gebiet der Medizin bis ins molekulare Detail erst ermöglicht haben. Ich konnte mir nie vorstellen, das Medizinstudium ohne Einblick in dieses interessante, aber auch zeitaufwendige Gebiet abzuschließen. Nach den ersten Einblicken und Experimenten wurde mir der enorme Forschungsaufwand bewusst, der nötig ist, um nur ein kleines Mosaik des großen Ganzen zu untersuchen. Ich erlernte die Grundlagen der Laborarbeit, bekam in Seminaren und Vorträgen Einblicke in wichtige Techniken der Biochemie und erlernte die Two-Electrodes-Voltage-Clamp Technik, die in der Kanal- und Transporterforschung unersetzbar ist.

Darüberhinaus bemerkte ich aber auch, dass ich in der Arbeitsgruppe Koepsell auf ein äußerst kollegiales und nettes Team und in Prof. Koepsell auf einen außerordentlich guten Betreuer gestoßen war.

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten einen kleinen Beitrag zum Verständnis der organischen Kationentransporter liefern. Natürlich resultiert aus den ermittelten Daten keine direkte klinische Anwendung, daher sei abschließend nochmals an das Zitat des griechischen Philosophen Aristoteles erinnert, das, in die heutige Zeit übertragen, die Bedeutung der Grundlagenforschung unterstreicht:

"Offenbar müssen wir die Wissenschaft von den ersten Ursachen gewinnen; denn erst dann können wir sagen, dass wir etwas verstehen, wenn wir die erste Ursache zu kennen glauben."

Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Name Alexander Matthias Sturm
Geburtsdatum 19. Juli 1976
Geburtsort Ochsenfurt
Konfession evangelisch
Familienstand ledig

Schulbildung:

09/1982 - 07/1986 Grundschule Markt Willanzheim
09/1986 - 06/1995 Gymnasium Marktbreit, Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst:

08/1995 - 08/1996 Bayerisches Rotes Kreuz, Kreisverband Kitzingen
überwiegender Einsatz auf dem Rettungswagen in Wiesentheid,
Ausbildung zum Rettungsdiensthelfer
08/1996 - 01/2002 ehrenamtliche Tätigkeit beim Bayerischen Roten Kreuz

Hochschulausbildung:

10/1996 - 05/2003 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-
Universität Würzburg als Stipendiat des Freistaats Bayern
04/2002 - 03/2003 Praktisches Jahr in Würzburg und Medunsa, Südafrika
05/2003 Bestehen der ärztlichen Prüfung

AIP und Assistenzarzt

seit 08/2003 Universitätskinderklinik Würzburg
Direktor: Prof. Dr. Ch. P. Speer
seit 12/2004 Wissenschaftliches Arbeiten in einem Gemeinschaftsprojekt der
Kinderklinik und des Zentrallabors der Universität Würzburg

Hüttenheim, 21.12.2005

Alexander 