

**Klonierung und funktionelle
Charakterisierung von organischen
Kationentransportern aus der Rattenniere**

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

vorgelegt von

Petra Arndt

aus Seeheim-Jugenheim

Würzburg 2000

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	1
1.A. KATIONENTRANSPORT IN DER NIERE.....	1
1.B. OCT1-TRANSPORTER.....	4
1.C. HOMOLOGIE-KLONIERUNG.....	5
1.D. DIE XENOPUS LAEVIS OOZYTE ALS EXPRESSIONSSYSTEM.....	6
1.E. MESSUNGEN MIT RADIOAKTIV MARKIERTEN SUBSTRATEN.....	7
1.F. ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	8
2. MATERIAL UND METHODEN.....	9
2.A. MATERIAL.....	9
2.A.1. Chemikalien.....	9
2.A.2. Radiochemikalien.....	11
2.A.3. Enzyme.....	12
2.A.4. Kit-Systeme.....	12
2.A.5. Arbeitsmaterialien.....	12
2.A.6. Geräte.....	13
2.A.7. Bakterienstämme.....	14
2.A.8. Plasmide.....	14
2.A.9. Oligonukleotide.....	16
2.B. MIKROBIOLOGISCHE METHODEN.....	17
2.B.1. Bakterienanzuchtmedien.....	17
2.B.2. Bakterienkulturen.....	20
2.B.3. Herstellung elektrokompenter Zellen.....	21
2.B.4. Elektrotransformation von E.coli.....	21
2.C. DURCHMUSTERUNG VON cDNA-BIBLIOTHEKEN.....	22
2.C.1. λ gt10-cDNA-Bibliothek.....	22
2.C.2. Herstellung und Ausplattieren von Infektionsansätzen.....	22
2.C.3. Titerbestimmung von cDNA-Bibliotheken.....	23
2.C.4. DNA-Transfer auf Nitrozellulosemembranen.....	24
2.C.5. Hybridisierung und Detektion von positiven Signalen.....	25
2.C.6. Vereinzeln positiver Signale.....	27
2.C.7. Amplifizierung des Bakteriophagen λ	28
2.D. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	29
2.D.1. Herstellung einer radioaktiven DNA-Sonde.....	29
2.D.2. Isolierung von Plasmid-DNA.....	29
2.D.3. Reinigung von Plasmid-DNA.....	31
2.D.4. Isolierung und Reinigung von λ -DNA.....	34
2.D.5. Modifikation von DNA.....	36
2.D.6. DNA-Analyse.....	37
2.D.7. DNA-Sequenzierung.....	37
2.D.8. cRNA-Synthese.....	38
2.D.9. Agarosegelelektrophorese denaturierter RNA.....	39
2.D.10. Klonierung von rOAT1.....	40
2.E. MESSUNGEN AM OOZYTENSYSTEM.....	41
2.E.1. Allgemeines.....	41
2.E.2. Oozyten-Kulturmedien.....	43
2.E.3. Haltung und Krankheiten von Xenopus laevis.....	44
2.E.4. Entnahme und Präparation von Oozyten.....	46

2.E.5. Lagerung und Umgang mit Oozyten.....	49
2.E.6. Mikroinjektion in Oozyten.....	52
2.E.7. Transportmessungen an Oozyten.....	53
2.E.7.a. Bestimmung der Substrataufnahme.....	53
2.E.7.b. K_m -Wert-Bestimmungen.....	54
2.E.7.c. IC_{50} -Wert-Bestimmungen.....	54
2.E.7.d. Efflux-Messungen.....	55
2.E.8. Elektrophysiologie.....	55
2.E.9. Datenauswertung.....	56
3. ERGEBNISSE.....	57
3.A. KLONIERUNG VON <i>rOCT2</i>.....	57
3.B. TRANSPORTMESSUNGEN MIT VERSCHIEDENEN SUBSTRATEN.....	59
3.C. ZEITABHÄNGIGKEIT DES TEA-TRANSPORTS.....	60
3.D. K_m-WERT-BESTIMMUNGEN.....	61
3.D.1. TEA-Kinetik.....	61
3.D.2. Cholin-Kinetik.....	62
3.D.3. Guanidin-Kinetik.....	64
3.D.4. Affinitäten und maximale Transportraten.....	65
3.E. BESTIMMUNG DER POTENTIALABHÄNGIGKEIT.....	67
3.E.1. Potentialabhängige K_m -Wert- Verschiebungen.....	67
3.E.2. Bestimmung der Substrataufnahme unter depolarisierenden Bedingungen....	68
3.F. INHIBITION DES TEA-TRANSPORTS.....	70
3.F.1. Organische Kationen.....	70
3.F.2. Organische Anionen.....	75
3.F.3. Corticosteron.....	78
3.G. KINETISCHE CHARAKTERISIERUNG DER TRANSPORTHEMMUNG DURCH TRANSPORTIERTE UND NICHT TRANSPORTIERTE KATIONEN.....	79
3.H. TRANS-EFFEKTE VERSCHIEDENER KATIONEN AUF MPP-AUFNAHME UND - EFFLUX.....	85
3.H.1. Bestimmung des Membranpotentials.....	85
3.H.2. MPP-Aufnahme.....	86
3.H.3. MPP-Efflux.....	87
4. DISKUSSION.....	90
4.A. DIE OCT-FAMILIE.....	90
4.B. KLONIERUNG UND FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG VON <i>rOCT2</i>.....	93
4.B.1. Potentialabhängigkeit.....	94
4.B.2. pH-Abhängigkeit.....	95
4.C. VERGLEICHENDE FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG VON <i>rOCT1</i> UND <i>rOCT2</i>.....	96
4.C.1. Polyspezifität.....	96
4.C.2. Inhibitoren.....	98
4.D. AUSBLICK.....	104
5. ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY.....	107
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	109
7. ANHANG.....	124
7.A. pH-ABHÄNGIGKEIT DES DURCH <i>rOCT2</i> VERMITTELTEN KATIONENTRANSPORTS.....	124
7.B. PLASMIDKARTEN VON <i>rOCT1</i>, <i>rOCT2</i> UND <i>rOAT1</i>.....	126
7.C. STRUKTURFORMELN.....	127

<i>7.D. ABKÜRZUNGEN UND EINHEITEN</i>	129
<i>7.E. QUELLENTABELLE ZUM OCT-STAMMBAUM</i>	132
8. VERÖFFENTLICHUNGEN	134
9. CURRICULUM VITAE	135

1. Einleitung

1.A Kationentransport in der Niere

Die Niere fungiert neben ihrer Rolle bei der Osmoregulation als ein Organ für die Ausscheidung von Fremdstoffen und die Rückresorption von körpereigenen (endogenen) Stoffen. Entgiftungsmechanismen, die für die Beseitigung von potentiell toxischen Xenobiotika aus dem Körper verantwortlich sind, können Enzyme sein, die am Metabolismus (z. B. Cytochrom P450) beteiligt sind und sekretorische Transporter in Niere, Leber und Dünndarm. Toxische Substanzen und schätzungsweise 50% der in der Klinik gebräuchlichen Medikamente sind organische Kationen oder Basen (*Dresser et al., 2000*), die zum größten Teil in der protonierten Form bei physiologischem pH-Wert vorliegen. Hierzu zählen Antiarrhythmika (z. B. Chinidin, Procainamid, Disopyramid, Lidocain), Antihistamine (z. B. Promethazin, Cimetidin), opioide Analgetika (z. B. Morphin, Codein, Methadon), β -adrenerge Blocker (z. B. Propranolol, Timolol, Pindolol, Acebutolol) und Skelettmuskelrelaxantien (Tubocurarin, Pancuronium, Vecuronium). Außerdem gibt es noch toxische Substanzen (z. B. Paraquat und 1-Methyl-4-phenylpyridinium) und endogene Substanzen wie Dopamin, Serotonin, Noradrenalin, Histamin, Azetylcholin, Cholin und *N*¹-Methylnikotinamid (NMN).

Das Nierenepithel des proximalen Tubulus spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase im Körper durch die selektive Eliminierung von verschiedenen endogenen Substanzen und Xenobiotika. Die Selektivität wird zum größten Teil durch die asymmetrische Verteilung von Transportproteinen in der Bürstensaummembran oder der basolateralen Membran der Nierentubuli gewährleistet, die den vektorialen Fluß von Molekülen in die Sekretionsrichtung (z. B. vom Blut in das Lumen) bewerkstelligt. Obwohl organische Kationen im proximalen Tubulus auch reabsorbiert werden können, kommt im allgemeinen eine Nettosekretion vor (*Ullrich, 1994; Bendayan, 1996; Pritchard und Miller, 1993*).

Es gibt einige Modellsubstrate, die zum Studium des organischen Kationentransports verwendet wurden. Hierzu gehören Tetraethylammonium (TEA), NMN, 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP), Cholin und Guanidin (*Strukturformeln im Anhang*). Die Mechanismen des Transports organischer Kationen wurden ausführlich in verschiedenen epithelialen und nicht epithelialen Geweben wie Niere, Leber, Dünndarm, Plazenta und Gehirn untersucht (*Iseki et al., 1993*;

Müller und Jansen, 1997; Prasad et al., 1992; Pritchard und Miller, 1993, 1996; Streich et al., 1996; Ullrich, 1997). Hierbei wurden verschiedene experimentelle Techniken verwendet, um den organischen Kationentransport zu untersuchen, wozu Messungen an perfundiertem und nicht perfundiertem Gewebe gehören. Außerdem wurde an Vesikeln gemessen, die aus biologischen Membranen (apikal und basolateral) präpariert worden waren, außerdem an isolierten Gewebeschnitten und primären Zellkulturen.

Das klassische organische Kationentransportsystem am Nierenepithel wurde zuerst 1947 durch *Rennick und Sperber* beschrieben. Die renale tubuläre Kationensekretion beinhaltet eine transportvermittelte Passage aus den peritubulären Kapillaren über die basolaterale Membran in die Tubuluszelle mit anschließendem Transport über die luminale Membran in das Tubuluslumen. Wegweisende Versuche, die zur Aufklärung des organischen Kationentransportsystems beitrugen, wurden mit TEA durchgeführt, welches den Prototyp eines Substrates für dieses Transportsystem darstellt. *Rennick und Moe* konnten 1960 zeigen, daß TEA über den proximalen Tubulus des Nephrons ausgeschieden wird. Ein modifiziertes Modell der Sekretion von organischen Kationen ist in *Abb.1.A.* dargestellt, welches ursprünglich 1981 von *Holohan und Ross* auf Studien in Membranvesikeln aus Hundeniere basierend, vorgeschlagen wurde (*Holohan und Ross, 1981; Kinsella et al., 1979*). Der erste Schritt der Sekretion beginnt mit dem Transport des organischen Kations aus dem Blut in die Zelle über die basolaterale Membran. Studien an Membranvesikeln und isolierten Tubuli lassen vermuten, daß es mehrere verschiedene organische Kationen-transporter gibt, die den Transport über die basolaterale Membran vermitteln. Der Transport von TEA ist ein sättigbarer, energieabhängiger, carriervermittelter und vom pH-Wert unabhängiger Prozeß, der durch ein negatives

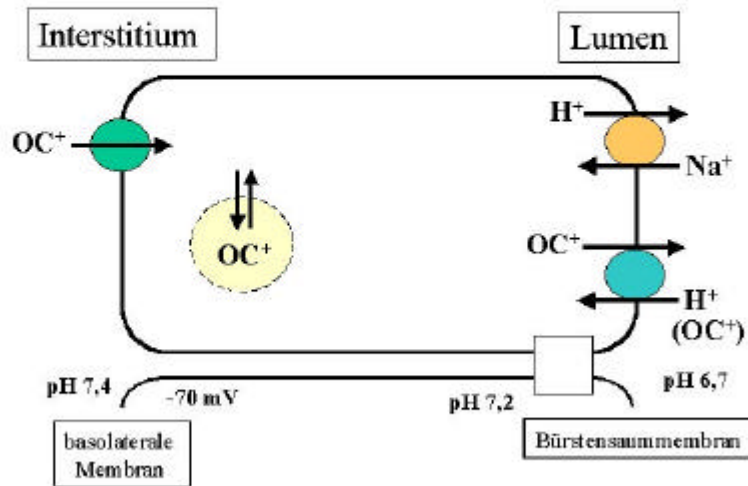


Abb.1.A. Modell der Sekretion von organischen Kationen im proximalen Tubulus der Niere.

Hierbei handelt es sich um TEA, NMN und Paraquat, deren Transport durch mindestens zwei verschiedene Transportproteine in der Kaninchenniere vermittelt wird (Sokol und McKinney, 1990; Besseghir et al., 1990; Groves et al., 1995).

Nach dem Transport über die Zellmembran akkumulieren organische Kationen in der proximalen Tubuluszelle. Dies wird durch die im Innern negative Potentialdifferenz (-60 zu -80 mV) begünstigt. Außerdem besitzen intrazelluläre Organellen die Fähigkeit, organische Kationen zu transportieren und anzuhäufen (Liebermann et al., 1989; Pritchard und Miller, 1996b). Durch Verschmelzen mit der Zellmembran können diese Organellen die eingeschlossenen organischen Kationen wieder frei setzen. Es gibt eine ATP-abhängige Anhäufung von TEA in Endosomen, welche die hohe intrazelluläre TEA-Konzentration erklären kann, die um einen zehnfachen Wert über dem vorhergesagten Wert nach der Nernst-Gleichung liegt (Pritchard et al., 1994). Der quantitative Beitrag der Anhäufung und anschließenden Freisetzung von organischen Kationen aus beladenen Vesikeln an den Transportraten und der Eliminierung von organischen Kationen im proximalen Tubulus ist bis jetzt nicht bekannt. Im

zweiten Schritt wird der Efflux von organischen Kationen aus der Tubuluszelle in das Lumen durch einen sättigbaren elektroneutralen Austausch gegen Protonen (H^+ /organische Kationen-Austauscher) oder organische Kationen vermittelt (*Holohan und Ross, 1981; Takano et al., 1984; Hsyu und Giacomini., 1987; Dantzler et al., 1989; Ullrich, 1994; David et al., 1995, Wright und Wunz, 1987; Ott et al., 1991; Yuan et al., 1991; Gisclon et al., 1987; Miyamoto et al., 1989; Chun et al., 1997*). Bis jetzt wurden zwei Isoformen des H^+ /organische Kationen-Austauschers beschrieben, die sich in ihren Substratselektivitäten unterscheiden (*Miyamoto et al., 1989; Chun et al., 1997*): zum einen ein Guanidin-selektiver H^+ /organische Kationen-Antiporter, der TEA und NMN ausschließt und zum anderen ein TEA-selektiver H^+ /organische Kationen-Austauscher, der Guanidin ausschließt. Neben diesen Isoformen gibt es viele Transporterfamilien, die in den Transport von organischen Kationen über die Bürstensaummembran involviert sein können wie z. B. P-Glykoproteine (*Saeki et al., 1993*). Der Transport durch den H^+ /organische Kationen-Antiporter wird durch einen Protonengradienten getrieben, welcher vom Na^+/H^+ -Austauscher (NHE) in der luminalen Membran aufgebaut wird (*Takano et al., 1984; Rafizadeh et al., 1987*). Northern Blot-Analysen haben gezeigt, daß die mRNA aus vier von fünf bekannten NHE-Isoformen (NHE1-4) in der Säugerniere gefunden wurde (*Orlowski et al., 1992; Sardet et al., 1989; Tse et al., 1992 und 1993*). Immunhistochemische Studien haben gezeigt, daß NHE1 in der basolateralen Membran und daß NHE3 in der apikalen Membran von proximalen Tubuluszellen zu finden sind (*Amemiya et al., 1995; Biemesderfer et al., 1992 und 1993*).

I.B. OCT1-Transporter

1994 wurde der erste polyspezifische organische Kationentransporter (rOCT1) kloniert und charakterisiert (*Gründemann et al., 1994a*). rOCT1 wurde durch Expressions-klonierung aus einer Rattennieren-cDNA-Bibliothek isoliert. Das Transportprotein besteht aus 556 Aminosäuren mit einer vorhergesagten Sekundärstruktur, die 11 oder 12 Transmembrandomänen beinhaltet. Funktionelle Studien an mit cRNA-injizierten *Xenopus*-Oozyten und HEK293-Zellen haben gezeigt, daß organische Kationen wie TEA, 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP), Cholin, NMN und Dopamin durch rOCT1 transportiert werden (*Gründemann et al., 1994a; Busch et al., 1996; Nagel et al., 1997*). Es handelte sich hierbei

um einen sättigbaren, elektrogenen pH- und Na⁺-unabhängigen Transport, der durch Cyanin863 und Chinin inhibiert werden konnte. Die funktionelle Charakterisierung wurde durch Transportmessungen mit radioaktiv markierten Substraten und elektrophysiologisch mit der Voltage-Clamp-Technik durchgeführt. Der potentialsensitive Transporter wurde auf Chromosom 1q11-12 lokalisiert (Koehler *et al.*, 1996) und als ein renaler basolateraler Membrantransporter vorgeschlagen. Durch RT-PCR mit Oligonukleotiden aus der rOCT1-Sequenz wurde eine Spleißvariante von rOCT1 isoliert, die als rOCT1A bezeichnet wurde (Zhang *et al.*, 1997a). Die Nukleotidsequenz von rOCT1A ist zu der von rOCT1 bis auf eine 104 Basenpaare lange Deletion identisch, die zwischen den Basenpaaren 451 und 556 liegt. Bei rOCT1A handelt es sich um eine trunke Version von rOCT1, die TEA mit sehr viel niedrigerer Affinität transportiert. Neben OCT1 aus der Ratte wurden die entsprechenden Klone aus der Maus (Schweifer und Barlow, 1996), dem Menschen (Gorboulev *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1997b) und dem Kaninchen (Terashita *et al.*, 1998) isoliert. Zwischen Ratte und Maus besteht eine 95%ige Identität der Aminosäuren in der OCT1-Sequenz und im Vergleich zum Menschen sind 78% und zum Kaninchen 81% der Aminosäuren identisch. In allen Spezies wird OCT1 in der Leber exprimiert. In Ratte, Maus und Kaninchen findet man OCT1 auch in der Niere und im Dünndarm. Durch immunhistochemische Untersuchungen wurde gezeigt, daß rOCT1 in der sinusoidalen Membran der Hepatozyten lokalisiert ist (Meyer-Wentrup *et al.*, 1998; Koepsell *et al.*, 1998). In der Niere wurde einer Verteilung von rOCT1 in der basolateralen Membran des S1-, S2- und S3-Segment des proximalen Tubulus gezeigt (Karbach *et al.*, 2000).

I.C. Homologie-Klonierung

Bei der Homologie-Klonierung handelt es sich um eine Technik, bei der eine bekannte Sequenzinformation verwendet wird, um Isoformen der Sequenz und/oder verwandte Gene zu klonieren. Die zwei Haupttechniken der Homologie-Klonierung sind das Durchmustern (Screening) von DNA-Bibliotheken und die reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR). Beim Durchmustern einer DNA-Bibliothek durchsucht man diese mit einer Nukleinsäuresonde, um zu der Sonde verwandte Sequenzen zu finden. Diese Vorgehensweise wird in *Material und Methoden* (2.C.) noch ausführlich beschrieben. Die auf einer Homologie basierende RT-PCR wird in drei Hauptschritten durchgeführt. Zuerst werden die Oligonukleotide

(Primer) mit einer bekannten Sequenz hergestellt. Hierbei kann es sich um degenerierte Primer oder um Primer einer konservierten Sequenzregion handeln. Im nächsten Schritt verwendet man diese Oligonukleotide, um ein DNA-Fragment zu amplifizieren. Danach benutzt man eine 'rapid amplification for cDNA ends' (RACE), um die 5'- und 3'- Region der Sequenz erhalten, falls die isolierte DNA an ihren Enden noch nicht vollständig war (Schäfer, 1995).

I.D. Die *Xenopus laevis* Oozyte als Expressionssystem

Ein Expressionssystem, welches für Studien des organischen Kationentransports verwendet werden kann, sollte bestimmte Eigenschaften aufweisen: 1. Die endogene organische Kationenaufnahme sollte sehr niedrig sein. 2. Die zelluläre Maschinerie sollte den Transporter soweit prozessieren, daß ein funktionelles Transportprotein in der Plasmamembran entsteht. 3. Der Transporter muß in Mengen exprimiert werden, die seinen Nachweis in dem angewandten Testsystem erlauben.

Die *Xenopus laevis* Oozyte stellt ein etabliertes Expressionssystem für Funktionsstudien von Membranproteinen wie Transportern, Kanälen und Pumpen dar (Marino, 1996). rOCT1 wurde durch Benutzung dieses System isoliert und charakterisiert (Gründemann et al., 1994a). Eine genaue Beschreibung des *Xenopus laevis* Oozytenexpressionssystems wird in *Material und Methoden* (2.E.) gegeben. Funktionelle Studien, die in diesem System durchgeführt werden, erfolgen meist mit radioaktiv markierten Substanzen. Jede gemessene Oozyte dient dabei als individuelles Expressionssystem. Transportstudien können durchgeführt werden, um bestimmte Charakteristika von klonierten Transportern kennenzulernen. Inhibitoren können zu den Reaktionsansätzen gegeben werden, um Inhibitionsprofile des Transporters zu ermitteln. Durch konzentrationsabhängige Studien von Substraten und Hemmstoffen können kinetische Parameter (K_m , V_{max} und IC_{50}) ermittelt werden. Hierbei sollte herausgestellt werden, daß die Proteinexpressionsmenge und das Membranpotential der Oozyten von Frosch zu Frosch unterschiedlich sein kann und, daß kinetische Parameter aus verschiedenen Experimenten unterschiedlich sein können. Deswegen wurden vergleichende Experimente in dieser Arbeit an Oozyten aus einem Frosch aus der gleichen Präparation durchgeführt.

1.E. Messungen mit radioaktiv markierten Substraten

Die Hauptfunktion eines Transporters ist es, die Passage seines Substrates von der einen Seite der Zellmembran zur anderen zu erleichtern. Hierbei sind drei basale Vorgänge wichtig: das Binden, die Translokation und die Freisetzung. Um die Passage detektieren zu können, werden radioaktiv markierte Substanzen mit hoher spezifischer Aktivität verwendet. Hierbei reichen kleinste Mengen des zu untersuchenden Substrates aus. Ein Flüssigszintillationszähler kann femtomolare Mengen einer radioaktiven Substanz mit hoher spezifischer Aktivität detektieren. Außerdem können bei einer Transportmessung mit radioaktivem Substrat auch Interaktionsstudien mit nicht markierten Substanzen durchgeführt werden.

Um die Funktion von klonierten organischen Kationentransportern zu verstehen, sind [^{14}C]TEA und [^3H]MPP häufig verwendete kationische Modellsubstrate. Die Aufnahme (Influx) dieser Substanzen wird entweder an mit cRNA-injizierten Oozyten oder an transfizierten Zellen gemessen. Am Ende einer Inkubation mit radioaktiver Substanz werden die Zellen mit eiskaltem Puffer gewaschen, um die nichtspezifisch gebundene Radioaktivität zu entfernen. Nach der Lyse der gewaschenen Zellen kann die Radioaktivität, die sich im Innern der Zellen befunden oder an die Membran gebunden hat, gezählt werden. Auf ähnliche Weise können Efflux-Studien durchgeführt werden, bei denen radioaktive Substanzen entweder in die Zellen injiziert oder mit ihnen vorinkubiert werden. Nach dem Waschen mit Puffer kann dann der Ausstrom der Radioaktivität bestimmt werden. Bei den Influx- und Efflux-Experimenten kann bestimmt werden, ob es sich bei einer radioaktiven Substanz um ein Substrat des Transporters handelt, welches wirklich transportiert und nicht nur gebunden wird.

I.F. Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Klonierung eines mit rOCT1 verwandten Transportproteins aus der Rattenniere. Dieses Protein sollte dann im Vergleich zu rOCT1 funktionell charakterisiert werden. Hierfür sollte zunächst eine Homologie-Klonierung zur Isolierung eines Subtyps von rOCT1 durchgeführt werden. Nach der Klonierung sollte eine detaillierte funktionelle Charakterisierung des neuen Proteins durch Transportmessungen mit radioaktiv markierten Substanzen im *Xenopus*-Oozyten-Expressionssystem erfolgen, um Unterschiede und Ähnlichkeiten zwischen rOCT1 und rOCT2 herauszuarbeiten. Die Spezifität und Affinität der organischen Kationentransporter gegenüber bestimmten Substraten sollte beschrieben werden, um die physiologische und pharmakologische Relevanz dieser Proteine in der Niere diskutieren zu können.

2. Material und Methoden

2.A. Material

1.A.1. Chemikalien

NAME	HERSTELLER
Acrylease TM	Stratagene, Heidelberg
Acrylamid/Bisacrylamidlösungen	Roth, Karlsruhe
Adenosin-5'-triphosphat	Stratagene, Heidelberg
Agar	Difco, Hamburg
Agarose	Serva, Heidelberg
p-Aminohippurat (PAH)	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma, Deisenhofen
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Bakto-Hefeextrakt	Difco, Hamburg
Bakto-Trypton	Difco, Hamburg
N,N-bis[2-Hydroxyethyl]-2-aminoethan-sulfonsäure (BES)	Sigma, Deisenhofen
Bindesilan	Pharmacia, Freiburg
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Bovine Serum Albumine (BSA)	ICN, Eschwege
Caesiumchlorid	Life Technologies, Eggenstein
Chinidinhydrochlorid	Sigma, Deisenhofen
Chininhydrochlorid	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Corticosteron	Fluka, Neu-Ulm
Cyanin863	Sigma, Deisenhofen
Decynium22	Sigma, Deisenhofen
Desipraminhydrochlorid	Sigma, Deisenhofen
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Deisenhofen
Dimethylformamid	Sigma, Deisenhofen
Dithiothreitol (DTT)	Biorad, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen

NAME	HERSTELLER
DNA aus Heringssperma	Boehringer, Mannheim
DNA-Molekulargewichtsstandard	Boehringer, Mannheim
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ficoll 400	Sigma, Deisenhofen
Gentamycinsulfat	Sigma, Deisenhofen
Glyzerin, ultrapure TM	Life Technologies, Eggenstein
Glyoxal	Sigma, Deisenhofen
Harnstoff	Sigma, Deisenhofen
Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Isopropyl- β -D-Galaktopyranosid (IPTG)	Sigma, Deisenhofen
α -Ketoglutarat	Sigma, Deisenhofen
Mepiperphenidol (Darstin)	Merck Sharp and Dohme Res. Lab, Rahway (USA)
3-O-Methylisoprenalin	Boehringer, Ingelheim
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	Fluka, Neu-Ulm
N-1-Methylnicotinamid (NMN)	Sigma, Deisenhofen
Natriumborat	ICN, Eschwege

ICN, Eschwege

NAME	HERSTELLER
Tetramethylammoniumchlorid (TMA)	Fluka, Neu-Ulm
Tetrapentylammoniumchlorid (TPeA)	Fluka, Neu-Ulm
Tetrapropylammoniumchlorid	Fluka, Neu-Ulm
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Tris	Fluka, Neu-Ulm
X-Gal	Sigma, Deisenhofen
Xylencyanol FF	Merck, Darmstadt

2.A.2. Radiochemikalien

NAME	HERSTELLER
[γ - ³² P]Adenosin-5'-Triphosphat (167TBq/mmol)	ICN Biochemicals, Meckenheim
[α - ³⁵ S]dNTP (41 TBq/mmol)	Amersham, Braunschweig
[¹⁴ C]p-Aminohippurat (2,0 GBq/mmol)	Biotrend, Köln
[³ H]Chinin (0,56 TBq/mmol)	Biotrend, Köln
[³ H]Chinidin (0,54 TBq/mmol)	Biotrend, Köln
[³ H]Cholinchlorid (2,6 TBq/mmol)	Amersham, Braunschweig
[¹⁴ C]Debrisoquin (1,96GBq/mmol)	Amersham, Braunschweig
[³ H]Digoxin (703 GBq/mmol)	Du Pont de Nemours, Dreieich
[³ H]Dopamin (1,8 TBq/mmol)	Amersham, Braunschweig
[¹⁴ C]Guanidinhydrochlorid (2,0 GBq/mmol)	Biotrend, Köln
[³ H]Histamin (1,9 TBq/mmol)	Amersham, Braunschweig
[³ H]N-1-Methylnicotinamid	ICN Biochemicals, Meckenheim
[³ H]1-Methyl-4-phenylpyridiniumiodid (3,1 TBq/mmol)	Du Pont de Nemours, Dreieich
[³ H]Serotonin (370 GBq/mmol)	Amersham, Braunschweig
[¹⁴ C]Tetraethylammonium	Biotrend, Köln

2.A.3. Enzyme

NAME	HERSTELLER
Ampli Taq™ DNA Polymerase	Perkin Elmer, Überlingen
DNA Polymerase I (Klenow Fragment)	BRL, Eggenstein
Kollagenase	Sigma, Deisenhofen
Lysozym	Sigma, Deisenhofen
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Schwalbach
RNase A	Sigma, Deisenhofen
SP6 Polymerase	MBI Fermentas
Taq DNA Polymerase	BRL, Eggenstein
T4 DNA Ligase	Boehringer, Mannheim
T7 Polymerase	MBI Fermentas

2.A.4. Kit-Systeme

NAME	HERSTELLER
Cycle-Sequencing-Kit	Biozym, Oldendorf
Easy Pure DNA Purification Kit	Biozym, Oldendorf
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Sequenase-Kit	Amersham, Braunschweig
RadPrime DNA Labeling System	Life Technologies, Karlsruhe
Expand Long Template Amplification Kit	Boehringer, Mannheim

2.A.5. Arbeitsmaterialien

NAME	HERSTELLER
Einweg-Plastikgefäße	Eppendorf, Hamburg Greiner, Frickenhausen Nunc Seromed, Berlin Sarstedt, Nimbrecht
Filter zum Sterilfiltrieren	Schleicher/Schuell, Dassel
Filterpapier, Whatman	Hartenstein, Würzburg

NAME	HERSTELLER
Glaskapillaren	Hildenberg, Malsfeld
Nitrozellulose-Membranen	Amersham, Braunschweig
Polystyrolbecher	Sarstedt, Nimbrecht
Röntgenfilm Kodak Biomax MR	Hartenstein, Würzburg
Szintillationscocktail Lumasafe Plus	Lumac LSC, Groningen (Niederlande)
Zählröhrchen	Sarstedt, Nimbrecht

2.A.6. Geräte

NAME	HERSTELLER
Elektroporationsgerät, Biojet MI	BioMed, Jena
Inkubationsofen	Hereaus, Offenbach
Macrophor TM Sequenzierapparatur	Pharmacia, Freiburg
Mikroinjektionsspumpe	Drummond, USA
PCR Thermal Cycler	MWG Biotech, Ebersberg
Fotokamera	Polaroid, Offenbach
Fotometer, Ultraspec3	Pharmacia, Freiburg
Schüttelinkubator	Brunswick, New York (USA)
Flüssigkeitsszintillationszähler Tri-Carb 1600CA	Canberra Packard, Dreieich
Umwälzpumpe	LKB, Bromma (Schweden)
UV Stratalinker TM	Stratagene, Heidelberg
UV Transilluminator	Herolab, St. Leon
Zentrifugen und Rotoren JS 21 (JA 14, JA 20) RC 2-B (SS34, HS4, HB4) Biofuge 28 RS (HFA 22.1) Ultrazentrifuge L7-65 (Vti 65, Ti 60, TLS 55)	Beckmann, München Sorvall, Bad Homburg Heraeus, Hanau Beckmann, München

2.A.7. Bakterienstämme

Bei den zu dieser Arbeit benötigten Bakterienstämmen handelte es sich um verschiedene modifizierte *Escherichia coli* Stämme.

Name	Genotyp	Verwendung
XL1-Blue (<i>Bullock et al., 1987</i>)	<i>D(lac) endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺) relA1 [F' proAB lacI^qZDM15 Tn10 (Tet^r)*</i>	Blau/Weiß-Selektion von rekombinanten Klonen, die auf IPTG X-gal-Platten wachsen
DH10B (<i>Grant et al. 1990, Lorrow und Jessee, 1990; GibcoBRL</i>)	<i>F-mrcA D(mrr- hsdRMS-mcrBC) F80dlacZDM15 D(lac)X74 deoR recA1 araD139 D(ara, leu)7697 galU galK λ-rpsL endA1 nupG</i>	Elektrotransformation Blau/Weiß-Selektion von rekombinanten Klonen, die auf IPTG X-gal-Platten wachsen
NM 514 (<i>Murray et al., 1977; Stratgene</i>)	<i>hsdR514 (r_k⁻ m_k⁻) argH galE galX lycB7 str A (Hfl⁺)</i>	Wirtsstamm zur Amplifikation des Bakteriophagen <i>I</i> (<i>I</i> gt10-Vektor)

2.A.8. Plasmide

pUC19 (2686 bp) trägt das Gen für eine β-Laktamase (amp^r) und das lacZα-Fragment mit dem zugehörigen Promotor/Operator-Bereich (*Yanisch-Perron et al., 1985*). Der Polylinker ist Teil des kodierenden Bereichs des α-Fragmentes. Sofern der Wirt das Ω-Fragment herstellt (z. B. DH10B und XL1-Blue), färben sich bei der α-Komplementierung der β-Galaktosidase Kolonien von *E. coli* mit pUC19 in Gegenwart von IPTG und X-Gal blau. Ein DNA-Einschub im Polylinker des pUC19-Plasmids führt dazu, daß nach dem Bakterienwachstum meistens nur weiße Kolonien auf der Agarplatte zu erkennen sind.

pBluescript II SK(-) (2958 b) ist eine Weiterentwicklung von pUC19 (*Short et al., 1988*). Zusätzlich aufgenommen wurde der Zwischengenbereich des Phagen f1, so daß durch eine Infektion des Wirtes (F+) mit filamentösen Phagen einzelsträngige Plasmid-DNA hergestellt und in einer Virushülle verpackt ausgeschleust wird (*Rasched und Oberer, 1986*). Neu sind auch Promotoren für die T3 und T7 RNA-Polymerasen, die den erweiterten Polylinker flankieren und eine in vitro Transkription von DNA-Einschüben erlauben.

pOG2 und pRSSP sind Expressionsvektoren, die zur Translation von Proteinen nach cRNA-Injektion in *Xenopus laevis*-Oozyten verwendet werden. Diese Vektoren enthalten untranslatierte Regionen des *Xenopus* β -Globin-Gens. rOCT1 wurde nach seiner Klonierung in den pRSSP-Vektor (*Busch et al., 1996a*) 0.4lasm7 0.786 -, 1 Tj 0 -2lr Klont, umen, in

)

2.A.9. Oligonukleotide

Die bestellten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG, Ebersberg, geliefert und auf eine Konzentration von 100 pmol/µl eingestellt. Diese Stammlösungen wurden bei -20°C gelagert.

NAME	Sequenz	Position	Verwendung
PT1 (reverse)	5' - GAT TCC TGA TGT ATG TGG - 3'	1430 - 1413	Sequenzierung von rOCT2
PT2	5' - CTC GAT GGT CTC AGG CAG - 3'	1618 - 1601	Sequenzierung von rOCT2
PT3 (forward)	5' - TCT CTG AGG GGC TCT CAT - 3'	603 - 618	Sequenzierung von rOCT2
PT4	5' - AGC TCG TGA ACC AAT TGT AC - 3'	1112 - 1093	Sequenzierung von rOCT2
PT5	5' - TGT AAT CAG GAT GTA GCC - 3'	715 - 698	Sequenzierung von rOCT2
PT6	5' - GGT AGA ATG GGC ATC ACC - 3'	352 - 369	Sequenzierung von rOCT2
PT8	5' - GCT ACC TGA GAC CAA AGG - 3'	1576 - 1593	Sequenzierung von rOCT2
PT9	5' - GAA AGG GCA TCA TTG CTG - 3'	1710 - 1727	Sequenzierung von rOCT2
PT10	5' - ATG TTG TGG TGG AGA AGG - 3'	2009 - 1192	Sequenzierung von rOCT2
PT11	5' - GCC TCC TGA TCC TGG CTG - 3'	780 - 797	Sequenzierung von rOCT2
PT12	5' - GGT GTC AGG TTC TGA AGA GAG - 3'	200 - 216	Sequenzierung von rOCT2
PT13	5' - GCA TAC CGG AAT CTC CAA - 3'	2009 - 1992	Sequenzierung von rOCT2
PT14	5' - CTG TTT CAG TCA GTA GTG - 3'	448 - 505	Sequenzierung von rOCT2
PT15	5' - GAG AAG CTC CAT CTC TGG - 3'	1772 - 1755	Sequenzierung von rOCT2
PT16	5' - TGG CTC AGC TTG GCT GC - 3'	216 - 200	Sequenzierung von rOCT2
U3	5' - AAC TTC CGG CCA AAC CTG TCC GC - 3'	570 - 498	Sequenzierung von rOCT2
U4	5' - GCT TCT GGT TCC AGT CCA C - 3'	334 - 317	Sequenzierung von rOCT2
ROATF	5' - CCA CTC GAG CCT	254 - 275 in rOAT1-	Klonierung von rOAT1

	GGC CCA GCC C - 3'	Sequenz (AB004559)	
ROATR	5' - GCA GGA TCC TGT AGA ACC CCA C 3'	1984 - 1964 in rOAT1- Sequenz (AB004559)	Klonierung von rOAT1
M13 (-20) Universal- Primer	5' - GTA AAA CGA CGG CCA GT - 3'	674 - 694	Sequenzierung von in den pBluescript II SK-Vektor einklonierten DNA- Fragmenten
M13 Reverse- Primer	5' - GGA AAC AGC TAT GAC CAT G- 3'	826 - 808	Sequenzierung von in den pBluescript II SK-Vektor einklonierten DNA- Fragmenten
SK	5' - CGC TCT AGA ACT AGT GGA TC - 3'	674 - 693	Sequenzierung von in den pBluescript II SK-Vektor einklonierten DNA- Fragmenten
KS	5' - TCG AGG TCG ACG GTA TC - 3'	744 - 728	Sequenzierung von in den pBluescript II SK-Vektor einklonierten DNA- Fragmenten

2.B. Mikrobiologische Methoden

2.B.1. Bakterienanzuchtmedien

Allgemeine Verfahrensweisen

Alle Arbeiten, die mit *E.coli* und dem Bakteriophagen *I* durchgeführt wurden, fanden unter einer Sterilbank oder am Arbeitsplatz mit Bunsenbrennerflamme statt, um Kontaminationen der Ansätze und um die Freisetzung von bakteriellem Material zu verhindern. Alle Arbeitsflächen wurden vor und nach Gebrauch mit 70% Isopropanol desinfiziert. Die mit gentechnisch veränderten Organismen (GVOs) in Verbindung gekommenen Arbeitsutensilien wurden in feuchter Hitze bei 121°C und 2 bar 20 min sterilisiert.

Die verwendeten Kulturplatten wurden, wenn sie in nicht sterilem Zustand waren, mit 70%iger Isopropanollösung gereinigt und in der Sterilbank unter UV-Licht getrocknet. Anzuchtkolben wurden vor ihrer Verwendung bei 160°C im Trockenschrank ausgebacken. Nach dem Gebrauch wurde gentechnisch verändertes Material rückautoklaviert. Die nicht autoklavierbaren Geräte wurden vor dem Spülen mit 70%iger Ethanollösung gereinigt.

Behandlung von Nährmedien

Die Nährmedien und Pufferlösungen wurden nach ihrer Herstellung mit den genannten Komponenten und ddH₂O 20 min bei 121°C und 2 bar autoklaviert. Aufgrund der geringeren Stabilität von Maltose bei hohen Temperaturen wurden Maltose-haltige Medien sterilfiltriert (0,22 µm Porengröße). Nach dem Autoklavieren wurden alle Agar-haltigen Medien unter Rühren bis zu ihrer Weiterverarbeitung abgekühlt. Nährböden wurden in der Sterilbank nach Abkühlung der Medien auf ca. 60°C in sterile Polystyrol-Petrischalen (ca. 20 bzw. 50 ml für Platten mit einem Durchmesser von 92 bzw. 145 mm) gegossen.

Antibiotika

Stammlösungen von Ampicillin (25 mg/ml) wurden lichtgeschützt bei -20°C gelagert. Selektionsmedium wurde auf 100 µg/ml Ampicillin eingestellt. Bei der Herstellung von Agarplatten wurde der auf ca. 50°C abgekühlte Nährboden mit Ampicillin versetzt und anschließend in Platten gegossen. Die ausgehärteten Agarplatten wurden maximal vier Wochen bei 4-8°C lichtgeschützt gelagert.

	LB-Medium		LB-Agar
10 g/l	Casein-Hydrolysat		LB-Medium versetzt
5 g/l	Hefeextrakt		Mit
5 g/l	NaCl	15 g/l	Agar
	pH-Wert wird mit 5N NaOH auf 7,0 eingestellt		
	LB-MM-Medium		LB-Amp-Medium
	LB-Medium versetzt mit		LB-Medium versetzt mit
0,2 %	Maltose	100 µg/ml	Ampicillin
10 mM	MgSO ₄		

	IPTG/X-Gal-Nährboden		NZCYM-Medium	
	LB-Medium versetzt mit		1 g/l	Caseinhydrolysat
0,2 mM	IPTG		5 g/l	Hefextrakt
40 µg/ml	X-Gal		2 g/l	MgSO ₄ × 7H ₂ O
50 µg/ml	Ampicillin		5 g/l	NaCl
1.5 % (w/v)	Agar		10 g/l	NZ-Amin
	NZY-Medium		NZY-Agar	
10 g/l	Casein-Hydrolysat			NZY-Medium versetzt
5 g/l	Hefeextrakt			Mit
2 g/l	MgSO ₄ × 7H ₂ O	15 g/l		Agar
5 g/l	NaCl			
	pH-Wert wird mit 5N NaOH auf 7,5 eingestellt			
	NZY-Top-Agarose			
	NZY-Medium versetzt mit			
	0,7% (w/v) Agarose			
	SOB-Medium		SOC-Medium	
20 g/l	Casein-Hydrolysat			SOB-Medium versetzt mit
5 g/l	Hefeextrakt	10 mM		MgSO ₄
10 mM	NaCl	10 mM		MgCl ₂
2.5 mM	KCl	20 mM		Glukose
	pH-Wert wird mit 5N NaOH auf 7,0 eingestellt			
	SM-Puffer		Glycerin-Medium	
5,8 g/l	NaCl	5 ml		passendes Medium versetzt mit
2 g/l	MgSO ₄ × 7H ₂ O	5 ml		Glycerin
5 % (v/v)	1 M Tris-HCl (pH 7,5)			
0,5 % (v/v)	2% (w/v) Gelatine			

2.B.2. Bakterienkulturen

Plattenkulturen

Bakterien einer Flüssig- oder Festkultur wurden fraktioniert auf einer Agarplatte mit dem passenden Antibiotikum ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht. Diese Plattenkultur konnte mindestens eine Woche bei 4°C mit Parafilm abgedichtet aufbewahrt werden oder wurde in einwöchigem Abstand erneuert.

Vorkulturen

Eine Bakterienkolonie wurde in 3 ml Selektionsmedium angeimpft und bei 37°C und 250 rpm meist über Nacht geschüttelt. Diese Vorkultur wurde zur Inokulation größerer Volumina oder zur Minipräparation von Plasmid-DNA verwendet.

Magnesiumsulfat (MS)-Kulturen

20 ml LB-MM-Medium wurden mit einer Einzelkolonie einer Plattenkultur angeimpft und bei 30°C unter Schütteln (200 rpm) über Nacht inkubiert. Durch 0,2 % Maltose in diesem Medium wurde eine bessere Adsorption der Bakteriophagen erreicht als ohne Maltose, da der Zucker das Maltose-Operon induziert, welches das Gen (*lamB*) enthält, das den Rezeptor des Bakteriophagen *I* kodiert. Nach mindestens achtstündigem Wachstum wurden die Zellen 10 Minuten bei 2000 rpm in einem sterilen Röhrchen zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen, und anschließend wurde das Bakteriensediment in ca. 15 ml 10 mM MgSO₄ resuspendiert. Die Absorption dieser Bakteriensuspension wurde mit steriler 10 mM MgSO₄-Lösung auf einen A₆₀₀-Wert = 0,5 eingestellt. Diese MS-Kultur konnte für 2-3 Tage bei 4°C gelagert werden.

Dauerkulturen

Um Bakterien längerfristig lagern zu können, wurden aus Übertagkulturen sogenannte Dauerkulturen bzw. Glycerinstämme hergestellt. Hierzu wurden Bakterien einer Einzelkolonie, die von einer Plattenkultur (siehe oben) entnommen wurde, in 5 ml Selektionsmedium angeimpft und unter Schütteln bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀≈1,0 wachsen gelassen. Als die Bakterien die gewünschte Dichte erreicht hatten, wurde jeweils 1 ml der Kultur mit 450 µl Glycerin-Flüssigmedium versetzt, welches zu gleichen Teilen aus Glycerin und dem Selektionsmedium

bestand. Die nun mit Glycerin versetzten Ansätze wurden gut geschüttelt (gevortext), in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.B.3. Herstellung elektrokompetenter Zellen

(Dower et al., 1988)

Der *E. coli*- Stamm DH10B wurde aus der Dauerkultur auf LB-Agar ausgestrichen. Mit einer Einzelkolonie dieser Kulturplatte wurden 6 ml SOB-Medium als Vorkultur angeimpft und über Nacht inkubiert. 1 l SOB-Medium wurde mit dieser Vorkultur in einer 1:200-Verdünnung inokuliert und bei 37°C unter Schütteln inkubiert bis die OD₆₀₀=1 betrug. Die Bakterien wurden in Eiswasser auf 4°C abgekühlt und auf 10⁸ CFU/ml zentrifugiert. Die Zellen wurden bei 4°C aufbewahrt.

20 µl elektrokompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 1 µl des entsalzten Ligationsansatzes vorsichtig gemischt. Diese Mischung wurde luftblasenfrei zwischen die Elektroden einer auf Eis gekühlten 1 mm-Küvette pipettiert. Die Elektroporation wurde bei einer Spannung von 1,6 kV durchgeführt. Anschließend wurde 1 ml SOC-Medium zugegeben und vorsichtig gemischt. Diese Bakteriensuspension wurde 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden 50 - 250 µl des Ansatzes auf dem eingeführten Plasmid entsprechenden Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.C. Durchmusterung von cDNA-Bibliotheken

2.C.1. *Igt10*-cDNA-Bibliothek

Igt10 ist ein Klonierungsvektor, in den man DNA-Fragmente bis zu einer Länge von 7,6 Kilobasen einfügen kann. *Igt10* enthält eine universelle *EcoRI*-Schnittstelle, die im Innern des *cI imm*⁴³⁴-Gen lokalisiert ist, so daß eine Selektion für rekombinante Phagen angewendet werden kann. Wenn ein DNA-Fragment in diese *EcoRI*-Schnittstelle inkloniert wird, wird ein *cI imm*⁴³⁴-Phage gebildet, und wenn ein *Igt10*-Phage einen *E. coli* Stamm infiziert, der die Mutation für 'high frequency of lysogeny' (*hfl*) trägt, wird der *cI*⁺ Phage (Hintergrund) reprimiert, und der *cI*⁻ Phage (Rekombinante) bildet Plaques mit der normalen Effizienz. cDNA-Bibliotheken, die mit diesem Vektor konstruiert wurden, können mit DNA-Sonden durchmustert (gescreent) werden. Die in dieser Arbeit verwendete *Igt10* cDNA-Bibliothek aus der Rattenniere wurde von Dr. Valentin Gorboulev, Anatomisches Institut Würzburg, hergestellt und zur Verfügung gestellt.

Der *E. coli* Wirtstamm, der zum Ausplattieren der *Igt10* cDNA-Bibliothek verwendet wurde, nennt sich NM514 und weist *lycB7*-Defizienz auf. Diese Mutation führt zu dem oben geforderten *hfl*-Genotyp (2.A.7.).

2.C.2. Herstellung und Ausplattieren von Infektionsansätzen

Zunächst wurde eine MS-Kultur des Wirtsbakteriums (*E. coli* NM514) hergestellt (2.B.2.). Dann wurden die gewünschten Verdünnungen der *I*-Phagen in SM-Puffer (2.B.1.) angesetzt. 1

μl - 10 μl dieser Phagenlysate wurden mit 200 μl der MS-Kultur vermischt. Die Infektionsansätze wurden nun 15 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert, um die Adsorption der Phagen an die Bakterien zu gewährleisten. Zu diesen Ansätzen wurden 3 ml auf 49°C vorgewärmte Top-Agarose gegeben, kurz gemischt und zügig auf ebenfalls vorgewärmte und trockene NZY-Platten ausplattiert. Anschließend ließ man die Platten bis zum vollständigen Abkühlen der Top-Agarose-Schicht ruhen und inkubierte 7 h - 12 h bei 37°C im Brutschrank, bis die Plaques auf dem Bakterienrasen deutlich sichtbar wurden. Die oben angegebenen Volumina wurden für das Ausplattieren auf 96 mm Petrischalen gewählt. Dies war der Fall bei Titerbestimmungen oder bei der Vereinzelnung positiver Plaques. Bei der Herstellung der Infektionsansätze für 150 mm-Platten (beim Ausplattieren der Bibliotheken für die 1. Runde der Durchmusterung) wurden folgende Volumina eingesetzt: 600 μl des Wirtsbakteriums, 1-10 μl der Phagenlysate und 6,5-7 ml Top-Agarose.

2.C.3. Titerbestimmung von cDNA-Bibliotheken

Die cDNA-Bibliothek aus der Rattenniere war in zwei Ansätze aliquotiert worden, die getrennt ausplattiert wurden. Es wurde jeweils eine 1:100 und eine 1:1000-Verdünnung der Phagensuspensionen in SM-Puffer hergestellt. Jeder Ansatz wurde zur Bildung eines Mittelwertes zweimal ausplattiert, wobei 10 μl der jeweiligen Verdünnung mit 200 μl MS-Kultur bei 37°C inkubiert und anschließend ausplattiert wurden (2.C.1.). Die auf dem Bakterienrasen entstandenen Plaques wurden dann mit der Hand ausgezählt. Aus dieser Titerbestimmung ging das benötigte Volumen der Phagensuspensionen hervor, die zum effizienten Ausplattieren der cDNA-Bibliothek für die erste und die zweite Runde der Durchmusterung nötig waren. Für die 1. Runde auf 150 mm-Platten sollten 30000 Plaques pro Platte erreicht werden, und die Ausplattierung zur 2. Runde auf 96 mm-Platten sollte die Zahl von 200 Plaques pro Platte nicht überschreiten, damit deutlich einzelne Plaques detektiert und die zugehörigen Phagen eindeutig separiert werden konnten.

2.C.4. DNA-Transfer auf Nitrozellulosemembranen

Nachdem die Bakterien erst gewachsen und dann von den Phagen lysiert worden waren, wurden die mit den Plaques übersäten Platten auf 4°C abgekühlt, um zu verhindern, daß sich nach dem Auflegen der Nitrozellulosemembranen (NZ-Membranen) die TopAgarose nicht von dem übrigen Agar ablöste und an der Membran hängen blieb. Bei den nächsten Schritten sollten unbedingt Handschuhe getragen werden, da das Anfassen der NZ-Membranen zu unspezifischen Signalen auf den Filtern führen kann. Auf die Platten wurde nun für 1 min eine NZ-Membran aufgelegt. Die NZ-Membran und der Agar wurden bis zum Plattenboden mit einer Nadel mehrere Male durchstochen, um die Orientierung der NZ-Membran auf der Platte zu einem späteren Zeitpunkt nachvollziehen zu können. Auf dem Plattenboden wurden außen die Einstichstellen mit einem wasserunlöslichen Stift deutlich markiert und sowohl die Platte als auch die NZ-Membran eindeutig beschriftet, um diese später wieder einander zuordnen zu können. Nach dem einminütigen Auflegen wurde eine weitere Membran auf derselben Platte für zwei Minuten aufgelegt und wie bei dem ersten Filterverfahren. Nach dem Auflegen wurden die NZ-Membranen mit der zu den Plaques exponierten Seite nach oben auf Whatman 3MM-Filterpapier gelegt, bis bei allen anderen Platten der DNA-Transfer auf die Nitrozellulosemembranen auch durchgeführt worden war. Nach dem Transfer wurden die NZ-Membranen mit der DNA-Seite nach oben 7 min auf ein mit Denaturierungslösung getränktes Whatman 3MM-Filterpapier gelegt und so die transferierte DNA denaturiert. Die Nitrozellulosemembranen sollten die Denaturierungslösung über ihre gesamte Fläche aufsaugen, aber keinesfalls in der Lösung schwimmen. Anschließend wurden die NZ-Membranen 3 min auf mit Neutralisierungslösung getränktes Filterpapier gelegt. Der Neutralisierungsschritt wurde noch einmal für 3 min wiederholt. Nun wurden die Filter in einem Gefäß mit $2 \times$ SSC-Puffer gewaschen, indem man die NZ-Membranen in den Puffer eintauchte, kurz schwenkte und dann auf Whatman 3MM-Filterpapier vollständig trocknen ließ. Danach wurde die transferierte DNA mit der NZ-Membran quervernetzt ('cross-linking'), indem die Membranen für ca. 30 sec einer UV-Bestrahlung von 1200 Joule ausgesetzt wurden (UV Stratlinker der Firma Stratagene). Auf diesen NZ-Membranen erfolgte in den anschließenden Schritten die Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde (2.C.5.)

Denaturierungslösung: 1,5 M NaCl
0,5 M NaOH

Neutralisierungslösung: 1,5 M NaCl
0,5 M Tris-HCl, pH 7,2

20 × SSC-Puffer: 3,0 M NaCl
0,3 M Na₃Citrat·2H₂O
mit 1 M HCl auf pH 7,0 einstellen

2.C.5. Hybridisierung und Detektion von positiven Signalen

Bevor die Nitrozellulosefilter mit der radioaktiv markierten Sonde hybridisiert wurden, erfolgte zunächst eine Prähybridisierung der Filter. Hierzu wurden die Filter in Hybridisierungsröhren mit Prähybridisierungslösung gesteckt und in einem Hybridisierungsofen inkubiert. Die Menge der Prähybridisierungslösung richtete sich nach der Menge der zu inkubierenden Filter. In der Regel wurden 2-3 ml Lösung/Membran (d = 140 mm) verwendet. Zur Prähybridisierung von 10 Nitrozellulosefiltern in einer Hybridisierungsröhre wurden 25 ml Prähybridisierungslösung verwendet, die zunächst auf 65°C vortemperiert worden war. Zur Absättigung des Hintergrundes wurden pro Röhre 500 µg Heringssperma-DNA zugegeben, welche zuvor 5 min bei 100 °C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt worden war. Die Nitrozellulosefilter wurden übereinander gestapelt, zusammengerollt und in die Hybridisierungsröhre gesteckt. Die Prähybridisierung erfolgte für 4 h bei 65°C im Hybridisierungsofen. Während dieser Zeit wurden erneut 25 ml Hybridisierungslösung auf 65°C vortemperiert und ebenfalls mit denaturierter Heringssperma-DNA versetzt. Die Prähybridisierungslösung wurde nun gegen diese frische Lösung ausgetauscht und die radioaktiv markierte DNA-Sonde (*Q.D.I.*), die zuvor auch denaturiert worden war, zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C.

(Prä)Hybridisierungslösung/ 200 ml: 60 ml 20 × SSC-Puffer
10 ml 100 × Denhardt-Lösung
10 ml 10 % SDS-Lösung
mit H₂O ad 500 ml

20 × SSC-Puffer/ Liter: 175,3 g NaCl
88,2 g Na₃Citrat·2H₂O
mit H₂O ad 800 ml
mit 1 M HCl auf pH 7,0 einstellen
mit H₂O ad 1 l

100 × Denhardt-Lösung/ 500 ml: 10 g Ficoll 400
10 g Polyvinylpyrrolidone
10 g BSA
mit H₂O ad 500 ml

Nach der Hybridisierung wurden die Filter gewaschen. Hierzu wurden die folgenden Waschlösungen angesetzt und auf 60°C temperiert:

Waschlösung 1: 2 × SSC-Puffer
0,1% SDS

Waschlösung 2: 0,25 × SSC-Puffer
0,1% SDS

In zwei 2 Liter-Bechergläser wurden jeweils 1,5 l der Waschlösung 1 gefüllt. Die Filter wurden zunächst vorsichtig mit einer langen Pinzette aus den Hybridisierungsröhren in ein Gefäß mit vortemperierter Waschlösung 1 überführt. Von dort aus wurde ein Filter nach dem anderen in das 1. Becherglas überführt. Die Bechergläser standen in einem auf 60°C beheizten Schüttelbad. Nachdem alle Filter überführt waren, wurden die Filter 30 min unter Schütteln gewaschen und anschließend genauso im 2. Becherglas behandelt. Während dieser Zeit wurde ein drittes Becherglas mit 1,5 l der Waschlösung 2 vorbereitet. Die Waschprozedur wurde ein drittes Mal für 15 min bei 60°C wiederholt. Um die Hybridisierung der radioaktiven Sonde auf den Filtern detektieren zu können, sollten Röntgenfilme für einen bestimmten Zeitraum aufgelegt werden. Hierzu wurden Expositionsboxen mit dünner durchsichtiger Plastikfolie ausgelegt. Die Filter wurden, ohne dabei zu trocknen und ohne sich gegenseitig zu bedecken, auf die Folie gelegt und dann selbst noch einmal mit Folie bedeckt. Nun wurden noch fluoreszierende Aufkleber zur Markierung der Positionen der Filter auf die Folie geklebt, deren Muster dann später auf den entwickelten Röntgenfilmen zu sehen war. Zuletzt wurden die Filme aufgelegt, die Boxen nach

einer Minute fest verschlossen und 2 Tage bei -80°C inkubiert. Nach 48-72 h wurden die Röntgenfilme entwickelt und getrocknet. Anhand der Übereinstimmung der Signale von positiven Klonen mit den Mustern der fluoreszierenden Aufkleber konnte man den einzelnen Filmen die richtigen Filter zuordnen. Die Einstichstellen der Nadeln, die beim Auflegen der Nitrozellulosefilter auf die Agarplatten entstanden, wurden farbig auf der Plastikfolie markiert und anschließend so exakt wie möglich auf die entwickelten trockenen Filme übertragen. Von den markierten Punkten auf den Filmen ausgehend, wurden nun die positiven Signale der Hybridisierung auf dem Boden der zugehörigen Agarplatten eingezeichnet und die positiven Signale vereinzelt (2.C.5.).

2.C.6. Vereinzlung positiver Signale

Bei der Vereinzlung von positiven Plaques, wurden die auf den Agarplatten gekennzeichneten Klone (Plaques) mit einer sterilen Pasteurpipette ausgestochen. Hierzu wurden die Plaques mit dem darunterliegenden Agar ausgestochen und in ein vorbereitetes Gefäß mit 500 μl SM-Puffer und fünf Tropfen Chloroform überführt. Diese Agarstückchen mit den Phagen ließ man 1-2 h bei Raumtemperatur stehen, um eine Diffusion der Phagenpartikel in das Medium zu ermöglichen. Ein durchschnittlicher Plaque enthält 10^6 - 10^7 infektiöse Bakteriophagen, die bei 4°C ohne Verlust der Überlebensfähigkeit in SM-Puffer mit Chloroform gelagert werden können. Bei älterem Chloroform besteht die Möglichkeit, daß durch Produkte der Photolyse die Bakteriophagen inaktiviert werden können. Deswegen wurde für den SM-Puffer möglichst frisches Chloroform verwendet. Nach der Vereinzlung der positiven Phagenplaques aus der ersten Durchmusterungsrunde wurden die Phagen zur Bestimmung des Phagentiters auf 96 mm-Platten ausplattiert. Anschließend wurden die Phagen erneut in einer Anzahl von bis zu 200 Phagen pro Platte ausplattiert und nochmals einer Hybridisierung unterzogen. Die Vereinzlung der positiven Palques wurde solange weitergeführt, bis die Isolierung der Phagen des identifizierten positiven Plaques ohne Vermischung mit anderen Klonen gewährleistet war. Die Phagensuspensionen wurden entweder in mit Chloroform versetztem SM-Puffer bei 4°C gelagert oder nach einer Amplifikation (2.C.6.) einer anschließenden *I*-DNA-Präparation (2.D.6.) unterzogen.

2.C.7. Amplifizierung des Bakteriophagen I

Es ist oft nützlich, cDNA-Bibliotheken zu amplifizieren, um eine große stabile Menge einer Stammlösung der Bibliothek mit einem hohen Titer lagern zu können. Man sollte die Phagen einer cDNA-Bibliothek jedoch nur einmal amplifizieren, da sonst Klone, die schlechter wachsen, nach mehreren Amplifizierungen unterrepräsentiert sind.

Zunächst wurde eine MS-Kultur der Wirtsbakterien hergestellt (2.B.2.). Außerdem wurden die Phagen der cDNA-Bibliothek in SM-Puffer so verdünnt, daß die angesetzte Phagenverdünung ungefähr 50000 'plaque-forming units' (pfu) enthielt. Das Volumen dieser Phagensuspension sollte jedoch nicht größer als 300 µl sein. Die hergestellte Phagensuspension wurde mit 600 µl der MS-Kultur 15 min bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde auf einer 150 mm-Platten ausplattiert (2.C.2.) und bei 37°C für mindestens 6 h inkubiert. Die Plaques sollten nicht größer als 1-2 mm werden. In der Regel setzt man für eine Amplifizierung ungefähr sechs Platten mit den oben beschriebenen Ansätzen an. Nach der Inkubation wurden die Platten mit 8-10 ml SM-Puffer überschichtet und über Nacht bei 4°C unter leichten Schwenken inkubiert, damit die Phagen abgeschwemmt wurden. Am nächsten Morgen wurden die Bakteriophagensuspensionen von jeder Platte in einem 50 ml-Plastikröhrchen vereinigt. Die Platten wurden mit jeweils 2 ml SM-Puffer gewaschen und den bereits entnommenen Phagen zugefügt. Schließlich wurde Chloroform in einer Endkonzentration von 5% zugegeben und gut gemischt. Die Phagensuspensionen wurden für 15 min bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wurden die Zelltrümmer der Bakterien durch eine Zentrifugation für 10 min bei $2000 \times g$ abgetrennt. Der Überstand mit den amplifizierten Bakteriophagen wurde abgenommen, und Chloroform wurde bis zu einer 0,3%igen Endkonzentration zugegeben und bei 4°C gelagert. Über eine Verdünnungsreihe dieser Stammlösung wurde noch der erhaltene Phagentiter bestimmt (2.C.3.).

2.D. Molekularbiologische Methoden

2.D.1. Herstellung einer radioaktiven DNA-Sonde

Zur Klonierung von rOCT2 wurde rOCT1-DNA (*Gründemann et al., 1994a*) als Sonde verwendet, um eine *Igt10*-cDNA-Bibliothek aus Rattenniere zu durchsuchen. Das zu markierende rOCT1-Fragment wurde mit EcoRI aus dem Vektor ausgeschnitten und hatte eine Größe von 1,2 kb. Das Fragment wurde aus dem Gel isoliert (2.D.2.) und anschließend mit dem 'RadPrime DNA Labeling System' von LifeTechnologies radioaktiv markiert. Dieses Markierungssystem erzeugt hoch spezifisch aktive [³²P]-Sonden. Hierbei binden Nukleotid-Oktamere (sog. Random Primer) an die denaturierte DNA und durch das Klenow-Fragment (große Untereinheit der DNA-Polymerase I) wird α -[³²P]dATP in den entstehenden DNA-Strang eingebaut. Für die Markierung wurden 200 ng des DNA-Fragments eingesetzt. Die DNA wurde zunächst mit H₂O auf 13,5 μ l aufgefüllt und 5 min bei 100 °C denaturiert und anschließend 5 min auf Eis gestellt. Nach der Denaturierung wurden jeweils 1 μ l 500 μ M dCTP, dGTP, dTTP und 20 μ l 2,5fach-konzentrierter Puffer, der die 'Random Primer' enthielt, zupipettiert. Die genauen Angaben über Pufferzusammensetzung und die Basenabfolge der Oligonukleotide behielt sich der Hersteller LifeTechnologies vor. Der Ansatz wurde kurz zentrifugiert und anschließend 12,5 μ l α -³²P-dATP (125 μ Ci) zugegeben. Das Volumen des Ansatzes sollte nun 49 μ l betragen. Es wurde 1 μ l Klenow-Fragment zupipettiert und der Ansatz 1 h bei Raumtemperatur belassen. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 5 μ l Stopplösung beendet. Die radioaktiv markierte DNA wurde, wie oben beschrieben, erneut denaturiert und 2/3 des Sondenvolumens wurden über Nacht für die Hybridisierungsreaktion (2.C.5.) verwendet. Der Rest der Sonden wurde für eine eventuelle zweite Runde der Durchmusterung aufbewahrt.

2.D.2. Isolierung von Plasmid-DNA

Je nach gewünschter Menge und Verwendung der zu isolierenden Plasmid-DNA wurden unterschiedliche Ansätze zu deren Isolierung und Reinigung gewählt. Die Plasmid-DNA aus den 'Minipräparationen' wurde für Sequenzierungen und Restriktionsanalysen eingesetzt. Die DNA aus 'Maxipräparationen' wurde neben den bereits genannten Verwendungsarten auch zur

Herstellung von cRNA (2.D.8.) benutzt. Die DNA-Menge bzw. Qualität wurde nach den jeweiligen Präparationen photometrisch (2.D.6.) und durch Auftragung auf ein Agarosegel (2.D.6.) bestimmt.

Minipräparation

Hierbei handelt es sich um die Plasmidpräparation aus Bakterien durch alkalische Lyse (*Birnboim und Doly, 1979*). Begonnen wurde mit der dreiminütigen Zentrifugation von 1,5 ml Übernachtskultur bei $5000 \times g$. Das Bakteriensediment wurde in 300 μ l P1-Puffer zur Destabilisierung der Zellmembran resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wurden 300 μ l P2-Puffer zugegeben und somit die alkalische Lyse induziert. Dieser Ansatz wurde vorsichtig gemischt und nicht länger als 5 min auf Eis belassen. Durch Zugabe von 300 μ l P3-Puffer wurden die hochmolekulare DNA und ein Teil der Bakterienproteine gefällt. Das Lysat wurde 15 min auf Eis gekühlt und anschließend für 15 min bei $11000 \times g$ zentrifugiert. 800 μ l des Überstands wurden mit 640 μ l Isopropanol versetzt. Dieser Ansatz wurde für 30 min bei $10000 \times g$ zentrifugiert. Anschließend wurde das DNA-Sediment mit 70%igem Ethanol gewaschen und danach in 20 μ l H₂O oder TE-Puffer gelöst.

P1-Puffer: 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 μ g/ml RNase, pH 8,0

P2-Puffer: 0,2 M NaOH, 1% SDS (frisch angesetzt)

P3-Puffer: 3 M KAc, pH 5,5

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0

Maxipräparation

(*Sambrook et al., 1989*)

Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA wurden 250 ml Übernachtskultur für 10 min auf Eis abgekühlt und danach bei $2000 \times g$ und 4°C 15 min lang zentrifugiert. Das Sediment wurde in 4 ml Lysozym-Glukose-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden 8 ml Lysepuffer zugegeben. Nun stand das Lysat für 7 min auf Eis. Danach wurden durch Zugabe von 6 ml 3 M Kaliumacetat, pH 5,3, der größte Teil der bakteriellen Proteine, die

hochmolekulare DNA und das SDS gefällt. Nachdem das Bakterienlysat 15 min auf Eis gekühlt worden war, wurde es 30 min lang bei $28000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden zum Überstand 9 ml einer eisgekühlten PEG 6000-Lösung gegeben. Zur Fällung der DNA wurde die Suspension dann 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde sie für 15 min bei $5000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 70% EtOH gewaschen und in 2,5 ml TE-Puffer gelöst. Danach konnte die Plasmidpräparation durch einen Caesiumchlorid-Gradienten (2.D.3.) von möglichen Resten chromosomaler DNA oder bakterieller RNA gereinigt werden.

Lysozym-Glukose-Puffer: 50 mM Glukose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA,
2,5 mg/ml Lysozym, 100 $\mu\text{g/ml}$ RNase A, pH 8,0

Lysepuffer: 0,2 M NaOH, 1% SDS

PEG 6000-Lösung: 30% PEG

2.D.3. Reinigung von Plasmid-DNA

Caesiumchlorid-Dichtegradienten-Zentrifugation

(Sambrook et al, 1989)

2,5 ml einer DNA-Lösung wurden mit 7 ml TE-Puffer und 1 ml Ethidiumbromidlösung (10mg/ml) versetzt. In diesem Ansatz wurden 9,92 g CsCl gelöst, um so eine CsCl-Endkonzentration von 5,6 M einzustellen. Diese Lösung wurde luftblasenfrei in ein ‚Quickseal-Röhrchen‘ gefüllt und 20 h bei $38000 \times g$ und 18°C ultrazentrifugiert. Nach dem ungebremsen Auslaufen der Zentrifuge wurde die ‚supercoiled‘ DNA-Bande mittels einer Kanüle abgezogen und das Ethiumbromid durch mehrmaliges Ausschütteln mit Isoamylalkohol entfernt. Anschließend wurde die DNA in 70% Ethanol 30 min auf Eis gefällt und 15 min bei $8000 \times g$ bei 4°C zentrifugiert. Danach wurde das DNA-Sediment in 500 μl H₂O gelöst und durch eine NaAc-Fällung präzipitiert. Das mit 70% EtOH gewaschene und vollständig getrocknete DNA-Sediment wurde in ca. 200 μl H₂O gelöst und anschließend die erhaltene DNA-Menge photometrisch bestimmt.

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0

Qiagen-Säulen

Wenn zur Aufreinigung von Plasmid-DNA ‚Qiagen-tip 500-Säulen‘ (Firma Qiagen) verwendet wurden, wurde die Plasmid-Präparation und die anschließende Aufreinigung nach Empfehlung des Herstellers durchgeführt:

Die Bakterien wurden in 100 ml Erlenmeyer-Kolben mit 25 ml selektivem LB-Medium angeimpft. Sie wuchsen 12-16 h bei 37°C unter Schütteln. Nachdem sie bei $3000 \times g$ abzentrifugiert worden waren, wurde das Bakteriensediment in 10 ml Puffer P1 suspendiert. Durch die Zugabe von Puffer P2 für 5 min erfolgte eine alkalische Lyse der Bakterien. Anschließend wurden 10 ml Puffer P3 für eine 20minütige Präzipitation auf Eis hinzugefügt. Das Präzipitat wurde bei $10000 \times g$ in einem Sorvall SS-34 Rotor zentrifugiert und der Überstand mit der Plasmid-DNA anschließend sofort abgenommen. Dieser Überstand wurde erneut für 15 min bei $10000 \times g$ zentrifugiert und danach auf eine Qiagen-Säule, die vorher mit 10 ml QBT-Puffer equilibriert worden war, aufgetragen. Nachdem die Säule mit dem Plasmid-haltigen Überstand beladen worden war, wurde diese zweimal mit 30 ml Puffer QC gewaschen, um anschließend die DNA mit 15 ml Puffer QF zu eluieren. Das Eluat wurde mit 0,7 Volumen (10,5 ml) auf Raumtemperatur vorgewärmtem Isopropanol gemischt und sofort bei $12000 \times g$ für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Das DNA-Sediment wurde mit 5 ml 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet, in 200 μ l H₂O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

P1-Puffer: 50 mM Tris·Cl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 μ g/ml RNase A

P2-Puffer: 200 mM NaOH; 1% SDS

P3-Puffer: 3 M Kaliumacetat; pH 5,5

Puffer QBT: 750 mM NaCl; 50 mM MOPS; pH 7,0; 15% Isopropanol;
0,15% Triton X-100

Puffer QC: 1 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15% Isopropanol

Puffer QF: 1,25 M NaCl; 50 mM Tris·Cl, pH 8,5; 15% Isopropanol

Phenol/Chloroform-Extraktion

(Wallace, 1987)

Zur Entfernung von Proteinen wurden DNA-Lösungen mit dem gleichen Volumen einer gesättigten Phenol/Chloroform-Lösung und anschließend mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) bei Raumtemperatur ausgeschüttelt. Nach dem Ausschütteln wurde jeweils bei $10000 \times g$ 5 min lang zentrifugiert und die obere wäßrige Phase abgenommen. Nach dem ersten Ausschütteln mit Phenol/Chloroform wurde die organische Phase nochmals mit dem gleichen Volumen H_2O versetzt und erneut extrahiert. Die wäßrigen Phasen wurden vereinigt. Um Phenolreste aus der wäßrigen Phase herauszulösen, wurde der Ansatz mit Chloroform/Isoamylalkohol behandelt. Nach diesem Schritt wurde die wäßrige Phase abgetrennt eine DNA-Präzipitation durchgeführt.

DNA-Präzipitation

Fällung mit Natriumazetat

Durch die Präzipitation der DNA wird eine Konzentrierung der DNA und eine Verringerung der Salzkonzentration erreicht. Hierzu wurde die DNA-Lösung mit 1/10 Volumen 3 M NaAc, pH 5,2 und 2,5 Volumeneinheiten 96% EtOH versetzt. Enthielt der Ansatz voraussichtlich weniger als 2 μg DNA, wurde lineares Polyacrylamid bis zu einer Endkonzentration von 3 $\mu g/ml$ als Fällungshilfe zugegeben. Danach wurde der Ansatz mindestens 1 h bei $-20^\circ C$ belassen und anschließend 15 min lang bei $10000 \times g$ zentrifugiert. Das DNA-Sediment wurde mit 70% EtOH gewaschen, getrocknet und in H_2O gelöst. DNA-Lösungen, die für eine Elektroporation entsalzt werden mußten, wurden einem zusätzlichen Waschschrift unterzogen. Hierzu wurde die sedimentierte DNA in 70% EtOH 30 min lang bei Raumtemperatur belassen und anschließend 15 min bei $10000 \times g$ zentrifugiert und danach, wie oben beschrieben, nochmals gewaschen und resuspendiert.

Fällung mit Ammoniumazetat

Bei dieser Fällung wurden 0,2 Volumen 10 M Ammoniumazetat und 2 Volumen Ethanol zu der wäßrigen DNA-Lösung gegeben. Diese Mischung wurde 10 min bei Raumtemperatur belassen

und anschließend bei $10000 \times g$ für 20 min zentrifugiert. Das DNA-Sediment wurde getrocknet und in einem passenden Volumen H_2O aufgenommen.

Extraktion von DNA aus einem präparativen Agarosegel

Die zu isolierende DNA wurde durch Agarosegelelektrophorese (1%iges Gel) aufgetrennt. Die entsprechende DNA-Bande wurde mit dem Skalpell ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des ‚EasyPure DNA Purification Kit‘ der Firma Biozym isoliert. Der EasyPure Kit arbeitet mit einer größendefinierten Silicomatrix, die sowohl einzel- als auch doppelsträngige DNA bindet, während DNA-Fragmente unter 40 bp (z. B. Oligonukleotide) nicht gebunden werden. Die Aufreinigung der gewünschten DNA erfolgte in drei Schritten über eine Bindung, Waschung und Elution. Die Silicomatrix erleichterte das Resuspendieren sedimentierter DNA. Da die abschließende Elution der DNA in einem Volumen von 10-20 μl erfolgte, entfiel eine weitere Konzentrierung wie z. B. durch Ethanolfällung. 1 μl der gewonnenen DNA wurde zur Mengenbestimmung auf einem analytischen Gel mit DNA-Proben bekannter Konzentration verglichen.

2.D.4. Isolierung und Reinigung von *I*-DNA

Um größere Mengen DNA aus dem Bakteriophagen *I* isolieren zu können, wurde die Amplifizierung der Phagen mit Hilfe des Bakterienstammes NM514 durchgeführt.

1. Tag: Die Phagen wurden aus positiven Signalplaques nach der Durchmusterung einer cDNA-Bibliothek in 500 μl SM-Puffer und 5 μl Chloroform über Nacht abgeschwemmt. Parallel dazu ließ man eine Übernachtskultur des Bakterienstamms NM514 wachsen.

2. Tag: In 250 ml-Erlenmeyerkolben mit Schikane wurden 50 ml NZCYM-Medium vorgelegt und der folgende Infektionsansatz pipettiert:

100 μl Phagensuspension

100 μl NM514-Übernachtskultur

100 μl 10 mM $MgCl_2$ /10 mM $CaCl_2$

Dieser Ansatz wurde für 15 min bei 37°C inkubiert und anschließend in die vorbereiteten Kolben überführt. Das Medium mit dem Infektionsansatz ließ man nun bei 300 rpm und 37°C schütteln. Nach sechs Stunden schaute man in regelmäßigen Abständen nach, ob die bis dahin gewachsene Bakterienkultur durch die Lyse wieder klar wurde. Konnte man dies beobachten, wurden zur vollständigen Lyse der Bakterien noch einige Tropfen Chloroform zugegeben. Die Suspension wurde nun unter Zurücklassen des Chloroforms in SS34-Röhrchen überführt und 10 min bei $12000 \times g$ bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig in ein steriles 50 ml-Greiner-Röhrchen pipettiert, ohne dabei Reste der Zell-Debris aus dem Sediment mit zu überführen. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation für 10 min bei $12000 \times g$ bei 4°C. Der Überstand wurde wieder vorsichtig entnommen und bei 4°C aufbewahrt.

3.Tag: Zu 50 ml Phagensuspension werden 10 µl DNase-Lösung (5 mg/ml; 2500 U/mg) und 25 µl RNase-Lösung (10 mg/ml; 5000 U/mg) zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei $32000 \times g$ im SS34-Rotor bei 4°C für 1,5 h. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die restliche Flüssigkeit komplett aus den Röhrchen entfernt. Das Phagensediment wurde in 400 µl 0,05 M Tris-HCl, pH 8,0 mit einer abgeschnittenen blauen Eppendorf-Spitze gelöst. Anschließend wurde die Suspension in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß übertragen, mit 400 µl Phenol versetzt und 20 min horizontal bei Raumtemperatur geschüttelt. Die dabei entstandene obere viskose Phase wurde vorsichtig abgenommen und die Phenol-Extraktion wiederholt. Anschließend wurden 400 µl Chloroform zugegeben und nach dem Schütteln wiederum die obere Phase abgenommen. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt. Nun erfolgte die Präzipitation unter Zugabe von 40 µl 3 M NaAc, pH 4,2 und zwei Volumen Ethanol (Raumtemperatur). Der Ansatz wurde 10 min bei $10000 \times g$ und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das DNA-Sediment wurde 5 min mit 70%igem Ethanol gewaschen. Die DNA wurde getrocknet und in 100 µl H₂O aufgenommen. Anschließend wurde mit einem *I*-DNA-Mengenstandard über eine Agarosegelelektrophorese die Ausbeute der präparierten DNA bestimmt.

2.D.5. Modifikation von DNA

Enzymatische Restriktion

Alle Restriktionsenzyme wurden gemäß den Herstellerangaben eingesetzt. In der Regel wurden Typ-2 Endonukleasen eingesetzt, die durch 50 mM EDTA deaktiviert oder durch Phenol/Chloroform-Extraktion entfernt werden konnten. Die geschnittene DNA konnte durch eine Agarosegelelektrophorese analysiert werden.

Linearisierung von Plasmid-DNA für die cRNA-Synthese

Für eine *in vitro*-Transkription zur cRNA-Synthese wurden 10 µg Plasmid-DNA in einem Restriktionsansatz geschnitten. In der Regel wurde die Restriktion in einem Gesamtvolumen von 100 µl durchgeführt. Nach der Inkubation bei der dem Enzym entsprechenden Temperatur wurde die Vollständigkeit der Linearisierung auf einem Agarosegel überprüft. Anschließend wurde die geschnittene DNA nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion mit Natriumazetat gefällt. Nach dem Trocknen wurde die DNA auf eine Endkonzentration von 1 µg/µl in DEPC-H₂O aufgenommen. Für die *in vitro*-Transkription wurde 1 µg DNA pro Ansatz eingesetzt.

Ligation von DNA durch T4-DNA-Ligase

Vor der Ligation wurden die Vektor- und die Fremd-DNA mit den passenden Restriktionsenzymen verdaut und durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt (2.D.3.). Nach der Fällung mit Natriumazetat (3.D.3.) wurde die DNA in Wasser gelöst und auf eine Konzentration von 100 µg/ml eingestellt. Pro Ligationsansatz wurde 0,1 µg Vektor-DNA eingesetzt und die äquimolare Menge an Fremd-DNA zugegeben. Das Gesamtvolumen des Ligationsansatzes sollte nicht mehr als 10 µl betragen.

Reaktionsansatz:	50	mM	Tris-HCl, pH 7,5
	7	mM	MgCl ₂
	1	mM	DTT
	1	mM	RATP
	0,2	U/µl	Ligase

Inkubation: 12 h, 37°C

Meist wurde der Ligationsansatz nach der Inkubation für eine Elektrotransformation eingesetzt (2.B.4.).

2.D.6. DNA-Analyse

Photometrische Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die Absorption der DNA bei 260 nm gemessen. Unter Anwendung des Lambert-Beerschen-Gesetzes ließ sich die Konzentration aus gemessener Absorption und bekanntem Extinktionskoeffizienten berechnen, wobei die Optische Dichte von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml entsprach. Um die Reinheit der DNA-Lösung abschätzen zu können, wurde der Quotient aus A_{260} und A_{280} unter Berücksichtigung der H₂O-Absorption ermittelt. Bei einem Quotienten zwischen 1,6 und 2,0 betrachtete man die DNA als gut aufgereinigt.

Agarosegelelektrophorese

Um die Qualität und die Menge von DNA einschätzen zu können, wurde diese durch ein 1%iges Agarosegel in einer Elektrophorese aufgetrennt (*Sambrook et al., 1989*). Agarose wurde in TAE-Puffer aufgekocht, und nach dem Abkühlen auf ca. 60°C wurde 0,1 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben. Die DNA-Proben wurden mit 1/5 Auftragspuffer versetzt. Neben den zu analysierenden Proben wurde ein DNA-Molekulargewichtsstandard bzw. DNA-Mengenstandard mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte bei 6-8 V/cm. Durch die Interkalation des Ethidiumbromids in die DNA konnte diese bei UV-Anregung auf einem Transilluminator sichtbar gemacht und analysiert werden.

TAE-Puffer: 40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0

Auftragspuffer: 30% (v/v) Glycerin, 0,25% (w/v) Bromphenolblau

2.D.7. DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzbestimmung von DNA wurde die Kettenabbruchmethode nach *Sanger (1977)* verwendet. Die durch den Kettenabbruch entstandenen Fragmente wurden in einem

denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Die Sequenzierungsreaktion wurde mit einem Kit-System (Sequenase-Kit) der Firma Boehringer, Mannheim, durchgeführt, wobei nach Herstellerangaben verfahren wurde. Die DNA wurde vor der Reaktion denaturiert. Unter Zugabe von 1/10 Denaturierungslösung (2 M NaOH, 2 mM EDTA) wurde der Ansatz 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Ammoniumazetat in einer Endkonzentration von 2 - 2,5 M und von 3,5 Volumeneinheiten 96% Ethanol. Die Probe wurde für 30 min bei Raumtemperatur stehengelassen und anschließend bei $10000 \times g$ 10 min zentrifugiert. Das Sediment wurde in 70% Ethanol gewaschen, danach in H_2O aufgenommen und so für die Sequenzierungsreaktion eingesetzt.

Die Auftrennung der bei der Sequenzierungsreaktion entstandenen Produkte erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in einem 5%igen Polyacrylamidgel mit 7 M Harnstoff, wobei TBE-Puffer als Elektrophoresepuffer verwendet wurde. Es wurde ein Keilgel (0,1-0,4 mm Dicke) gegossen, welches durch die Trennung im Feldstärkegradienten (*Ansorge und Labeit, 1984*) die Darstellung im hochmolekularen Trennbereich und zur Stauchung kurzer Abbruchprodukte verbesserte. Vor der Herstellung des Gels wurde die Ohrenplatte mit 10 ml Bindesilanlösung behandelt, was ein besseres Anhaften des polymerisierten Gels gewährleisten sollte. Die Thermoplatte wurde mit AcryleaseTM behandelt. Die Polymerisation der Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung wurde durch Zugabe von 0,001% (v/v) TEMED und 0,06% (w/v) APS gestartet und war nach ca. 30 min abgeschlossen. Die Elektrophorese erfolgte bei 55°C und zunächst 1000 V zum gleichmäßigen Einlaufen der Proben. Die Spannung wurde nach 5 min auf 2000 V erhöht. Anschließend wurde das Gel in 10%iger (v/v) Essigsäure fixiert und danach bei 80-100°C getrocknet. Die Exposition eines aufgelegten Röntgenfilms erfolgte für 24 h.

TBE-Puffer: 90 mM Tris; 90 mM Natriumborat; 2 mM EDTA, pH 8,3

Bindesilanlösung: 0,002% (v/v) Bindesilan; 0,2% (v/v) Essigsäure in Ethanol

2.D.8. cRNA-Synthese

Zur Charakterisierung von Transportproteinen kann die DNA dieser Proteine in cRNA umgeschrieben und im Oozytensystem exprimiert werden (2.E.). Für die Expression in *Xenopus*-

Oozyten waren rOCT1 in den pRSSP- und rOCT2 in den pOG2-Vektor kloniert worden. Dieser Vektor enthält untranslatierte Regionen des *Xenopus*/β-Globin-Gens (Busch et al., 1996). Zur Herstellung von cRNA durch die *in vitro*-Transkription wurde der folgende Reaktionsansatz hergestellt und für 2 h bei 37°C inkubiert.

1-2 µg	lineare Plasmid-DNA
40 mM	Tris/HCl, pH 7,5
je 1,8 mM	ATP, CTP und UTP
0,3 mM	GTP
1,5 mM	m ⁷ G(5')ppp(5')G
13,2 mM	MgCl ₂
5 mM	DTT
0,5 U/µl	Rnasin
5 U/ml	Anorganische Pyrophosphatase
50 U	RNA-Polymerase
	H ₂ O ad 25 µl

Bei diesem Reaktionsansatz wurden die DNA-abhängigen-RNA-Polymerasen der Bakteriophagen T7 oder SP6 eingesetzt. Die Polymerase wurde entsprechend dem Vektor gewählt, in den das zu exprimierende Protein inkloniert worden war.

2.D.9. Agarosegelelektrophorese denaturierter RNA

Um Qualität und Menge der hergestellten cRNA abschätzen zu können, wurde die cRNA denaturiert durch Gelelektrophorese nach dem 'Glyoxalsystem' analysiert. Die Denaturierung von RNA erfolgte standardmäßig mit Glyoxal und DMSO (McMaster und Carmichael, 1977; Carmichael und McMaster, 1980). Es wurde ein 1%iges Agarosegel in Laufpuffer hergestellt, welches 5 mM Natriumjodessigsäure enthielt. Die RNA-Probe wurde mit drei Probenvolumen Glyoxalpuffer gemischt und 1 h bei 50°C inkubiert (Gründemann und Koepsell, 1994b). Nach Zugabe von Glycerin und Bromphenolblau auf die Endkonzentrationen von 10% bzw. 0,5 mg/ml wurde die RNA auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstant 5 V/cm in 75-90 min. Um die Entstehung von pH-Gradienten zu vermeiden, wurde der Laufpuffer ab 10 min nach der Probenauftragung mit einer Schlauchpumpe von der Anode zur Kathode umgewälzt. Als Längen- und Mengenstandard diente eine RNA-Leiter von GibcoBRL Life Technologies.

Laufpuffer: 10 mM BES, 0.1 mM EDTA, pH 6,7

Glyoxalpuffer: 50 µg/ml Ethidiumbromid, 50% DMSO, 1 M Glyoxal in Laufpuffer
(frisch angesetzt)

Da Glyoxal an der Luft vollständig oxidiert wird, mußte es vor Gebrauch mit Hilfe einer Deionisierungssäule vorbehandelt werden. Das Glyoxal wurde so häufig über eine Säule (Bio-Rad AG 501-X8) geschickt, bis der pH-Wert größer als 5 war. Die Lösung wurde zur Lagerung aliquotiert und eingefroren.

2.D.10. Klonierung von rOAT1

rOAT1 wurde über eine Polymerasekettenreaktion (PCR) aus Nierencortex-mRNA der Ratte isoliert. Hierzu wurden Oligonukleotidsequenzen (siehe Oligonukleotidtablelle) von der veröffentlichten rOAT1-Sequenz abgeleitet (*Sekine et al., 1997*). In den Oligonukleotidsequenzen war im 'Forward-Primer' eine XhoI-Schnittstelle und im 'Reverse-Primer' eine BamHI-Schnittstelle enthalten.

Die PCR-Bedingungen zur Amplifizierung der rOAT1-Sequenz waren:

Zeit	Temperatur	Anzahl der Zyklen
2'	94°C	1
30''	94°C	10
30''	50°C	
2'	68°C	
30''	94°C	20
30''	50°C	
2'	68°C	
20''	68°C	
7'	68°C	1

Die PCR wurde mit der 'Expand Long Template Amplification'-Kit von Boehringer Mannheim durchgeführt. Nach der Reaktion wurde das PCR-Produkt aus dem Agarosegel extrahiert und über die *BamHI/XhoI*-Schnittstellen in den pOG2-Vektor inkloniert (*siehe Anhang*).

2.E. Messungen am Oozytensystem

2.E.1. Allgemeines

Die *Xenopus*-Oozyte ist als eine undifferenzierte, omnipotente Einzelzelle besonders hilfreich für Untersuchungen von exogenen, Oozyten-fremden Proteinen wie z. B. Ionenkanälen, Membranrezeptoren oder zytoplasmatischen Enzymen. Zur Durchführung dieser Experimente werden die jeweiligen Boten-Ribonukleinsäuren (*messenger RNA*) oder die DNA in die Oozyte mikroinjiziert (*Gurdon et al., 1971*) und nach gewisser Zeit die proteinären Produkte der Expression in der lebenden Zelle oder im Zellextrakt detektiert. Das Studium exogener Proteinspezies nach Mikroinjektion von mRNA aus vielen bisher getesteten Organismen (*Lane, 1983*) ermöglicht Untersuchungen über Regulation, Kontrolle und Charakterisierung der Proteinbiosynthese in lebenden Zellen und nicht im *in vitro* System. Wegen der großen Masse und Translationskapazität (*Taylor, 1985; Soreq und Seidman, 1992*) einer einzelnen Oozyte erhält man bei sparsamem mRNA Einsatz hohe Proteinausbeuten. Es genügt eine einmalige Injektion von weniger als 1 pg mRNA pro Oozyte, um detektierbare Proteinmengen zu erhalten. Eine Sättigung des Translationsapparates ist mit ca. 20 ng/Oozyte erreicht (*Colman, 1984; Huez und Marbaix, 1986*). Meistens genügen 5-10 ng, d. h., mRNA Mengen von 100 oder 200 µg/ml werden in 50 nl dotiert. Injizierte Mengen und Translationsantwort sind nicht unbedingt proportional; oft erfolgt weitere oder erhöhte Translation erst nach längerer Zeit. Bei optimalem mRNA Einsatz werden ca. 10-30 Proteinmoleküle pro 1 mRNA-Molekül je Stunde translatiert bzw. exprimiert.

Die Oozyte kann posttranslationale Modifikationen (Phosphorylierung, N-Glykosylierung, Hydroxylierung, Azetylierung) durchführen und befördert das Protein in das richtige Kompartiment. Signalsequenzen werden abgespalten und oligomere Proteine korrekt zusammengesetzt (*Soreq, 1985; Huez und Marbaix, 1986*). Diese Eigenschaften sind insbesondere für die funktionelle Expression von Membranproteinen von größter Bedeutung (*Sigel, 1990*). Gegenüber den translatierenden zellfreien *in vitro* Translationssystemen wie Baculo-Viren, Retikulozyten oder Lysaten aus Weizenkeimlingen besitzt das Oozyten-System quantitative Vorteile, indem Oozyten unter Umständen über viele Stunden hinweg eine injizierte mRNA translatieren können, sofern das synthetisierte Protein mit der Physiologie der Oozyte

kompatibel ist (Colman, 1984; Huez und Marbaix, 1986). Die Syntheserate ist in manchen zellfreien Systemen zwar bis zu 10fach höher, jedoch sind diese Systeme oft nach 60 Minuten erschöpft. Der Umgang mit Oozyten erfordert im Gegensatz zur Zellkultur keine strikt sterilen Bedingungen. Die Präparation, Lagerung und Handhabung ist wegen der Größe der Zellen unproblematisch. Hinzu kommen eindeutige qualitative Vorteile. Es können mehrere Elektroden oder Mikrokapillaren gleichzeitig appliziert werden, um simultan die verschiedenen elektrophysiologischen Parameter (E_m , R_m , C_m) oder Ionenflüsse zu messen oder Injektate wie Second Messenger (Ca^{2+} , $InsP_3$, cAMP, cGMP), cDNA oder mRNA verabreichen zu können. Damit lassen sich zusätzlich biochemische Vorgänge wie Bindungsstudien mit anschließender morphologischer Charakterisierung des zellulären Status studieren. Das Translationssystem Oozyte kann gleichzeitig als *in vivo* System zur Charakterisierung und für Topologiestudien der translatierten Proteine verwendet werden: 1) Ionenkanäle, Rezeptoren oder Transportproteine können exprimiert und ihre Funktion mittels Mikroelektroden oder „Patch-Clamp“-Pipetten analysiert werden (Goldin, 1991). 2) Ligandenbindung künstlich in die Oozyte eingebrachter Rezeptoren kann *in vivo* studiert und die Effekte verschiedener Liganden auf das System gemessen werden. 3) Das exprimierte Protein kann präpariert werden und dessen Charakterisierung biochemisch erfolgen (Soreq, 1985). Man muß allerdings auch berücksichtigen, daß der Experimentator relativ lange (mind. 2 Tage) warten muß, bis die injizierte mRNA in das Fremdprotein translatiert ist und dies in das Oolemma eingebaut worden ist. Die zelluläre Antwort steigt meist langsam, aber stetig über ca. 0,5-2 Wochen, bis zur Erschöpfung der maternalen translationalen Kapazität oder bedingt die Deaktivierung der mRNA durch endogene Enzyme (RNasen). Die Oozyten haben natürlich nur begrenzte Ressourcen an rauhem endoplasmatischem Retikulum und freien Ribosomen. Deshalb werden einige mRNA-Spezies nur limitiert prozessiert oder bleiben als Enklave im Zytoplasma separiert. Außerdem hat die Oozyte eine hohe endogene Translationsaktivität, d. h. die injizierten Baupläne konkurrieren mit denen der Oozyte (Huez und Marbaix, 1986), wobei die funktionelle Expression von Fremdproteinen erst durch endogene Proteine möglich wird. Darüber hinaus können jahreszeitliche Rhythmik oder Variationen innerhalb der Weibchen aus Laborzuchten oder Wildfängen die Konditionierung der Oozytenpopulation erschweren. Experimentelle Befunde deuten darauf hin, daß sich die Qualität der Versuchszellen während unterschiedlicher Jahreszeiten verändert (Dascal, 1987), was sich folgendermaßen ausdrückt: 1. Die Rate der

Expression exogener Proteine ist oft vermindert. 2. Die Rate der Endozytose von Nährsubstanzen ist reduziert. 3. Die Lebensfähigkeit der Oozyten ist mit 1-2 Tagen relativ kurz, verbunden mit morphologischen Veränderungen, was oft eine eingeschränkte Verfügbarkeit für Langzeitexperimente bedeutet. 4. Werte für elektrophysiologische Parameter wie das Membranpotential und der Membranwiderstand sind verändert.

2.E.2. Oozyten-Kulturmedien

Als Standardlösung diente eine Oozyten-Ringer-Lösung (ORi), die je nach Bedarf modifiziert wurde. Die Lösungen wurden auf einen pH von 7.4 eingestellt. Bei mehr als einer Oozyte pro ml Medium ist es ratsam, Bakterienwachstum mit einem Antibiotikum (Penicillin, Streptomycin, Gentamycin) vorzubeugen - sofern es die Funktion des zu untersuchenden Proteins nicht ungünstig beeinflusst (*Okamoto und Sumikawa, 1991*). KulORi und GentORi wurden bei 18-19°C gelagert. Da die gelösten Antibiotika bei dieser Temperatur nach einigen Tagen ihre Wirksamkeit verlieren (*Lindl und Bauer, 1987*), mußten diese Medien wöchentlich frisch angesetzt werden. ORi wurde durch Verdünnen einer autoklavierten 10 × Stammlösung bereitgestellt.

	NaCl	KCl	CaCl ₂	MgCl ₂	MOPS	TMACl
ORi	110	3	2	1	5	-
Ca ²⁺ -freier ORi	110	3	-	1	5	-
K-ORi	-	100	2	1	5	-
TMA-ORi	-	3	2	1	5	110

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

Tab.2.E.2. Oozyten-Standardmedien, Angaben in mM

2.E.3. Haltung und Krankheiten von *Xenopus laevis*

Haltung von *Xenopus laevis*

Nach dem herkömmlichen Klassifikationsschema läßt sich *Xenopus laevis* folgendermaßen einordnen:

Klasse: Amphibia

Ordnung: Anura

Unterordnung: Archaeobatrachia

Superfamilie: Pipoidea

Familie: Pipidae

Unterfamilie: Xenopodinae

Gattung: *Xenopus* (eigentliche Krallenfrösche)

Art: *Xenopus laevis*

Xenopus laevis - Weibchen mit einer Länge von 10-11 cm wurden von H. Kähler, Hamburg, bezogen. Maximal 25 Frösche belegten ein 150 l Kunststoffbecken, in dem eine ständig betriebene Aquarienpumpe das Wasser filterte und belüftete. Die Wassertemperatur wurde durch Raumluft und Regulation des permanent zufließenden Leitungswassers zwischen 16°C und 20°C gehalten. Mit Zeitschaltuhren und über den Becken angebrachten 25-W-Glühbirnen wurde eine konstante Tageslänge von 6-18 Uhr vorgegeben. Längshalbierte Tonröhren oder Tonplatten dienten als Versteck für die Tiere. Die Frösche wurden zweimal wöchentlich mit Rinderherzstückchen gefüttert, die mit 10 Tropfen Vitaminen (Merck Multibionta) beträufelt worden waren. Um die Gefahr von Infektionsübertragung von einem Becken in ein anderes zu minimieren, war jedes Becken mit einem eigenen Käscher ausgestattet.



Abb.2.E.3. Weiblicher Xenopus laevis

Krankheiten

Die am häufigsten beschriebene Infektionskrankheit bei Amphibien ist die sogenannte ‘red-leg-disease’. Die für diese Krankheit charakteristische Rotfärbung der Haut erscheint bei *X. laevis* vorwiegend auf der Unterseite des Rumpfes und weniger ausgeprägt an den Hinterbeinen. Als Ursache kommt eine Infektion mit *Aeromonas hydrophila* in Betracht (Hubbard, 1981), wobei in der Regel noch zusätzliche Faktoren den Ausbruch der Krankheit unterstützen: Infektionsdruck durch Viren, Ernährungsmangel, andere Bakterien, Parasiten oder widrige Umgebungsbedingungen (National Research Council, 1974; Stephens et al., 1987). Beim Auftreten dieser Krankheit müssen die erkrankten Tiere sofort isoliert und die Becken desinfiziert werden. Als Behandlungsversuch werden Antibiotika-Gaben in das Wasser (Elkan, 1976; Jaeger, 1988) oder Tetrazyklin-Bäder (100-125 mg Tetrazyklin pro Liter Wasser; täglich frisch über 5 Tage) vorgeschlagen.

Eine Parasitose, die trotz guter Hygienemaßnahmen in unserer Tierhaltung in einem Zeitraum von drei Jahren viermal auftrat und auch zu hochgradigen Hautveränderungen geführt hat, war die ‚flaky‘ bzw. ‚grey skin disease‘, die häufig als Mycose verkannt wird. Hierbei wird die Haut ventral auch rötlich-braun (ähnlich wie bei der ‚red-leg-disease‘), dorsal jedoch grau und rauh. Bei dieser Krankheit handelte es sich wahrscheinlich um Hautparasiten, bei denen Nematoden (*Capillaria xenopodis*) die häufigsten Vertreter sind (Wade, 1982; Cohen et al., 1984; Stephens et al., 1987; Wu und Gerhart, 1991; Brayton, 1992, Ruble et al., 1995). Die starke Perforation und Unterminierung der Haut (‚kutane Capillariasis‘) stellen für bakterielle Erreger (‚red-leg-disease,‘) Infektionssporten dar (Stephens et al., 1987; Ruble et al., 1995) und sind häufig Ursachen für mangelhafte Oozytenbildung und Tod (Brayton, 1992). Mit dreimaliger Levamisol-Behandlung (12 mg/l Wasser im Abstand von 3 Tagen) wurden die Erreger regelmäßig und dauerhaft eliminiert, wenn das Krankheitsbild bei den Tieren noch nicht zu weit fortgeschritten war.

2.E.4. Entnahme und Präparation von Oozyten

Gewinnung von Oozyten

Das Ovar.

Der paarige Eierstock von *Xenopus laevis* besteht aus bis zu 16 sackförmigen Mesovarien oder Loben, die vom äußeren Ovariepithel begrenzt werden und Melanozyten enthalten. Das ovariale Gewebe beherbergt die oozytären Stadien I-VI (Dumont, 1972), die vom Follikelepithel, der bindegewebigen Theka mit Fibroblasten und Blutkapillaren, und dem einschichtigen inneren Ovariepithel umgeben sind. Das paarige symmetrische Ovarium eines adulten Weibchens im optimalen Fütterungszustand mit einem Gewicht von ca. 150 g und einer Kopf-Steiß-Länge von ca. 13 cm enthält annähernd 30.000 Oozyten der verschiedenen Entwicklungsstadien. Nach Organentnahme schließen sich die Mesovarien wieder, so daß der Eierstock wieder eine weitgehend unversehrte Einheit bilden und teilweise sukzessive regenerieren kann.

Laparotomie

Zur kurzzeitigen Betäubung wurde *Xenopus laevis* in 18-20°C temperiertes MS 222 (3-Aminobenzoessäure Ethylester Methansulfonat, = Tricain), 0.1-0.15 % in Leitungswasser, pH 7.2) für 5-10 Minuten gesetzt. Tricain ist ein Narkotikum für Kaltblüter und wird von Amphibien über die Haut resorbiert. Die Analgesie hält für 20-60 Minuten an (Kaplan, 1969; Bonath, 1977). Sobald das Tier ruhig gestellt war, wurde es auf den Rücken gedreht, das Aussetzen des respiratorischen Schluckreflexes durch Berühren der Kehlgangregion geprüft und mit Eis bedeckt. Das betäubte Tier wurde nun in Rückenlage in eine Operationsschale gelegt und nun die Bauchhaut im Areal des späteren Schnittes durch mehrmaliges trocknendes Auflegen eines Tupfers von der Schleimschicht befreit.

Die Organentnahme sollte im caudalen Abdominalbereich erfolgen, um den zentral im Tier liegenden Ovarialstamm zu schonen. Sonst besteht die Gefahr, daß zuerst proximale Mesovarien entnommen und dadurch caudale Loben von der Blutversorgung abgeschnitten werden. Es empfiehlt sich, vorerst die eine Hälfte des paarigen Ovars sukzessive bis zum ovarialen Stamm zu entnehmen und später die andere Hälfte zu biopsieren. Die Laparotomie sollte niemals exakt medial vorgenommen werden, da diese die periphere Abdominalarterie zerstören könnte, was den Verlust des Tieres bedeuten könnte.

Die abgetrocknete Lederhaut wurde mit trockenen Fingerspitzen oder Filterpapier gefaßt und sofort mit feiner Schere in den gebildeten Wulst geschnitten. Es resultierte eine in Körperlängsachse gerichtete operative Öffnung von maximal 7-10 mm Länge. Anschließend wurde das Peritoneum mit einer spitzen, am Ende abgewinkelten Pinzette freigelegt und man machte einen gleich langen Schnitt, wobei Haut und Muskelschicht vom darunter liegenden Verdauungstrakt abgehoben wurden. Alle Gerätschaften wurden vor dem Eingriff mit 70% Ethanol desinfiziert.

Entnahme der Mesovarien

Nach Penetration der Bauchhaut wurde vorsichtig mit einer spitzen Pinzette das Ovar zwischen den abdominalen Organen (Darmschlingen, Leber, Fettkörper und Ovidukt) gesucht und durch die operative Öffnung gezogen. Das gewünschte Stück Mesovar wurde mit einer feinen Schere abgetrennt und in KulORi zwischengelagert., ohne daß Gewebe an der Oberfläche schwimmt. Das nicht benötigte Ovar wurde wieder in den abdominalen Raum zurück appliziert. Als Nahtmaterial wurde dünne, gezwirnte Seide verwendet, die in eine gebogene Wundnadel im Nadelhalter eingeführt wurde. Zum Verschließen der Wunde wurden die Oberhaut und das Peritoneum mit grober abgewinkelter Pinzette gemeinsam gefaßt und möglichst weit von den abdominalen Organen abgehoben. Mit kleiner Wundnadel wurde nun direkt senkrecht neben der Pinzette eingestochen und die gegenüberliegende Seite in der umgekehrten Reihenfolge perforiert. Dieselbe Manipulation wurde mindestens noch zweimal im 2-3 mm Abstand daneben durchgeführt. Es wurden zuerst alle Fäden durch die Gewebeschichten gezogen, um sie danach mit einigen Doppelknoten per Hand vorsichtig und langsam, jedoch fest zusammenzuziehen.

Postoperative Versorgung

Das Tier wurde nach Wundverschluß gründlich mit Leitungswasser abgespült und in eine Schale gesetzt, deren Boden maximal nur 1 cm hoch mit Wasser bedeckt sein durfte. Der Kopf des Tieres darf nicht unter Wasser tauchen, damit es nicht ersticken kann. Um Austrocknung zu vermeiden, wurde der Rücken des Tieres alle 5 Minuten mit Wasser benetzt, bis der Schluckreflex wieder eingesetzt hatte und *Xenopus laevis* kräftige Schwimmbewegungen zeigte. Nachdem das Tier vollkommen aus der Narkose erwacht war, wurde es einen Tag in ein dunkles 5 Liter Einzelbecken gegeben, das 15 cm hoch eine Lösung aus 0,5 g/l Meersalz (Fachhandel für Aquaristik) mit einer Spatelspitze Streptomycin enthielt. Nach 2 Wochen hatte sich in der Regel ein Wundverschluß aus granuliertem Gewebe gebildet. Biopsien am selben Tier sollten nicht in kürzeren Abständen als 3-4 Wochen erfolgen. Dabei sollten die Narben oder Stichkanäle früherer Eingriffe umgangen werden.

Präparation von Oozyten

Die entnommenen Ovarlappen wurden mit 2 Pinzetten in kleinere Stücke zerzupft, in einer Schale mit ORi gewaschen und anschließend in 10 ml KulORi, versetzt mit 1 mg/ml Kollagenase (1200 U/mg), 12 Stunden bei 18 °C inkubiert. Zur Aufbewahrung der Oozyten dienen Gewebekulturschalen aus Polystyrol mit Deckel (Falcon 3802 Primaria, 60 × 50 mm; Becton Dickinson). Die Schälchen mußten jedoch fabrikatbedingt mit Oozytenhomogenat ‚gefettet‘ werden, um ein Aufkleben der Oozyten zu verhindern. Dazu wurden die bei -20 °C gesammelten, aufgetauten Reste von Oozytenpräparationen mit einem Potter-Elvehjem-Homogenisator zerkleinert und mit Wasser verdünnt. Die Schalen wurden mit dem Homogenat ausgeschwenkt und anschließend gründlich mit Wasser ausgespült. Auf die gleiche Weise wurden die für den Transfer von Oozyten verwendeten Glaspipetten behandelt. Bei den Glaspipetten handelte es sich um Pasteurpipetten, deren Spitze so abgeschnitten war, daß der Durchmesser auf 1,5 mm erweitert war. Zur Defollikulierung wurden die Oozyten nach der Kollagenasebehandlung 5 min mit Ca²⁺-freiem ORi gewaschen und anschließend ihrem Stadium und ihrer Güte entsprechend sorgfältig aussortiert. Für Transportmessungen sollten nur vollständig defollikulierte Oozyten des Stadium V ausgesucht werden. Diese zeigten bei seitlicher Betrachtung eine glänzende Oberfläche. Zur Begutachtung der Zellen wurde ein Zoom-Stereo-Präparationsmikroskop verwendet, wobei die Beleuchtung durch eine 150 W Kaltlichtquelle mit 2-armigem Lichtleiter gewährleistet wurde.

2.E.5. Lagerung und Umgang mit Oozyten

Die Oozyten-Stadien I-IV

Um eine korrekte Selektion und Handhabung der für Versuchszwecke benötigten Oozyten zu gewährleisten, ist es unumgänglich, die verschiedenen Oozytenstadien eingehend kennenzulernen und die im Eierstock auftretenden Zelltypen genau bestimmen zu können. Prophase-I Oozyte von *Xenopus laevis* werden in sechs Stadien gemäß *Dumont (1972)* eingeteilt.

Stadium I: 50-300 µm große, prä-vitellogenetische Oozyte mit transparentem Zytoplasma und sehr großem Zellkern.

Stadium II: 300-450 μm große Oozyte; das Zytoplasma ist weißlich schimmernd; die Fläche der Zytoplasmamembran (= Oolemma) vergrößert sich durch Mikrovilli; parallel zur endogenen Proteinbiosynthese beginnt die Einlagerung von Reservesubstanzen in Form der Dotterbildung (Vitellogenese).

Stadium III: 450-600 μm große, vitellogenetische Oozyte; durch Pigmentierung braun-schwarz gefärbtes Zytoplasma (Cortex); primordialer, homogen verteilter Protein- und Lipoid-Dotter; der Zellkern hat eine gefaltete Hülle und enthält Chromosomen im Lampenbürstenstadium; erhöhte Aufnahme von Vitellogenin und anderen Nährstoffen erfolgt durch Pinozytose und membranäre Transporter; cortikale Vesikel bilden sich; die ca. 1 μm dicke, für alle essentiellen Nährsubstrate penetrable Vitellinhülle wird als Exoskelett dieser Riesenzelle aufgelagert.

Stadium IV: 600-1000 μm große, vitellogenetische Oozyte mit optischer Polarisierung in eine animale (zytoplasma- und ribosomenreiche, leichte) und vegetale (hauptsächlich dotterhaltige und dadurch schwerere) Hälfte, besonders hervorgehoben durch die homogene schwarz-braune Pigmentierung der animalen Hemisphäre; erhöhte Dotterbildung.

Stadium V: 1000-1200 μm große, vitellogenetische Oozyte; cortikale Vesikel akkumulieren am Oolemma; der Zellkern enthält große vakuolisierte Nukleoli und wandert in die animale Hemisphäre ein; bis zu 15 μm große Dotterorganellen sammeln sich vermehrt in der vegetalen (vegetativen) Hemisphäre; die Vitellogenese ist weitgehend abgeschlossen. Der Durchmesser beträgt 1.2-1.3 mm, das Volumen variiert von 0.9-1.2 μl .

Beim Auslesen der Oozyten sollte man sich auf die folgenden Kriterien konzentrieren:

- a) Das Pigment ist am animalen Pol homogen verteilt und verleiht der Oberfläche ein samtiges Aussehen. Im Mittel größere, locker hellbraun ausgefärbte Oozyten sind oft weniger stabil und haltbar als kleinere dicht schwarz-pigmentierte. Der Grad der Pigmentierung einer Oozytenpopulation ist nicht immer proportional zur Pigmentierung des Donor-Tieres. Oozyten mit hellen Flecken oder Pigmentkonzentrationen sollten verworfen werden.
- b) Die vegetale, primär dotterhaltige Hemisphäre kann in ihrer Farbgebung von weiß über grau zu gelblich bis grünlich variieren und hat auf die Güte der Oozyten keinen Einfluß.

- c) Die Oozyte darf sich nicht aus der durch zu harte Manipulation eventuell aufgerissenen Vitellinhülle hervorwölben.
- d) Alternde, degenerierende Oozyten im Stadium V erscheinen leicht geschwollen, haben eine weichere Konsistenz und einen geringen Turgor. Ihre Pigmentierung verändert sich; die Oozyte erscheint nun gräulich-braun.
- e) Ein einzelner unscharf begrenzter runder Fleck auf der animalen Hemisphäre deutet auf unphysiologische pseudo-meiotische Vorgänge hin, die unterschiedliche Ursachen haben: Große Temperaturschwankungen, Schädigungen der Membran durch die Kollagenase-Behandlung, proteolytische Enzyme der Kollagenase-Charge oder eine Abhängigkeit von der jahreszeitlichen Rhythmik können eine Veränderung der oozytären Homöostase bewirken. Diese Oozyten beginnen nach einer Stunde abzusterben.

Stadium VI: 1200-1300 μm große, post-vitellogenetische Oozyte, zeigt äquatoriale Pigmentringe; die Mikrovilli nehmen an Zahl und Größe ab; die Oozyte löst ihre Nexi (Gap Junction) und Desmosomen (Zonula adherens) zum Follikel­epithel und zeigt verminderte Aktivität membranärer Transportsysteme, was durch erhöhte Endozytose von Oozytenmembran bedingt ist. Das typische Stadium VI tritt relativ selten auf.

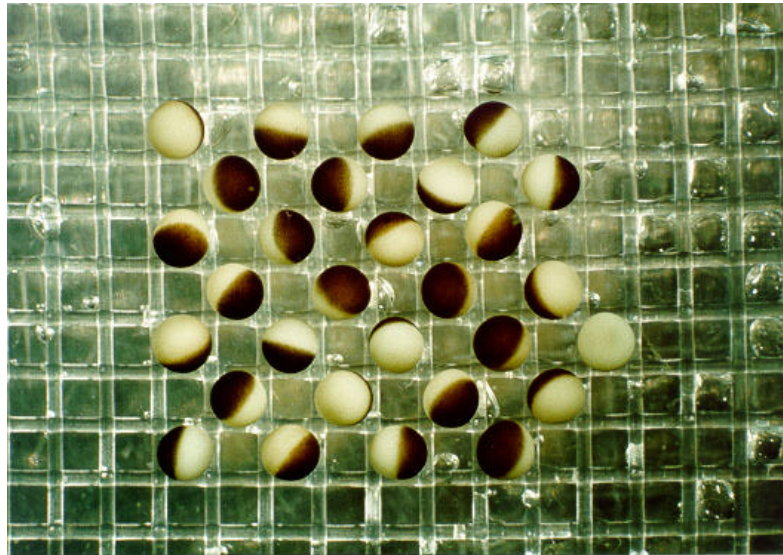


Abb.2.E.5. Xenopus-Oozyten des Stadiums V.

2.E.6. Mikroinjektion in Oozyten

Die zu injizierenden Oozyten wurden innerhalb einer *Sylgard*-Rille aufgereiht. Die Injektion erfolgte mit Glaskapillaren aus Borosilikat (Hildenberg, Malsfeld; Durchmesser: innen: 0.5 mm; außen: 1.0 mm), die in einer Glühwendel fein ausgezogen worden waren. Zum Ansaugen und Herausdrücken von Probelösungen diente eine Mikroinjektionspumpe der Firma Drummond. Eine Kapillare wurde luftblasenfrei mit Mineralöl (Sigma 400-5 heavy white oil, $\delta = 0.88$ g/ml) gefüllt und in eine mit einem Manipulator versehene Mikropumpe eingespannt. Mit einer Pinzette wurde die noch verschmolzene Spitze der Injektionskapillare vorsichtig abgebrochen, so daß das Öl ausgepumpt und das gewünschte RNA-Volumen aufgesogen werden konnte. Das Aufsaugen der RNA in die Injektionskapillare fand unter einem sterilen Mineralölfilm statt, um die Aufkonzentrierung der RNA durch Verdunstung oder deren Degradation durch Kontaminationen zu verhindern. Die Injektionskanüle wurde im Winkel von 90° auf die Oberfläche der Oozyte aufgesetzt und mit leichtem Druck in die Oozyte eingestochen. Die Spitze sollte nicht tiefer als 100-200 μM in das Zytoplasma eingebracht werden. Das Volumen der Injektate überschritt nie 50 nl (etwa 5% des Oozytenvolumens von ca. 0.9 μl). Die Injektionskapillare wurde nach Applikation des gewünschten Volumens für 5-10 Sekunden in der Oozyte belassen, damit ein Druckausgleich stattfinden und kein Injektat entlang des offenen Stichkanals auslaufen konnte. Eine zusätzliche Maßnahme zur Verhinderung des Auslaufens war das ‚Vorschrumpfen‘ der Oozyten für mindestens 10 Minuten vor der Injektion in KulORi mit 130 statt 100 mM NaCl, also in hypertonischer Lösung. Oozyten, die nach dem Herausziehen der Kapillare eine größere Menge Dotter und damit eventuell einen Teil der Injektionslösung verloren haben konnten, wurden ausgesondert.

Injizierte Oozyten wurden in den 3 Tagen bis zur Messung der Substrataufnahme abwechselnd in KulORi und GentORi bei 18°C aufbewahrt. Verletzte, akut veränderte oder später stark geschädigte Zellen wurden verworfen. Pigmentverschiebungen zeigen nicht unbedingt die Degeneration der Oozyte an, sondern wurden häufig auch bei erfolgreicher Expression beobachtet.

2.E.7. Transportmessungen an Oozyten

Die Transportmessungen von radioaktiv markierten Substanzen wurden an *Xenopus laevis* Oozyten mit der sog. 'Tracer Flux-Methode' durchgeführt. Hierbei wurde die Transportrate von Substraten über die Oozytenmembran ins Zytosol bestimmt.

2.E.7.a. Bestimmung der Substrataufnahme

Mit Oozytenhomogenat behandelte Becher aus Polystyrol wurden mit 200 μ l Substratlösung befüllt. Die Oozyten wurden nach ihrer Lagerung zweimal in ORi gewaschen bevor diese zur Messung eingesetzt wurden. In der Regel wurden 8-10 Oozyten in einem Ansatz gemessen, um statistische Berechnungen durchführen zu können. Nach der Zugabe der Oozyten in die Substratlösung wurde der Ansatz leicht gemischt und bei 22°C meistens 1 h lang inkubiert. Um die Substrataufnahme nach diesem Zeitraum zu stoppen, wurde 1 ml eiskalter ORi zugegeben. Die Oozyten wurden nun viermal in je 15 ml eiskaltem ORi gewaschen und dann einzeln in 6 ml Zählröhrchen überführt. Um die Oozytenmembran aufzulösen, wurden 100 μ l 5%ige SDS-Lösung zu den Oozyten pipettiert. Die Röhrchen wurden 30-45 min auf einen Schüttler gestellt bis sich die Oozyten vollständig aufgelöst hatten. Die Lysate wurden mit 2 ml Szintillationscocktail vermischt und in einem Flüssigszintillationszähler mit Lumineszenzkorrektur und externem Standard für die Quenchkorrektur ausgewertet. Jedes Röhrchen wurde 5 min ausgezählt. Um nach dem Eintropfen der Oozyten die Substratkonzentration zu bestimmen, wurden 2×10 μ l Lösung aus dem Reaktionsansatz entnommen, mit 100 μ l 5% SDS-Lösung versetzt und entsprechend im Zähler ausgewertet. Diese Werte wurden dann bei der Berechnung der Transportraten mit einbezogen.

p-Aminohippurat (PAH)-Aufnahme: Die Oozyten wurden vor der Messung für 4h mit 2 mM α -Ketoglutarat (AKG) bei 19°C vorinkubiert und anschließend bei 0°C mit Ori gewaschen. Die Aufnahme von [¹⁴C]PAH wurde bei 1 h Inkubation bei 19°C gemessen. Zur Bestimmung der hemmbaren Aufnahme wurden 2 mM Probenecid verwendet.

trans-Stimulations-Messungen: Um die *trans*-Stimulation der Kationen-Aufnahme zu messen, wurden die Oozyten entweder durch Vorinkubation oder durch Präinjektion mit der gewünschten Substanz vorbeladen. Die Vorinkubation erfolgte für 12 h bei 19°C. Die Präinjektion wurde mit 50 nl einer 10fach konzentrierten organischen Kationenlösung gemacht. Mit beiden Vorbeladungsprotokollen wurden die gleichen Ergebnisse erzielt. Nach dem Vorbeladen wurden die Oozyten in eiskaltem ORi oder K-ORi gewaschen und anschließend in die Reaktionslösung überführt. Die Messung erfolgte für 5 min bei 19°C und wurde bei 0°C gestoppt.

2.E.7.b. K_m -Wert-Bestimmungen

Bei der Bestimmung der konzentrationsabhängigen Substrataufnahme wurden Verdünnungsreihen des untersuchten Substrates gemacht und die Radioaktivität so verteilt, daß pro Ansatz zwischen 10000 und 20000 cpm im Überstand gezählt wurden. Im Falle von rOCT1 und rOCT2 wurde bei K_m -Wert-Bestimmungen immer 1 h lang die Substrataufnahme gemessen. Parallel zu jeder Substratkonzentration wurden die entsprechenden Ansätze mit einem hochaffinen Inhibitor des untersuchten Transports angesetzt und ausgezählt. Außerdem wurde zur Bestimmung des Hintergrunds, also der unspezifischen Substrataufnahme (z. B. durch Diffusion), die Messung auch an H₂O-injizierten Oozyten durchgeführt. Die Transportraten wurden nach ihrer Berechnung gegen die Substratkonzentrationen graphisch aufgetragen und nach der Michaelis-Menten-Gleichung mathematisch angepaßt.

2.E.7.c. IC_{50} -Wert-Bestimmungen

Bei den IC_{50} -Wert-Bestimmungen wurde bei konstanter Substratkonzentration die Inhibitorkonzentration verändert. Im Fall von rOCT1 und rOCT2 wurde der IC_{50} -Wert immer gegen 10 µM TEA als Endkonzentration im Ansatz ermittelt. Vor der Messung wurde, von einer Stammlösung ausgehend, eine Verdünnungsreihe der Hemmstofflösung hergestellt. Die Inhibitoren waren nie radioaktiv markiert, sondern immer nur TEA. Zur Bestimmung der maximalen Aufnahme (v_0 -Wert) diente ein TEA-Ansatz ohne Zugabe eines Hemmstoffes. Dieser v_0 -Wert wurde immer doppelt bestimmt, da er als Richtgröße zur Berechnung des IC_{50} -Werts diente.

2.E.7.d. Efflux-Messungen

Bei den Efflux-Messungen wurden die Oozyten auf Eis mit 50 nl einer wäßrigen Lösung von 0,1 pmol [³H]1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP) injiziert. Anschließend wurden die Oozyten viermal mit 20 ml Ori auf Eis gewaschen und dann in die Meßgefäße überführt, die entweder nur Puffer (Na⁺- oder K⁺- ORi) oder organische Kationen für *trans*-Stimulationsversuche enthielten. Die initialen Efflux-Raten wurden zwischen 10 sec und 70 sec Inkubationsdauer errechnet.

2.E.8. Elektrophysiologie

Die Strom-Spannungskurven einzelner Oozyten wurden mit Hilfe der Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemme aufgenommen. Das Prinzip und die Details der Meßanordnung wurden ausführlich beschrieben (*Busch et al. 1996; Nagel et al., 1997*). Die Messungen wurden 3-8 Tage nach der cRNA-Injektion bei Raumtemperatur durchgeführt. Eine Oozyte wurde in eine Durchflußkammer gelegt und permanent mit ORi bzw. Substrat in ORi umspült (1-2 ml/min). Die Zelle wurde mit zwei fein ausgezogenen, mit 3 M KCl gefüllten Glaskapillaren angestochen (Spannungs- bzw. Stromelektrode). Bei der Bestimmung der Potentialabhängigkeit des rOCT2-vermittelten Transports (*3.E.*) wurde das Membranpotential durch einen Regelkreis auf 0 mV, -50 mV und -60 mV geklemmt und der durch Cholin-induzierte konzentrationsabhängige Strom gemessen. Ein angeschlossener Schreiber protokollierte Membranpotential und Strom.

Bei der Bestimmung des Membranpotentials von rOCT2-exprimierenden Oozyten (*3.H.1.*), die mit verschiedenen Kationen 12 h vorinkubiert worden waren, wurde das extrazelluläre Na⁺ gegen die äquimolare Konzentration an K⁺ im ORi-Puffer ausgetauscht. Die Durchflußrate der Superfusion betrug 20 ml/min und der komplette Austausch der Badlösung erfolgte innerhalb von 10 s.

Bei der Bestimmung der pH-Abhängigkeit (*7.A.*) wurde das Membranpotential zunächst durch einen Regelkreis auf -60 mV geklemmt. Sobald der über eine Badelektrode gemessene Strom konstant war, wurden Strom-Spannungskurven bei verschiedenen pH-Werten der Badlösung aufgenommen. Dabei erzeugte im Abstand von 2 s ein im Regelkreis integrierter, computergesteuerter Verstärker einen rechteckigen 200-ms- Spannungsimpuls. In einem Bereich von -150 mV bis +30 mV wurde das Potential bei jedem Impuls um 10 mV erhöht.

Die Größe der durch die Kationen induzierten Ströme bzw. der Potentialverschiebungen variierte

abhängig von Zeitraum nach der cRNA-Injektion und in verschiedenen Oozytenpräparationen. Deswegen wurden vergleichende elektrophysiologische Messungen an Oozyten aus einer Präparation am gleichen Tag vorgenommen.

2.E.9. Datenauswertung

Bei den Transportmessungen mit radioaktiv markierten Substraten und elektrophysiologischen Messungen wurden die Mittelwerte mit den mittleren Standardabweichungen (S.E.M.) ermittelt. Die Mittelwerte wurden entweder aus 8-10 Oozyten (radioaktive Messungen) oder aus 5-6 Oozyten (elektrophysiologische Messungen) errechnet. Die apparenten K_m - und V_{max} -Werte wurden nach der Michaelis-Menten-Gleichung [$y = V_{max} [S] / (K_m + [S])$] bestimmt, nachdem die Aufnahme in Gegenwart von verschiedenen Substratkonzentrationen ermittelt worden war.

Zu Kalkulation der IC_{50} -Werte, wurden den Daten der Hill-Gleichung für eine 'multisite' Inhibition angepaßt. Die Geraden, die zur Bestimmung des Hemmtyps im Eadie-Hofstee-Plot zusehen sind, wurden nach der linearen Regression berechnet.

Signifikanz: Wenn sich die Standardfehler (S.E.M.) überlappten, dann waren zwei Mittelwerte nicht signifikant unterschiedlich. Bei der Bestimmung der Signifikanz wurde diese mit dem Zweistichproben-t-Test für unabhängige Zufallsstichproben (ein- oder zweiseitige Fragestellung, Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha \leq 0,05$) überprüft (Sachs, 1992).

3. Ergebnisse

3.A. Klonierung von rOCT2

Eine cDNA-Bibliothek aus Rattenniere wurde mit einer DNA-Sonde von rOCT1 durchsucht. Hierbei wurde ein Klon isoliert, der anschließend mit sequenzspezifischen Oligonukleotiden (2.A.9.) vollständig sequenziert wurde. Dieser neue, bis dahin nicht in öffentlichen Datenbanken zu findende Transporter wurde der zweite organische Kationentransporter aus der Ratte, rOCT2, genannt. Die Sequenz wurde an die Genbank unter dem Eintrag X98334 weitergegeben (*Busch et al., 1996b*).

rOCT2 besteht aus 593 Aminosäuren und besitzt 12 putative Transmembrandomänen. Das Protein besitzt zwölf der in der OCT-Familie konservierten Cysteine und zwei konservierte mutmaßliche N-Glykosylierungsstellen, die in der großen extrazellulären Schleife zwischen der ersten und zweiten Transmembrandomäne liegen. Die intrazelluläre Schleife zwischen der sechsten und siebten Transmembrandomäne besitzt eine konservierte Konsensussequenz für Proteinkinase C (PKC) und eine nicht konservierte an der Position Ser-553. Ebenfalls finden sich in dieser Schleife konservierte Motive für Caseinkinase II (CK II) am Ser-334 und für Proteinkinase A (PKA) am Thr-348. Die letztere befindet sich jedoch schon am Übergang von der Schleife zum Beginn der siebten Transmembrandomäne. Neben der bereits erwähnten CK II-Sequenz gibt es noch fünf weitere. Die Position am Thr-525 am Carboxyl-Ende scheint ebenfalls in der OCT-Familie hoch konserviert zu sein. In *Tab.3.A.* sind in einem Vergleich die wichtigsten Struktur motive von rOCT1 und rOCT2 noch einmal zusammengefaßt.

rOCT1 und rOCT2 besitzen eine 69%ige Identität und 77%ige Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz. In *Abb.3.A.* ist der Vergleich der Aminosäuresequenzen dargestellt. Die meisten der oben für rOCT2 beschriebenen Sequenzmotive sind auch in der rOCT1-Sequenz zu finden und stellen wahrscheinlich konservierte Motive dar. Sie sind in *Tab.3.A.* fett gedruckt.

Gen	Konservierte Cysteine	N-Glykosylierungsstellen	PKA-Konsensus-Positionen	PKC-Konsensus-Positionen	Caseinkinase II-Konsensus-Positionen
rOCT1	50, 62, 89, 103, 122, 143, 179, 418, 437, 451, 470, 474	71, 97, 113, 432	Thr-237 Thr-297 Thr-348 Ser-537	Ser-286 Ser-292 Thr-296 Ser-328 Thr-550	Thr-3 Ser-334 Thr-525
rOCT2	50, 62, 89, 103, 122, 143, 179, 418, 437, 451, 470, 474	71, 97	Thr-348	Ser-286 Ser-553	Ser-2, Thr-3 , Thr-322 Ser-334 Ser-472 Thr-525

Tab.3.A. Struktur motive in den rOCT1- und rOCT2-Sequenzen. Die fettgedruckten Positionen bezeichnen die in beiden Proteinen konservierten Motive.

1	MPTVDDVLEQVGEFGWFQKQAFLLLC LISASLAPIYVGIVFLGFTPGHYCQNPQVAELSQ	60	rOCT1
1	MSTVDDILEHIGEFHLFQKQTFLLALLSGAFTPIYVGIVFLGFTPDHHCWSPGAAKLSQ	60	rOCT2
61	RCGWSQAEELNYTVPLGPSDEASFLSQCMRYEVDWNQSTLDCVDPLSSLVANRSQLPLG	120	rOCT1
61	RCGWSQAEELNYTVPLGPSDEASFLSQCMRYEVDWNQSTLDCVDPLSSLAADRNLPLG	120	rOCT2
121	PCEHGWVYDTPGSSIVTEFNLVCGDAWKVDLQSCVNLGFFLGSVVGVIADRFGRKLCL	180	rOCT1
121	PCEHGWVYNTPGSSIVTEFNLVCAHSWMLDLQSVVNVGFFIGAMMIGYLADRFGRKFCL	180	rOCT2
181	LVTTLVTSVSGVLTAVAPDYTSMLLFRLQGMVSKGWSVSGYTLITEFVSGYRRRTAIL	240	rOCT1
181	LVTILINAISGALMAISPNYAWMLVFRFLQGLVSKAGWLIGYILITEFVGLGYRRMVGIC	240	rOCT2
241	YQMAFTVGLVGLAGVAYAI PDWRWLQAVSLPTFLFLLYWFVPESPRWLLSQKRTTRAV	300	rOCT1
241	YQIAFTVGLLILAGVAYVIPNWRWLQFAVTLNFCFLLYFWCIPESPRWLISQNKIVKAM	300	rOCT2
301	RIMEQIAQKNGKVPADLKMLCLEEDASEKRSPSFADLFRTPNLRKHTVILMYLWFSCAV	360	rOCT1
301	KIIKHI AKKNGKSVVSLQNLTPDEDAGKLNPSFLDLVTRTPQIRKHTLILMYNWF TSSV	360	rOCT2
361	LYQGLIMHV GATGANLYLDFFYSSLVEFPAAFIILVTIDRIGRIYPIAASNVTGAACLL	420	rOCT1
361	LYQGLIMHMGLAGDNIYLDFFYSALVEFPAAFI IILTIDRVGRYPWAVSNMVGAACLA	420	rOCT2
421	MIFIPHELHWNVTLACLGRMGATIVLQMVCLVNAELYPTFIRNLGMMVCSALCDLGGIF	480	rOCT1
421	SVFIPDDLQWLKITIACLGRMGITMAYEMVCLVNAELYPTYIRNLGVLVCSMCDIGGII	480	rOCT2
481	TPFMVFRLEMEVWQALPLILFVGLGLTAGAMTLLL PETKGV ALPETIEEAENLGR-RKSKA	539	rOCT2
481	TPFLVYRLTDIWMFPLVVFVAVGLVAGALVLLL PETKGV ALPETIEDAENMQRPKRKER	540	rOCT2
540	KENT-----IYLQVQTGKSSS-----T	556	rOCT1
541	KENLPSPQASRPSAKLKRKGI I AAGADFALSEARDGASLSPPKPTQTNLTYP	593	rOCT2

Abb.3.A. Vergleich der Proteinsequenzen von rOCT1 und rOCT2.

3.B. Transportmessungen mit verschiedenen Substraten

Um die funktionelle Rolle von rOCT2 beim Kationentransport zu verstehen, reicht es nicht aus, nur die Membrantopologie oder die zelluläre Lokalisation zu kennen. Hierzu müssen Transportmechanismus und Spezifität des Transporters definiert werden. Zunächst wurde rOCT2 in einem orientierenden Versuch auf Polyspezifität getestet. Dabei wurde die Aufnahme von verschiedenen in radioaktiv markierter Form erhältlichen Kationen gemessen. Hierfür wurden rOCT2- und H₂O-injizierte Oozyten für eine Stunde mit radioaktiv markierten Substanzen (5 µM) inkubiert. Unter den Substraten waren endogene Amine wie z. B. Neurotransmitter und Xenobiotika. Bei Cholin war eine höhere unspezifische Aufnahme in Wasser-injizierte Oozyten zu beobachten als bei den anderen getesteten Substraten. Der Versuch zeigte, daß es sich bei rOCT2 um einen polyspezifischen Transporter handelt, der viele strukturell unterschiedliche Kationen transportieren kann.

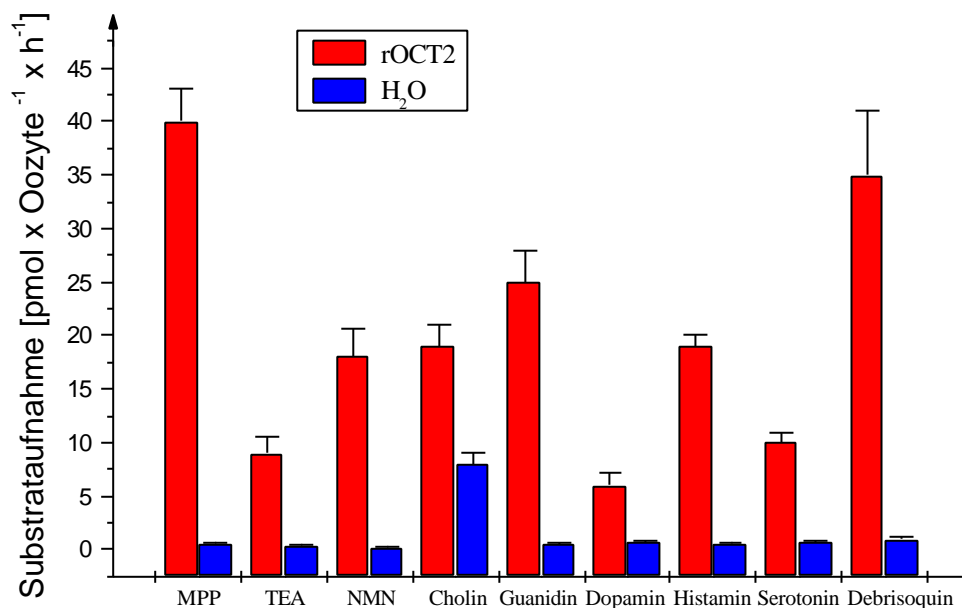


Abb.3.B. Transportmessungen mit verschiedenen [¹⁴C]- oder [³H]-markierten Substanzen, die in einer Konzentration von 5 µM eingesetzt wurden. *Xenopus*-Oozyten wurden mit 20 ng rOCT2-cRNA injiziert und nach drei Tagen wurde die Aufnahme an rOCT2-exprimierenden und H₂O-injizierten Oozyten gemessen. Der Transport in den mit rOCT2-cRNA-injizierten Oozyten konnte in allen Fällen mit 100 µM Cyanin863 bis auf die Wasserwerte runtergehemmt werden (Hemmung nicht gezeigt).

3.C. Zeitabhängigkeit des TEA-Transports

Nachdem die Polyspezifität von rOCT2 gezeigt worden war, sollten nun kinetische Parameter ermittelt werden. Da dies nur im linearen Bereich der Transporter-induzierten Aufnahme in die Oozyten möglich ist, wurde zunächst die Zeitabhängigkeit des Modellsubstrates TEA gemessen. Hierbei wurde zu verschiedenen Zeitpunkten die Aufnahme von TEA in rOCT2-exprimierende Oozyten bestimmt (Abb.3.C.). Dabei wurde mit 2,2 mM eine TEA-Konzentration gewählt, bei der der durch rOCT2-vermittelte Transport seinen maximalen Wert erreicht hatte. Die Aufnahme war bis nach ca. 90 min linear. Für die nachfolgenden Messungen zur funktionellen Charakterisierung von rOCT2 konnte so eine Meßzeit von einer Stunde für die Substrataufnahme in *Xenopus*-Oozyten angesetzt werden.

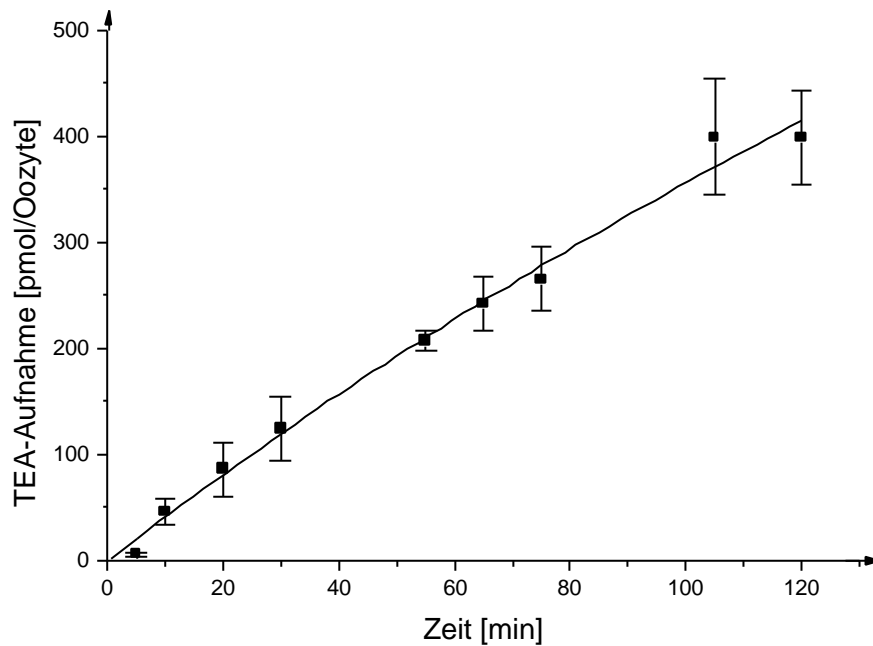


Abb.3.C. Zeitabhängigkeit der Aufnahme von 2,2 mM [14 C]TEA in rOCT2-exprimierende Oozyten. Die Aufnahme wurde nach den gezeigten Zeitpunkten bestimmt. In dem Diagramm ist die durch 100 μ M Cyanin863 gehemmte TEA-Aufnahme gezeigt.

3.D. K_m -Wert-Bestimmungen

3.D.1. TEA-Kinetik

Nachdem für rOCT2 die Aufnahme einiger Substrate gezeigt werden konnte (3.B.), sollten nun die kinetischen Parameter für die Substrataufnahme bestimmt werden, um diese mit den entsprechenden Daten für rOCT1 zu vergleichen. Dadurch sollten Unterschiede in der Spezifität und Selektivität zwischen beiden Transportern herausgefunden werden. Es wurde mit dem Modellsubstrat für das organische Kationenransportsystem der Niere, dem Tetraethylammonium (TEA), begonnen. Hierfür wurde bei verschiedenen Konzentrationen dieses Substrates an rOCT1- und rOCT2-exprimierenden Oozyten die Aufnahme in die Oozyten gemessen. Nach der Anpassung der Meßdaten an die Michaelis-Menten-Gleichung erhielt man für rOCT1 den K_m -Wert $129 \pm 16 \mu\text{M}$ und den V_{max} -Wert $569 \pm 24 \text{ pmol} \times \text{Oocyte}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ (Abb.3.D.1.A.).

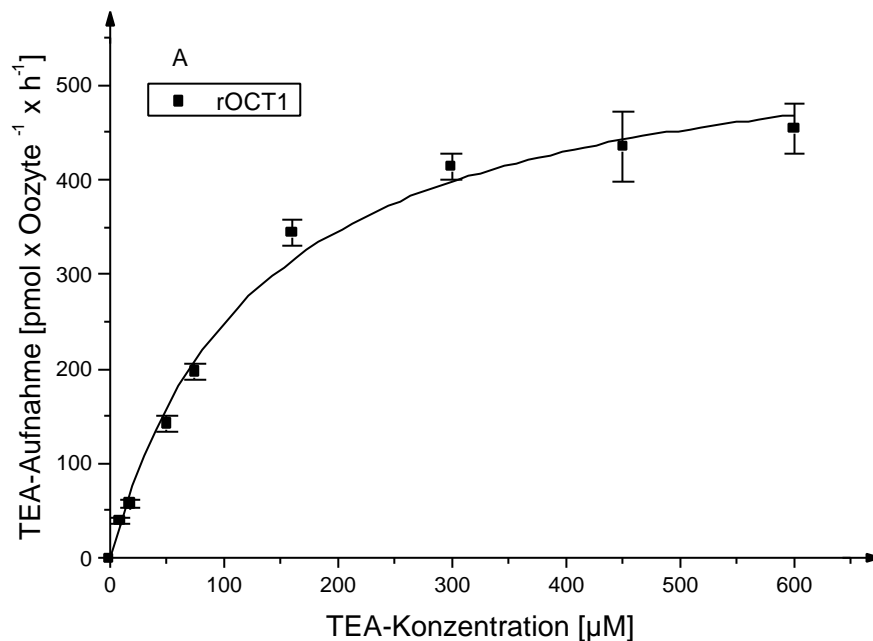


Abb.3.D.1.A. Substratabhängigkeit der rOCT1-vermittelten [^{14}C]TEA-Aufnahme. Nach Injektion von rOCT1-cRNA in *Xenopus*-Oozyten wurde die [^{14}C]TEA-Aufnahme bei verschiedenen TEA-Konzentrationen über den Zeitraum von einer Stunde gemessen.

Für rOCT2 (Abb.3.D.1.B.) ergaben sich die Werte $91 \pm 10 \mu\text{M}$ (K_m) und $160 \pm 5 \text{ pmol} \times \text{Oozyte}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ (V_{max}). Beide Transporter besitzen eine ähnliche Affinität für TEA.

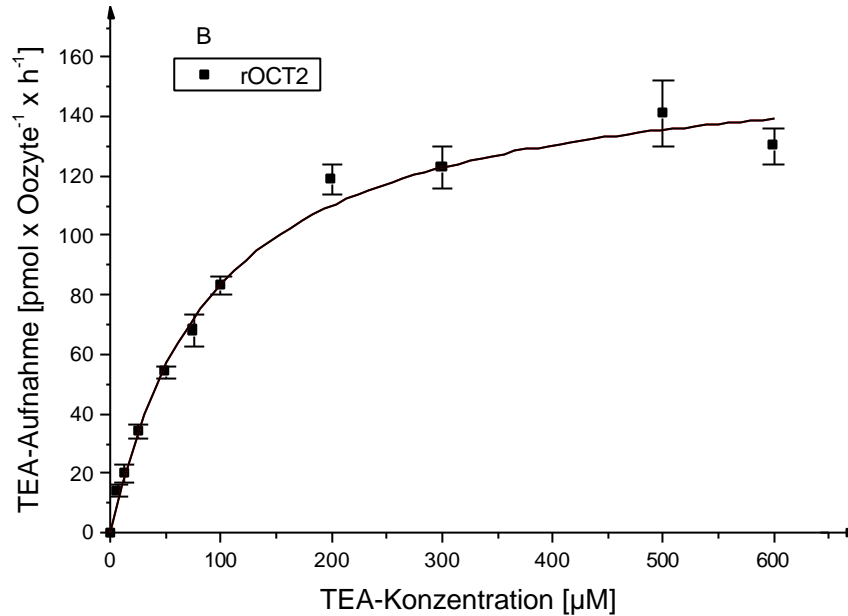


Abb.3.D.1.B. Substratabhängigkeit der rOCT2-vermittelten [¹⁴C]TEA-Aufnahme. Der Versuch wurde wie in Abb.3.D.1.A. durchgeführt.

3.D.2. Cholin-Kinetik

In diesem Abschnitt wird die konzentrationsabhängige Aufnahme von Cholin an rOCT2-exprimierenden Oozyten gezeigt. Die Transportkinetik von Cholin ist in Abb.3.D.2. dargestellt. In rOCT2-exprimierenden Oozyten konnte man eine spezifische, durch Cyanin863 hemmbare, konzentrationsabhängige Cholin-Aufnahme feststellen. In Abschnitt 3.B. wurde jedoch bereits gezeigt, daß die unspezifische Aufnahme von Cholin in den H₂O-injizierten Kontrolloozyten sehr viel höher war als bei anderen getesteten Substraten. Nach dem Messen der konzentrationsabhängigen Aufnahme von Cholin an Kontrolloozyten in und ohne Abwesenheit von Cyanin863 (Abb.3.D.2.B.) konnte man erkennen, daß die endogene Aufnahme von Cholin keine Sättigbarkeit und keine Hemmbarkeit durch Cyanin863 aufwies. Die Aufnahme stieg linear in Abhängigkeit der

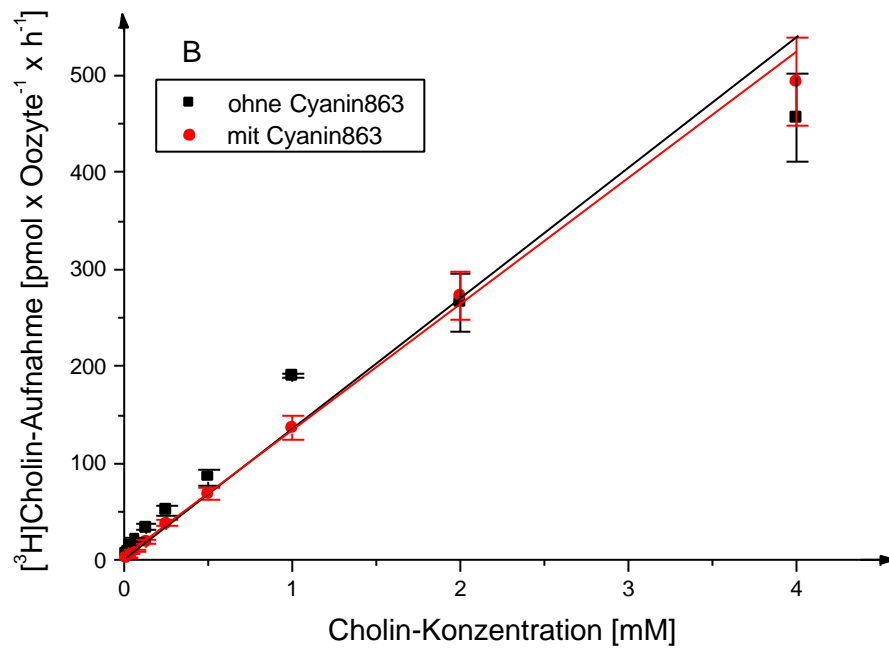
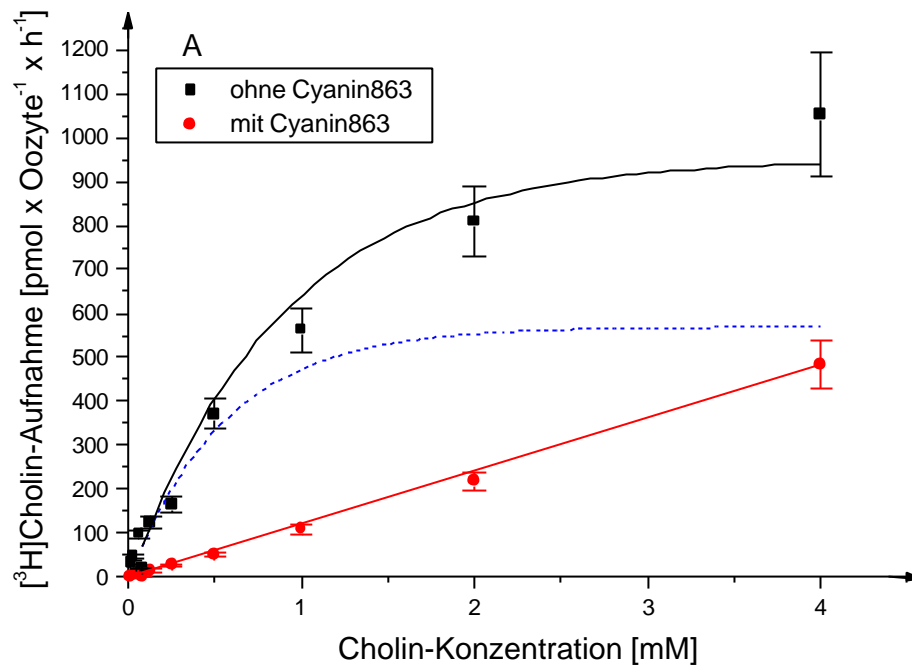


Abb.3.D.2 Substratabhängigkeit der rOCT2-vermittelten [³H]Cholin-Aufnahme. Nach Injektion von rOCT2-cRNA (A) und H₂O (B) in *Xenopus*-Oozyten wurde die [³H]Cholin-Aufnahme bei verschiedenen Cholin-Konzentrationen in Abwesenheit und Präsenz von Cyanin863 gemessen.

Cholinkonzentration an. Die Aufnahme von Cholin, die an rOCT2- exprimierenden Oozyten beobachtet werden konnte, setzte sich also einem spezifischen und einem unspezifischen bzw. einem hemmbaren und einem nicht hemmbaren Anteil zusammen. Aus der gesamten Cholinaufnahme wurde der nur hemmbare Anteil (*gestrichelte Linie in Abb.3.C.4.A.*) der Michaelis-Menten-Gleichung angepaßt, wobei sich ein apparenter K_m -Wert von $604 \pm 102 \mu\text{M}$ und ein V_{max} -Wert von $703 \pm 40 \text{ pmol} \times \text{Oozyte}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ ergaben. Im Vergleich zu rOCT1 ($K_m = 370\text{-}620 \mu\text{M}$; 3.D.4.) lag dieser ermittelte K_m -Wert von $604 \mu\text{M}$ für rOCT2 in einem ähnlichen Bereich.

3.D.3. Guanidin-Kinetik

In *Abb.3.D.3.* ist die konzentrationsabhängige Aufnahme von Guanidin dargestellt. Die K_m -Werte von Guanidin für rOCT1 und rOCT2 sollten in einer Parallel-Messung bestimmt werden, um aufzuklären, ob Guanidin ein Substrat darstellt, für das rOCT1 und rOCT2 unterschiedliche Affinitäten besitzen.

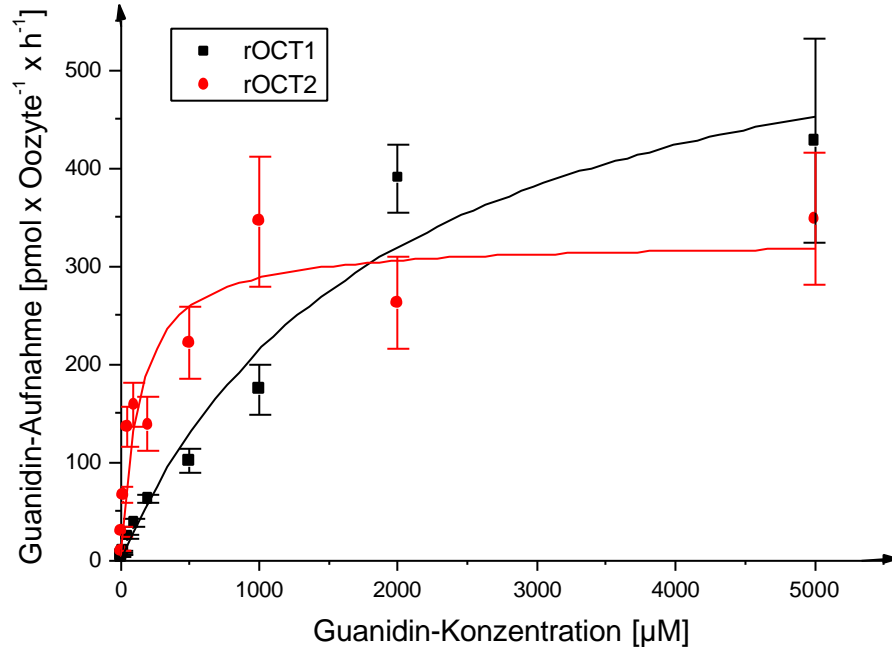


Abb.3.D.3. Substratabhängigkeit der rOCT1/rOCT2-vermittelten [^{14}C]Guanidin-Aufnahme. Nach Injektion von rOCT1- und rOCT2-cRNA in *Xenopus*-Oozyten wurde die [^{14}C]Guanidin-Aufnahme bei verschiedenen Guanidin-Konzentrationen in Abwesenheit und Präsenz von $100 \mu\text{M}$ Cyanin863 gemessen.

Die K_m - und V_{max} -Werte für Guanidin unterschieden sich zwischen rOCT1 und rOCT2 deutlich. Die Anpassung nach Michaelis-Menten-Gleichung ergab für rOCT1 einen K_m -Wert von $1,9 \pm 5,9$ mM und ein V_{max} -Wert von 625 ± 86 pmol \times Oozyte⁻¹ \times h⁻¹. Für rOCT2 dagegen ergab sich ein K_m -Wert von 127 ± 48 μ M und ein V_{max} -Wert von 324 ± 29 pmol \times Oozyte⁻¹ \times h⁻¹.

3.D.4. Affinitäten und maximale Transportraten von rOCT1 und rOCT2 im Vergleich

Zum weiteren Vergleich der Transporteigenschaften von rOCT1 und rOCT2 wurden die kinetischen Parameter, neben den bereits in 3.D. gezeigten Substraten, auch noch für einige andere Substrate durch Tracer-Flux-Messungen bestimmt. Es handelte sich hierbei um MPP, NMN und Histamin. Um den Überblick über die in der vorliegenden Arbeit bestimmten K_m - und V_{max} -Werte der verschiedenen Substrate zu bekommen, sind die K_m -Werte und V_{max} -Werte in Tab.3.D.4.A. und 3.D.4.B. dargestellt.

Substrat	K_m [μ M]	
	rOCT1	rOCT2
MPP	3 - 19 *	17 ± 2
TEA	95 - 129 *	91 ± 10
NMN	126 - 340 *	245 ± 30
Histamin	123 ± 37	260 ± 63
Cholin	370 - 620 *	604 ± 102
Guanidin	1900 ± 100	130 ± 50

Tab. 3.D.4.A. Apparente K_m -Werte verschiedener Substrate von rOCT1 und rOCT2 im Vergleich. Die für rOCT1-ermittelten Werte stammen teilweise aus unabhängig von dieser Arbeit ermittelten Daten aus verschiedenen Publikationen (Gründemann et al., 1994a; Busch et al., 1996a; Gorboulev et al., 1999). Der Vollständigkeit halber sind diese Werte mit den von mir ermittelten zusammengefasst. Sie sind mit * gekennzeichnet.

Betrachtet man sich die K_m -Werte, erkennt man, daß rOCT1 und rOCT2 im großen und ganzen ähnliche Affinitäten für meisten Substrate besitzen. Guanidin (3.D.3.) bildet hier eine Ausnahme. Bei den V_{max} -Werten fiel auf, daß diese zwischen beiden Transporter unterschiedlich sein können, obwohl die K_m -Werte im ähnlichen Bereich liegen.

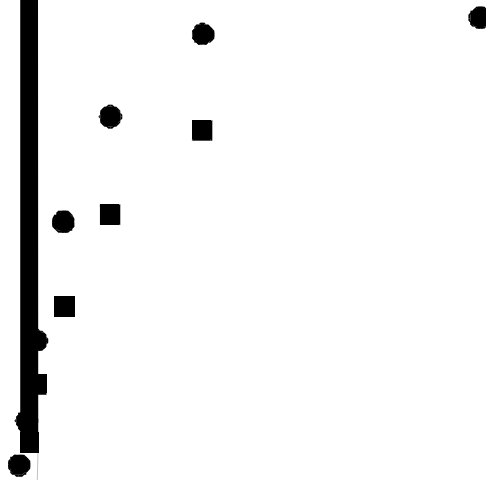
Substrat	V_{max} [pmol \cdot Oozyte ⁻¹ \cdot h ⁻¹]	
	rOCT1	rOCT2
MPP	118 \pm 10	47 \pm 6
TEA	157 \pm 20	96 \pm 16
NMN	168 \pm 40	93 \pm 24
Cholin	213 \pm 62	138 \pm 49
Guanidin	625 \pm 86	324 \pm 29
Histamin	42 \pm 5	861 \pm 56

Tab.3.D.4.B. Maximale Transportraten verschiedener Substrate im Vergleich. Die Aufnahme der Substrate wurde für die entsprechenden Substanzen immer bei einer Konzentration gemessen, bei der sich die Substrataufnahme bei einer Transportkinetik bereits im gesättigten Bereich befunden hatte.

Der V_{max} -Wert der Histamin-Aufnahme war bei rOCT1 zwanzigfach kleiner als bei rOCT2 (42 \pm 5 versus 861 \pm 56 pmol \times Oozyte⁻¹ \times h⁻¹), während der V_{max} -Wert für MPP bei rOCT1 zweifach höher lag als bei rOCT2 (118 \pm 10 versus 47 \pm 6 pmol \times Oozyte⁻¹ \times h⁻¹). Ähnlich wie bei MPP verhielt es sich mit den anderen getesteten Substraten, wo die V_{max} -Werte bei rOCT1 ca. zweimal höher lagen als bei rOCT2.

3.E.1. Potentialabhängige K_m -Wert-Verschiebungen

In einem Vorversuch zeigten elektrische Messungen mit rOCT2-exprimierenden Oozyten, die auf -50 mV geklemmt waren, daß rOCT2 ein Transporter ist, der elektrische Ladung zusammen mit den transportierten Kationen in die Oozyten befördert. Um die Potentialabhängigkeit des durch rOCT2-vermittelten Transports zu überprüfen, wurden an rOCT2-exprimierenden Oozyten elektrophysiologische Messungen durchgeführt, bei denen eine Spannung von 0 mV, -50 mV oder -90 mV angelegt wurde. Die Oozyten wurden mit verschiedenen Konzentrationen Cholin überspült und die Einwärtsströme bestimmt (Abb.3.E.1.). Diese Messung wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Christopher Volk, Anatomisches Institut, Würzburg, gemacht.



Man erkennt in *Abb.3.E.1.*, daß es sich um einen sättigbaren Stromfluß handelt, der bei allen drei Versuchsbedingungen im Bereich von 2.5 mM Cholin seine gesättigte Phase erreicht hat. Paßt man diese Ströme der Michaelis-Menten-Gleichung an und bestimmt daraus die apparenten K_m -Werte, erkennt man deutlich eine Potentialabhängigkeit des Cholin-induzierten Stroms und der ermittelten K_m -Werte [$0,7 \pm 0,09$ mM (0 mV), $0,38 \pm 0,05$ mM (-50 mV), $0,27 \pm 0,04$ mM (-90 mV)] und der V_{max} -Werte [136 ± 15 nA (0 mV), 232 ± 8 nA (-50 mV), 282 ± 13 nA (-90 mV)]. Je niedriger die an die Oozyten angelegte Spannung war, desto niedriger wurde der aus dem Cholin-induzierten Strom abgeleitete K_m -Wert. Bei einem negativen Anstieg der Spannung erhöhten sich die auch die V_{max} -Werte. Durch ein niedriges Membranpotential (erhöhte negative Spannung im Innern der Zelle und dadurch Anstieg der Potentialdifferenz zwischen innerem und äußerem Milieu) wurde die treibende Kraft für den Einstrom positiver Ladung in die Zelle erhöht. Die Potentialabhängigkeit des durch rOCT2-vermittelten Stromflusses von Cholin zeigte sich in den veränderten K_m - und V_{max} -Werten. Für rOCT1 war schon früher die Potentialabhängigkeit des organischen Kationentransports gezeigt worden (*Busch et al., 1996a*).

3.E. 2. Bestimmung der Substrataufnahme unter depolarisierenden Bedingungen

In physiologischem Puffer bilden *Xenopus*-Oozyten ein transmembranes elektrisches Potential aus, wobei durch den Austausch von Na^+ -Ionen gegen K^+ -Ionen die Potentialdifferenz sehr stark verringert werden kann. Durch die hohe Konzentration an extrazellulärem K^+ -Ionen fällt der K^+ -Gradient über die Oozytenmembran weg, was zu einer Abnahme der Potentialdifferenz führt. Neben die konstanten Spannungsklemme in *3.E.1.* bestand die Möglichkeit, das Membranpotential durch eine Veränderung der Ionenzusammensetzung im Reaktionspuffer zu beeinflussen. Die Potentialdifferenz konnte durch Abwesenheit von Na^+ und durch eine erhöhte Konzentration an K^+ im ORi vermindert oder die Oozyten gänzlich depolarisiert werden. Dieser Effekt konnte durch Bestimmung des Ruhepotentials der Oozyten von Dr. Christopher Volk, Anatomisches Institut Würzburg, gezeigt werden (*unveröffentlichte Daten*). Wie in *Abb.3.E.2.* gezeigt, nimmt die Aufnahme der Substrate MPP und TEA mit in K^+ -ORi (100 mM K^+ ; 1 mM Na^+) im Gegensatz zur Aufnahme in Na^+ -ORi (100 mM Na^+ ; 1 mM K^+) deutlich ab. Durch Messung der Substrataufnahme im K^+ -ORi besteht die Möglichkeit, Transportmechanismen

nahezu unbeeinflusst vom Membranpotential zu untersuchen. Diese Reaktionsbedingungen wurden bei den *trans*-Stimulationsexperimenten angelegt (3.G.), um die Asymmetrie des durch rOCT2-induzierten Transports bei niedrigem Membranpotential bestimmen zu können.

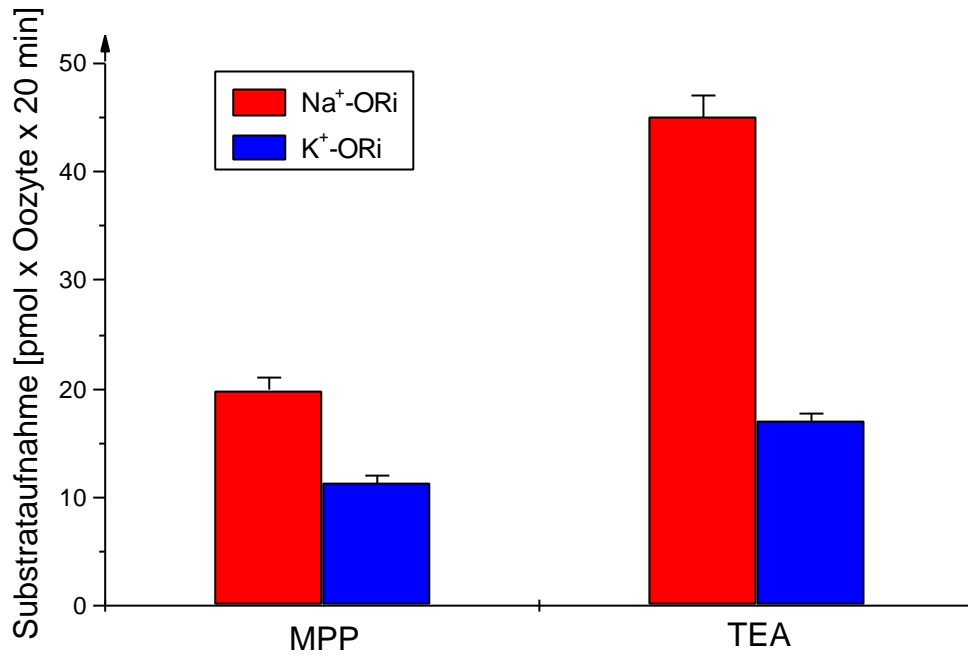


Abb.3.E.2. Aufnahme von 10 μM [^3H]MPP und 10 μM [^{14}C]TEA an rOCT2-exprimierenden Oozyten unter normalen (Na^+ -ORi) und depolarisierenden Bedingungen (K^+ -ORi). In K^+ -ORi waren 100 mM Na^+ gegen 100 mM K^+ ausgetauscht worden.

3.F. Inhibition des TEA-Transports

3.F.1. Organische Kationen

Um die Spezifität und Affinität von rOCT1 und rOCT2 gegenüber einigen Substanzen zu bestimmen und vergleichen zu können, wurden Dosis-Wirkungs-Kurven einiger Inhibitoren erstellt. Zunächst wurden Substanzen untersucht, die teilweise bereits für rOCT1 beschrieben worden waren (*Gründemann et al., 1994a*) und bei denen es sich um organische Kationen handelte. Hierbei wurde die Aufnahme von 10 μM TEA konzentrationsabhängig mit dem jeweiligen Inhibitor gehemmt und die IC_{50} -Werte ermittelt. Für den Vergleich der beiden Transporter untereinander wurden für die jeweiligen Substanzen die Oozyten aus einem operierten Tier (gleicher 'Oozyten-Batch') verwendet. Dadurch sollten Affinitätsverschiebungen durch Schwankungen der Ruhepotentiale zwischen den Oozyten von verschiedenen Tieren ausgeschlossen werden. Da Abschnitt 3.E.1. schon beschrieben wurde, daß die K_m -Werte von Cholin vom Membranpotential abhängig sind, mußte dies bei der Planung der Versuchsreihe zur Inhibition des TEA-Transports berücksichtigt werden. Schwankungen des Membranpotentials bei Oozyten aus verschiedenen Präparationen können auch durch unterschiedliche Expressionsraten entstehen. Bei erhöhten Expressionsraten kommt es nämlich während des Einstroms von Kationen in die Zelle zu einer verstärkten Depolarisation. In *Tab.3.F.1.* sind die IC_{50} -Werte der untersuchten organischen Kationen zusammengefaßt. Beim Vergleich von den aus verschiedenen Oozytenpräparationen bestimmten IC_{50} -Werten konnte man große Unterschiede in den ermittelten Werten feststellen. Beispiele hierfür sind in *Tab.3.F.1.* bei den Substanzen gezeigt, die mit Sternchen (*) gekennzeichnet sind. Bei den meisten getesteten Substanzen konnte man keine signifikanten Unterschiede der IC_{50} -Werte im Vergleich von rOCT1 zu rOCT2 feststellen. Dies war bei Cyanin863, Decynium22, Tetrapentylammonium, Chinidin, Tetrapropylammonium, Desipramin, MPP, TEA, NMN, Cholin und Tetramethylammonium der Fall. Bei den ersten drei genannten Substanzen handelt es sich um hochaffine Hemmstoffe, deren IC_{50} -Werte unter einem μM liegen. Bei vier untersuchten Hemmstoffen konnte man signifikante Unterschiede in den IC_{50} -Werten feststellen. *Abb.3.F.1.A.* zeigt die Hemmung des TEA-Transports durch Procainamid.

	rOCT1 IC₅₀ [µM ± S.E.M]	rOCT2 IC₅₀ [µM ± S.E.M]
Cyanin863	0,52 ± 0,14	2.2 ± 0,7
Decynium22	0.36 ± 0,1	0.59 ± 0,05
Tetrapentylammonium	0.53 ± 0,04	0.84 ± 0,33
Chinin*	3,6 ± 0,8 (6,7 ± 2,9)	12.8 ± 0,61 (28 ± 3,8)
Chinidin	12.7 ± 2,5	14.6 ± 1,35
Darstin**	7,6 ± 3,9 (4,9 ± 2,0)	822 ± 95 (387 ± 48)
Tetrapropylammonium	11.3 ± 3,7	6.2 ± 0,3
Desipramin	17.5 ± 7,8	10 ± 1,0
Procainamid*	27 ± 8,0 (32 ± 5,0)	401 ± 49 (743 ± 130)
MPP	24 ± 10	46 ± 5,0
O-Methylisoprenalin**	43 ± 1,3 (34 ± 3,0)	3434 ± 570 (2200 ± 420)
TEA	76 ± 8,5	102 ± 4,0
NMN	273 ± 21	270 ± 14
Cholin	350 ± 52	341 ± 41
Tetramethylammonium	1342 ± 362	630 ± 144

Tab.3.F.1. IC₅₀-Werte verschiedener organischer Kationen aus der Hemmung des rOCT1/rOCT2-vermittelten 10 µM [¹⁴C]TEA-Transports. Signifikante Unterschiede in den IC₅₀-Werten sind mit einem Sternchen ($p < 0.05$) bzw. mit zwei Sternchen ($p < 0.01$) gekennzeichnet.

in rOCT1- und rOCT2- exprimierenden Oozyten. Anhand der Messung ließ sich der IC_{50} -Wert bei rOCT1 auf $27 \pm 8 \mu\text{M}$ und bei rOCT2 auf $401 \pm 49 \mu\text{M}$ ermitteln. Somit ist die Affinität für Procainamid um ca. einen Faktor 15 bei rOCT1 höher als bei rOCT2. Dieser signifikante Affinitätsunterschied stellt ein Differenzierungsmerkmal zwischen beiden Transportproteinen dar.

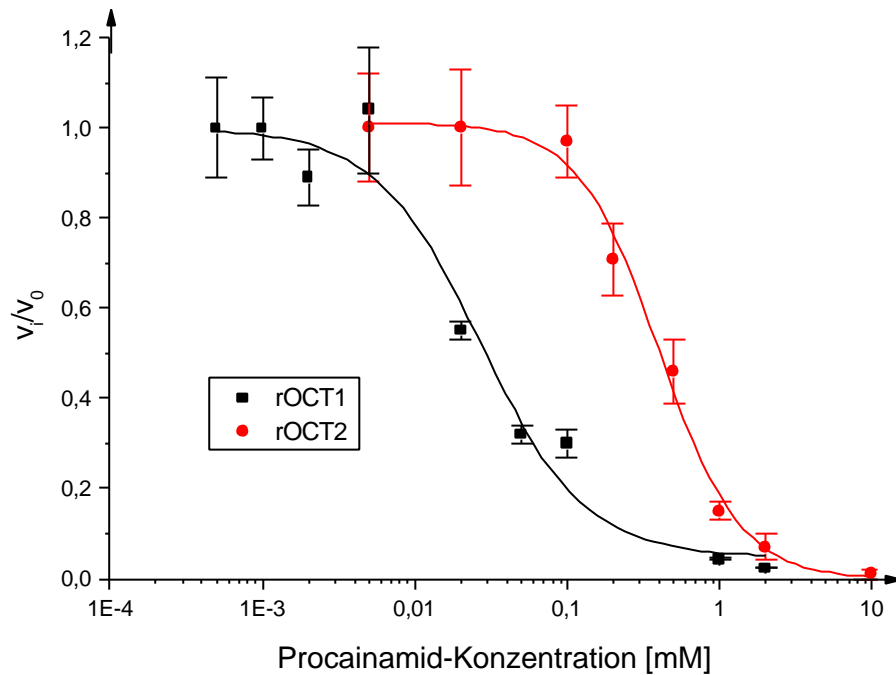


Abb.3.F.1.A. Konzentrationsabhängige Hemmung des rOCT1/rOCT2-vermittelten Transports von $10 \mu\text{M}$ [^{14}C]TEA durch Procainamid.

Weitere Substanzen, bei denen man für rOCT1- und rOCT2 unterschiedliche IC_{50} -Werte errechnet und die sich ähnlich darstellen lassen wie das oben gezeigte Procainamid, sind Darstin (Mepiperphenidol), O-Methylisoprenalin und Chinin. Hierbei ergab sich für rOCT1 immer ein niedrigerer IC_{50} -Wert als für rOCT2. Der IC_{50} -Wert war ca. 105fach niedriger bei Mepiperphenidol (Darstin), 80fach bei O-Methylisoprenalin und drei- bis vierfach bei Chinin.

Vergleicht man die getesteten Substanzen untereinander, kann man bei den Tetraalkylverbindungen Tetramethyl-, -ethyl-, -propyl- und -pentylammonium feststellen, daß die Affinität dieser Inhibitoren für rOCT1 und rOCT2 mit steigender Hydrophobizität zunahm. Dies war sowohl bei rOCT1 als auch bei rOCT2 der Fall. Zwei weitere Inhibitoren, die Diastereomere Chinin und Chinidin, wurden bezüglich ihrer Affinität zu rOCT1 und rOCT2

verglichen. Der Transport von 10 μM TEA wurde durch verschiedene Chinin- und Chinidin-Konzentrationen gehemmt. Hierbei stellte sich für rOCT2 heraus, daß die ermittelten IC_{50} -Werte für beide Substanzen im gleichen Bereich lagen (Chinin: $12,8 \pm 0,68 \mu\text{M}$ und Chinidin: $14,6 \pm 1,35 \mu\text{M}$). Bei rOCT1 zeigt sich jedoch ein signifikanter Unterschied der beiden IC_{50} -Werte. Chinin liegt mit einem IC_{50} -Wert von $3,6 \pm 0,8 \mu\text{M}$ um einen Faktor drei unter dem für Chinidin ermittelten IC_{50} -Wert von $12,7 \pm 2,5 \mu\text{M}$ (Abb.3.F.1.B.). Der durch rOCT1-vermittelte TEA-Transport läßt sich also stereoselektiv durch Chinin und Chinidin hemmen. Diese Stereospezifität stellt ein weiteres Differenzierungsmerkmal zwischen rOCT1 und rOCT2 dar.

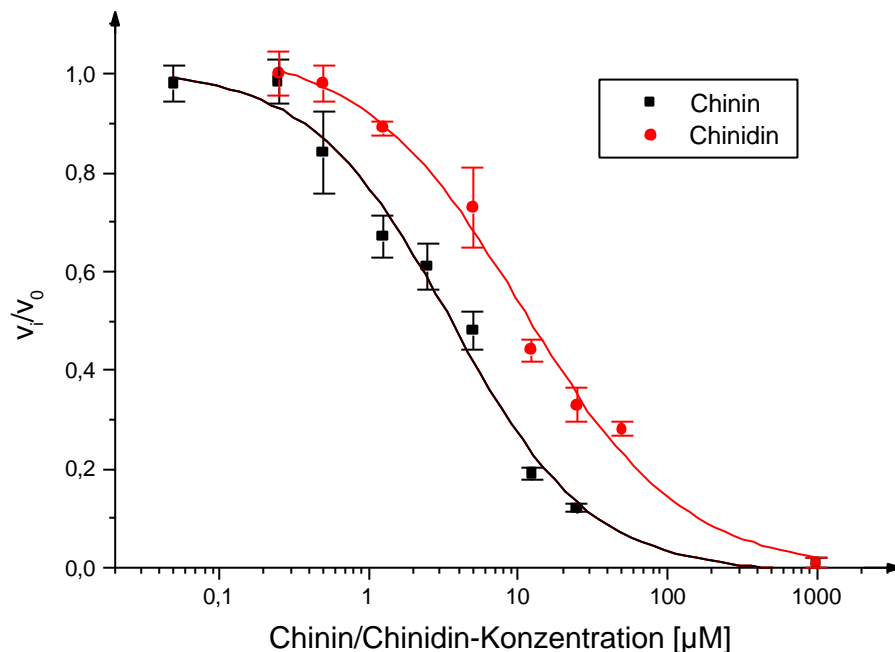


Abb.3.F.1.B. Bestimmung der IC_{50} -Werte für die Hemmung des Transports von 10 μM [^{14}C]TEA durch Chinin und Chinidin an rOCT1-exprimierenden Oozyten.

Chinin und Chinidin sind hydrophobe, sperrige Moleküle, die den TEA-Transport hochaffin hemmen. Bislang waren für den Transport über die Oozytenmembran nur kleine hydrophile Kationen getestet worden. Da man nicht davon ausgehen sollte, daß Hemmstoffe eines Transportproteins auch entsprechend von diesem transportiert werden, wurden die Substrateigenschaften von Chinin und Chinidin getestet. Abb.3.F.1.C. zeigt, daß Chinin und Chinidin, die zwar Hemmstoffe des rOCT2-vermittelten Transports sind, selbst nicht transportiert

werden. Man konnte keine durch rOCT2-spezifisch vermittelte Aufnahme von $1 \mu\text{M}$ [^3H]Chinin oder $1 \mu\text{M}$ [^3H]Chinidin feststellen. Die Aufnahme, die an H_2O -injizierten Oozyten ermittelt wurden, lag in dem Bereich, der an rOCT2-exprimierenden Oozyten bestimmt wurde und es war kein signifikanter Unterschied in der Transportrate an rOCT2- und Kontrolloozyten festzustellen. Die unspezifische Aufnahme von Chinidin war im Vergleich zu der von Chinin höher. Chinidin scheint die Plasmamembran besser unspezifisch passieren zu können als Chinin. Bei Chinin und Chinidin handelt es sich nach den gezeigten Ergebnissen um Hemmstoffe der rOCT2-vermittelten TEA-Aufnahme, die selbst jedoch nicht durch rOCT2 spezifisch transportiert werden. Da diese beiden Diastereomere die hier gezeigten Eigenschaften besitzen, war es interessant, den Hemmechanismus der TEA-Aufnahme bei dieser Substanzklasse zu untersuchen (3.G.).

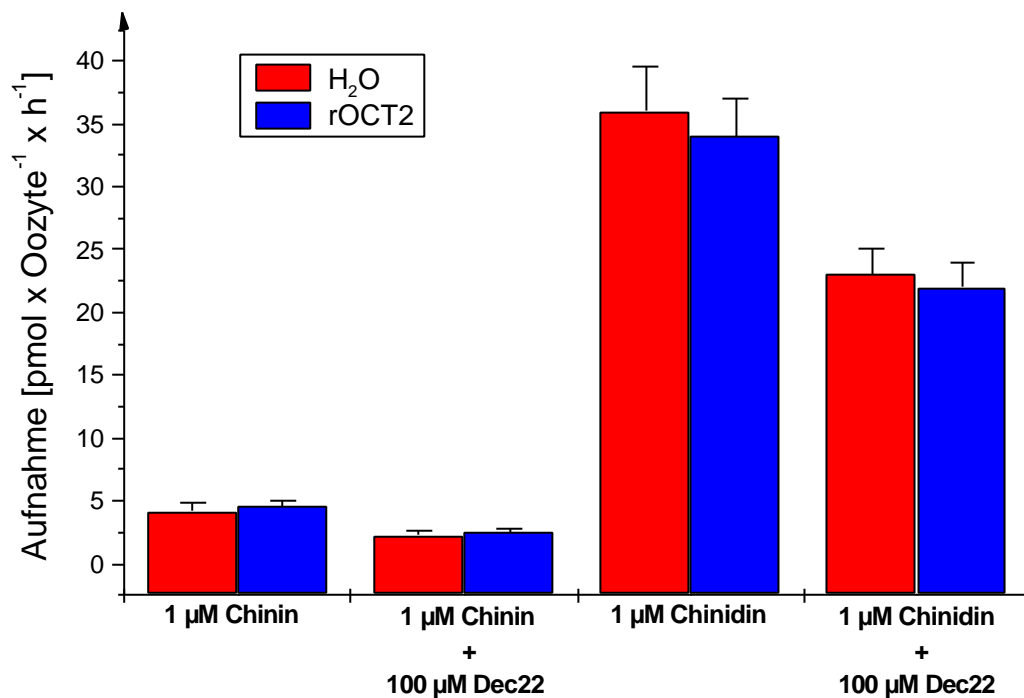


Abb.3.F.1.C. $1 \mu\text{M}$ [^3H]Chinin/Chinidin-Aufnahme in H_2O - und rOCT2- injizierten Oozyten.

3.F.2. Organische Anionen

Da der organische Kationen- und Anionentransporter rOCT1 und rOAT1 eine 30%ige Identität in ihren Aminosäuresequenzen besitzen, wurde getestet, ob organische Anionen den TEA-Transport hemmen können. Nachdem in einem initialen Versuch gezeigt werden konnte, daß die durch rOCT1- oder rOCT2-vermittelte Aufnahme von 10 μM [^{14}C]-TEA durch 1 mM **a**-Ketoglutarat, Probenecid und *p*-Aminohippurat (PAH) gehemmt wurde, wurden Dosis-Wirkungskurven von diesen Substanzen erstellt (Abb.3.F.2.A.). Vergleicht man die ermittelten IC_{50} -Werte in rOCT1- und rOCT2- exprimierenden Oozyten, erhält man für die beiden Transporter ähnliche Daten. Die ermittelten IC_{50} -Werte für rOCT1 und rOCT2 sind in Tab.3.F.2. dargestellt. Für **a**-Ketoglutarat wurde bei beiden Transportern ein IC_{50} -Wert von ca. 700 μM bestimmt, der deutlich unter den Werten für die anderen getesteten Anionen lag.

	rOCT1 IC_{50} [mM \pm S.E.M]	rOCT2 IC_{50} [mM \pm S.E.M]
Probenecid	1,64 \pm 0,09	1,7 \pm 0,09
a -Ketoglutarat	0,74 \pm 0,2	0,7 \pm 0,17
<i>p</i> -Aminohippurat	1,34 \pm 0,36	4,5 \pm 1,9

Tab.3.F.2. IC_{50} -Werte der Hemmung der rOCT1- und rOCT2-vermittelten Aufnahme von 10 μM [^{14}C]TEA (1 h Inkubation-szeit) durch verschiedene Konzentrationen **a**-Ketoglutarat, Probenecid und *p*-Aminohippurat.

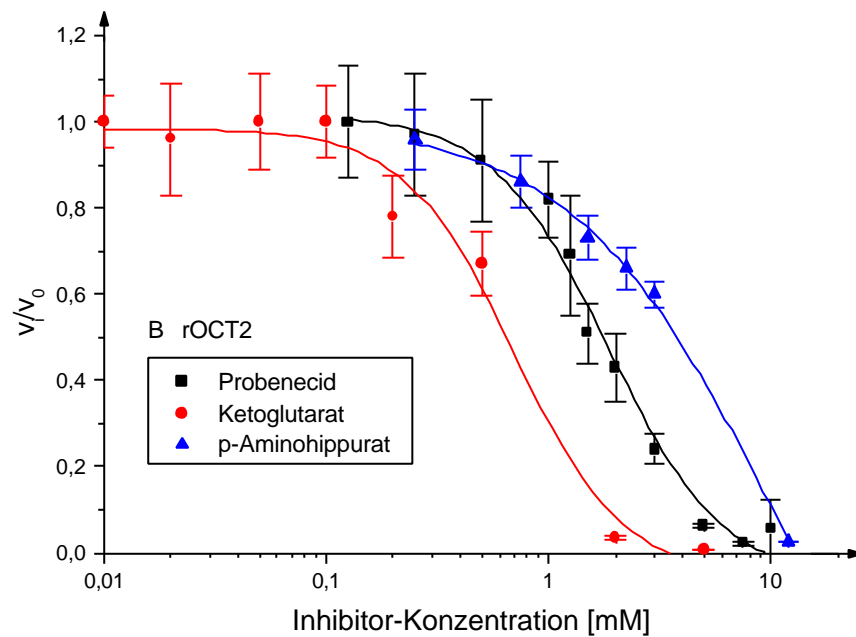
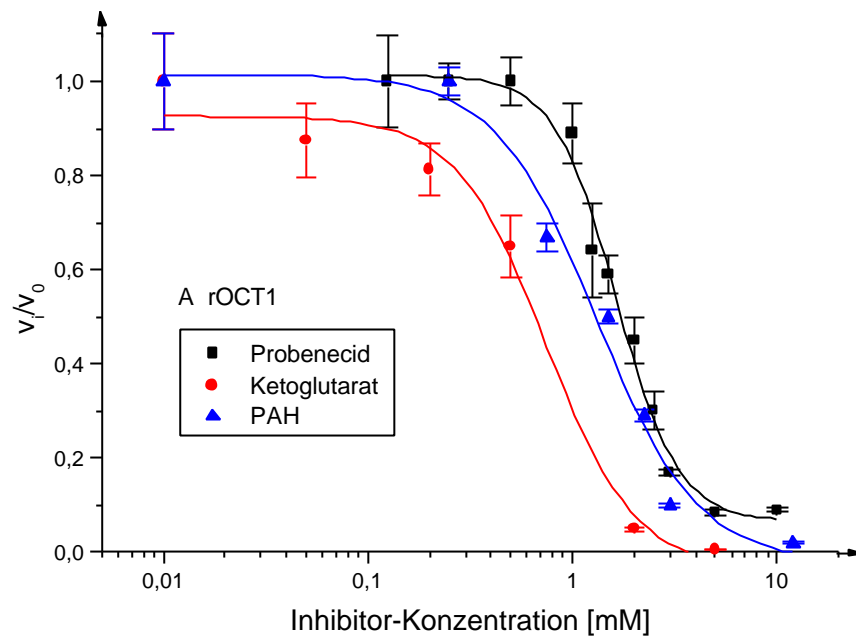


Abb.3.F.2.1. Konzentrationsabhängige Hemmung der rOCT1 (a)- und rOCT2-vermittelten Aufnahme von $10 \mu\text{M}$ [^{14}C]TEA (1 h Inkubationsdauer) durch Probenecid, α -Ketoglutarat und p -Aminohippurat.

Da sich die TEA-Aufnahme von den oben gezeigten organischen Anionen konzentrationsabhängig hemmen ließ (*Abb.3.F.2.1.*), wurde auch getestet, ob diese *p*-Aminohippurat (PAH) von rOCT1 und rOCT2 transportiert werden. Um eine Positivkontrolle für diesen Test zu haben, wurde der organische Anionentransporter rOAT1, der PAH mit einem K_m -Wert von 14 μM transportiert, aus der Rattenniere kloniert (*2.D.10.*). Die Aufnahme von PAH durch rOCT1 wird durch einen auswärts gerichteten Dicarboxylat-Gradienten stimuliert (*Sekine et al., 1997*). Der organische Anionentransporter arbeitet also als Anionen/Dicarboxylat-Austauscher und deswegen wurden die Oozyten in diesen Versuch mit 2 mM α -Ketoglutarat für ca. 2 h vorinkubiert. Die Oozyten sind in der Lage α -Ketoglutarat endogen in die Zelle aufzunehmen. In *Abb.3.F.2.2.* ist die PAH-Aufnahme in rOAT1-, rOCT1- und rOCT2-exprimierende Oozyten dargestellt. Man erkennt, daß PAH von rOCT1 und rOCT2 nicht transportiert wurde. Bei rOAT1 hingegen konnte man eine durch Probenecid hemmbare Aufnahme feststellen.

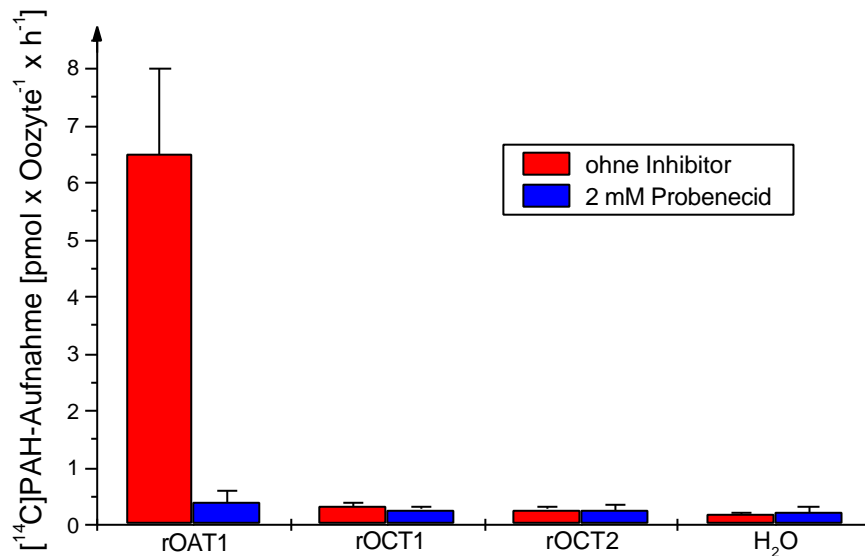


Abb.3.F.2.2. Aufnahme von 30 μM [^{14}C]p-Aminohippurat (PAH) in rOAT1- und rOCT1/2-exprimierende Oozyten. Der PAH-Transport wurde mit 2 mM Probenecid gehemmt.

Aus diesem Versuch konnte man ableiten, daß rOCT1 und rOCT2 PAH nicht über den gleichen

Mechanismus wie rOAT1 transportieren. Da es sich bei den organischen Kationentransportern aber um elektrogene Transporter handelt, die möglicherweise nicht die Eigenschaft besitzen, als Anionen/Dicarboxylat-Austauscher zu arbeiten, könnte man die PAH-Aufnahme auch unter anderen Versuchsbedingungen testen. Es besteht noch die Möglichkeit, an depolarisierten oder an auf positive Spannung geklemmte Oozyten zu messen, bei denen der Einstrom von negativer Ladung nicht von vornherein gegen das negative Membranpotential laufen würde.

3.E.3. Corticosteron

Das Nebennierenrindenhormon Corticosteron ist eine elektroneutrale Substanz, deren Hemmwirkung auf den organischen Kationentransport getestet wurde. Corticosteron hemmt hochaffin ($IC_{50} = 102 \text{ nM}$) den extraneuronalen Monoamintransport (uptake2) (Martel *et al.*, 1999a) und wurde bislang zur Unterscheidung von rOCT1 und dem 'uptake2' verwendet. Mittlerweile wurde der extraneuronale Monoamintransporter aus verschiedenen Spezies isoliert und als Mitglied der OCT-Familie identifiziert. Es handelt sich hierbei um OCT3 aus Mensch (EMT), Ratte (rOCT3) und Maus (mOCT3) (Gründemann *et al.*, 1998; Kekuda *et al.*, 1998; Verhaagh *et al.*, 1999). Da der IC_{50} -Wert von Corticosteron in rOCT1 und rOCT2 exprimierenden Oozyten bislang nie genau bestimmt worden war und man nach der Klonierung von rOCT2 nicht wußte, ob es sich hierbei um den extraneuronalen Monoamintransporter handelte, wurde hier die Aufnahme von $10 \mu\text{M}$ TEA konzentrationsabhängig durch Corticosteron gehemmt. Für rOCT1 wurde ein IC_{50} -Wert von $172 \pm 17 \mu\text{M}$ ermittelt, für rOCT2 dagegen ein Wert von $4,2 \pm 0,63 \mu\text{M}$ (Abb.3.F.3.). Somit besitzt rOCT2 eine um den Faktor 34 höhere Affinität für Corticosteron als rOCT1. Corticosteron ist bisher die einzige untersuchte Hemmstoff, der gegenüber rOCT2 eine deutlich höhere Affinität besitzt als gegenüber rOCT1. Die Hemmung des TEA-Transports durch Corticosteron kann als Unterscheidungsmerkmal zwischen rOCT1 und rOCT2 herausgestellt werden. Da Corticosteron aber nicht nur rOCT2, sondern auch den extraneuronalen Monoamintransport mit hoher Affinität hemmt, kann es *in vivo* nicht als alleiniges Kriterium zur Identifizierung von rOCT2 verwendet werden.

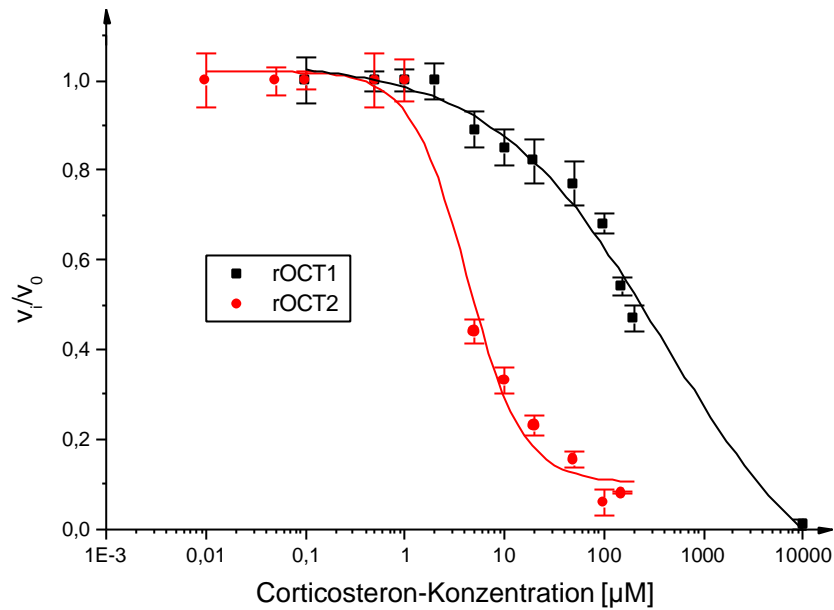


Abb.3.F.3. Konzentrationsabhängige Hemmung der rOCT1/rOCT2- vermittelten Aufnahme von 10 μM [^{14}C]TEA durch Corticosteron.

3.G. Kinetische Charakterisierung der Transporthemmung durch transportierte und nicht transportierte Kationen

Um die Interaktion von transportierten und nicht-transportierten Inhibitoren mit rOCT1 und rOCT2 zu charakterisieren, wurde für einige Inhibitoren der kinetische Hemmtyp bestimmt. Dazu wurden Transportraten bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen in Abwesenheit und Gegenwart unterschiedlicher Hemmstoffe gemessen. Die Messungen wurden bei drei verschiedenen Hemmstoffkonzentrationen durchgeführt. In *Abb.3.G.1.* sind Messungen mit den Inhibitoren NMN, Chinin und Tetrapentylammonium (TPeA), in *Abb.3.G.2.* mit den Hemmstoffen NMN, Chinin und Decynium22, gezeigt. Dabei wurde der Transport mit [^{14}C]TEA als Substrat gemessen. Dr. Christopher Volk, Anatomisches Institut, Würzburg, hat durch elektrophysiologische Messungen gezeigt, daß Cyanin863, Decynium22 und Tetrapentylammonium wahrscheinlich nicht durch rOCT1 und rOCT2 transportiert werden, da diese Substanzen keine positiven Einwärtsströme in diese Transporter exprimierenden *Xenopus laevis* Oozyten hervorgerufen haben (*unveröffentlichte Daten*).

Chinin [μM]

- () 0 **b**
- () 5
- () 10
- () 20

TPA [

- () 0.5
- () 1.5
- () 15

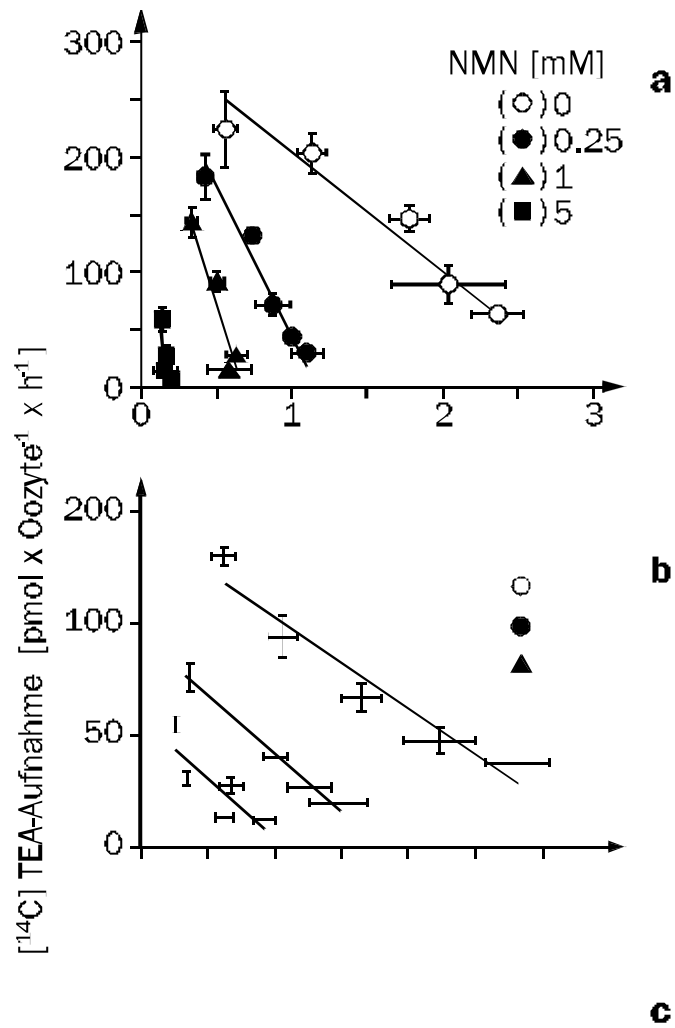


Abb.3.G.2. Inhibitionstudien des rOCT2-vermittelten TEA-Transports mit NMN, Chinin und Decynium22. Der Versuch wurde wie in Abb.3.G.1 durchgeführt und ausgewertet.

Abb.3.G.1. zeigt Messungen, bei denen rOCT1 exprimiert wurde, während in Abb.3.G.2. Messungen mit rOCT2 dargestellt sind. Die in Abb.3.G.1. gezeigten Daten wurden in Zusammenarbeit mit Isabel Ulzheimer-Teuber, Anatomisches Institut, Würzburg, ermittelt. Die erhaltenen Daten wurden in einem Eadie-Hofstee-Plot dargestellt, um den vorliegenden Hemmtyp zu veranschaulichen. Die lineare Auftragung der Daten ermöglicht die Abschätzung der K_m -Werte, die der Steigung der angepassten Regressionsgeraden entsprechen. Die V_{max} -Werte ergeben sich aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der y-Achse. In Gegenwart von NMN veränderte sich die maximale Aufnahme (V_{max}) von TEA kaum, was auf eine kompetitive Hemmung hindeutet.

Nach einer Anpassung der Michelis-Menten-Gleichung an die nicht transformierten Daten der konzentrationsabhängigen Aufnahme von TEA in Gegenwart verschiedener NMN-Konzentrationen, ergaben sich die folgenden K_m - und V_{max} -Werte (Tab.3.G.1.):

rOCT1	K_m (μM)	V_{max} ($\text{pmol} \cdot \text{Oocyte}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
0 mM NMN	49 ± 14	369 ± 27
1 mM NMN	323 ± 118	381 ± 77
5 mM NMN	797 ± 88	368 ± 21
10 mM NMN	1207 ± 195	284 ± 29

rOCT2	K_m (μM)	V_{max} ($\text{pmol} \cdot \text{Oocyte}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
0 mM NMN	82 ± 15	279 ± 19
0,25 mM NMN	227 ± 27	285 ± 17
1 mM NMN	526 ± 104	346 ± 56

5 mM NMN 1750 ± 470 275 ± 61 $\text{E10 0.70 T2. 486 353 5 r6.75}$

Die Daten zeigen, daß die durch rOCT1- und rOCT2-vermittelte TEA-Aufnahme durch das Substrat NMN kompetitiv gehemmt wird. Im Gegensatz dazu wurde der durch rOCT1- und rOCT2- vermittelte TEA-Transport vorwiegend nicht-kompetitiv durch Chinin gehemmt (Abb.3.G.1. und Abb.3.G.2.).

rOCT1	K_m (μM)	V_{max} ($\text{pmol} \cdot \text{Oocyte}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
0 μM Chinin	61 ± 6	388 ± 10
5 μM Chinin	101 ± 24	227 ± 17
10 μM Chinin	139 ± 41	167 ± 17
20 μM Chinin	97 ± 27	76 ± 7

rOCT2	K_m (μM)	V_{max} ($\text{pmol} \cdot \text{Oocyte}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
0 μM Chinin	96 ± 9	152 ± 8
20 μM Chinin	103 ± 7	94 ± 4
60 μM Chinin	108 ± 41	59 ± 13

Tab.3.G.2. Nach Michaelis-Menten gefittete K_m - und V_{max} -Werte für die konzentrationsabhängige rOCT1/rOCT2-vermittelte [^{14}C]TEA-Aufnahme unter Einfluß verschiedener Chinin-Konzentrationen.

Eine nicht kompetitive Hemmung der TEA-Aufnahme wurde auch für Decynium22 bei rOCT2 (Abb.3.G.2.C.) und für Tetrapentylammonium bei rOCT1 (Abb.3.G.1.C.) gefunden. Tab.3.G.3. zeigt die K_m - und V_{max} -Werte der TEA-Kinetiken, die mit und ohne diese hoch affinen Hemmstoffe bestimmt wurden.

rOCT1	K_m (μM)	V_{max} ($\text{pmol} \cdot \text{Oocyte}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
0 μM TPeA	36 ± 4	95 ± 26
0,5 μM TPeA	57 ± 16	74 ± 5
1,5 μM TPeA	68 ± 16	49 ± 3
15 μM TPeA	142 ± 15	21 ± 7

rOCT2	K_m (μM)	V_{max} ($\text{pmol} \cdot \text{Oocyte}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
0 μM Dec22	336 ± 76	408 ± 43
0,1 μM Dec22	349 ± 93	318 ± 42
0,25 μM Dec22	292 ± 54	258 ± 22
1 μM Dec22	309 ± 87	188 ± 26

Tab.3.G.3. Nach Michaelis-Menten gefittete K_m - und V_{max} -Werte der konzentrationsabhängigen [^{14}C]TEA-Aufnahme unter Einfluß verschiedener Konzentrationen von Tetrapentyl-ammonium (rOCT1) und Decynium22 (rOCT2).

Bei rOCT1-vermittelter TEA-Aufnahme wurde durch frühere Messungen, die Isabel Ulzheimer-Teuber in der Arbeitsgruppe von Prof. Koepsell, Anatomisches Institut, Würzburg, durchgeführt hatte, bereits gezeigt, daß Cyanin863 ebenfalls ein nicht kompetitiver Hemmstoff der rOCT1-vermittelten TEA-Aufnahme ist.

3.H. Trans-Effekte verschiedener Kationen auf MPP-Aufnahme und Efflux

Um die Transporteigenschaften von rOCT2 näher zu bestimmen und, um zu untersuchen, ob es sich bei rOCT2 um einen symmetrischen oder asymmetrischen Transport handelt, wurden *trans*-Effekte auf die Substrataufnahme und den Efflux untersucht. Da der rOCT2-vermittelte Transport potentialabhängig ist, wurden die Transportmessungen auch unter depolarisierenden Bedingungen in K⁺-ORi durchgeführt (2.E.7.), um Effekte der auf der *trans*-Seite zugegebenen Kationen auf das Membranpotential zu verringern.

3.H.1. Bestimmung des Membranpotentials

Zunächst wurde das Membranpotential von rOCT2-exprimierenden und H₂O-injizierten Oozyten bestimmt. Dieses Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Christopher Volk, Anatomisches Institut, Würzburg, durchgeführt. Die Experimente wurden in Na⁺-ORi (100 mM Na⁺, 3 mM K⁺) oder K⁺-ORi (103 mM K⁺) durchgeführt. In H₂O-injizierten Kontrolloozyten und in rOCT2-exprimierenden Oozyten lag das Membranpotential bei $-62 \pm 2,9$ mV bzw. $-60,6$ mV $\pm 7,4$ in Na⁺-ORi und bei $-9,1 \pm 0,3$ mV bzw. $-9,0 \pm 1,6$ mV bei 103 mM K⁺ (Abb.3.H.1.). Bei einer Vorbeladung mit 1 mM Cholin stieg das Membranpotential in rOCT2-exprimierenden Oozyten auf $-98 \pm 4,5$ mV in Na⁺-ORi bzw. auf $-30,5 \pm 2,0$ mV in K⁺-ORi, blieb aber in den Kontrolloozyten unverändert, was den elektrogenen Kationenefflux durch rOCT2 zeigte. Die Vorinkubation der rOCT2-exprimierenden Oozyten mit 1 mM TEA führte zu einer Erhöhung des Membranpotentials auf -74 ± 5 mV in Na⁺-Ori bzw. auf $-15 \pm 1,5$ mV in K⁺-ORi, wobei auch hier in den H₂O-injizierten Kontrolloozyten die Vorinkubation mit TEA keinen Einfluß auf das Membranpotential hatte.

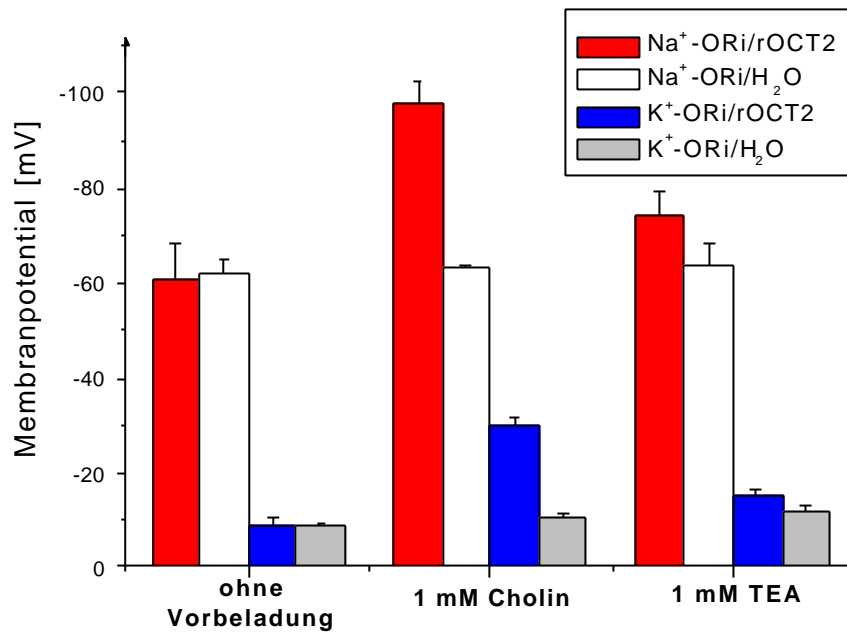


Abb.3.H.1. Membranpotentiale von rOCT2-exprimierenden Oozyten mit und ohne Vorinkubation mit organischen Kationen in Na⁺- oder K⁺-ORi. Die mit rOCT2-injizierten Oozyten wurden 12 h lang mit Cholin, TEA, MPP in den oben angegebenen Konzentration inkubiert. Als Vergleich dienten nicht-vorinkubierte Kationen. Die Standardabweichung von sechs Oozyten wurde berechnet.

3.H.2. trans-Effekte auf die MPP-Aufnahme

In Abb.3.H.2. wurden die *trans*-Effekte von Cholin und TEA auf die rOCT2-vermittelte MPP-Aufnahme untersucht. Im linken Teil der Abbildung erkennt man, daß die Aufnahme von 0,1 µM [³H]MPP in nicht vorbeladenen rOCT2-exprimierenden Oozyten höher war, wenn sich 110 mM Na⁺ in der Badlösung (Na⁺-ORi) befand, im Vergleich dazu, wenn Na⁺ durch K⁺ ersetzt wurde (K⁺-ORi). Dieser Befund war zu erwarten, da rOCT2 ein elektrogener Transporter ist, der teilweise durch das Membranpotential getrieben wird (β.E.). Der mittlere Teil der Abbildung zeigt, daß eine Vorbelastung der rOCT2-exprimierenden Oozyten mit 1 mM Cholin zu einem signifikanten Anstieg der MPP-Aufnahme in Gegenwart von Na⁺ oder K⁺ führte. Nach der Vorinkubation der Oozyten mit TEA war die Transstimulation der MPP-Aufnahme geringer. Signifikanz wurde nur in Gegenwart von K⁺ (K⁺-ORi) erreicht. Die Daten zeigen, daß der

rOCT2-Transport durch Cholin und TEA *trans*-stimulierbar war. Dabei kann nicht unterschieden werden, ob es sich um indirekte Effekte über Veränderungen des Membranpotentials oder direkte Effekte durch eine *trans*-Stimulation handelte.

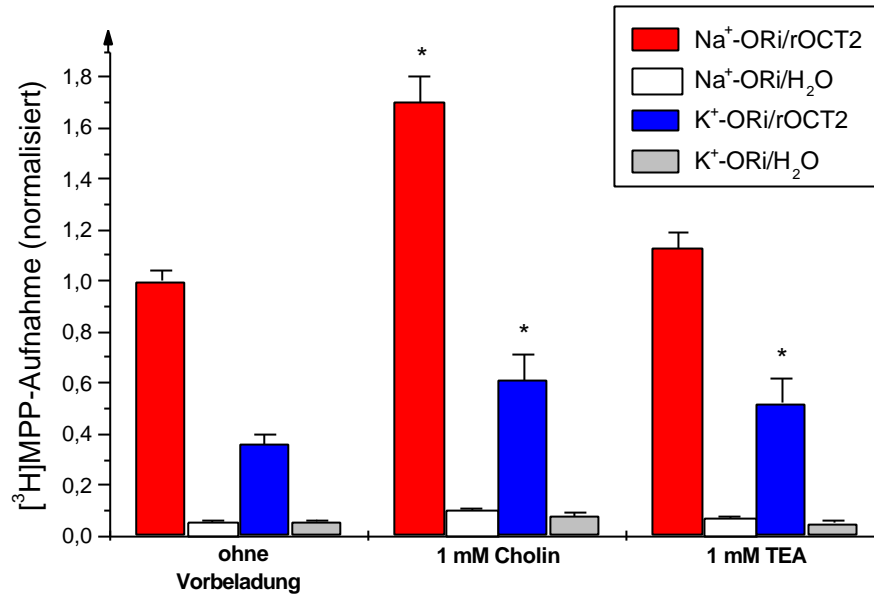


Abb.3.H.2. Bestimmung der durch rOCT2 vermittelten $0,1 \mu\text{M}$ [^3H]MPP-Aufnahme ohne oder nach Vorinkubation mit 1 mM Cholin und 1 mM TEA in rOCT2- und H_2O -injizierten Oozyten. Die Messung erfolgte für 5 min bei 19°C . Signifikante Veränderungen der Transportrate wurden mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet. Die Signifikanzen bezogen auf die Kontrollwerte ohne Vorinkubation unter den entsprechenden Versuchsbedingungen (gleiche Farben)

3.H.3. MPP-Efflux

Im nächsten Schritt der funktionellen Charakterisierung von rOCT2 wurde der durch rOCT2-vermittelte Transport auf Bidirektionalität und Symmetrie untersucht. Dabei wurde getestet, ob man in Efflux-Experimenten einen Auswärtstransport (Efflux) von $0,1 \text{ pmol}$ [^3H]MPP aus der Oozyte und eine *trans*-Stimulation des Transports durch verschiedene Kationen beobachten kann. Zur Bestimmung der Efflux-Rate unter *trans-0*-Bedingungen wurden die mit MPP injizierten Oozyten in Na^+ - bzw. K^+ -ORi inkubiert und die Effluxrate von MPP in rOCT2-exprimierenden Oozyten und mit H_2O -injizierten Kontrolloozyten bestimmt (Abb.3.H.3.). Zunächst wurde gezeigt, daß rOCT2 injiziertes MPP über die Oozytenmembran nach außen in

das Medium transportieren kann. Im linken Teil der Abbildung erkennt man außerdem, daß der rOCT2-vermittelte Efflux von MPP größer war, wenn sich 100 mM K^+ im Außenmedium befand, die Plasmamembran also weitgehend depolarisiert war. Die Daten zeigen, daß rOCT2 in beide Richtungen transportieren kann und deuten darauf hin, daß auch der Efflux elektrogen ist. Der MPP-Efflux war durch Cholin unter Na^+ -Bedingungen *trans*-stimulierbar. Unter K^+ -Bedingungen konnte man jedoch eine signifikante *trans*-Hemmung des MPP-Ausstroms beobachten. Vergleicht man diese Daten mit denen der MPP-Aufnahme (3.H.2.), kann man eine Asymmetrie des MPP-Transports unter *trans*-Cholin-Bedingungen für rOCT2 feststellen. Bei *trans*-TEA-Bedingungen waren die Ergebnisse ähnlich. Bei *trans*-Inkubation mit den von rOCT2 nicht transportierten Kationen Chinin und Decynium22 nahm der MPP-Efflux sowohl unter Na^+ - als auch unter K^+ -Bedingungen signifikant ab.

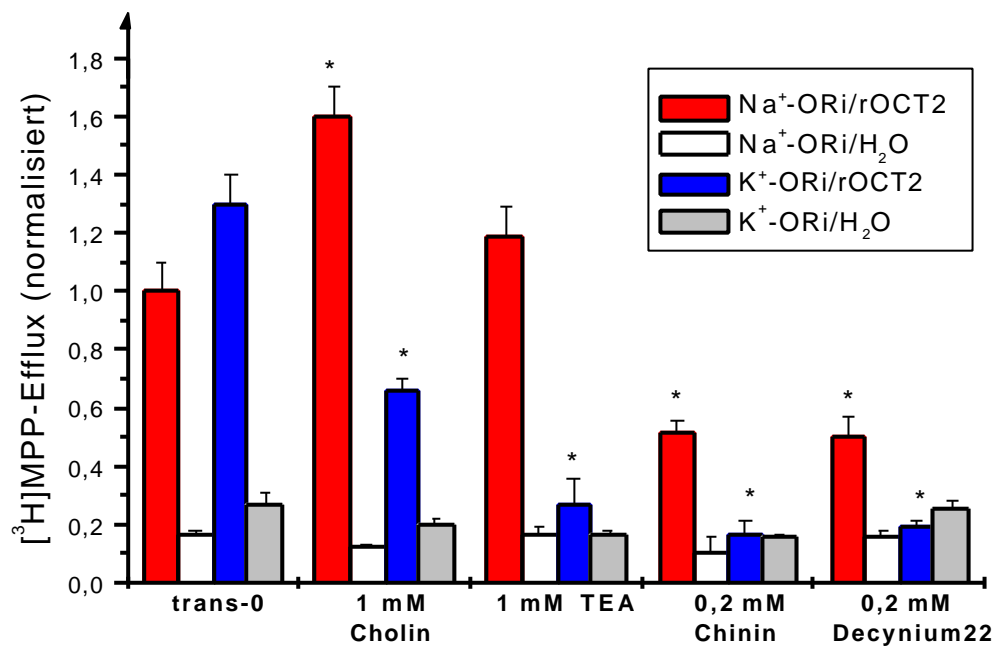


Abb.3.H.3. Bestimmung der durch rOCT2-vermittelten Effluxrate von MPP unter verschiedenen Pufferbedingungen. H_2O -oder rOCT2-injizierte Oozyten wurden mit [3H]MPP injiziert und in Na^+ - bzw. K^+ -ORi (*trans*-0) oder in Na^+ - oder K^+ -ORi inkubiert, der entweder 1 mM Cholin, 1 mM TEA, 0,2 mM Chinin oder 0,2 mM Decynium22 enthielt. Die Efflux-Rate wurde, wie in 2.E.7.d. angegeben ist, berechnet. Signifikante Veränderungen der Transportraten im Vergleich zur *trans*-0-Bedingung (unter entsprechenden Na^+ - und K^+ -Konzentrationen) wurden mit (*) gekennzeichnet.

Sowohl rOCT1 als auch rOCT2 können den Kationentransport über die Oozytenmembran in beide Richtungen vermitteln (3.H.; Busch et al., 1996b). Da in Abschnitt 3.H. nur Daten für rOCT2 ermittelt wurden und nicht im direkten Vergleich zu rOCT1, möchte ich nun hier direkt im Anschluß an die oben gezeigten Ergebnisse die *trans*-Effekte zusammenfassen und diskutieren. Der elektrogene Efflux von endogenen Kationen wie Cholin aus der Epithelzelle des proximalen Tubulus kann die zelluläre Aufnahme von Kationen aus dem Interstitium stimulieren. Eine Stimulation durch Cholin bei der MPP-Aufnahme in die Oozyten konnte auch für rOCT2 gezeigt werden (3.H.2.). Das Membranpotential dient als 'driving force' der Kationenaufnahme durch rOCT1 und rOCT2 und steigert auch den V_{max} -Wert des Transports (Abb.3.D.1.). Dabei erhöht sich die Affinität des rOCT1/rOCT2-Transports bei steigendem negativem Membranpotential (Busch et al., 1996; 3.D.1.). rOCT1 und rOCT2 könnten auch an der basolateralen Freisetzung von endogenen Kationen beteiligt sein. Bei normalem Membranpotential ist die Freisetzung sehr niedrig. Sie sollte jedoch bei einer Abnahme des Membranpotentials ansteigen. Solch eine Abnahme des Membranpotentials könnte durch die elektrogene Kationenaufnahme durch die entsprechenden Transporter induziert werden. Also könnten kationische Substrate von rOCT1 und rOCT2 im Interstitium den Efflux von zellulären Kationen steigern. Wenn jedoch die Zellen andererseits stark depolarisiert sind, können Kationen an der Außenseite den gegenteiligen Effekt haben: sie können die zelluläre Kationenfreisetzung hemmen wie dies zumindest für rOCT2 im Verlauf dieser Arbeit gezeigt wurde (Abb.3.G.3.). Unsere Daten deuten darauf hin, daß spezifische Funktionen von rOCT1 und rOCT2 in verschiedenen Segmenten des proximalen Tubulus durch die Konzentration von intrazellulären und extrazellulären Kationen bestimmt werden kann. Diese Konzentrationsänderungen können den Transport durch rOCT1 und rOCT2 in Abhängigkeit des entsprechenden Membranpotentials beeinflussen. Unabhängig von dieser Arbeit wurde der Einwärts- und Auswärtstranport von MPP bereits an kultivierten Hepatozyten der Ratte gezeigt und rOCT1 als für den MPP-Transport verantwortliches Transportprotein diskutiert. Hierbei konnte ebenfalls die Hemmung des MPP-Ausstroms durch Decynium22 gezeigt werden (Martel et al., 1996, 1999b). Die Übereinstimmungen der Messungen an Oozyten und kultivierten Hepatozyten und die Tatsache, daß rOCT1 in der sinusoidalen Membran von Hepatozyten lokalisiert ist (Martel et al., 1996; Meyer-Wentrup et al., 1998), läßt vermuten, daß der Transport von organischen Kationen über die sinusoidale Membran in den Blutstrom durch rOCT1 bewerkstelligt wird.

4. Diskussion

Die Diskussion der in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse möchte ich damit beginnen, eine Einführung über die Genfamilie der organischen Kationentransporter zu geben. Dies soll dazu dienen, einen Überblick über die OCT-Familie zu bekommen und zu rOCT1- und rOCT2 verwandte Transporter kennenzulernen, die in der Diskussion des öfteren erwähnt werden. Anschließend werden die Ergebnisse der vergleichenden Charakterisierung von rOCT1 und rOCT2 diskutiert und in einem Ausblick die Relevanz der in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Erkenntnisse für zukünftige Forschungsarbeiten erläutert.

4.A. Die OCT-Familie

Durch Expressionsklonierung wurde der erste organische Kationentransporter (rOCT1) aus einer Rattennieren-cDNA-Bibliothek (rOCT1) isoliert (*Gründemann et al. 1994a*). Mit der Isolierung dieses aus 556 Aminosäuren bestehenden Proteins wurde die Charakterisierung einer neuen Transporterfamilie (OCT-Familie) eingeleitet. Bei rOCT1 handelt es sich um einen potentialabhängigen Transporter, der den Transport von organischen Kationen, wie z. B. TEA vermittelt. In dieser Arbeit sollte nun die Isolierung und Charakterisierung eines weiteren OCT-Subtyps erfolgen. Unabhängig davon wurden im Laufe der Zeit OCT1-Isoformen aus anderen Spezies beschrieben. Hierzu gehört die Isolierung der OCT1-Transporter aus der menschlichen Niere (*Gorboulev et al., 1997*) und Leber (*Zhang et al., 1997b*) und aus der Niere von Kaninchen (*Terashita et al., 1998*) und Maus (*Schweifer und Barlow, 1996; Green et al., 1999*). Durch Homologieklonierung gelang es, einen weiteren organischen Kationentransporter aus der Rattenniere, rOCT2, zu isolieren (3.A.). Auf dessen Klonierung wird in Abschnitt 4.B. eingegangen. Unabhängig von der Klonierung von rOCT2 wurden Isoformen aus anderen Spezies isoliert. OCT2 wurde aus der Maus (*Mooslehner und Allen, 1999*), dem Menschen (*Gorboulev et al., 1997*) und dem Schwein (LLC-PK1-Zellen) (*Gründemann et al., 1997*) kloniert. Alle diese OCT2-Klone zeigen untereinander eine große Ähnlichkeit. Sie besitzen eine 80-90%ige Identität. Im Laufe der letzten Jahre wurden viele weitere Mitglieder der OCT-Familie isoliert. Um die Verwandtschaft der einzelnen Transporter untereinander und die rasch

ansteigende Mitgliederzahl dieser Familie zu zeigen, sind die Proteine in einem Stammbaum zusammengefaßt.

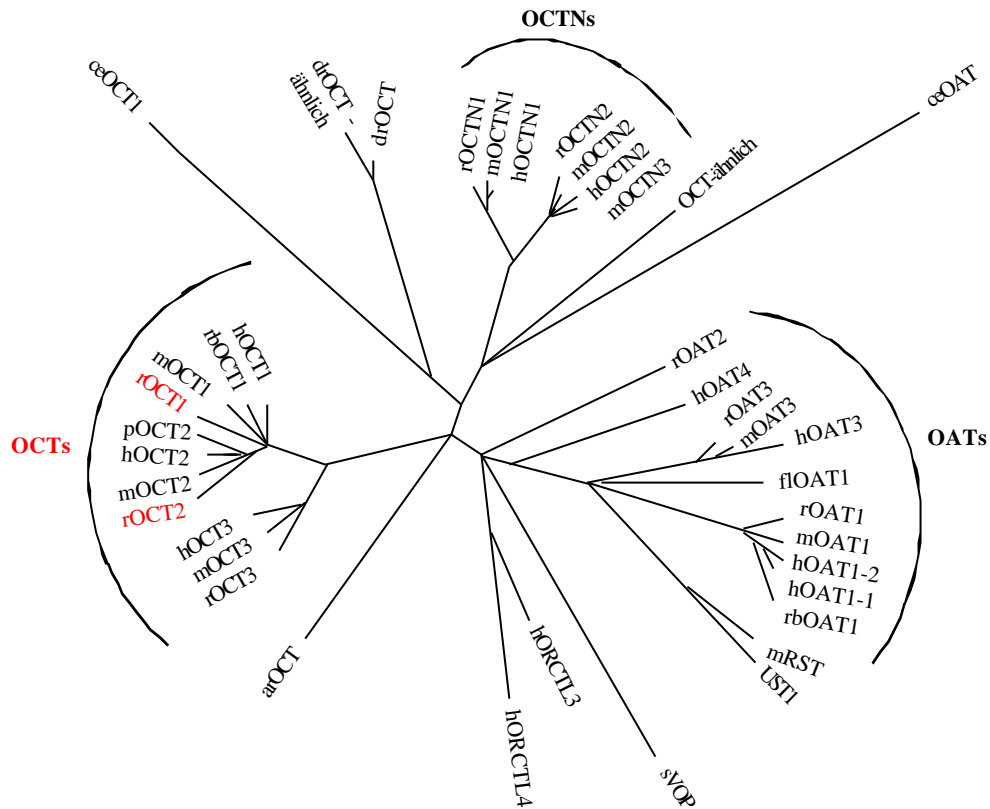


Abb.4.A. Stammbaum der OCT-Familie. Das Programm 'Drawtree' aus dem PHYLIP-Paket (Felsenstein, 1998) wurde verwendet, um phylogenetische Entfernungen zu veranschaulichen, die aus einem Sequenzvergleich von rOCT1 mit den gezeigten Genen ermittelt wurden. Mit der Funktion 'Pile-Up' im GCG-Programm (Wisconsin Sequence Analysis Package) wurde die Ähnlichkeit der Sequenzen errechnet (Anonymous, 1998) und in der Abbildung durch die Längen und Verzweigungen der verschiedenen Geraden dargestellt. Erläuterungen zu den hier gezeigten Genen finden sich entweder im Text oder im Anhang dieser Arbeit (7.E.).

Bislang unterteilt man die OCT-Familie in drei große Gruppen. Erstens gibt es die Gruppe der elektrogenen organischen Kationentransporter, von denen bisher drei Subtypen gefunden wurden: OCT1, OCT2 und OCT3. Bei dieser Gruppe handelt es sich um elektrogene, potentialsensitive, Na⁺-unabhängige Transporter, von denen rOCT1 und rOCT2 in dieser Arbeit ausführlich charakterisiert wurden. Das dritte Mitglied dieser Genfamilie, rOCT3, wurde aus der Plazenta der Ratte kloniert (*Kekuda et al., 1998*) und mittlerweile wurde OCT3 auch aus dem Menschen (hOCT3) und der Maus (mOCT3) isoliert (*Gründemann et al., 1999; Verhaagh et al., 1998*). Es wurde gezeigt, daß hOCT3 und rOCT3 mit dem als extraneuronalen Noradrenalintransporter beschriebenen Transportsystem identisch sind (*Gründemann et al., 1999; Kekuda et al., 1998*).

Die zweite Gruppe umfaßt die OCTN-Transporter. Der Transporter OCTN1 wurde aus der humanen fötalen Leber isoliert (*Tamai et al., 1997*). Hierbei handelt es sich um ein Transportprotein, bei dem eine pH-Abhängigkeit des TEA-Transports gezeigt wurde. Mittlerweile sind die OCTN1-Sequenzen auch aus der Maus (mOCTN1) und der Ratte (rOCTN1, UST2) bekannt (*Schömig et al., 1998*). Die hOCTN1-Isoform, hOCTN2, wurde aus einer humanen Plazenta-Trophoblasten-Zelllinie (*Wu et al., 1998*) kloniert. Bei OCTN2 handelt es sich um den Na⁺-abhängigen Carnitintransporter. Ein Defekt in diesem Gen kann zu einer primären Carnitin-Defizienz führen (*Nezu et al., 1999*). OCTN2 ist aber auch in der Lage, organische Kationen wie z. B. TEA Na⁺-unabhängig zu transportieren (*Seth et al., 1999*). OCTN2 wurde auch aus der Ratte (*Sekine et al., 1998a; Schömig et al., 1998*) und der Maus (*Lu et al., 1998*) isoliert. OCTN1 und OCTN2 besitzen eine ≈30%ige Identität mit den OCTs und den unten beschriebenen organischen Anionentransportern.

Bei der dritten Gruppe handelt es sich um die organischen Anionentransporter, die für den Transport anionischer organischer Substanzen aus dem Blut zur Ausscheidung aus dem Körper verantwortlich sind. Der erste organische Anionentransporter wurde aus der Ratte (rOAT1) durch Expressionsklonierung isoliert (*Sweet et al., 1997; Sekine et al., 1997*). rOAT1 und rOCT1 besitzen eine 34%ige Identität. rOAT1 wurde ursprünglich als ein 'novel kidney transporter' (NKT) aus der Maus bezeichnet, war aber nicht funktionell charakterisiert worden. NKT wurde wegen der strukturellen Verwandtschaft zu rOCT1 als ein putativer Kationentransporter beschrieben (*Lopez-Nieto et al., 1997*). Letztendlich konnte aber gezeigt werden daß es sich bei NKT um den organischen Anionentransporter aus der Maus (mOAT1)

handelte. Aufgrund der Sequenzhomologien wurde die Einordnung der OATs in die OCT-Familie beibehalten. Bei den OATs handelt es sich ebenfalls um eine sehr stark wachsende Transportergruppe, in der mittlerweile vier Subtypen aus den verschiedenen Spezies beschrieben wurden.

Neben den beschriebenen Vertretern der OCT-Familie gibt es zahlreiche Sequenzen, die aufgrund ihrer Homologien ebenfalls dieser Familie zugeordnet werden können. Viele Einträge, die in den genomischen Datenbanken zu finden sind, die eine Ähnlichkeit mit OCT besitzen, sind entweder nicht vollständig kloniert oder nicht funktionell charakterisiert. Auf die nicht funktionell charakterisierten Gene aus *Abb.4.A.* möchte ich in diesem Rahmen nicht eingehen. Im Anhang dieser Arbeit findet sich eine Tabelle der in *Abb.4.A.* gezeigten Gene mit Datenbankeinträgen und Quellenangaben (*7.E.*). Es sollte hier aber erwähnt werden, daß OCT-Transporter in niedrig entwickelten Spezies wie *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* zu finden sind und, daß es auch Vertreter dieser Genfamilie in der Pflanzenwelt wie z. B. in *Arabidopsis thaliana* zu geben scheint. Das Vorkommen dieser Genfamilie mit der Konservierung ihrer Sequenzmotive in den unterschiedlich entwickelten Organismen unterstreicht ihre Wichtigkeit in der Evolution und fordert die weitere Aufklärung der physiologischen Bedeutung und die genaue Beschreibung der funktionellen Charakteristika.

4.B. Klonierung und funktionelle Charakterisierung von rOCT2

rOCT2 wurde 1995 im Rahmen dieser Dissertation das erste Mal kloniert und beschrieben (*Gorboulev et al., 1995; Genbank-Eintrag (Accessionnumber) X98334.* Durch Hydrophathie-Analyse wurden für die Topologie von rOCT2 wie auch für alle anderen klonierten Mitglieder der OCT-Familie zwölf Transmembrandomänen vorhergesagt. Auch andere Struktur motive (konservierte Proteinkinase A- und Proteinkinase C-Phosphorylierungs-stellen) und Sequenzvergleiche zeigen die nahe Verwandtschaft von rOCT1 zu rOCT2 (*3.A.*). Die beiden Proteine zeigen eine über 70%ige Identität untereinander. Der größte strukturelle Unterschied zwischen rOCT2 und rOCT1 besteht darin, daß rOCT2 ca. 40 Aminosäuren länger ist. Die erste erfolgreiche Expression des Transports von organischen Kationen durch rOCT2 wurde 1996 von einer japanischen Arbeitsgruppe publiziert (*Okuda et al., 1996*). Weitere funktionelle

Daten wurden in den nächsten Jahren von einigen anderen Arbeitsgruppen berichtet (*Urakami et al., 1998; Gründemann et al., 1998; Sweet and Pritchard, 1999; Pan et al., 1999*). In diesen Arbeiten wurden teilweise widersprüchliche Ergebnisse gezeigt. Außerdem wurde keine systematische Charakterisierung der Spezifität von rOCT2 für transportierte Kationen und nicht transportierte Hemmstoffe durchgeführt. Die vorliegende Arbeit füllt diese Lücke und widerlegt einige früher berichtete Daten. Durch die während der Durchführung der vorliegenden Arbeit in der Literatur auftauchenden Daten mußte der Schwerpunkt der Charakterisierung von rOCT2 verändert werden. Aus diesem Grund wurde z. B. die pH-Abhängigkeit des durch rOCT2-vermittelten Transports weniger umfassend untersucht als ursprünglich geplant.

4.B.1. Potentialabhängigkeit

Bei rOCT2 handelt es sich um einen potentialabhängigen Transporter, der elektrische Ladung über die Plasmamembran transportiert. Dies wurde anhand elektrophysiologischer Messungen gezeigt (*Arndt et al., 1997; Sweet und Pritchard, 1999*). In Messungen mit radioaktiv markierten Substraten konnte gezeigt werden, daß die Aufnahme von TEA oder MPP in rOCT2-exprimierenden Oozyten abnahm, wenn Na^+ -Ionen durch K^+ -Ionen ersetzt wurden (*3.E.2.; 3.H.2.; Okuda et al., 1999*). Entsprechend nahm der MPP-Efflux bei depolarisierten Oozyten zu, wodurch gezeigt wurde, daß auch der durch rOCT2-vermittelte Efflux potentialabhängig ist (*3.H.3.*). Für den TEA-Transport in rOCT1-exprimierenden Oozyten wurden ähnliche Beobachtungen gemacht (*Gründemann et al., 1994a; Busch et al., 1996b; Nagel et al., 1997*). Der durch Cholin induzierte Einwärtsstrom an rOCT2-exprimierenden Oozyten zeigte einen ansteigenden apparenten K_m -Wert, wenn die angelegte Spannung erhöht wurde (*3.E.1.*). Hierbei erhöhten sich auch die V_{max} -Werte. Die Potentialeffekte auf den K_m - und V_{max} -Wert stellen interessante Phänomene mit möglicher physiologischer Bedeutung dar. Eine Interpretation dieser Effekte im Rahmen eines Transportermodells ist beim derzeitigen Kenntnisstand nicht möglich.

4.B.2 pH-Abhängigkeit

Die Untersuchung der pH-Abhängigkeit des Transports durch rOCT2 stand zu Beginn dieser Arbeit mit im Zentrum der Untersuchungen, da in der Literatur die spekulative Hypothese auftauchte, daß es sich bei den OCT2-Transportern, inklusive rOCT2, um H⁺/Kationen-Austauscher handle, die für den Export von Kationen aus Zellen verantwortlich sind (*Gründemann et al., 1997, 1998a, 1999*). Durch unsere Daten und Daten von *Sweet und Pritchard (1999)* konnte diese Hypothese mittlerweile eindeutig widerlegt werden. Da die Versuche zur pH-Abhängigkeit zusammen mit Dr. Christopher Volk aus unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurden und wegen der zwischenzeitlich durch *Sweet und Pritchard (1999)* publizierten Daten abgebrochen wurden, sind diese Ergebnisse im Anhang dargestellt (7.A.). Wegen ihrer Bedeutung für das Verständnis der physiologischen Funktion von rOCT2 sollen sie aber diskutiert werden. *Sweet und Pritchard (1999)* haben durch Aufnahmemessungen mit radioaktiven Kationen an Oozyten und MDCK-Zellen, in denen rOCT2 exprimiert wurde, gezeigt, daß die durch rOCT2-vermittelte Kationenaufnahme bzw. der Kationenefflux nicht durch einen Protonengradienten in die Gegenrichtung stimuliert wurde. Durch elektrische Messungen, die im Anhang dargestellt sind (7.A.) konnte ich zusammen mit Dr. Volk zeigen, daß die elektrogene Cholin-Aufnahme durch rOCT1 und rOCT2 durch den äußeren pH-Wert unterschiedlich beeinflusst wird, der Protonengradient über die Zellmembran aber keine treibende Kraft für den durch rOCT1- und rOCT2-vermittelten Kationentransport darstellt.

4.C. Vergleichende funktionelle Charakterisierung von rOCT1 und rOCT2

In den folgenden Abschnitten wird die systematische funktionelle Charakterisierung von rOCT2 im Vergleich zu rOCT1 gezeigt. Hierbei gehe ich zunächst auf die Substrate des rOCT1- und rOCT2-vermittelten Transports ein und anschließend werden die Inhibitoren dieser Transporter gezeigt, um das pharmakologische Profil von rOCT1 und rOCT2 zu präsentieren.

4.C.1. Polyspezifität

Ein Modells substrat, welches seit langem für die Charakterisierung des organischen Kationentransports in der Nierentubuluszelle verwendet wird, ist Tetraethylammonium (TEA). Nach der Klonierung von rOCT2 wurde die Funktionalität des Proteins zuerst mit dieser Substanz getestet. Der K_m -Wert des TEA-Transports durch rOCT2 beträgt 91 μM und wurde in etwa an mit rOCT2-transfizierten NIH3T3-Zellen mit einen Wert von 141 μM (*Pan et al., 1999*), und an MDCK-rOCT2 45 μM bestätigt (*Urakami et al., 1998*). Für rOCT1 wurden K_m -Werte für TEA in verschiedenen Expressionssystemen mit unterschiedlichen Meßmethoden angegeben, die von 38-125 μM reichten (*Gründemann et al., 1994a; Busch et al., 1996b, Koepsell, 1998; Urakami et al., 1998; Gorboulev et al., 1999*). Bei unserer funktionellen Charakterisierung von rOCT2 wurde auch der Transport verschiedener anderer Substanzen durch rOCT2 gezeigt. Im Verlauf dieser Arbeit wurden weitere Substrate für rOCT2 beschrieben und im Vergleich zu rOCT1 näher charakterisiert. Dabei handelte es sich um MPP, NMN, Guanidin, Debrisoquin und die Neurotransmitter Dopamin, Histamin, Cholin und Serotonin. Auch andere Mitglieder der OCT-Familie, rOCT1 und EMT (rOCT3) akzeptieren Catecholamine und 5-Hydroxytryptamin als Substrate und werden deswegen als nicht-neuronale Monoamintransporter bezeichnet (*Gründemann et al., 1994a; Nagel et al., 1997; Breidert et al., 1996; Gründemann et al., 1998a; Kekuda et al., 1998*).

Die in 3.D.2. präsentierten Messungen des Transports von Cholin durch rOCT2 widerlegen die Aussage, daß rOCT2 Cholin nicht transportiert (*Gründemann et al., 1999*). rOCT2 transportiert Cholin mit einer Affinität von 600 μM . Gründemann und Mitarbeiter konnten keinen Cholintransport an mit rOCT2-transfizierten HEK-Zellen zeigen. Die Aufnahme von Cholin wurde von dieser Arbeitsgruppe an HEK293-Zellen nur bei einer sehr niedrigen Cholin-Konzentration von 0,1 μM Cholin und ohne spezifischen Hemmstoff bei transfizierten und nicht transfizierten Zellen durchgeführt. In unserer Gruppe gelang es mittlerweile, den hemmbaren Transport von 500 μM Cholin durch rOCT2 auch an HEK293-Zellen zu zeigen (*Arndt et al., 2000*). Auch rOCT1 transportiert Cholin mit einem K_m -Wert von 370-620 μM und unterscheidet sich in seiner Affinität nicht von rOCT2 (*Gründemann et al., 1994a; Busch et al., 1996b, Koepsell, 1998; Urakami et al., 1998; Gorboulev et al., 1999*) und somit kann die Aufnahme von Cholin nicht als Differenzierungsmerkmal zwischen rOCT1 und rOCT2 dienen. In der Regel unterliegen organische Kationen einer Netto-Sekretion über den proximalen Tubulus,

wobei auch eine Rückresorption vor allem von endogenen Kationen, wie z. B. Cholin möglich ist. Cholin als Vorläufer des Zellmembranbausteins Phosphatidylcholin und des Neurotransmitters Acetylcholin kann, um die Plasmakonzentration dieses wichtigen Bausteins aufrecht zu erhalten, reabsorbiert werden (Acara *et al.*, 1973; 1975 und 1979; Besseghir *et al.*, 1981). Bei Plasmakonzentrationen, die höher als 100 μM liegen, wird Cholin ausgeschieden. Bei Konzentrationen unterhalb dieses Wertes erfolgt die Reabsorption. Die normale Plasmakonzentration liegt bei 25 μM (Besseghir *et al.*, 1981). Es konnte bereits gezeigt werden, daß der erste Schritt der Sekretion über die basolaterale Membran entlang des elektrochemischen Gradienten durch organischen Kationentransport erfolgt. Dieser Transport kann elektrogen oder als neutraler Kationen-Austausch erfolgen (Busch *et al.*, 1996b; Dantzler *et al.*, 1991; Groves *et al.*, 1994; Gründemann *et al.*, 1994a; Montrose-Rafizadeh *et al.*, 1989; Pritchard und Miller, 1993; Sokol und McKinney, 1990). rOCT2 hat für die zelluläre Aufnahme von Cholin über die basolaterale Membran in Bezug auf Potentialabhängigkeit und Affinität die beschriebenen Eigenschaften. Für den zellulären Efflux von Cholin an der basolateralen Membran wurde aufgrund physiologischer Messungen ursprünglich ein Kationenaustausch postuliert (Dantzler und Wright, 1997; Wright *et al.*, 1992). Spätere Messungen am S2-Segment des proximalen Tubulus des Kaninchen zeigten jedoch, daß durch TEA keine *trans*-Stimulation des Cholin-Effluxes, sondern eine Hemmung des Cholin-Ausflusses, erfolgte (Dantzler *et al.*, 1998). Da in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, daß der durch rOCT2-vermittelte Efflux von MPP durch Cholin *trans*-stimuliert wird, wenn die Zellen weitgehend depolarisiert sind (3.H.3.), und rOCT2 in der basolateralen Membran der proximalen Nierentubuli lokalisiert ist, erscheint es möglich, daß rOCT2 für den Cholinefflux in der basolateralen Membran verantwortlich ist.

Ein weiteres Substrat, das von rOCT2 und anderen Mitgliedern der OCT-Familie transportiert wurde, ist 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP). MPP ist ein Neurotoxin, welches einen Metaboliten des Parkinson-Toxins MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin) darstellt. MPP ist mit einem K_m -Wert von 17 μM die bis dato von den OCTs mit höchster Affinität transportierte Substanz. Bei einem Vergleich der von rOCT1 und rOCT2 ermittelten K_m -Werte erkennt man, daß sich die Affinitäten dieser Transporter gegenüber den meisten getesteten Substrate ähneln. Die einzige Ausnahme bildet Guanidin. In Abschnitt 3.D.3. konnte gezeigt werden, daß rOCT2 dieses Substrat mit einer ca. 15fachen höheren Affinität als rOCT1

(130 μM (rOCT2) versus 1,9 mM (rOCT1)) transportiert. Gründemann und Mitarbeiter haben beschrieben, daß rOCT1 Guanidin und Histamin in MDCK-Zellen nur sehr schwach transportiert, währenddessen für rOCT2 K_m -Werte von 730 μM (Guanidin) und 540 μM (Histamin) bestimmt wurden (*Gründemann et al., 1999*). Die in der vorliegenden Arbeit für Guanidin bestimmten V_{max} -Werte zeigen jedoch, daß sowohl rOCT1 als auch rOCT2 Guanidin transportieren. rOCT1 zeigte eine zweifach höhere maximale Transportrate für Guanidin als rOCT2. Ebenfalls wurde der Transport von Histamin durch rOCT1 und rOCT2 gezeigt (*Arndt et al., 2000*).

Nach der Beschreibung einiger der in der vorliegenden Arbeit charakterisierten Substrate sollte der Vollständigkeit halber hier noch erwähnt werden, daß rOCT2 eventuell auch eine Rolle bei der Sekretion des Cytostatikums Cisplatin spielt (*Pan et al., 1999*). Die Affinität von Cisplatin gegenüber rOCT2 ist relativ niedrig ($K_i = 925 \mu\text{M}$) und Cisplatin wird als Substrat für rOCT2 diskutiert. Andere Substrate des rOCT2-vermittelten TEA-Transports sind Nikotin, Cimetidin und Levofloxacin (*Okuda et al., 1999, Urakami et al., 1998*).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß rOCT2 kleine hydrophile positiv geladene organische Substrate transportiert, während bisher kein spezifischer Transport von großen hydrophoben Kationen über die Zellmembran gezeigt werden konnte.

4.C.2. Inhibitoren

Die organischen Kationentransporter interagieren mit vielen verschiedenen Substanzen und werden deswegen als 'polyspezifisch' (*Gorboulev et al., 1997; Okuda et al., 1998*) bzw. als 'multispezifisch' bezeichnet (*Urakami et al., 1998*). Es hat sich während unserer Charakterisierung von rOCT2 herausgestellt, daß ein Inhibitor eines von rOCT2-vermittelten Transports nicht unbedingt ein transportiertes Substrat darstellt. Chinin, Chinidin und *p*-Aminohippursäure sind hierfür Beispiele (3.F.1.; 3.F.2.). Neben den Messungen mit radioaktiven Substanzen, die keinen Transport von Chinin und Chinidin durch rOCT2 zeigten, wurde auch bei elektrophysiologischen Messungen an auf -50 mV geklemmten Oozyten durch Gabe von 100 μM Chinin oder Chinidin kein spezifischer durch rOCT2-induzierter Strom gemessen. Dies wurde für Chinin und Chinidin auch schon bei rOCT1 festgestellt (*Nagel et al., 1997*). Durch parallele Messungen zur Bestimmung der IC_{50} -Werte der Stereoisomere Chinin

und Chinidin konnten wir feststellen, daß der durch rOCT2-vermittelte TEA-Transport nicht stereoselektiv gehemmt wird. Im Gegensatz dazu wurde eine signifikante Enantioselektivität bei rOCT1 gefunden, wobei Chinin der um einen Faktor 3 potentere Hemmstoff ist (3.F.1.). Chinin wurde schon früher als das potentere Diastereomer bei der rOCT1-Hemmung beschrieben (Somogyi et al., 1996). Darüber hinaus fand man bei der Amantadin- und NMN-Aufnahme an kortikalen Gewebeschnitten der Rattenniere und an isolierten renalen proximalen Tubuli durch Mikroperfusion eine 2-3fach niedrigere Affinität von Chinidin bei der Hemmung des contraluminalen Transports im Vergleich zu Chinin (Wong et al., 1990; Somogyi et al., 1996). Diese Stereoselektivität wurde auch schon an anderen Transportsystemen in verschiedenen Spezies gezeigt. So wurden zum Beispiel bei Untersuchungen an isolierten Hepatozyten der Ratte bei der Aufnahme der Typ 2-Substrate Digoxin und Ouabain stereoselektive inhibitotrische Effekte durch Chinin und Chinidin nachgewiesen, wobei sich Chinin als der potentere Inhibitor erwies (Hedman und Meijer, 1998). An renalen Bürstensaummembranvesikeln aus Kaninchen und Ratte (Ott et al., 1991; Gross und Somogyi, 1994) und an isolierten Rattentubuli *in situ* (Somogyi et al., 1996) zeigte die Interaktion von Chinin und Chinidin mit dem H⁺/organischen Kationen-Austauscher keine unterschiedlichen IC₅₀-Werte bei der Hemmung der NMN-Aufnahme.

In Transportmessungen von TEA an rOCT1- und rOCT2-exprimierenden Oozyten in Gegenwart von Chinin und anderen nicht transportierten, stark hydrophoben Hemmstoffen wie Decynium22 und Tetrapentylammonium (TPeA) konnte gezeigt werden, daß diese hydrophoben Hemmstoffe durch TEA nicht von ihrer Bindestelle verdrängt werden konnten, so wie das bei NMN gezeigt werden konnte. In der vorliegenden Arbeit werden erstmalig Daten präsentiert, die einen nicht-kompetitiven Hemmtyp für hochaffine Hemmstoffe belegen (3.G.). Daß Cyanin863 ebenfalls ein nicht-kompetitiver Hemmstoff des durch rOCT1-vermittelten TEA-Transports ist, wurde von Prof. Koepsell in internationalen Vorträgen 1997 und 1998 und in einem Übersichtsartikel (Koepsell et al., 1999) berichtet und von Pan et al., (1999) ohne Präsentation von Daten erwähnt. Eine nicht-kompetitive Hemmung kann durch das Vorhandensein einer allosterischen Bindungsstelle zustande kommen. Allerdings gibt es eine Reihe anderer Gründe, durch die ein nicht-kompetitiver Hemmtyp erzeugt werden kann, obwohl der Hemmstoff dicht an der Substratbindungsstelle bindet. Die wichtigsten Gründe sind: 1) eine sehr hochaffine Bindung der Hemmstoffe mit einer extrem langsamen Dissoziationskonstante, die keine Verdrängung

durch wasserlösliche konkurrierende niederaffine Substrate erlaubt; 2) eine durch den Hemmstoff induzierte Inaktivierung des Proteins; 3) ein hydrophober Hemmstoff hemmt das Transportprotein an der nach innen gerichteten Konformation der Substratbindestelle, nachdem er passiv durch die Membran diffundiert ist. Daß diese Möglichkeiten bei dem von uns beobachteten nicht-kompetitiven Hemmtyp für hochaffine Hemmstoffe in Erwägung gezogen werden müssen, ergibt sich aus Befunden, die darauf hindeuten, daß der nicht-kompetitive Hemmstoff mit der Substratbindungsstelle von rOCT2 interagiert. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, daß eine Mutation in der wahrscheinlichen Substratbindestelle von rOCT1 dazu führte, daß sich der IC_{50} -Wert von Tetrapentylammonium drastisch erniedrigte (*Gorboulev et al. 1999*). Da die gleiche Punktmutation die K_m -Werte für Substrate deutlich erniedrigt hatte und es sehr unwahrscheinlich ist, daß eine Punktmutation die Substratbindungsstelle und eine allosterische Bindungsstelle in gleicher Weise beeinflusst, deuten diese Daten darauf hin, daß TPeA mit der Substratbindungsstelle interagiert. Tetrapentylammonium wurde in 3.G. als nicht-kompetitiver Inhibitor des TEA-Transports durch rOCT1 beschrieben. Darüber hinaus wurde bei elektrischen Messungen bei 'inside-out macropatches' an *Xenopus* Oozyten festgestellt, daß der nicht-kompetitive Inhibitor Chinin den elektrogenen Kationentransport von der intrazellulären Seite hemmt (*Budimann, unveröffentlichte Ergebnisse*). Da Chinin nicht von rOCT2 transportiert wird und eine allosterische Bindestelle des Transporters entweder auf der intrazellulären oder der extrazellulären Seite lokalisiert sein sollte, lassen diese Messungen vermuten, daß auch Chinin mit der Substratbindestelle interagiert, die sowohl zum intrazellulären als auch zum extrazellulären Kompartiment hin exponiert vorliegen kann.

Chinidin wurde ebenfalls als nicht-kompetitiver Hemmstoff bei der zellulären Aufnahme von Ouabain an isolierten Ratten-Hepatozyten beschrieben (*Hedman und Meijer, 1998*), wobei noch unklar ist, ob Ouabain außer für das Transportsystem für hydrophobe Kationen (Typ 2-System) nicht auch ein Substrat für das Transportsystem für hydrophile Kationen (Typ 1-System) darstellt. Der Histaminrezeptor-Agonist Cimetidin wurde ebenfalls als nicht-kompetitiver Hemmstoff für rOCT2-vermittelten TEA-Transport erwähnt (*Pan et al., 1999*). Auffällig hierbei war, daß es sich bei diesem nicht-kompetitiv wirkenden Hemmstoff um die Substanz mit dem niedrigsten IC_{50} -Wert (198 μ M) in dieser Inhibitor-Klasse handelte bzw., daß dieser IC_{50} -Wert im Vergleich zu den bereits diskutierten nicht-kompetitiven Hemmstoffen relativ hoch war.

Bei dem Vergleich der IC_{50} -Werte einiger Tetraalkylammoniumverbindungen wurde festgestellt, daß die Affinität mit zunehmender Hydrophobizität anstieg. So handelte es sich bei Tetrapentylammonium um den affinsten Hemmstoff aus dieser Gruppe und bei Tetramethylammonium um den niederaffinsten. Die Korrelation zwischen Alkylkettenlänge (von Methyl zu Pentyl) und steigender Affinität war schon früher für das renale organische Kationentransportsystem an der basolateralen Membran im Kaninchen beschrieben worden (Groves *et al.*, 1994). Im Gegensatz dazu wurde an isolierten proximalen Nierentubuli der Ratte gezeigt, daß die Abnahme der Alkylkettenlänge von einem Ethylrest zu einem Methylrest zu keiner Verminderung der Affinität im basolateralen Transportsystem geführt hatte (Ullrich *et al.*, 1991a). Im Fall von rOCT1 und rOCT2 konnte bei unseren vergleichenden Messungen gezeigt werden, daß eine Erniedrigung der Affinität jedoch bis zur Verkürzung auf einen Methylrest zu beobachten war (3.F.1.; Gorboulev *et al.*, 1999). Diese Einflüsse der strukturellen Eigenschaften der Inhibitoren sind natürlich an den isolierten Transportern im Oozyten-Expressionssystem leichter nachzuvollziehen als an isolierten Nierentubuli, da bei Messungen an einem gesamten physiologischen System wie dem Nierentubulus auch kinetische Parameter von Transportern einfließen, die eventuell ähnliche Affinitäten wie die zu charakterisierenden Transportproteine besitzen. Die Regelmäßigkeit, daß mit zunehmender Hydrophobizität der Tetraalkylammoniumverbindungen auch die Affinität des Hemmstoffs anstieg, wurde für OCT1 an Maus, Kaninchen, Mensch und Ratte mittlerweile bestätigt (Gorboulev *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1999).

Um unterschiedliche Affinitäten von rOCT1 und rOCT2 gegenüber verschiedenen Hemmstoffen herauszuarbeiten, wurden systematisch entsprechende IC_{50} -Werte miteinander verglichen. Mit dem Nebennierenrindenhormon Corticosteron konnten wir im direkten Vergleich zwischen rOCT1 und rOCT2 einen Hemmstoff ermitteln, der bis dato der einzige bekannte Inhibitor ist, für den rOCT2 mit 5 μM eine weitaus größere Affinität als rOCT1 mit 150 μM besitzt (3.E.3.). Der IC_{50} - bzw. K_i -Wert war für rOCT1 bislang am Oozytensystem noch nicht genau bestimmt worden: ($K_i > 10 \mu\text{M}$; Gründemann *et al.*, 1994a). Messungen mit rOCT1-transfizierten 293-Zellen ergaben einen IC_{50} -Wert von 72 μM (Martel *et al.*, 1996), der um die Hälfte niedriger als der hier ermittelte Wert von 150 μM lag. Hierbei muß man beachten, daß von Martel die Hemmung des MPP-Transports in Zellkultur gemessen wurde und nicht, wie in dieser Arbeit die Hemmung des TEA-Transports an *Xenopus*-Oozyten. Diese Tatsache, daß rOCT2 für

Systemen (Oozyten und HEK293-Zellen) gemessen wurden. Da wir die IC_{50} -Werte für O-Methylisoprenalin, wie oben gezeigt, systematisch an einem Expressionssystem ermittelt haben, können wir nun die sichere Aussage machen, daß man mit O-Methylisoprenalin rOCT1 und rOCT2 *in vivo* unterscheiden kann. Es ist jedoch leider noch nicht bekannt, ob rOCT2 mit O-Methylisoprenalin von dem extraneuronalen Monoamintransporter rOCT3 unterschieden werden kann, denn bis jetzt wurde nur für den menschlichen extraneuronalen Monoamintransporter hOCT3 für O-Methylisoprenalin ein IC_{50} -Wert (2 μ M) bestimmt (*Gründemann et al., 1998*). Messungen mit OCT3 an der Ratte müssen klären, ob die IC_{50} -Werte für rOCT2 und rOCT3 eine separate Hemmung dieser Transporter durch O-Methylisoprenalin zulassen.

Eine weitere Substanzklasse, die den TEA-Transports durch rOCT1 und rOCT2 hemmt, sind organische Anionen. Probenecid wurde bisher als ein spezifischer Hemmstoff für organische Anionentransportsysteme (PAH-Transporter) beschrieben (*Farah et al., 1959; Holohan et al., 1975; Rennick, 1982*). Im Gegensatz dazu gab es Berichte, in denen organische Anionen bei Messungen des Kationentransports an intakten proximalen Tubuli der Niere, an isolierten Plasmamembranen und an Gewebeschnitten als Hemmstoffe beschrieben wurden (*McKinney et al., 1981; Cacini et al., 1982; Hysu et al., 1988; Inotsume et al., 1990; Boom et al., 1992; Ott et al., 1990; Ullrich et al., 1993; Dantzler et al., 1998*). In der vorliegenden Arbeit konnte die konzentrationsabhängige Inhibition des durch rOCT1- und rOCT2-vermittelten TEA-Transports durch die organischen Anionen Probenecid, α -Ketoglutarat und *p*-Aminohippurat gezeigt werden. α -Ketoglutarat zeigte von den untersuchten Anionen die höchste Affinität.

Das Phänomen, daß bestimmte Substanzen sowohl mit dem kationischen als auch mit dem anionischen contraluminalen Transportsystem im proximalen Tubulus der Ratte interagieren können, veranlaßten *Ullrich et al. (1993)* zur Annahme, daß es Bisubstrate für die Anionen- und Kationentransporter gäbe. Aufgrund der Homologien dieser Transporter und ihrer prinzipiellen Polyspezifität erscheint diese Annahme plausibel. Als Bisubstrate wurden neben den beschriebenen organischen Anionen auch die bereits diskutierten Inhibitoren Chinin, Chinidin und Corticosteron bezeichnet. Da es sich bei diesen Verbindungen jedoch um Hemmstoffe und keine transportierten Substrate handelt, ist die Existenz echter Bisubstrate bisher noch nicht bewiesen. Die in dieser Arbeit gezeigte Interaktion von Substraten der Anionentransporter mit den Kationentransportern rOCT1 und rOCT2 legt allerdings die Annahme einer Ähnlichkeit der Substratbindungsstellen nahe.

Mit der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten funktionellen Charakterisierung von rOCT1 und rOCT2 wurde ein erster Schritt zum Verständnis der physiologischen Rolle dieser beiden Transporter gemacht. Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß es Speziesunterschiede betreffend der funktionellen Eigenschaften und Expression gibt, ist es wichtig, die Faktoren zu verstehen, die die physiologische Funktion der Transporter beeinflussen. Neben der Interaktion von verschiedenen Substanzen mit rOCT1 und rOCT2 unter definierten experimentellen Bedingungen sollte nun im nächsten Schritt eine detailliertere Untersuchung an intakten Nierentubuli erfolgen, wo diese Transporter im Zusammenspiel mit den luminalen Kationentransportern arbeiten und wo die Konzentrationen von intrazellulären Kationen anders sind. Nachdem Inhibitoren mit unterschiedlichen Affinitäten beschrieben worden sind, könnten nun beide Transporter selektiv in physiologischen Messungen wie *in vivo* Mikroperfusion von seziierten Nephronsegmenten untersucht werden, um deren Beteiligung am Transport verschiedenster Substanzen unter physiologischen Bedingungen einzuschätzen.

4.D. Ausblick

In den letzten fünf Jahren hat sich das Feld um den organischen Kationentransport von der zellulären Ebene und Gewebestudien auf eine molekulare Ebene der Forschung erweitert. Da man nun einige Gene und Proteine kennt, die für den organischen Kationentransport verantwortlich sind, kann man dieses Wissen zur Erforschung der physiologischen und pathologischen Bedeutung und zur Entwicklung von Medikamenten einsetzen. Durch die Identifizierung der OCT-Familie und die Klonierung und funktionelle Charakterisierung weiterer Mitglieder dieser Familie ist ein neues Zeitalter für die Aufklärung der Arzneimittelausscheidung und Arzneimittelentwicklung angebrochen. Die bereits vorhandenen Sequenzinformationen ermöglichen die Identifizierung weiterer Arzneimitteltransporter. Dabei kann man sich die Methoden der Bioinformatik zu Nutze machen. Frühe Ergebnisse aus Gewebe und Vesikelstudien haben gezeigt, daß viele verschiedene organische Kationentransporter in verschiedenen Geweben existieren. Zur Zeit sind drei organische Kationentransporter beschrieben, die in die Gruppe der 'elektrogenen' organischen Kationentransporter der OCT-Familie eingeordnet werden. Die Einordnung in diese Gruppe beruht auf der Sequenzhomologie

der Transporter untereinander und auf ihrer Funktion als elektrogene Transporter. Funktionelle und mechanistische Daten über den Transport von organischen Kationen sagen vorher, daß es noch einige organische Kationentransporter gibt, die kloniert werden können (*McKinney, 1982; McKinney und Hosford, 1993; Miyamoto et al., 1989; Pritchard und Miller, 1993 und 1996; Zhang et al., 1998*). Die traditionellen Klonierungsmethoden sind ein arbeits- und zeitintensiver Weg zur Isolierung dieser Transporter. Ein anderer Weg dahin ist die Anwendung der Bioinformatik. Da mehr und mehr Sequenzinformation aus den einzelnen Spezies bekannt wird, kann die Bioinformatik als Methode am Computer, die eine Möglichkeit darstellt, Gen- und Protein-Datenbanken zu erstellen und zu durchsuchen, sehr viel leisten. Die Bioinformatik hat das Potential, Klonierungsstrategien in verschiedenster Weise anzuwenden. Es gibt mindestens drei Hauptansätze, die man wählen kann, um beispielsweise neue putative Mitglieder der OCT-Familie zu finden. Erstens kann man mit einer bekannten Sequenz die Datenbank nach neuen verwandten Sequenzen absuchen. Hierbei muß man jedoch entscheiden, welche Datenbank und welcher Suchalgorhythmus für den einzelnen Fall am besten sind. Zweitens kann man durch multiple Sequenzvergleiche konservierte Sequenzmotive herausfinden, die charakteristisch für eine bestimmte Genfamilie sind und durch die kombinierte Suche mit diesen Motiven neue interessante Sequenzen finden. Drittens kann man Sequenzen nach Spleißstellen absuchen und so die Isolierung von Spleißvarianten bestimmter Proteine erleichtern. Der populärste dieser Ansätze ist das Durchsuchen von Datenbanken. Es gibt einige Datenbanken, die weltweit der Öffentlichkeit zugänglich sind. 'Entrez' ist eine Datenbank für Sequenzinformation und biologische Information, die von dem 'National Center of Biotechnology Information' bereitgestellt wird und die unter der Internet-Adresse '<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>' angewählt werden kann. Die Sequenzinformation in Entrez wird aus einigen Quellen wie GenBank, SWISS-PROT, PIR-International, Brookhaven Protein Data Bank, der Protein Research Foundation Datenbank und der Genomic Sequence Database zusammengestellt (*Dresser et al., 2000*). Es gibt noch zwei zusätzliche Datenbanken, die sehr oft genutzt werden: die EST- (expressed sequence tag) und die STS- (sequenced tagged sites) Datenbank, die auch über 'Entrez' zugänglich sind. Diese beiden Datenbanken enthalten cDNA-Sequenzfragmente aus vielen Geweben verschiedener Spezies, einschließlich Mensch. Der Suchalgorhythmus, der am häufigsten gewählt wird, ist BLAST (basic local alignment search tool). Hierbei sucht man mit einer ausgewählten Sequenz

bestimmte Datenbanken ab, wobei es sich sowohl um Nukleotid- als auch um Protein-Datenbanken handeln kann.

Die Bioinformatik bietet einige Vorteile gegenüber den klassischen Klonierungsmethoden. Sie ist schnell und effizient. Ein Nachteil ist, daß die Datenbanken oft redundante Sequenzen enthalten, welche die Suche schwierig machen. Manchmal ist auch die Sequenzinformation schlecht und unzuverlässig, so daß der Wissenschaftler unter Zeitaufwand gezwungen ist, den entsprechenden Klon zu isolieren und die Sequenz zu überprüfen.

Wenn die wichtigsten Arzneimitteltransporter funktionell charakterisiert und in den Geweben lokalisiert sind, ihre Regulation in verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Zuständen charakterisiert sind und das Substrat/Inhibitor-Profil für jedes dieser Proteine erstellt worden ist, wird man mit diesen Informationen die organspezifische Ausscheidung ('clearance') oder Verteilung von Medikamenten oder die Reabsorption von endogenen Substanzen in den einzelnen Geweben vorhersagen können. Anhand von Computermodellen wird es dem Wissenschaftler erlaubt sein, Vorhersagen über den Verbleib und die Wirkungsweise von Substanzen im kranken und gesunden Lebewesen machen zu können.

Es werden noch einige Jahre bis zur Klonierung und Erforschung der noch nicht isolierten Transporter gehen, aber mit der genauen Charakterisierung von rOCT1 und rOCT2 und den anderen in der Literatur beschriebenen Mitgliedern der OCT-Familie ist der Anfang für die Aufklärung dieses Feldes gemacht worden.

5. Zusammenfassung

Der organische Kationentransport im proximalen Tubulus der Niere spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase der Körperflüssigkeiten und der Ausschleusung von toxischen organischen Kationen (*Inui and Okuda, 1998; Pritchard and Miller, 1993*). Der Transport von organischen Kationen wird an der Bürstensaummembran durch den H⁺/organische Kationen-Austauscher vermittelt (*Holohan and Ross, 1981; Takano et al., 1984; Hsyu and Giacomini, 1987; Dantzler et al., 1989; David et al., 1995*), während bei dem Transport von organischen Kationen an der basolateralen Membran das nach innen gerichtete negative Membranpotential eine treibende Kraft darstellt (*Takano et al., 1984; Sokol and McKinney, 1990; Montrose-Rafizadeh et al., 1989*). Durch Expressionsklonierung wurde der erste organische Kationentransporter, rOCT1, aus der Ratte isoliert. rOCT1 wird in Leber und Niere exprimiert (*Gründemann et al., 1994a*). 1995 gelang es unserer Arbeitsgruppe, durch Homologie-Klonierung einen anderen organischen Kationentransporter aus der Rattenniere zu isolieren (*Gorboulev et al., 1995; Busch et al., 1996b*). rOCT2 ist ausschließlich in der Niere in Medulla und Cortex lokalisiert (*Okuda et al., 1996*). rOCT2 besteht aus 593 Aminosäuren und besitzt 12 putative Transmembrandomänen. Zum funktionellen Vergleich zwischen rOCT1 und rOCT2 wurde das Oozyten-expressionssystem verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde ein pharmakologisches Profil von rOCT2 erstellt. Das Substratspektrum von rOCT2 ist dem von rOCT1 sehr ähnlich. Die Affinitäten von rOCT2 gegenüber verschiedenen Substanzen wurden direkt mit denen von rOCT1 verglichen. Einerseits fanden wir bei einigen Substraten Unterschiede in den K_m - und V_{max} -Werten, aber andererseits auch viele Ähnlichkeiten zwischen beiden Transportern. Anionen (z. B. p-Aminohippurat) wurden als neue Gruppe von Inhibitoren für den durch rOCT1- und rOCT2-vermittelten Transport identifiziert. Die Potentialdifferenz ist die treibende Kraft des rOCT1- und rOCT2-vermittelten Transportes. Wir konnten potentialabhängige Veränderungen der K_m -Werte von Cholin-induzierten Einwärtsströmen zeigen. Bei dem Austausch von Na⁺-Ionen gegen K⁺-Ionen im Reaktionspuffer wurde die Aufnahme von Cholin und MPP durch rOCT2 erniedrigt. Der bidirektionale Transport von MPP wurde gezeigt und *trans*-Stimulationsexperimente für MPP-Influx und MPP-Efflux durchgeführt, um die Asymmetrie des Transporters zu studieren. Darüberhinaus wurde in der vorliegenden Arbeit die Interaktion von verschiedenen Substraten mit rOCT1 und rOCT2 untersucht und ein

kompetitiver und nicht-kompetitiver Hemmtyp bei der TEA-Aufnahme gefunden.

5. Summary

Organic cation transport in the renal tubule is an important physiological function for the maintenance of body fluid homeostasis and detoxification of harmful organic cations (*Inui and Okuda, 1998; Pritchard and Miller, 1993*). In general, transport of organic cations in brush-border membranes is mediated by the H⁺/organic cation antiporter (*Holohan and Ross, 1981; Takano et al., 1984; Hsyu and Giacomini, 1987; Dantzler et al., 1989; David et al., 1995*), whereas transport of organic cations in basolateral membranes is stimulated by the inside-negative membrane potential (*Takano et al., 1984; Sokol and McKinney, 1990; Montrose-Rafizadeh et al., 1989*). By the expression cloning method, the organic cation transporter rOCT1, which is expressed in rat liver and kidney, was isolated (*Gründemann et al., 1994a*). In 1995, we isolated another organic cation transporter from rat kidney, rOCT2, by homology cloning (*Gorboulev et al., 1995; Busch et al., 1996b*). rOCT2 is localized exclusively in the renal medulla and cortex (*Okuda et al., 1996*). rOCT2 was deduced to be a glycoprotein comprised of 593 amino acid residues with 12 putative transmembrane domains. To analyse the functional characteristics of rOCT2 in comparison with rOCT1 we utilized the *Xenopus* expression system. During this dissertation a pharmacological profile was made for rOCT2. The apparent substrate spectrum of rOCT2 was similar to that of rOCT1. Affinities of rOCT2 against several compounds were directly compared with those of rOCT1. We found differences in K_m - and IC_{50} -values for distinct substrates but also a lot of similarities between both transporters. Anions like *p*-aminohippuric acid were identified as a new group of inhibitors for rOCT1- and rOCT2-mediated transport. The potential difference is the driving force of transport mediated by rOCT1 and rOCT2. We showed the potential-dependent changes of K_m -values of choline induced inward currents. Further when extracellular Na⁺ ions were replaced with K⁺ ions, the uptake of MPP and choline by rOCT2 was decreased. The bidirectional transport of MPP was shown and *trans*-stimulation experiments for MPP influx and efflux were performed to study asymmetry of the transporter. The mechanism of interaction of several substrates with rOCT1 and rOCT2 were investigated and we found competitive and non-competitive inhibition of TEA-uptake.

6. Literaturverzeichnis

ACARA, M. (1975). The kidney in regulation of plasma choline in the chicken. *Am. J. Physiol.* **228**, 645-649.

ACARA, M. und RENNICK, B. (1973). Regulation of plasma choline by the renal tubule: bidirectional transport of choline. *Am. J. Physiol.* **225**, 1123-1128.

ACARA, M., ROCH-RAMEL, F. und RENNICK, B. (1979). Bidirectional renal tubular transport of free choline: a micropuncture study. *Am. J. Physiol.* **236**, F112-F118.

AMEMIYA, M., LOFFING, J., LOTSCHER, M., KAISLING, B., ALPERN, R. J. und MOE, O. W. (1995). Expression of NHE-3 in the apical membrane of rat renal proximal tubule and thick ascending limb. *Kidney Int.* **48**, 1206-15.

ANONYMOUS (1998). Programm Manual for the Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8.0, Genetic Computer Group, University Research Park, Madison, Wisconsin.

ANSORGE, W. und LABELT, S. (1984). Field gradients improve resolution on DNA sequencing gels. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**, 237-243.

ARNDT, P., GORBOULEV, V., NAGEL, G., FRIEDRICH, T., GAMBARYAN, S., VOLK, C. und KOEPESELL, H. (1997). Functional properties of the polyspecific rat organic cation transporter, rOCT2. *Nova Acta Leopoldina NF 78* **306**, 347-348.

ARNDT, P., VOLK, C., GORBOULEV, V., BUDIMAN, T., POPP, C., ULZHEIMER-TEUBER, I., AKHOUNDOVA, A., BAMBERG, E., NAGEL, G. und KOEPESELL, H. (2000). Interaction of the organic cation transporters 1 and 2 from rat kidney with cations, a weak base and anions. *Am. J. Physiol.*, zur Veröffentlichung eingereicht.

BENDAYAN, R. (1996). Renal drug transport: A review. *Pharmacotherapy* **16**, 971-985.

BESSEGHIR, K., PEARCE, L. B. und RENNICK, B. (1981). Renal tubular transport and metabolism of organic cations by the rabbit. *Am. J. Physiol.* **241**, F308-F314.

BESSEGHIR, K., MOSIG, D. und ROCH-RAMEL, F. (1990). Transport of the organic cation N^1 -methylnicotinamide by the rabbit proximal tubule. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **253**, 444-451.

BIEMESDERFER, D., PIZZONIA, J., ABU ALFA, A., EXNER, M., REILLY, R. F., IGARASHI, P. und ARONSON, P. S. (1993). NHE3: a Na^+/H^+ exchanger isoform of renal brush border. *Am. J. Physiol.* **265**, F736-F742.

BIEMESDERFER, D., REILLY, R. F., EXNER, M., IGARASHI, P. und ARONSON, P. S. (1992). Immunocytochemical characterization of Na^+/H^+ exchanger isoform NHE-1 in rabbit kidney. *Am. J. Physiol.* **263**, F833-F840.

BIRNBOIM, H. C. und DOLY, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.

- BONATH, K. (1977). Narkose der Reptilien, Amphibien und Fische. In: Merckenschlager, M., Gärtner, K. (Hrsg.), Schriftenreihe Versuchstierkunde, Heft 4. Paul Parey, Berlin, Hamburg.
- BOOM, S. P. A., GRIBNAU, F. W. J. und RUSSEL, F. G. M. (1992). Organic cation transport and cationic drug interactions in freshly isolated proximal tubular cells of the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **263**, 445-450.
- BRADY, K. P., DUSHKIN, H., FORNZLER, D., KOIKE, T., MAGNER, F., HER, H., GULLANS, S., SEGRE, G. V., GREEN, R. M. und BEIER, D. R. (1999). A novel putative transporter maps to the osteosclerosis (oc) mutation and is not expressed in the oc mutant mouse. *Genomics* **56**, 254-261.
- BRAYTON, C. (1992). Wasting disease associated with cutaneous and renal nematodes, in commercially obtained *Xenopus laevis*. *Ann. Ny. Acad. Sci.* **653**, 197-201.
- BREIDERT, T., SPITZENBERGER, F., GRÜNDEMANN, D. und SCHÖMIG, E. (1998). Catecholamine transport by the organic cation transporter type 1 (OCT1). *Brit. J. Pharmacol.* **125**, 218-224.
- BUDIMANN, T., BAMBERG, E., KOEPESELL, H. und NAGEL, G. (2000). Mechanism of electrogenic cation transport by the cloned organic cation transporter 2 from rat. *J. Biol. Chem.* **275**, 29413-29420.
- BULLOCK, W. O., FERNANDEZ, J. M. und SHORT, J. M. (1987). XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* **5**, 376-378.
- BUSCH, A. E., KARBACH, U., MISKA, D., GORBOULEV, V., AKHOUNDOVA, A., VOLK, C., ARNDT, P., ULZHEIMER, J. C., SONNERS, M. S., BAUMANN, C., WALDEGGER, S., LANG, F. und KOEPESELL, H. (1998). Human neurons express the polyspecific cation transporter hOCT2, which translocates monoamine neurotransmitters, amantadine, and memantine. *Mol. Pharmacol.* **54**, 342-352.
- BUSCH, A. E., QUESTER, S., ULZHEIMER, J. C., GORBOULEV, V., AKHOUNDOVA, A., WALDEGGER, S., LANG, F. und KOEPESELL, H. (1996a). Monoamine neurotransmitter transport mediated by the polyspecific cation transporter rOCT1. *FEBS Lett.* **395**, 153-156.
- BUSCH, A. E., QUESTER, S., ULZHEIMER, J. C., WALDEGGER, S., GORBOULEV, V., ARNDT, P., LANG, F. und KOEPESELL, H. (1996b). Electrogenic properties and substrate specificity of the polyspecific rat cation transporter rOCT1. *J. Biol. Chem.* **271**, 32599-32604.
- CACINI, W., KELLER, M. B. und GRUND, V. R. (1982). Accumulation of cimetidine by kidney cortex slices. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **221**, 342-346.
- 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 (Hrsg. Grossmann, L. und Moldave, K.). Academic Press, 380-391.
- CHA, S. H., SEKINE, T., KUSUHARA, H., YU, E., KIM, J. Y., KIM, D. K., SUGIYAMA, Y., KANAI, Y. und ENDOU, H. (2000). Molecular cloning and characterization of multispecific organic anion transporter 4 expressed in the placenta. *J. Biol. Chem.* **275**, 4507-4512.

- CHOMCZYNSKI, P. und SACCHI, N (1987). Single step method of RNA isolation by acid guanidinium-thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
- CHUN, J. K., ZHANG, L., PIQUETTE-MILLER, M., LAU, E., TONG, L.-Q. und GIACOMINI, K. M. (1997). Characterization of guanidine transport in human renal brush border membranes. *Pharm. Res.* **14**, 936-941.
- COHEN, N., EFFRIGE, N. J., PARSONS, S. G. V., ROLLINS-SMITH, L. A., NAGATA, S. und ALBRIGHT, D. (1984). Identification and treatment of a lethal nematode (*Capillaria xenopodis*) infestation in the South African Frog, *Xenopus laevis*. *Devel. Comp. Immun.* **8**, 739-741.
- COLMAN, A. (1984). Translation of eukaryotic messenger RNA in *Xenopus* oocytes. In: Transcription and translation - a practical approach (Hrsg. Hames, B. D. and Higgins, S. J.). IRL Press, 271-302.
- DANTZLER, W. H., BROKL, O. H. und WRIGHT, S. H. (1989). Brush-border TEA transport in intact proximal tubules and isolated membrane vesicles. *Am. J. Physiol.* **256**, F290-F297.
- DANTZLER, W., EVANS, K. K. und WRIGHT, S. H. (1998). Basolateral choline transport in isolated rabbit renal proximal tubules. *Pflügers Arch.* **436**, 899-905.
- DANTZLER, W. H. und WRIGHT, S. H. (1997). Renal tubular transport of organic anions and cations. In: Sipes IG, McQueen CA, Gandolfi AJ, Goldsein, RS (eds). Comprehensive toxicology. Vol. 7, Renal toxicology. Pergamon, New York, pp 61-75.
- DANTZLER, W. H., WRIGHT, S. H., CHATSUDTHIPONG, V. und BROKL, O. H. (1991). Basolateral tetraethylammonium transport in intact tubules: specificity and *trans*-stimulation. *Am. J. Physiol.* **261**, F386-F392.
- DASCAL, N. (1987). The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **22**, 317-387.
- DAVID, C., RUMRICH, G. und ULLRICH, K. J. (1995). Luminal transport system for H⁺/organic cations in the rat proximal tubule. Kinetics, dependence on pH; specificity as compared with the contraluminal organic cation-transport system. *Pflügers Arch.* **430**, 477-492.
- DOWER, W. J., MILLER, J. F. und RAGSDALE, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**, 6127-6145.
- 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.* **292**, 1146-1152.
- DUMONT, J. N. (1972). Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). 1. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morphol.* **136**, 153-180.
- ELKAN, E. (1976). Pathology in the Amphibia. In: Lofts, B. (Ed.), Physiology of the Amphibia, **3**, 273-311. Academic Press, New York, San Fransisco, London.

ENDOU, H. (1998). Recent advances in molecular mechanisms of nephrotoxicity. *Toxicol. Lett.* **102-103**, 29-33.

FARAH, A., FRAZER, M. und PORTER, E. (1959). Studies on the uptake of N^1 -methylnicotinamide by renal slices of the dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **126**, 202-211.

FELSENSTEIN, J. (1998). Phylogeny Interference package (PHYLIP) Version 3.5c, Dept. of Genetics, University of Washington, Seattle.

GAJEWSKI, A., LOURIM, D. und KROHNE, G. (1996). An antibody against a glycosylated integral membrane protein of the *Xenopus laevis* nuclear pore complex: a tool for the study of pore complex membranes. *EJCB* **71**, 14-21.

GEORGE, R. L., WU, X., HUANG, W., FEI, Y. J., LEIBACH, F. H. und GANAPATHY, V. (1999). Molecular cloning and functional characterization of a polyspecific organic anion transporter from *Caenorhabditis elegans*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **291**, 596-603.

GIACOMINI, K. M. (1997). Membrane transporters in drug disposition. *J. Pharmacokin. Biopharm.* **25**, 731-741.

GISCLON, L., WONG, F.-M. und GIACOMINI, K. M. (1987). Cimetidine transport in isolated luminal membrane vesicles from rabbit kidney. *Am. J. Physiol.* **253**, F141-F150.

GOLDIN, A. L. (1991). Expression of ion channels by injection of mRNA into *Xenopus* oocytes. *Methods Cell Biol.* **36**, 487-509.

GORBOULEV, V., ARNDT, P., ULZHEIMER, J. C. und KOEPESELL, H. (1995). Identification of genes which are homologous to the organic cation transporter OCT1. Symposium of 'Transport of organic anions and cations across cellular membranes' in Göttingen. Nov. 17-19, (Abstract).

GORBOULEV, V., BÜCHNER, H., AKHOUNDOVA, A. und FAHRENHOLZ, F. (1993). molecular cloning and functional characterization of V_2 [8-lysine] vasopressin and oxytocin receptors from a pig kidney cell line. *Eur. J. Biochem.* **215**, 1-7.

GORBOULEV, V., ULZHEIMER, J. C., AKHOUNDOVA, A., ULZHEIMER-TEUBER, I., KARBACH, U., QUESTER, S., BAUMANN, C., LANG, F., BUSCH, A. E. und KOEPESELL, H. (1997). Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters. *DNA Cell Biol.* **16**, 881-881.

GORBOULEV, V., VOLK, C., ARNDT, P., AKHOUNDOVA, A. und KOEPESELL, H. (1999). Selectivity of the polyspecific cation transporter rOCT1 is changed by mutation of aspartate 475 to glutamate. *Mol. Pharmacol.* **56**, 1254-1261.

GRANT, S. G., JESSEE, J., BLOOM, F. R. und HANAHAN, D. (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4645-4649.

GREEN, R. M., LO, K., STERRITT, C. und BEIER, D. R. (1999). Cloning and functional expression of a mouse liver organic cation transporter. *Hepatology* **29**, 1556-1562.

- GROVES, C. E., EVANS, K. K., DANTZLER, W. H. und WRIGHT, S. H. (1994). Peritubular organic cation transport in isolated rabbit proximal tubules. *Am. J. Physiol.* **266**, F450-F458.
- GROVES, C. E., MORALES, N. M., GANDOLFI, A. J., DANTZLER, W. H. und WRIGHT, S. H. (1995). Peritubular paraquat transport in isolated renal proximal tubules. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **275**, 926-932.
- GRÜNDEMANN, D., BABIN-EBELL, J., MARTEL, F., ÖRDING, N., SCHMIDT, A. und SCHÖMIG, E. (1997). Primary structure and functional expression of the apical organic cation transporter from kidney epithelial LLC-PK₁ cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 10408-10413.
- GRÜNDEMANN, D., GORBOULEV, V., GAMBARYAN, S., VEYHL, M. und KOEPESELL, H. (1994a). Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. *Nature* **372**, 549-52.
- GRÜNDEMANN, D. und KOEPESELL, H., (1994b). Ethidium bromide staining during denaturation with glyoxal for sensitive detection of RNA in agarose gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **216**, 459-461.
- GRÜNDEMANN, D., KÖSTER, S., KIEFER, N., BREIDERT, T., ENGELHARDT, M., SPITZENBERGER, F., OBERMÜLLER, N. und SCHÖMIG, E. (1998a). Transport of monoamine transmitters by the organic cation transporter type 2 (OCT2). *J. Biol. Chem.* **273**, 30915-30920.
- GRÜNDEMANN, D., LIEBICH, G., KIEFER, N., KÖSTER, S. und SCHÖMIG, E. (1999). Selective substrates for non-neuronal monoamine transporters. *Mol. Pharmacol.* **56**, 1-10.
- GRÜNDEMANN, D., SCHECHINGER, B., RAPPOLD, G. A. und SCHÖMIG, E. (1998b). Molecular identification of the corticosterone-sensitive extraneuronal catecholamine transporter. *Nature Neuroscience* **1**, 349-351.
- 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* **233**, 177-182.
- HEDMAN, A. und MEIJER, D. K. F. (1998a). Stereoselective inhibition by the diastereomeres quinidine and quinine of uptake of cardiac glycosides into isolated rat hepatocytes. *J. Pharm. Sci.* **87**, 457-461.
- HEDMAN, A. und MEIJER, D. K. F. (1998b). The stereoisomeres quinine and quinidine exhibit a marked stereoselectivity in the inhibition of hepatobiliary transport of cardiac glycosides. *J. Hepatol.* **28**, 240-249.
- HOFSTEE, B. H. F. (1995). Graphical analysis of single enzyme systems. *Enzymologia* **17**, 272-278.
- HOLOHAN, P. D., PESSAH, N. I. und ROSS, C. R. (1975). Binding of N¹-methylnicotinamide and *p*-aminohippuric acid to a particulate fraction from dog kidney. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **195**, 22-33.

- HOLOHAN, P. D. und ROSS, C. R. (1981). Mechanisms of organic cation transport in kidney plasma membrane vesicles: 2. Δ pH studies. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **216**, 294-298.
- HOSOYAMADA, M., SEKINE, T., KANAI, Y. und ENDOU, H. (1999). Molecular cloning and functional expression of a multispecific organic anion transporter from human kidney. *Am. J. Physiol.* **276**, F122-F128.
- HSYU, P.-H. und GIACOMINI, K. M. (1987). The pH gradient-dependent transport of organic cations in the renal brush border membrane. Studies with acridine orange. *J. Biol. Chem.* **262**, 3964-3968.
- HSYU, P.-H., GISCLON, L. G., HUI, A. C. und GIACOMINI, K. M. (1988). Interactions of organic anions with the organic cation transporter in renal BBMV. *Am. J. Physiol.* **254**, F56-61.
- HUBBARD, G. B. (1981). *Aeromonas hydrophila* infection in *Xenopus laevis*. *Lab. Anim. Sci.* **31**, 297-300.
- HUEZ, G. und MARBAIX, G. (1986). Microinjection of mRNA into *Xenopus* oocytes. In: Microinjection and organelle transplantation techniques. (Hrsg. Celis, J. E., Graessmann, A. und Loyter, A.). Academic press, London, 327-350.
- INOTSUME, N., NISHIMURA, M., NAKANO, M., FUJIYAMA, S. und SATO, T. (1990). The inhibitory effect of probenecid on renal excretion of famotidine in young, healthy volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* **30**, 50-56.
- INUI, K. und OKUDA, M. (1998). Cellular and molecular mechanisms of renal tubular secretion of organic anions and cations. *Clin. Exp. Nephrol.* **2**, 100-108.
- ISEKI, K., SUGAWARA, M., SAITOH, N. und MIYAZAKI, K. (1993). The transport mechanism of organic cations and their zwitterionic derivatives across rat intestinal brush-border membrane. II. Comparison of the membrane potential effect on the uptake by membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **1152**, 9-14.
- JAEGGER, J. (1988). „Die red-leg-Seuche,, bei Amphibien. *Kleintierpraxis* **33**, 99-100.
- JANZ, R., HOFMANN, K. und SUDHOF, T. C. (1998). SVOP, an evolutionarily conserved synaptic vesicle protein, suggests novel transport functions of synaptic vesicles. *J. Neurosci.* **18**, 9269-9281.
- KAPLAN, H. M. (1969). Anesthesia in amphibians and reptiles. *Feder. Proc.* **28**, 1541-1546.
- KARBACH, U., KRICKE, J., MEYER-WENTRUP, F., GORBOULEV, V., VOLK, C., LOFFING-CUENI, D., KAISLING, B., BACHMANN, S. und KOEPESELL, H. (2000). Localization of the organic cation transporters OCT1 and OCT2 in rat kidney. *Am. J. Physiol.* **279**, F676-F687.
- KEKUDA, R., PRASAD, P. D., WU, X., WANG, H., FEI, Y.-J., LEIBACH, F. H. und GANAPATHY, V. (1998). Cloning and functional characterization of a potential-sensitive, polyspecific organic cation transporter (OCT3) most abundantly expressed in placenta. *J. Biol. Chem.* **273**, 15971-15979.

- KOEHLER, M. R., GORBOULEV, V., KOEPESELL, H., STEINLEIN, C. und SCHMID, M. (1996). Roct1, a rat polyspecific transporter gene for the excretion of cationic drugs, maps to chromosome 1q11-12. *Mamm. Genome* **7**, 247-248.
- KOEPESELL, H. (1998). Organic cation transporters in intestine, kidney, liver, and brain. *Annu. Rev. Physiol.* **60**, 243-266.
- KOEPESELL, H., BUSCH, A., GORBOULEV, V. und ARNDT, P. (1998). Structure and function of renal organic cation transporters. *News Physiol. Sci.* **13**, 11-16.
- KOEPESELL, H., GORBOULEV, V. und ARNDT, P. (1999). Molecular pharmacology of organic cation transporters in kidney. *J. Membr. Biol.* **167**, 103-117.
- KOEPESELL, H., MEYER-WENTRUP, F., ARNDT, P., KARBACH, U., NAGEL, G. und GORBOULEV, V. (1998). Function and molecular structure of renal and hepatic cation transporters. *Nova Acta Leopoldina NF 78* **306**, 211-212.
- KUSUHARA, H., SEKINE, T., UTSUNOMIYA-TATE, N., TSUDA, M., KOJIMA, R., CHA, S.H., SUGIYAMA, Y., KANAI, Y. und ENDOU, H. (1999). Molecular cloning and characterization of a new multispecific organic anion transporter from rat brain. *J. Biol. Chem.* **274**, 13675-13680.
- LANE, C. D. (1983). The fate of genes, messengers, and proteins introduced into *Xenopus* oocytes. *Curr. Top. Dev. Biol.* **18**, 89-116.
- LIEBERMANN, D. M., REITHMEIER, R. A., LING, V., CHARUK, J. H., GOLDBERG, H. und SKORECKI, K. (1989). Identification of P-glycoprotein in renal brush border membranes. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **162**, 244-252.
- LINDL, T. und BAUER, J. (1987). Zell- und Gewebekultur. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- LOPEZ-NIETO, C., YOU, G., BUSH, K., BARROS, E., BEIER, D. und NIGAM, S. (1997). Molecular cloning and characterization of NKT, a gene product related to the organic cation transporter family that is almost exclusively expressed in the kidney. *J. Biol. Chem.* **272**, 6471-6478.
- LORROW, D. und JESSEE, J. (1990). Max efficiency DH10B: a new host for cloning methylated DNA. *Focus* **12**, 19-20.
- LU, K. M., NISHIMORI, H., NAKAMURA, Y., SHIMA, K. und KUWAJIMA, M. (1998). A missense mutation of mouse OCTN2, a sodium-dependent carnitine cotransporter, in the juvenile visceral steatosis mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **252**, 590-594.
- MADDEN, T. L., TATUSOV, R. und ZHANG, J. (1996). Applications of network blast server. *Meth. Enzym.* **266**, 131-140.
- MARINO, M. H. (1996). Protein expression in *Xenopus* oocytes. In: *Protein Engineering* (J. L. Cleland und C. S. Craik, Herausgeber). Wiley, New York, 219-248.

- MARTEL, F., RIBEIRO, L., CALHAU, C. und AZEVEDO, I. (1999a). Comparison between uptake₂ and OCT1: effects of catecholamines, metanephrines and corticosterone. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **359**, 303-309.
- MARTEL, F., RIBEIRO, L., CALHAU, C. und AZEVEDO, I. (1999b). Characterization of the efflux of the organic cation MPP⁺ in cultured rat hepatocytes. *Eur. J. Pharmacol.* **379**, 211-218.
- MARTEL, F., VETTER, T., RUSS, H., GRÜNDEMANN, D., AZEVEDO, I., KOEPESELL, H. und SCHÖMIG, E. (1996). Transport of small organic cations in the rat liver. The role of organic cation transporter rOCT1. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **354**, 320-326.
- McKINNEY, T. D. (1982). Heterogeneity of organic base secretion by proximal tubules. *Am. J. Physiol.* **243**, F404-F407.
- McKINNEY, T. D. und HOSFORD, M. A. (1993). ATP-stimulated tetraethylammonium transport by rabbit renal brush border membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* **268**, 6886-6895.
- McKINNEY, T. D., MYERS, P. und SPEEG, Jr., K. V. (1981). Cimetidine secretion by rabbit renal tubules in vitro. *Am. J. Physiol.* **24**, F69-F76.
- 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* **74**, 4835-4838.
- MEHRENS, T., LELLECK, S., CETINKAYA, M., KNOLLMANN, M., HOHAGE, H., GORBOULEV, V., BOKNIK, P., KOEPESELL, H. und SCHLATTER, E. (2000). The affinity of rOCT1 is increased by protein kinase C dependent phosphorylation. *J. Am. Soc. Nephrol.* In press.
- MEYER-WENTRUP, F., KARBACH, U., GORBOULEV, V., ARNDT, P. und KOEPESELL, H. (1998). Membrane localization of the electrogenic cation transporter rOCT1 in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **248**, 673-678.
- MIYAMOTO, Y., TIRUPPATHI, C., GANAPATHY, V. und LEIBACH, F. H. (1989). Multiple transport systems for organic cations in renal brush-border membrane vesicles. *Am. J. Physiol.* **256**, F540-F548.
- MONTROSE-RAFIZADEH, C., MINGARD, F., MURER, H. und ROCH-RAMEL, F. (1989). Carrier-mediated transport of tetraethylammonium across rabbit renal basolateral membrane. *Am. J. Physiol.* **257**, F243-F251.
- MOOSLEHNER, K. A. und ALLEN, N. D. (1999). Cloning of the mouse organic cation transporter 2 gene, Slc22a2, from an enhancer-trap transgene integration locus. *Mamm. Genome* **10**, 218-242.
- MORI, K., OGAWA, Y., EBIHARA, K., AOKI, T., TAMURA, N., SUGAWARA, A., KUWAHARA, T., OZAKI, S., MUKOYAMA, M., TASHIRO, K., TANAKA, I. und NAKAO, K. (1997). Kidney-specific expression of a novel mouse organic cation transporter-like protein. *FEBS Lett.* **417**, 371-374.
- MÜLLER, M. und JANSEN, P. L. (1997). Molecular aspects of hepatobiliary transport. *Am. J. Physiol.* **272**, G1285-G1303.

- MURRAY, N. E., BRAMMAR, W. J. und MURRAY, K. (1977). Lamboid phages that simplify the recovery of in vitro recombinants. *Mol. Gen. Genet.* **150**, 53-61.
- NAGEL, G., VOLK, C., FRIEDRICH, T., ULZHEIMER, J. C., BAMBERG, E. und KOEPSSELL, H. (1997). A reevaluation of substrate specificity of the rat cation transporter rOCT1. *J. Biol. Chem.* **272**, 31953-31956.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1974). Amphibians: Guidelines for the breeding, care and management of laboratory animals. A report of the subcommittee on amphibian standards. 153 S. Printing and Publishing Office, National Academie of Science, Washington, D. C.
- NEZU, J., TAMAI, I., OKU, A., OHASHI, R., YABUUCHI, H., HISHIMOTO, N., NIKAIDO, H., SAI, Y., KOIZUMI, A., SHOJI, Y., TAKADA, G., MATSUIISHI, 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.* **21**, 91-94.
- NISHIWAKI, T., DAIGO, Y., TAMARI, M., FUJII, Y. und NAKAMURA, Y. (1998). Molecular cloning, mapping, and characterization of two novel human genes, ORCTL3 and ORCTL4, bearing homology to organic-cation transporters. *Cytogenet. Cell Genet.* **83**, 251-255.
- OKAMOTO, T. und SUMIKAWA, K. (1991). Antibiotics cause changes in the desensitization of ACh receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **9**, 165-168.
- OKUDA, M., SAITO, H., URAKAMI, Y., TAKANO, M. und INUI, K.-I. (1996). cDNA cloning and functional expression of a novel rat kidney cation transporter, rOCT2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **224**, 500-507.
- OKUDA, M., URAKAMI, Y., SAITO, H. und INUI, K.-I. (1999). Molecular mechanisms of organic cation transport in OCT2-expressing *Xenopus* oocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **1417**, 224-231.
- ORLOWSKI, J., KANDASAMY, R. A. und SHULL, G. (1992). Molecular cloning of putative members of the Na⁺/H⁺ exchanger gene family. cDNA cloning, deduced amino acid sequence, and mRNA tissue expression of the rat Na⁺/H⁺ exchanger NHE-1 and two structurally related proteins. *J. Biol. Chem.* **267**, 9331-9339.
- OTT, R. J., HUI, A. C., YUAN, G. und GIACOMINI, K. M. (1991). Organic cation transport in human renal brush-border membrane vesicles. *Am. J. Physiol.* **261**, F443-F451.
- PAN, B. F., SWEET, D. H., PRITCHARD, J. B., CHEN, R. und NELSON, J. A. (1999). A transfected cell model for the renal toxin transporter, rOCT2. *Toxicol. Sci.* **47**, 181-186.
- PRASAD, P. D., LEIBACH, F. H., MAHESH, V. B. und GANAPATHY, V. (1992). Specific interaction of 5-(*N*-methyl-*N*-isobutyl)amiloride with the organic cation-proton antiporter in human placental brush-border membrane vesicles. Transport and binding. *J. Biol. Chem.* **267**, 23632-23639.
- PRITCHARD, J. B. und MILLER, D. S. (1993). Mechanisms mediating renal secretion of organic anions and cations. *Physiol. Rev.* **73**, 765-796.

PRITCHARD, J. B. und MILLER, D. S. (1996a). Renal secretion of organic anions and cations. *Kidney Int.* **49**, 1649-1654.

PRITCHARD, J. B. und MILLER, D. S. (1996b). Intracellular compartmentation of organic anions and cations during renal secretion. *Cell Physiol. Biochem.* **6**, 50-59.

PRITCHARD, J. B., SYKES, D. B., WALDEN, R. und MILLER, D. S. (1994). ATP-dependent transport of tetraethylammonium by endosomes isolated from rat renal cortex. *Am. J. Physiol.* **266**, F966-F976.

RACE, J. E., GRASSL, S. M., WILLIAMS, W. J. und HOLTZMAN, E. J. (1999). Molecular cloning and characterization of two novel human renal organic anion transporters (hOAT1 and hOAT3). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **255**, 508-514.

RAFIZADEH, C., ROCH-RAMEL, F. und SCHÄLI, C. (1987). Tetraethylammonium transport in renal brush border membrane vesicles of the rabbit. *FEBS Lett.* **214**, 111-114.

- SAMBROOK, E., FRITSCH, E. und MANIATIS, T. (1989). Molecular cloning, a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- SANGER, F., NICKLEN, S. und COULSON, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- SARDET, C., FRANCHI, A. und POUYSSEGUR, J. (1989). Molecular cloning, primary structure, and expression of the human growth factor-activatable Na⁺/H⁺ antiporter. *Cell* **56**, 271-280.
- SCHÄFER, B. C. (1995). Revolutions in rapid amplification of cDNA ends: New strategies for polymerase chain reaction cloning full-length cDNA ends. *Anal. Biochem.* **227**, 255-273.
- SCHÖMIG, E., SPITZENBERGER, F., ENGELHARDT, M., MARTEL, F., ÖRDING, N. und GRÜNDEMANN, D. (1998). Molecular cloning and characterization of two novel transport proteins from rat kidney. *FEBS Lett.* **425**, 79-86.
- 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. *Mamm. Genome* **7**, 735-740.
- SEGEL, I. H. (1975). Enzyme kinetics. Wiley, New York, pp 1-957.
- SEKINE, T., WATANABE, N., HOSOYAMADA, M., KANAI, Y. und ENDOU, H. (1997). Expression cloning and functional characterization of a novel multispecific organic anion transporter. *J. Biol. Chem.* **272**, 18526-18529.
- SEKINE, T., KUSUHARA, H., UTSUNOMIYA-TATE, N., TSUDA, M., SUGIYAMA, Y., KANAI, Y. und ENDOU, H. (1998a). Molecular cloning and characterization of high-affinity carnitine transporter from rat intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **251**, 586-591.
- SEKINE, T., CHA, S. H., TSUDA, M., APIWATTANAKUL, N., NAKAJIMA, N., KANAI, Y. und ENDOU, H. (1998b). Identification of multispecific organic anion transporter 2 expressed predominantly in the liver. *FEBS Lett.* **429**, 179-182.
- SETH, P., WU, X., LEIBACH, F. H. und GANAPATHY, V. (1999). Mutations in novel organic cation transporter (OCTN2), an organic cation/carnitin transporter, with differential effects on the organic cation transport function and the carnitine transport function. *J. Biol. Chem.* **274**, 33388-33392.
- SHORT, J. M., FERNANDEZ, J. M., SORGE, J. A., HUSE, W. D. (1988). Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acid Res.* **16**, 7583-7600.
- SIGEL, E. (1990). Use of *Xenopus* oocytes for the functional expression of plasma membrane proteins. *J. Membr. Biol.* **117**, 201-221.
- SIMONSON, G., VINCENT, A., ROBERG, K., HUANG, Y. und IWANIJ, V. (1994). Molecular cloning and characterization of a novel liver specific transport protein. *J. Cell. Sci.* **107**, 1065-1072.

SMITH, P. M., PRITCHARD, J. B. und MILLER, D. S. (1988). Membrane potential drives organic cation transport in teleost renal proximal tubules. *Am. J. Physiol.* **255**, R492-R499.

SOKOL, P. P. und McKINNEY, T. D. (1990). Mechanism of organic cation transport in rabbit renal basolateral membrane vesicles. *Am. J. Physiol.* **258**, F1599-F1607.

SOMOGYI, A. (1996). Renal transport of drugs: Specificity and molecular mechanisms. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **23**, 986-989.

SOMOGYI, A. A., RUMRICH, G., FRITZSCH, G. und ULLRICH, K. J. (1996). Stereoselectivity in contraluminal and luminal transporters of organic cations in the rat renal proximal tubule. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **278**, 31-36.

TAYLOR, C. A., STANLEY, K. N. und SHIRRAS, A. D. (1997). The Orct gene of *Drosophila melanogaster* codes for a putative organic cation transporter with six or 12 transmembrane domains. *Gene* **201**, 69-74.

TERASHITA, S., DRESSER, M. J., ZHANG, L., GRAY, A. T., YOST, S. C. und GIACOMINI, K. M. (1998). Molecular cloning and functional expression of a rabbit renal organic cation transporter. *Biochim. Biophys. Acta* **1369**, 1-6.

TSAI, T. D., SHUCK, M. E., THOMPSON, D. P., BIENKOWSKI, M. J. und LEE, K. S. (1995). Intracellular H⁺ inhibits a cloned rat kidney outer medulla K⁺ channel expressed in *Xenopus* oocytes. *Am J. Physiol.* **268**, C1173-C1178.

TSE, C. M., BRANT, S. R., WALKER, M. S., POUYSSEGUR, J. und DONOWITZ, M. (1992). Cloning and sequencing of a rabbit cDNA encoding an intestinal and kidney-specific Na⁺/H⁺ exchanger isoform (NHE-3). *J. Biol. Chem.* **267**, 9340-9346.

TSE, C. M., LEVINE, S. A., Yun, C. H., MONTROSE, M. H., LITTLE., P. J., POUYSSEGUR, J. und DONOWITZ, M. (1993). Cloning and expression of a rabbit cDNA encoding a serum-activated ethylisopropylamiloride-resistant epithelial Na⁺/H⁺ exchanger isoform (NHE-2). *J. Biol. Chem.* **268**, 11917-11924.

ULLRICH, K. J. (1994). Specificity of transporters for 'organic anions' and 'organic cations' in the kidney. *Biochim. Biophys. Acta* **1197**, 45-62.

ULLRICH, K. J. (1997). Renal transporters for 'organic anions' and 'organic cations'. Structural requirements for substrates. *J. Membr. Biol.* **158**, 95-107.

ULLRICH, K. J., PAPAVALASSILIOU, C., DAVID, C., RUMRICH, G. und FRITZSCH, G. (1991A). Contraluminal transport of organic cations in the proximal tubule of the rat kidney. *Pflügers Arch.* **419**, 84-92.

ULLRICH, K. J., RUMRICH, G., DAVID, C. und FRITZSCH, G. (1993a). Bisubstrates: substances that interact with renal contraluminal organic anion and organic cation transport systems. I. Amines, piperidines, piperazines, azepines, pyridines, quinolines, imidazoles, thiazoles, guanidines and hydrazines. *Pflügers Arch.* **425**, 280-299.

ULLRICH, K. J., RUMRICH, G., DAVID, C. und FRITZSCH, G. (1993b). Bisubstrates: substances that interact with both, renal contraluminal organic anion and organic cation transport systems. II. Zwitterionic substrates: dipeptides, cephalosporins, quinilone-carboxylate gyrase inhibitors and phosphamide thiazine carboxylates; nonionizable substrates: steroid hormones and cyclophosphamides. *Pflügers Arch.* **425**, 300-312.

ULLRICH, K. J., RUMRICH, G., PAPAVALASSILIOU, C. und HIERHOLZER, K. (1991B). Contraluminal p-aminohippurate transport in the proximal tubule of the rat kidney. VIII. Transport of corticosteroids. *Pflügers Arch.* **418**, 371-382.

URAKAMI, Y., NAKAMURA, N., TAKAHASHI, K., OKUDA, M., SAITO, H., HASHIMOTO, Y. und INUI, K.-I. (1999). Gender differences of organic cation transporter OCT2 expression. *FEBS Lett.* **461**, 339-342.

- URAKAMI, Y., OKUDA, M., MASUDA, S., SAITO, H und INUI, K.-I. (1998). Functional characteristics and membrane localization of rat multispecific organic cation transporters, OCT1 and OCT2, mediating tubular secretion of cationic drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **287**, 800-805.
- URAKAMI, Y., OKUDA, M., SAITO, H. und INUI, K.-I. (2000). Hormonal regulation of organic cation transporter OCT2 expression in rat kidney. *FEBS Lett.* **473**, 173-176.
- VERHAAGH, S., SCHWEIFER, N., BARLOW, D. P. und ZWART, R. (1999). Cloning of the mouse and human solute carrier 22a3 (Slc22a3/SLC22A3) identifies a conserved cluster of three organic cation transporters on mouse chromosome 17 and human 6q26-q27. *Genomics* **55**, 209-218.
- VEYHL, M., SPANGENBERG, J., PÜSCHEL, B., POPPE, R., DEKEL, C., FRIZSCH, G., HAASE, W. und KOEPESELL, H. (1993). Cloning of a membrane-associated protein which modifies activity and properties of the Na⁺-D-glucose cotransporter. *J. Biol. Chem.* **268**, 25041-25053.
- WADE, S. E. (1982). *Capillaria xenopodis* sp. n. (Nematoda: Trichuroidea) from the Epidermis of the South African Claw Frog (*Xenopus laevis* Daudin). *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* **49**, 86-92.
- WALLACE, D. M. (1987). Large- and small-scale phenol extractions. In: *Methods in Enzymology 152: guide to molecular cloning techniques* (Hrsg. Berger, S. L. und Kimmel, A. R.). Academic Press, Orlando, 33-41.
- WOLFF, N. A., WERNER, A., BURCKHARDT, S und BURCKHARDT, G. (1997). Expression cloning and characterization of a renal organic anion transporter from winter flounder. *FEBS Lett.* **417**, 287-291.
- WONG, L. T. Y., SMYTH, D. D. und SITAR, D. S. (1990). Stereoselective inhibition of amantadine accumulation by quinine and quinidine in rat proximal tubules and cortical slices. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **255**, 271-275.
- WRIGHT, S. H. (1985). Transport of N1-methylnicotinamide across brush border membrane vesicles from rabbit kidney. *Am. J. Physiol.* **249**, F903-F911.
- WRIGHT, S. H. und WUNZ, T. (1987). Transport of tetraethylammonium by rabbit renal brush-border and basolateral membrane vesicles. *Am. J. Physiol.* **253**, F1040-F1050.
- WRIGHT, S. H. und WUNZ, T. (1998). Influence of substrate structure on turnover of the organic cation/H⁺ exchanger of the renal luminal membrane. *Pflügers Arch.* **436**, 469-477.
- WRIGHT, S. H., WUNZ, T. M. und WUNZ, T. P. (1992). A choline transporter in renal brush border-membrane vesicles: energetics and structural specificity. *J. Membr. Biol.* **126**, 51-65.
- WRIGHT, S. H., WUNZ, T. M. und WUNZ, T. P. (1995). Structure and interaction of inhibitors with the TEA-H⁺ exchanger of rabbit renal brush border membranes. *Pflügers Arch.* **429**, 313-324.
- WU, M. und GERHART, J. (1991). Raising *Xenopus* in the laboratory. *Methods Cell Biol.* **36**, 3-18.

- WU, X., FEI, Y. J., HUANG, W., CHANCY, C., LEIBACH, F. H. und GANAPATHY, V. (1999a). Identity of the F52F12.1 gene product in *Caenorhabditis elegans* as an organic cation transporter. *Biochim. Biophys. Acta* **1418**, 239-244.
- WU, X., GEORGE, R. L., HUANG, W., WANG, H., CONWAY, S. J., LEIBACH, F. H. und GANAPATHY, V. (2000). Structural and functional characteristics and tissue distribution pattern of rat OCTN1, an organic cation transporter, cloned from placenta. *Biochim. Biophys. Acta* **1466**, 315-327.
- WU, X., PRASAD, P. D., LEIBACH, F. und GANAPATHY, V. (1998). cDNA sequence, transport function, and genomic organization of human OCTN2, a new member of the organic cation transporter family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **246**, 598-595.
- YANISCH-PERRON, C., VIEIRA, J. und MESSING, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.
- YUAN, G., OTT, R. J., SALGADO, C. und GIACOMINI, K. M. (1991). Transport of organic cations by a renal epithelial cell line (OK). *J. Biol. Chem.* **266**, 8978-8986.
- ZHANG, L., DRESSER, M. J., CHUN, J. K., BABBITT, P. C. und GIACOMINI, K. M. (1997a). Cloning and functional characterization of a rat renal organic cation transporter isoform (rOCT1A). *J. Biol. Chem.* **272**, 16548-16554.
- ZHANG, L., DRESSER, M. J., GRAY, A. T., YOST, S. C., TERASHITA, S. und GIACOMINI, K. M. (1997b). Cloning and functional expression of a human liver organic cation transporter. *Mol. Pharmacol.* **51**, 913-921.
- ZHANG, L., GORSET, W., DRESSER, M. J. und GIACOMINI, K. M. (1999). The interaction of n-tetraalkylammonium compounds with a human organic cation transporter, hOCT1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **288**, 1192-1198.

7. Anhang

7.A. pH-Abhängigkeit des durch rOCT1- und rOCT2-vermittelten Transports von organischen Kationen

Um den Einfluß von unterschiedlichen pH-Werten auf den Transport von organischen Kationen bestimmen, wurden die Einwärtsströme von 1 mM Cholin an rOCT1- und rOCT2-exprimierenden Oozyten bei verschiedenen pH-Werten gemessen (Abb.7.A.1.).

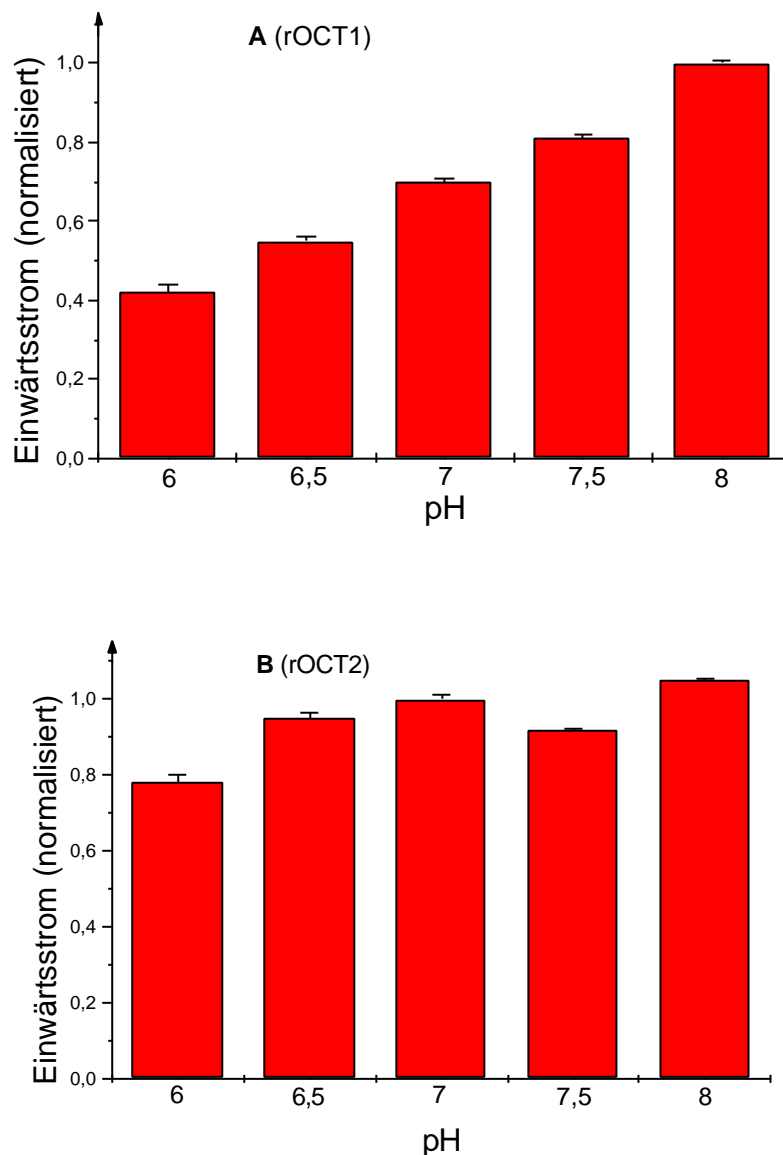


Abb.7.A.1. Messung der Cholin-induzierten Einwärtsströme bei verschiedenen pH-Werten an rOCT1 (A)- und rOCT2 (B)- exprimierenden Oozyten.

Die pH-Abhängigkeit von rOCT2 hat in den letzten Jahren zu kontroversen Diskussionen in der Literatur geführt (4.B.2.). In diesem Abschnitt sollen nun die Daten gezeigt werden, die zur Klärung der pH-Abhängigkeit des rOCT2-Transports beitragen sollten. Diese Messungen zur Bestimmung der pH-Abhängigkeit von rOCT1 und rOCT2 wurden von Dr. Christopher Volk, Anatomisches Institut, Würzburg, durchgeführt. Sie sind hier im Anhang gezeigt, weil diese Daten unentbehrlich für die Diskussion der funktionellen Eigenschaften von rOCT1 und rOCT2 sind (4.B.2.).

In rOCT1-exprimierenden Oozyten, die auf -50 mV geklemmt worden waren, wurden die durch 1 mM Cholin induzierten Einwärtsströme vom extrazellulären pH-Wert beeinflusst. Durch die Ansäuerung der Reaktionslösung von pH 8,0 auf pH 6,0 wurde der durch Cholin induzierte Einwärtsstrom um $57,4 \pm 4,9\%$ ($n=6$) vermindert (Abb.7.A.1.A.). In rOCT2-exprimierenden Oozyten änderten sich die durch 1 mM Cholin induzierten Einwärtsströme bei einer Veränderung der äußeren Protonenkonzentration von pH 8,0 auf pH 6,5 kaum. Nur eine weitere Ansäuerung auf pH 6,0 führte zu einer Verminderung des Cholinstroms um $25 \pm 2,0\%$ ($n=5$).

Für rOCT2 wurde zusätzlich noch eine Strom-/Spannungskurve für die Inkubation mit Cholin ermittelt, woraus sich auch keine pH-Abhängigkeit des Cholin induzierten Stromflusses ableiten läßt (Abb.7.A.2.).

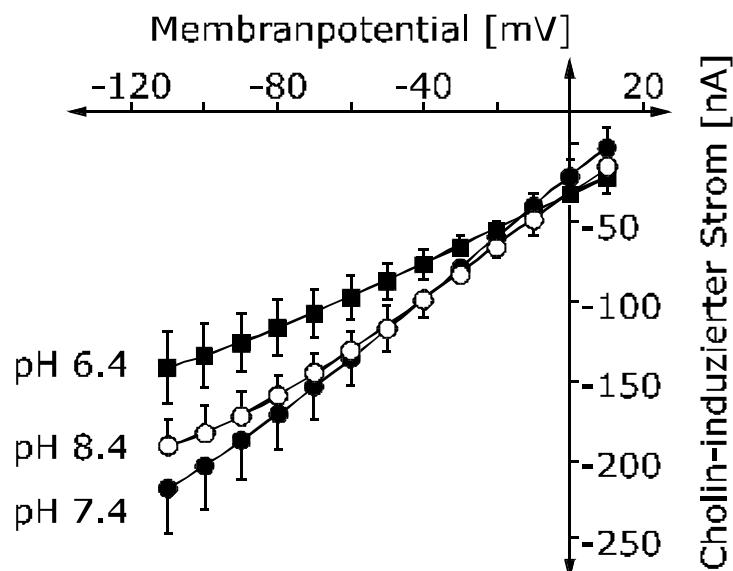
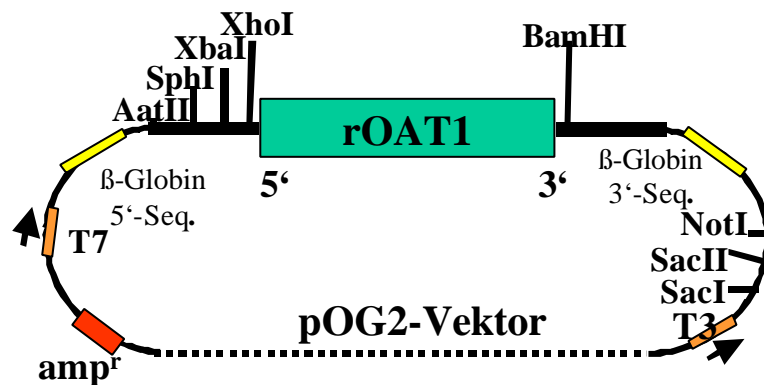
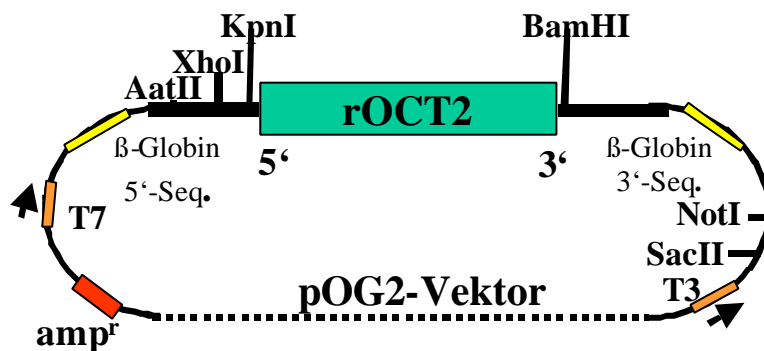
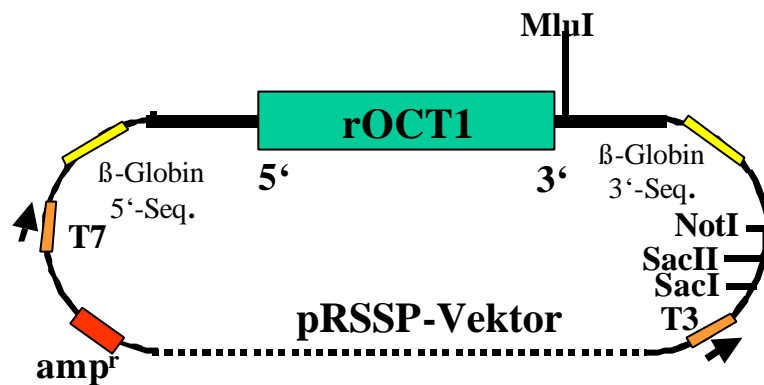


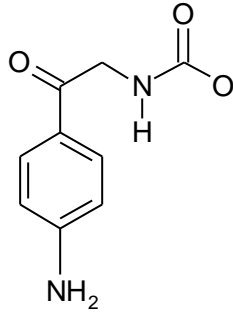
Abb.7.A.2. Strom-/Spannungskurven des von 1 mM Cholin induzierten Einwärtsstroms ermittelt mit rOCT2-exprimierenden Oozyten unter verschiedenen pH-Bedingungen.

7.B. Plasmidkonstrukte von rOCT1, rOCT2 und rOAT1

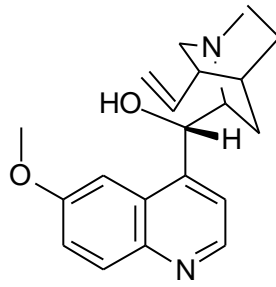
Auf dieser Seite sind die DNA-Konstrukte der Transporter schematisch dargestellt, mit denen bei der Anfertigung dieser Dissertation gearbeitet wurde bzw die zur Expression in *Xenopus*-Oozyten verwendet wurden. Hierbei handelt es sich um die organischen Kationentransporter rOCT1 und rOCT2



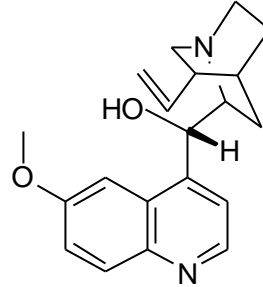
7.C. Strukturformeln



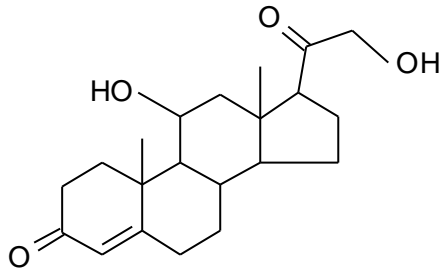
p-Aminohippurat



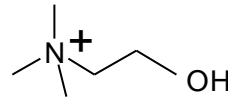
Chinidin



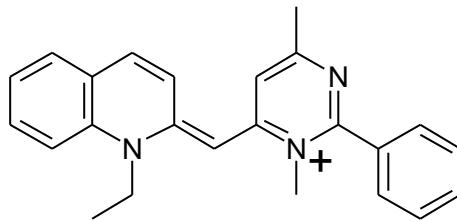
Chinin



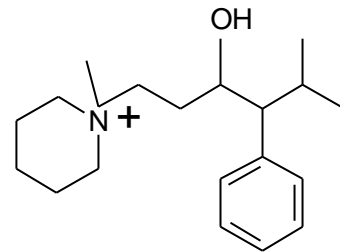
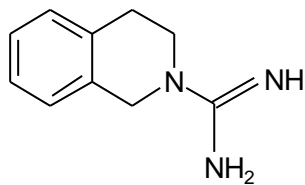
Corticosteron



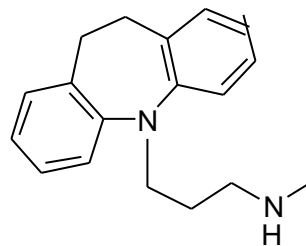
Cholin



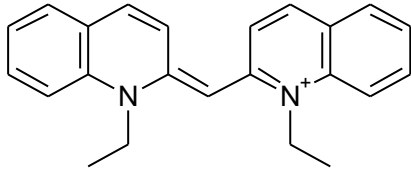
Cyanin863

Darstin
(Mepiperphenidol)

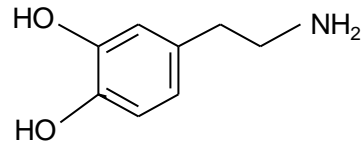
Debrisoquin



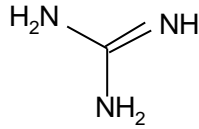
Desipramin



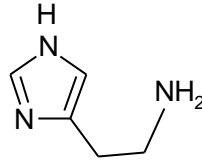
Decynium22



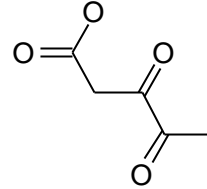
Dopamin



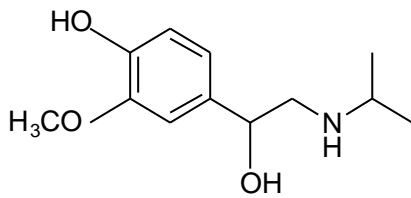
Guanidin



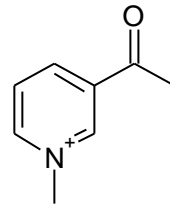
Histamin



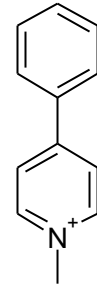
Ketoglutarat



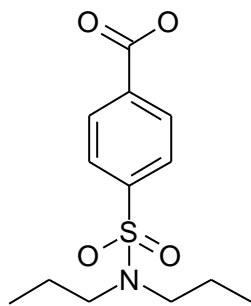
O-Methylisoprenalin



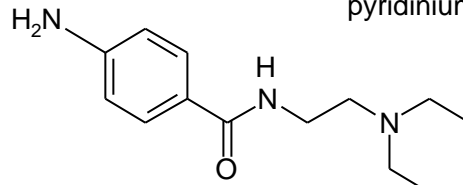
N-Methylnikotinamid (NMN)



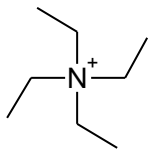
1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP)



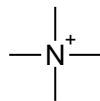
Probenecid



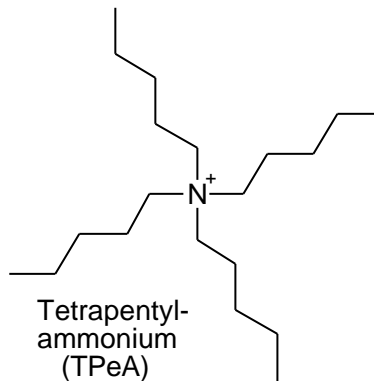
Procainamid



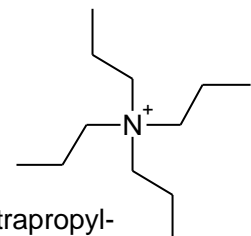
Tetraethylammonium (TEA)



Tetramethylammonium (TMA)



Tetrapentylammonium (TPeA)



Tetrapropylammonium

7.D. Abkürzungen und Einheiten

A	Ampère
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BES	N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-2-ethansulfonsäure
Bq	Bequerel
bzw.	beziehungsweise
cap	'Kappe' am 5'-Ende der mRNA = P ¹ -5'-(7-Methyl)-guanosin-P ³ -5'-guanosintriphosphat
cpm	counts per minute (gezählte radioaktive Zerfälle pro Minute)
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
Ci	Curie (3.7 x 10 ¹⁰ Bequerel)
cRNA	copy ribonucleic acid (kopierte Ribonukleinsäure)
Da	Dalton (molekulare Masse)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
dATP	2'-Desoxy-adenosin-5'triphosphat
dCTP	2'-Desoxy-cytidin-5'triphosphat
dGTP	2'-Desoxy-guanosin-5'triphosphat
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'triphosphat
dTTP	2'-Desoxy-thymidin-5'triphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
g	Gramm
GTP	Guanosin-5'-triphosphat

GVOs	gentechnisch veränderte Organismen
h	Stunde
hfl	high frequency of lysogeny
kDa	KiloDalton
LB	Luria Bertani
M	molar
MBq	MegaBequerel
mg	Milligramm
min	Minute
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MPP	1-Methyl-4-phenylpyridinium
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
nA	NanoAmpère
NMN	N-Methylnikotinamid
NTPs	Nukleotidtriphosphate
NZ	Nitrozellulose
OD	Optische Dichte
p. a.	pro analysi (zur Analyse)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol
poly A(+)-RNA	3'-polyadenylierte RNA
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
Rnase	Ribonuklease
rNTP's	Ribonukleosid-5'-triphosphat
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sog.	sogenannte
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-HCl-, NaBorat- und EDTA-gepufferte Lösung
TEA	Tetraethylammonium
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
u. a.	unter anderem
U	unit (Enzymeinheit)
UTP	Uridin-5'-triphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
(v/v)	volume per volume (Volumen pro Volumen)
W	Watt
(w/v)	weight per volume (Gewicht pro Volumen)

7.E. Quellenangaben zum OCT-Stammbaum

In der Tab.7.E. sind die Genbankeinträge und Literaturstellen angegeben, die zur Einordnung der im Stammbaum (4.A.) gezeigten Klone zur OCT-Familie geführt haben. Im Falle mehrerer Einträge wurde hier der älteste Eintrag mit der zugehörigen Genbanknummer (Accessionnummer) für die entsprechende Nukleotidsequenz aufgelistet.

NAME	REFERENZ	GENBANK -EINTRAG	PEPTID- LÄNGE	SPEZIES	GEWEBE
rOCT1	Gründemann et al., 1994a	X78855	556 AS	Ratte	Leber
hOCT1	Gorboulev et al., 1997 Zhang et al., 1997b	X98332 U77086	554 AS	Mensch	Leber
mOCT1 (Lx1)	Schweifer und Barlow, 1996 Green et al., 1999	U38652 AF010259	556 AS	Maus	Leber
rbOCT1	Terashita et al., 1998	AF015958	554 AS	Kaninchen	Niere
rOCT2	Gorboulev et al., 1995 (n.p.) Okuda et al., 1996	D83044 JC4884	593 AS	Ratte	Niere
hOCT2	Gorboulev et al., 1997	X98333	555 AS	Mensch	Niere
mOCT2	Mooslehner und Allen, 1999	AJ006036	553 AS	Maus	Leber, Niere
pOCT2	Gründemann et al., 1997	Y09400	554 AS	Schwein	LLCPK1- Zellen
rOCT3	Kekuda et al., 1998	AF055286	551 AS	Ratte	Plazenta
hOCT3 (EMT)	Gründemann et al., 1998b	AJ001417	556 AS	Mensch	Caki-1-Zellen
mOCT3	Wu et al., 1998 (n.p.) Verhaagh et al., 1999	AF082566 AF078750	551 AS	Maus	Niere Plazenta
rOCTN1	Wu et al., 2000	AF169831	553 AS	Ratte	Niere
hOCTN1	Tamai et al., 1997	AB007448	551 AS	Mensch	Fötale Leber
mOCTN1	Nezu et al., 1999 (n.p.)	AB016257	553 AS	Maus	Niere
rOCTN2 (rUST2)	Sekine et al., 1998a Schömig et al., 1998	AB017260 AJ001933	557 AS	Ratte	Dünndarm Niere
hOCTN2	Wu et al., 1998 Tamai et al., 1998	AF057164	557 AS	Mensch	Plazenta
mOCTN2	Lu et al., 1998	AB015800	557 AS	Maus	Niere
mOCTN3	Nezu et al., 1998 (n.p.)	AB018436	564 AS	Maus	Testis
mRST	Mori et al., 1997	AB005451	553 AS	Maus	Niere
rUST1	Schömig et al., 1998	Y09945	552 AS	Ratte	Niere
drOCT	Taylor et al., 1997	Y12400	548 AS	Drosophila melanogaster	Chromosom 2
drOCT- ähnlich	Taylor et al., 1997	Y12399	370 AS	Drosophila melanogaster	Chromosom 2

NAME	REFERENZ	GENBANK -EINTRAG	PEPTID- LÄNGE	SPEZIES	GEWEBE
ceOCT1	Wu et al., 1999a	AF110415	568 AS	Caenorhabditis elegans	Chromosom 1
arOCT	Theologis et al., 1998 (n.p.)	AC002986	527 AS	Arabidopsis thaliana	Chromosom 1
ORCTL3	Nishiwaki et al., 1998	AB26898	551 AS	Mensch	Chromosom 3p22-p21.3
ORCTL4	Nishiwaki et al., 1998	NM_004803	594 AS	Mensch	Chromosom 3p22-p21.3
OCT- ähnlich	Pauley et al., 1997 (n.p.)	AC002464	456 AS	Mensch	Bac-Klon
rSVOP	Janz et al., 1998	AF060174	727 AS	Ratte	Gehirn
rOAT1	Sekine et al., 1997 Sweet et al., 1997	AB004559; AF008221	551 AS	Ratte	Niere
mOAT1 (mNKT)	Lopez-Nieto et al., 1997	U52842	545 AS	Maus	Niere
hOAT1-1	Hosoyamada et al., 1999	AB009697	563 AS	Mensch	Niere
hROAT1 (hOAT1-2)	Reid et al., 1998 Hosoyamada et al., 1999	AF057039 AB009698	550 AS	Mensch	Niere
rbOAT1	Bahn et al., 1999 (n.p.)	AJ242871	551 AS	Kaninchen	Niere
flOAT1	Wolff et al., 1997	Z97028	562 AS	Flunder	Niere
rOAT2 (rNLT)	Simonson et al., 1994 Sekine et al., 1998b	L27651	548 AS	Ratte	Leber
rOAT3	Kusuhara et al., 1999	AB017446	536 AS	Ratte	Niere, Gehirn
mOAT3	Brady et al., 1999	AF078869	537 AS	Maus	Niere
hOAT3	Race et al., 1999	AF097491	568 AS	Mensch	Niere
hOAT4	Cha et al., 2000	AB026116	550 AS	Mensch	Niere
ceOAT	George et al., 1999	Kein Gen- bankeintrag	526 AS	Caenorhabditis elegans	Keine Angabe

Abb.7.E. *Quellenangaben zum OCT-Stammbaum. Bei jedem Gen wurde der erste Genbankeintrag bzw. die erste Publikation, wo das Gen beschrieben wurde, berücksichtigt. Falls aus dem ersten Genbankeintrag keine Veröffentlichung hervorgegangen ist, wurde dieser mit ,n.p.‘ (nicht publiziert) gekennzeichnet. Die klein geschriebenen Buchstaben vor den Gennamen (groß geschrieben) kürzen die Spezies ab, aus der das Gen isoliert wurde. Folgende Abkürzungen wurden gewählt: r (Ratte); fl (Flunder); m (Maus); h (human bzw. Mensch); rb (rabbit bzw. Kaninchen); p (pig bzw. Schwein); dr (Drosophila melanogaster); ce (Caenorhabditis elegans); ar (Arabidopsis thaliana). Die aus dem Englischen stammenden Gennamen lauten: organic cation transporter (OCT); organic cation transporter novel (OCTN); organic cation transporter-like (ORCTL); renal specific transporter (RST); urinary specific transporter (UST); extraneuronal monoamine transporter (EMT); synaptic vesicle protein (SVOP); novel kidney transporter (NKT); novel liver transporter (NLT); organic anion transporter (OAT);*

8. Veröffentlichungen

ARNDT, P., GORBOULEV, V., NAGEL, G., FRIEDRICH, T., GAMBARYAN, S., VOLK, C. und KOEPSSELL, H. (1997). Functional properties of the polyspecific rat organic cation transporter, rOCT2. *Nova Acta Leopoldina NF 78*, **306**, 347-348 (Abstract)

ARNDT, P., VOLK, C., GORBOULEV, V., BUDIMAN, T., POPP, C., ULZHEIMER-TEUBER, I., AKHOUNDOVA, A., BAMBERG, E., NAGEL, G. und KOEPSSELL, H. (2000). Interaction of the organic cation transporters 1 and 2 from rat kidney with cations, a weak base and anions. *Am. J. Physiol.*, zur Veröffentlichung eingereicht.

BUSCH, A. E., KARBACH, U., MISKA, D., GORBOULEV, V., AKHOUNDOVA, A., VOLK, C., ARNDT, P., ULZHEIMER, J. C., SONNERS, M. S., BAUMANN, C., WALDEGGER, S., LANG, F. und KOEPSSELL, H. (1998). Human neurons express the polyspecific cation transporter hOCT2, which translocates monoamine neurotransmitters, amantadine, and memantine. *Mol. Pharmacol.* **54**, 342-352.

BUSCH, A. E., QUESTER, S., ULZHEIMER, J. C., WALDEGGER, S., GORBOULEV, V., ARNDT, P., LANG, F. und KOEPSSELL, H. (1996b). Electrogenic properties and substrate specificity of the polyspecific rat cation transporter rOCT1. *J. Biol. Chem.* **271**, 32599-32604.

GORBOULEV, V., ARNDT, P., ULZHEIMER, J. C. und KOEPSSELL, H. (1995). Identification of genes which are homologous to the organic cation transporter OCT1. Symposium of 'Transport of organic anions and cations across cellular membranes' in Göttingen. Nov. 17-19. (Abstract)

GORBOULEV, V., VOLK, C., ARNDT, P., AKHOUNDOVA, A. und KOEPSSELL, H. (1999). Selectivity of the polyspecific cation transporter rOCT1 is changed by mutation of aspartate 475 to glutamate. *Mol. Pharmacol.* **56**, 1254-1261.

KOEPSSELL, H., BUSCH, A., GORBOULEV, V. und ARNDT, P. (1998). Structure and function of renal organic cation transporters. *News Physiol. Sci.* **13**, 11-16.

KOEPSSELL, H., GORBOULEV, V. und ARNDT, P. (1999). Molecular pharmacology of organic cation transporters in kidney. *J. Membr. Biol.* **167**, 103-117.

KOEPSSELL, H., MEYER-WENTRUP, F., ARNDT, P., KARBACH, U., NAGEL, G. und GORBOULEV, V. (1998). Function and molecular structure of renal and hepatic cation transporters. *Nova Acta Leopoldina NF 78* **306**, 211-212. (Abstract)

MEYER-WENTRUP, F., KARBACH, U., GORBOULEV, V., ARNDT, P. und KOEPSSELL, H. (1998). Membrane localization of the electrogenic cation transporter rOCT1 in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **248**, 673-678.

VALENTIN, M., KÜHLKAMP, T., WAGNER, K., KROHNE, G., ARNDT, P., BAUMGARTEN, K., WEBER, W.-M., SEGAL, A., VEYHL, M. und KOEPSSELL, H. (2000). The transport modifier RS1 is localized at the inner side of the plasma membrane and changes membrane capacitance. *Biochim. Biophys. Acta* **1468**, 367-380

9. Curriculum Vitae

Persönliche Daten:

Name: Petra Arndt
Geburtsdatum, -ort: 02.08.70, Seeheim-Jugenheim
Staatsangehörigkeit: deutsch
Mutter: Annemarie Arndt, geb. Scheitler
Vater: Willi Ludwig Arndt
Familienstand: ledig

Schulbildung:

7/76 – 7/80: Grundschule in Bickenbach/Bergstr.
9/80 – 7/86: Integrierte Gesamtschule, gymnasialer Zweig, in Alsbach-Hähnlein
10/85 – 7/86: Schülersprecherin der Sekundarstufe I
9/86 – 6/89: Sekundarstufe II, Schuldorf Bergstraße, in Seeheim-Jugenheim
6/89: Allgemeine Hochschulreife

Studium:

10/89 – 2/95: Studium an der Technischen Hochschule in Darmstadt;
Fachrichtung Biologie, Diplom
10/92: Diplom-Vorprüfungen in den Fächern Botanik, Zoologie, Anorganische
Chemie und Physik
7/94: Diplomprüfungen in den Fächern Mikrobiologie, Biochemie, Immunologie
und Organische Chemie
8/95 – 2/95: Diplomarbeit am Institut für Biochemie, Technische Hochschule
Darmstadt, unter der Leitung von Prof. Dr. H. G. Gassen
5/95 – 11/98: Promotionsstudium an der Universität Würzburg, Anfertigung der
Dissertation am Anatomischen Institut, Universität Würzburg; Betreuung
durch Prof. Dr. H. Koepsell

Beschäftigungs- verhältnisse:

1/93 – 11/93: Honorartätigkeit beim Internationalen Bund für Sozialarbeit in Darmstadt-
Eberstadt
3/93 und 3/94: Betreuung des Mikrobiologischen Grundpraktikums als studentische
Hilfskraft an der TH Darmstadt
1/94 – 12/94: Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft in der zellbiologischen
Arbeitsgruppe des zoologischen Instituts der TH Darmstadt
5/95 – 10/98: Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Anatomischen Institut, Würzburg
seit 1/99: Wissenschaftlerin bei Aventis Pharma, Cardiovascular, Frankfurt

Danksagung

Diese Dissertation wurde am Anatomischen Institut der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität in Würzburg am Lehrstuhl von Prof. Dr. H. Koepsell angefertigt. Ich danke Prof. Dr. H. Koepsell für die wissenschaftliche Anleitung und engagierte Betreuung meiner Arbeit.

Mein ganz besonders herzlicher Dank gilt Dr. Valentin Gorboulev, der mich in die Geheimnisse der Molekularbiologie eingeführt hat und durch seine stete Unterstützung das Gelingen dieser Arbeit ermöglicht hat

Außerdem möchte ich mich bei Irina Schatz, Dr. Aida Akhoundova und Eva Engel für ihre besondere Hilfsbereitschaft bedanken. Vor allem Irina Schatz konnte mir Dank ihres guten Organisationstalentes spontan bei vielen Arbeiten behilflich sein.

Dr. Maike Veyhl möchte ich herzlichst für die Unterstützung beim Erlernen des Umgangs mit *Xenopus*-Oozyten danken und werde mich immer an die schöne Zeit mit ihr in Würzburg zurück erinnern.

Dies gilt auch in ganz besonderer Weise für meine Freundinnen Katharina Baumgarten und Friederike Meyer-Wentrup, die mich immer in jeglicher Hinsicht unterstützt haben und ohne die ich nur halb so viel Spaß gehabt hätte.

Bei Dr. Christopher Volk möchte ich mich für seinen unermüdlichen Einsatz und seine Unterstützung bei der Charakterisierung von rOCT2 und für die netten Gespräche bedanken. Er hat einen großen Anteil an dieser Arbeit,

Ich bedanke mich bei Michael Christof und Käthe Maak für ihre stete Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit.

Für ihre Unterstützung möchte ich mich auch bei meinen Eltern und vor allem für seine Geduld bei Johannes Schroeter und auch bei allen anderen bedanken, die während der gesamten Zeit mit Interesse das Fortkommen dieser Arbeit verfolgt und mit getragen haben.

Erklärungen zur Zulassung zum Promotionsverfahren.

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

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

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

Bickenbach, den 12.06.00