

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Professor Dr. med. H. Koepsell

**Beeinflussung der  
Substratbindungsregion des organischen  
Kationentransporters 1 der Ratte durch  
Mutation einer intrazellulär gelegenen  
Aminosäure**

Inaugural-Dissertation  
Zur Erlangung der Doktorwürde der medizinischen Fakultät der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Christin Martina Senglanski  
aus Mosbach

Würzburg, April 2011

**Referent**

Prof. Dr. Hermann Koepsell

**Koreferent**

Priv.-Doz. Dr. Frank Döring

**Dekan**

Prof. Dr. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung: 17.10.2011**

**Die Promovendin ist Zahnärztin**

---

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	„Solute carrier 22“ (SLC22) .....	2
1.2	Die OCTs – Vorkommen und Funktion.....	4
1.3	Struktur und Transportmechanismus der OCTs.....	6
1.3.1	Struktur .....	6
1.3.2	Strukturmodell .....	7
1.3.3	Transportmechanismus – Alternating access mechanism.....	9
1.3.4	Aminosäuren in der Substratbindungstasche .....	10
1.4	Zielsetzung.....	13
2	Material und Methodik.....	15
2.1	Material.....	15
2.1.1	Chemikalien.....	15
2.1.2	Radiochemikalien .....	15
2.1.3	Verwendete Arbeitsmaterialien .....	15
2.1.4	Verwendete Enzyme.....	16
2.1.5	Verwendete Geräte .....	16
2.1.6	Oozytenringerlösung (ORI).....	16
2.1.7	Verwendete Computerprogramme.....	17
2.1.8	Xenopus laevis.....	17
2.1.9	Oozyten.....	18
2.1.10	Verwendetes Substrat und Inhibitoren.....	18
2.2	Methodik.....	20
2.2.1	cRNA-Synthese .....	20
2.2.2	Die Gewinnung der Oozyten .....	20
2.2.3	Auswahl der Oozyten .....	21
2.2.4	Injektion der Oozyten .....	21
2.2.5	Aufbewahrung und Inkubation der Oozyten .....	22
2.2.6	Messung der Substrataufnahme der Oozyten .....	22
2.3	Datenauswertung.....	24
3	Ergebnisse .....	26
3.1	Hemmung der TEA-Aufnahme durch Tetrabutylammonium.....	26
3.2	Hemmung der TEA-Aufnahme durch Kortikosteron .....	31

4	Diskussion.....	36
4.1	Die Mutation C451M – Die Bedeutung der Position 451 für das Bindungsverhalten von TBUA und Kortikosteron.....	38
4.2	Bedeutung der Position 447 für das Bindungsverhalten von TBUA und Kortikosteron.....	40
4.2.1	Hemmung der TEA-Aufnahme durch TBUA.....	40
4.2.2	Hemmung der TEA-Aufnahme durch Kortikosteron.....	43
4.3	Bedeutung der Position 222 für das Bindungsverhalten von TBUA und Kortikosteron.....	47
5	Klinischer Ausblick .....	49
6	Zusammenfassung .....	51
6.1	Deutsche Zusammenfassung .....	51
6.2	Englische Zusammenfassung .....	52
7	Literaturverzeichnis .....	53
8	Anhang.....	66

---

## Abkürzungsverzeichnis

Anova	Analysis of variance
Bq	Becquerel
C	Cystein
Ca	Kalzium
Ci	Curie
Cl	Chlorid
cm	Zentimeter
$^{14}\text{C}$ -TEA	$^{14}\text{C}$ - Tetraethylammonium
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
DEPC	Diethyldicarbonat
Dpm	decay per minute
F	Phenylalanin
GentORI	Oozytenringerlösung mit Gentamycin
K	Kalium
$K_m$	Michaelis- Konstante
$K_i$	Inhibitionskonstante eines Hemmstoffs
$\text{IC}_{50}$	mittlere inhibitorische Konzentration
l	Liter
L	Leucin
LacY	Laktosepermease von Escherichia coli
M	Methionin
Min	Minute
ml	Milliliter
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid

MPP	1-Methyl-4-phenylpyridin
N	Anzahl
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nl	Nanoliter
OAT	organischer Anionentransporter
OCT	organischer Kationentransporter
ORI	Oozytenringerlösung
rOCT	organischer Kationentransporter der Ratte
hOCT	organischer Kationentransporter des Menschen
S	Substrat
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLC	solute carrier family
TEA	Tetraethylammonium
TBuA	Tetrabutylammonium
TMH	Transmembran- Helix
$\mu\text{M}$	Mikromolar
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$V_{\text{max}}$	maximale Geschwindigkeit
Y	Tyrosin

## 1 Einleitung

*„It seems not improberable, but that by these [microscopes] helps the subtilty of composition of bodies, the structure of their parts, the various texture of their matter, the instruments and manner of their inward motions, and all the other possible appearances of things, may come to be more fully discovered.”<sup>1</sup>*

Als Robert Hooke in seinem im Jahre 1665 erschienenen Werk „Micrographia“ diese Worte schrieb, war ihm die heutige Bedeutung seiner Grundlagenforschung sicher nicht bewusst. Er entdeckte in den 60er Jahren des 17. Jahrhunderts die verkorkten Zellwände in Korkgewebe mittels eines selbstgebauten Mikroskops und nannte sie „cellulae“. Dies war einer der ersten Schritte der Zellbiologie.

Die vorliegende Arbeit widmet sich Fragen aus diesem Themengebiet. Sie beschäftigt sich mit der Erforschung der Struktur- und Bindungseigenschaften des organischen Kationentransporters 1 der Ratte (rOCT1) und soll einen Teil zu dessen besseren Verständnis beitragen.

Organische Kationen spielen eine bedeutende Rolle in der Physiologie des Menschen. So gehören beispielsweise monoamine Neurotransmitter, wie Acetylcholin, Dopamin, Serotonin, Histamin, Cholin und Coenzyme zu dieser Gruppe, aber auch eine bedeutende Menge an Xenobiotika und Medikamenten (Koepsell et al., 2003), wie Metformin und Phenformin (Antidiabetika) (Dresser et al., 2002), das antivirale Aciclovir (Takeda et al., 2002), das Muskelrelaxanz Memantin (Busch et al., 1998) und das Antiarrhythmikum Quinidin (Van Montfoort et al., 2001). So sind etwa 50 % aller klinisch relevanten Pharmaka Kationen oder bei physiologischem pH protonierte Basen (Sturm 2005). Aufgrund der schlechten Membranpermeabilität der meisten organischen Kationen, ist die Erforschung von Transportern, die in der Lage sind organische Kationen über die Plasmamembran zu transportieren, von entscheidender Bedeutung für die Pharmakokinetik dieser Substanzen.

---

<sup>1</sup> Zit. aus: Hooke R (1665) Micrographia.

## 1.1 „Solute carrier 22“ (SLC22)

Die Gruppe der „solute carrier“ beinhaltet 364 Proteine, die in 48 Familien aufgeteilt sind (Kusuhara und Sigiya, 2009). Eine davon ist die SLC22-Familie. Bereits im Jahre 1994 wurde der in dieser Dissertation untersuchte rOCT1 als Mitglied einer bis zu diesem Zeitpunkt noch unbekannten Transporterfamilie entdeckt (Gründemann et al., 1994) – der SLC22.

Diese SLC22-Familie stellt eine Untergruppe der MFS (major facilitator superfamily) (Pao et al., 1998; Koepsell et al., 2003) dar. Sie beinhaltet mehrere Transporteruntergruppen, die im Folgenden näher beschrieben werden sollen. Die SLC22 besteht zum Einen aus den drei organischen Kationentransportern (OCT1-3 oder SLC22A1-3), die als Uniporter fungieren, zum Anderen aus den drei Carnitin-Kationen-Transportern (OCTN1 oder SLC22A4, hOCTN2 oder SLC22A5 und hCT2 oder OCT6 oder SLC22A16) (Koepsell und Endou 2004; Koepsell et al., 2007). Weiterhin sind die organischen Anionentransporter (OAT1-6), die als Anionenaustauscher fungieren, zu nennen, sowie die ORCTL- Kationentransporter (Koepsell und Endou, 2004; Koepsell et al., 2003). Die Mitglieder der SLC22 kommen unter anderem im Darm, der Leber und der Niere vor und spielen eine bedeutende Rolle in der Aufnahme und Ausscheidung von Medikamenten, sowie von endogenen Komponenten (Koepsell 2004; Koepsell et al., 2007). Ebenso besitzen sie homöostatische Funktion in Herz und Gehirn. Endogene Substrate sind monoamine Neurotransmitter, L-Carnitin, Cholin (Acetylcholin),  $\alpha$ -Ketoglutarate, cAMP, cGMP und Prostaglandine (Koepsell und Endou, 2004).

Alle Mitglieder besitzen 12 Transmembrandomänen mit einer langen extrazellulären Schleife zwischen der ersten und zweiten Transmembrandomäne (Koepsell 2004) sowie einer langen intrazellulären Schleife zwischen der sechsten und siebten Transmembrandomäne. Die meisten Transporter der SLC-Familie sind polyspezifisch, was bedeutet, dass ein Transporter Stoffe verschiedener chemischer Strukturen, Größen und Molekulargewichte transportieren kann. Dies impliziert, dass ein Transporter abhängig vom zu transportierenden Stoff verschiedene Affinitäten und Umsatzraten besitzt. Liganden, die ein Molekulargewicht von 400 Da überschreiten,



fungieren häufig als Hemmstoffe (Anzai et al., 2006; Koepsell et al., 2007; Nigam et al., 2007; Rizwan und Burckhardt, 2007; Gorbunov et al., 2008).

## 1.2 Die OCTs – Vorkommen und Funktion

Bei den OCTs 1-3 handelt es sich um Uniporter, die Kationen und schwache Basen entlang ihres elektrochemischen Gradienten transportieren können. Vier Punkte sind allen OCTs hinsichtlich ihrer Funktion gemein. Erstens transportieren sie eine Vielzahl organischer Kationen, die verschiedene molekulare Strukturen aufweisen, und sie werden durch andere, nicht transportierte, Stoffe gehemmt (Koepsell et al., 2003). Zweitens transportieren die OCTs organische Kationen in einer elektrogenen Weise (Busch et al., 1996; Nagel et al., 1997; Budiman et al., 2000, Arndt et al., 2001; Koepsell et al., 2003; Keller et al., 2005). Drittens arbeiten die OCTs Na<sup>+</sup>-, Cl<sup>-</sup>- und pH-unabhängig (Busch et al., 1996; Budiman et al., 2000; Schmitt und Koepsell, 2005; Keller et al., 2005) und viertens sind sie in der Lage, organische Kationen in jede Richtung über die Plasmamembran zu transportieren (Busch et al., 1996; Nagel et al., 1997, Arndt et al., 2001; Volk et al., 2003).

Im Jahre 1994 wurde das erste Mitglied der OCT-Familie mittels Expressionsklonierung aus der Rattenniere isoliert. Bei diesem Transporter handelte es sich um den rOCT1 (Gründemann et al., 1994). Das Gen des rOCT1 ist auf Chromosom 1q11-12 (Koehler et al., 1996) lokalisiert und codiert ein Protein aus 556 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 62 kD. Mittels Northern Blot konnte der rOCT1 in Niere, Leber, Dünndarm und in der Lunge nachgewiesen werden (Gründemann et al., 1994). Der Transporter befindet sich sowohl in der Niere (Zhang et al., 1997a; Karbach et al., 2000; Sweet et al., 2000) als auch in der Leber (Meyer-Wentrup et al., 1998; Zhang et al., 1997b) und in den Enterozyten des Dünndarms in den basolateralen Membranen. In den Bronchien und der Trachea ist der OCT1 bei Mensch, Ratte und Maus jedoch in der luminalen Membran (Lips et al., 2005) lokalisiert. Das 1997 entdeckte menschliche Ortholog, der hOCT1 (Gorboulev et al., 1997; Zhang et al., 1997b), besitzt 555 Aminosäuren und ist wie alle menschlichen OCTs auf Chromosom 6q26-7 lokalisiert (Koepsell 2004). Er kommt im Gegensatz zum Ortholog des Nagers hauptsächlich in der Leber vor (Koepsell et al., 2007). Die Homologie des hOCT1 zum rOCT1 beträgt 78 % (Dresser et al., 2000). Die wichtigste physiologische Bedeutung des hOCT1 liegt in der Vermittlung des ersten Schrittes der

hepatischen Exkretion kationischer Arzneistoffe und Xenobiotika durch die Aufnahme über die sinusoidale (basolaterale) Membran in den Hepatozyten (Koepsell 2004).

Neben dem rOCT1 wurden zwei weitere Transporter namens rOCT2 und rOCT3 kloniert (Okuda et al., 1996; Kekuda et al., 1998; Wu et al., 1998a; Wu et al., 1998b; Sweet und Pritchard 1999a; Sweet und Pritchard 1999b). Der 1996 entdeckte rOCT2 (Okuda et al., 1996) ist vor allem in der Niere, weniger in anderen Organen wie in Dünndarm, Lunge, Haut und Gehirn lokalisiert (Sweet et al., 2001; Slitt et al., 2002; Choudhuri et al., 2003; Augustine et al., 2005; Lips et al., 2005; Alnouti et al., 2006; Koepsell et al., 2007). Er ist wie der rOCT1 in der Niere basolateral gelegen (Gorboulev et al., 1997; Karbach et al., 2000; Sweet et al., 2000). Im Jahre 1997 wurde auch ein menschliches Ortholog zum rOCT2, der hOCT2, erstmalig beschrieben (Gorboulev et al., 1997). Dieser hOCT2 wird überwiegend in der Niere, aber auch in Neuronen exprimiert (Gorboulev et al., 1997; Busch et al., 1998) und ist zu 70 % homolog dem hOCT1. Die Homologie zum rOCT2 beträgt 81 %. Vergleicht man das Vorkommen der OCT2 in der Niere, so ist zu erkennen, dass der hOCT2 in allen Segmenten des proximalen Tubulus zu finden ist (Motohashi et al., 2002), hingegen der rOCT2 lediglich in den Segmenten S2 und S3 lokalisiert ist (Karbach et al., 2000; Sugawara-Yokoo et al., 2000). Der hOCT2, der in allen Segmenten des proximalen Tubulus zu finden ist, vermittelt beim Menschen den ersten Schritt der renalen Sekretion kationischer Arzneimittel und den zweiten Schritt der Cholinreabsorption (Motohashi et al., 2002; Koepsell et al., 2003).

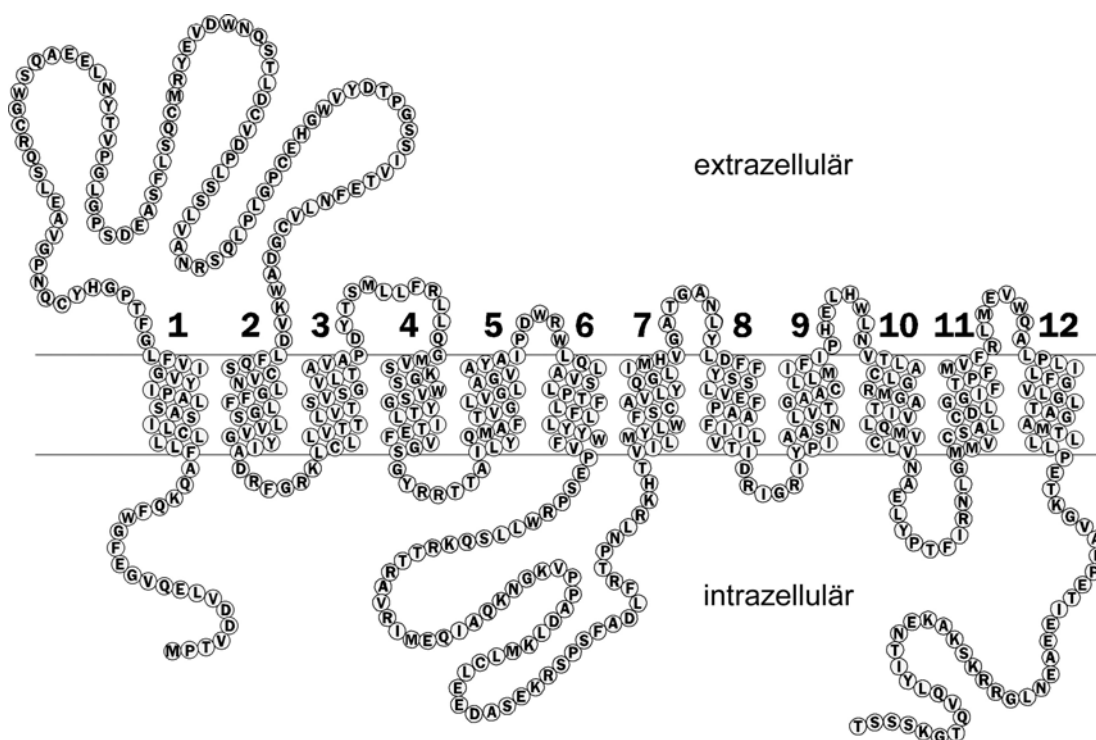
Der 1998 entdeckte rOCT3 wurde in vielen Organen nachgewiesen. Gehäuft kommt er in Placenta, Herz, Skelettmuskulatur, Niere und Leber, in geringem Maße aber auch im Gehirn vor (Kekuda et al., 1998; Koepsell 2003). Der hOCT3 zeigt eine dem rOCT3 ähnliche Verteilung und Funktion. Seine Aufgaben bestehen in der bilären Exkretion kationischer Medikamente, in der Regulation der intestinalen Konzentration monoaminer Neurotransmitter und kationischer Arzneistoffe im zentralen Nervensystem, Ganglien und im Herzen und in der Regulation der Acetylcholinabgabe in der Plazenta (Koepsell 2004).

Vergleicht man die verschiedenen OCTs einer Spezies untereinander, so beträgt die Übereinstimmung der Aminosäuren 67-70 % zwischen OCT1 und OCT2, zwischen OCT1 und OCT3 47-57 % und zwischen OCT2 und OCT3 40 - 51 % (Koepsell et al., 2003).

### 1.3 Struktur und Transportmechanismus der OCTs

#### 1.3.1 Struktur

Die Transporter der SLC22-Familie und somit auch die OCTs besitzen zwölf Transmembrandomänen (TMHs) und jeweils einen intrazellulären N-Terminus und einen intrazellulären C-Terminus. Es wurden zwei große Schleifen nachgewiesen. Eine lange extrazelluläre Schleife zwischen der ersten und zweiten Transmembrandomäne, die Glykosylierungsstellen besitzt, und eine lange intrazelluläre Schleife zwischen der sechsten und siebten Transmembrandomäne mit mehreren Phosphorylierungsstellen für Proteinkinasen (Gründemann et al., 1994; Meyer-Wentrup et al., 1998; Tanaka et al., 2004; Ciarimboli und Schlatter, 2005; Zhou et al., 2005; Pelis et al., 2006 a + b, Hong et al., 2007; Zhou und You, 2007; Keller et al., 2008). Intensive Mutationsstudien wurden am rOCT1 und rOCT2 durchgeführt und verschiedene Mutanten charakterisiert (Gorboulev et al., 1999; Gorboulev et al., 2005; Popp et al., 2005; Sturm et al., 2007; Gorbunov et al., 2008; Volk et al., 2009). Diese Daten wurden verwendet um ein Strukturmodell zu generieren (Abb.1).



**Abb.1:** Membrantopologiemodell des rOCT1 nach Gründemann 1994.

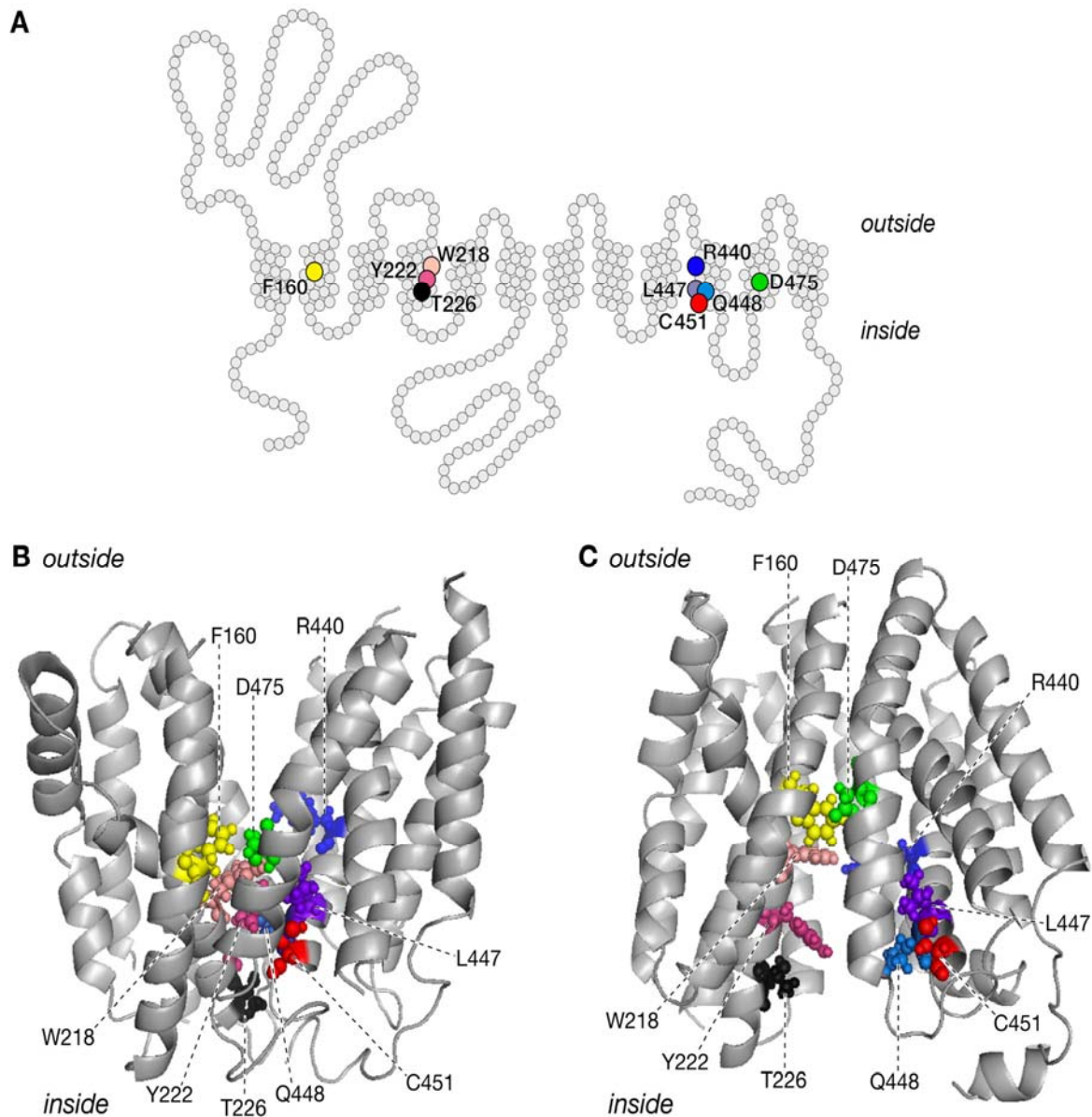
### 1.3.2 Strukturmodell

Das Modell des rOCT1 wurde basierend auf der innergerichteten Struktur der Laktosepermease (LacY) des Bakteriums *Escherichia coli* generiert. (Abramson et al., 2003; Popp et al., 2005). Diese Generation war möglich, da rOCT1 und die Laktosepermease derselben Proteinsuperfamilie angehören und zu 29% Sequenzähnlichkeiten aufweisen (Popp et al., 2005). Schmitt und Koepsell beschrieben im Jahr 2005 ein Vestibulum für die Bindungsregion des rOCT2. Dieses erklärt aufgrund seiner Weite die Bindung von Molekülen verschiedener Größe an den Transporter. Weiterhin ließ der Vergleich der Größe der Substrate mit der der Bindungsregion vermuten, dass mehrere Stoffe gleichzeitig binden können. Um diesen Sachverhalt näher zu untersuchen, wurde ein Modell des rOCT1 angefertigt (Abb.2; Abb.3).

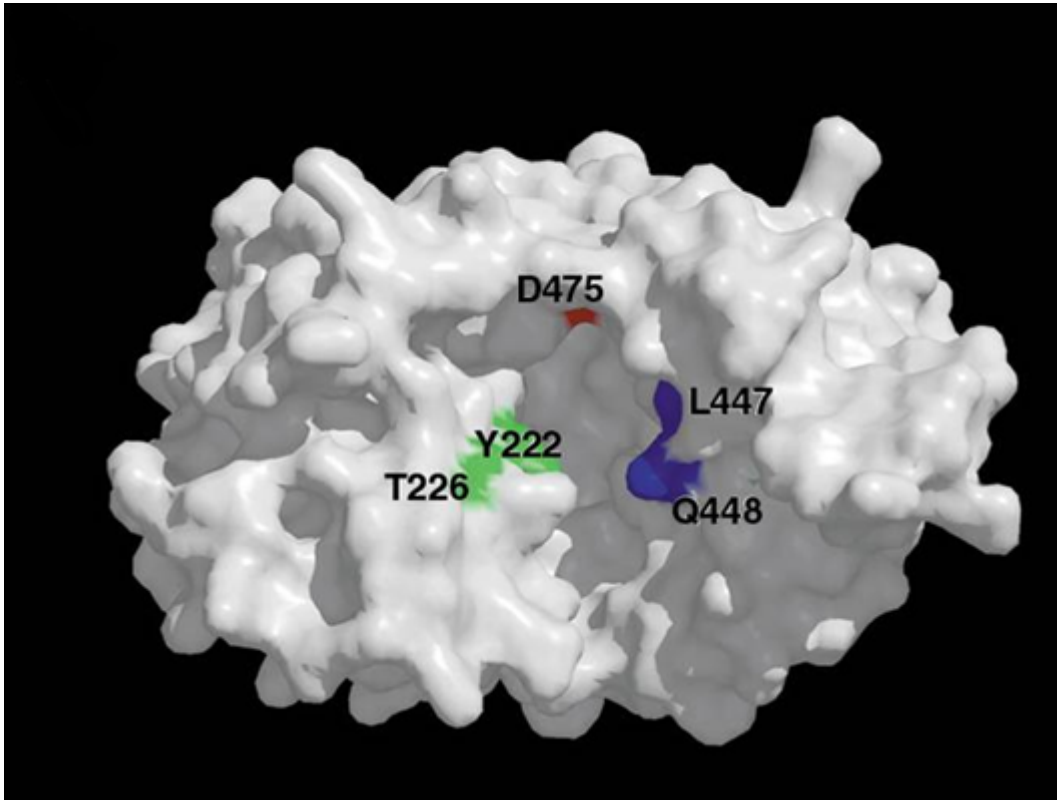
Im Modell zeigte sich ein großer Spalt, der vom Zytosol zugänglich ist und von mehreren Transmembrandomänen flankiert wird. Acht Aminosäuren deren Mutationen zu veränderten Affinitäten der Substrate führten, sind zu diesem Spalt hin orientiert. Dies legt die Vermutung nahe, dass sich dort die Substratbindungstasche befindet (Popp et al., 2005; Volk et al., 2009; Koepsell 2011). Es wird angenommen, dass die Substratbindungstasche der OCTs ihre Konformation bei der Umorientierung von intrazellulär nach extrazellulär und entgegengesetzt verändert (alternating access mechanism). Diese Umorientierung der Substratbindungsregion während des Transportvorgangs wird vermutlich begleitet von einer Änderung der Tertiärstruktur, die wiederum zu einer Affinitätsänderung des Transporters zu Inhibitoren und Substraten führt. Dieser Aspekt der Affinitätsänderung ist ligandenspezifisch, da jeder Ligand eine eigene Struktur aufweist und somit unterschiedlich bindet. Anhand des Modells wird vermutet, dass Substrate und Inhibitoren an unterschiedlichen, sich teilweise überlappenden, Stellen der Bindungsregion binden und dass diese Bindungsregion gleichzeitig mit mehreren Liganden besetzt sein kann (Popp, 2004).

In einem weiteren Modell wurde in Analogie zu der biochemisch identifizierten, nach außen offenen, Konformation der LacY (Smirnova et al., 2006; Kaback et al., 2007; Majumdar et al., 2007) die nach außen gerichtete Konformation des rOCT1 modelliert (Gorbunov et al., 2008). Es wurden Simulationen der Ligandenbindung an dieser modellierten Struktur durchgeführt (Abb.3) um Aminosäuren zu identifizieren, die von

außen an den Transporter binden (Volk et al., 2009).



**Abb.2:** Strukturmodelle des rOCT1. Die an der Bindungstasche beteiligten Aminosäuren und C451 sind farbig unterlegt. **A:** hypothetisches Membrantopologiemodell des rOCT1, **B:** nach extrazellulär offene Konformation. **C:** nach intrazellulär offene Konformation.

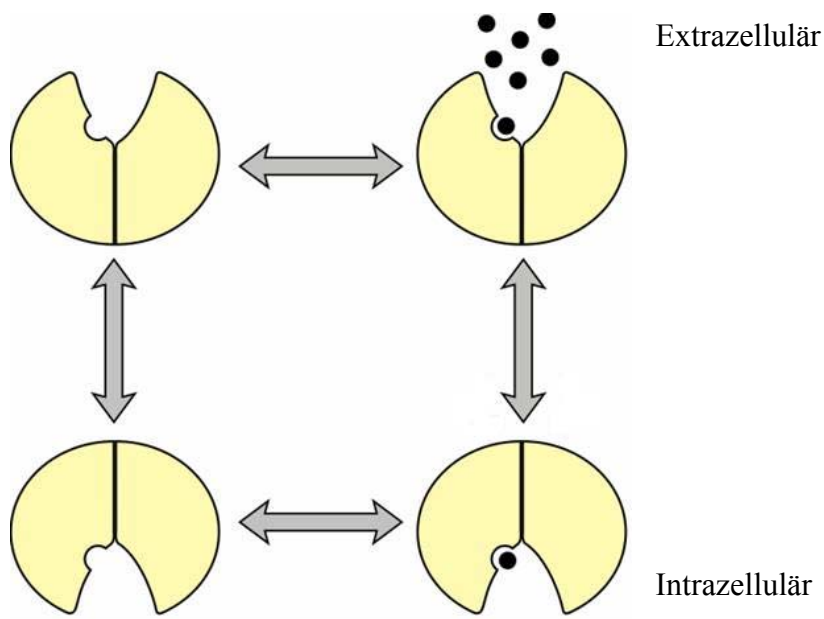


**Abb. 3:** Modell der Substratbindungsregion des rOCT1 (Popp et al., 2005).

### 1.3.3 Transportmechanismus – Alternating access mechanism

Man stellt sich die einzelnen Schritte eines „alternating access“-Transportmechanismus folgendermaßen vor (Koepsell et al. 2003) (Abb. 4):

- (a) Das Substrat bindet an die nach außen gerichtete Konformation des Transporters.
- (b) Das gebundene Substrat wird nach intrazellulär transportiert, wobei sich die Konformation des Transporters ändert.
- (c) Schließlich löst sich das Substrat von der nach innen gerichteten Konformation.
- (d) Die nun leere Substratbindungsregion reorientiert sich wieder nach extrazellulär, wobei die Ausgangskonformation wieder angenommen wird.



**Abb.4:** Schematische Darstellung des „alternating access-Mechanismus“. Das Molekül wird von der extrazellulären Konformation gebunden; es folgt die Translokation des Substrats nach intrazellulär, wobei der Transporter seine Konformation ändert. Das Substrat wird ins Zellinnere abgegeben. Schließlich nimmt der Transporter seine Ausgangskonformation an.

Es wird vermutet, dass die OCTs mittels eines „alternating access-Mechanismus“ ähnlich der Laktosepermease arbeiten. Zwei Beobachtungen unterstreichen diese Hypothese: Zum Einen zeigen Versuche aus dem Jahre 2003 (Volk et al., 2003), dass die Substratbindungsregion des rOCT2 sowohl von extra-, als auch von intrazellulär erreichbar ist. Zum Anderen verändern einzelne Punktmutationen, wie beispielsweise die Mutante L447Y des rOCT1, die Bindung von extra- und intrazellulär (Volk et al., 2009).

### 1.3.4 Aminosäuren in der Substratbindungstasche

Der Vorgang von Substratbindung und Translokation ist noch nicht gänzlich geklärt. Bisher wird angenommen, dass die OCTs Substratbindungstaschen mit teilweise überlappenden Domänen für verschiedene Substrate und Inhibitoren aufweisen (Gorboulev et al., 1999; Volk et al., 2003). Ein Vergleich bezüglich des Größenunterschieds der Bindungsregion in der nach außen gerichteten und der nach innen gerichteten Konformation des rOCT1-Modells mit den Substratmolekülen ließ



vermuten, dass mehrere Moleküle gleichzeitig an den Transporter binden können. So wurden drei Bindungsregionen für TBuA an der nach außen gerichteten Konformation des Transporters und zwei Substratbindungsregionen im Transporter nachgewiesen (Gorbunov et al., 2008; Koepsell 2011). Weiterhin wurde gezeigt, dass der Reorientierungsvorgang und somit die Konformationsänderung des Transporters mit einer Affinitätsänderung für Substrate und Inhibitoren einhergeht (Koepsell et al., 2003). Dies kann am Beispiel der Hemmstoffe TBuA und Kortikosteron belegt werden. Studien zeigten, dass TBuA und Kortikosteron mit der Substratbindungstasche der OCTs interagieren. Sie interagieren mit dem Substrat und mit einzelnen Aminosäuren der Substratbindungstasche, was zu Affinitätsänderungen des transportierten Kations, als auch der Hemmstoffe TBuA und Kortikosteron führt (Volk et al., 2003; Gorboulev et al., 2005). Die Versuche zeigten, dass die Hemmstoffe sowohl von extrazellulär, als auch von intrazellulär interagieren. So weist TBuA eine deutlich höhere Affinität von extrazellulär als von intrazellulär auf. Bei Kortikosteron verhält es sich gegenläufig (Volk et al., 2003; Koepsell et al., 2003). Dies wirft die Vermutung auf, dass die Substratbindungstasche sowohl von extrazellulär als auch von intrazellulär zugänglich ist und ähnliche, jedoch nicht identische, Substratspezifitäten existieren.

Durch Mutationsstudien wurden in den Transmembrandomänen 2, 4, 10 und 11 des rOCT1 insgesamt acht Aminosäuren identifiziert, die an der Substratbindung des rOCT1 beteiligt sind (Gorboulev et al., 1999 und 2005; Popp et al., 2005, Volk et al., 2009) (Abb.3).

Es handelt sich um Phenylalanin 160 der zweiten Transmembrandomäne (Volk et al., 2009); um drei Aminosäuren der vierten Transmembrandomäne, die im Jahre 2005 von Popp beschrieben wurden (Popp et al., 2005). Dies sind Tryptophan 218, Tyrosin 222 und Threonin 226. Studien weisen darauf hin, dass diese in der Bindungsregion des rOCT1 lokalisiert sind, da Mutationen dieser Stellen zu einer Veränderung der Affinität des Transporters führen (Popp, 2004; Popp et al., 2005).

Die drei Aminosäuren in der zehnten Transmembrandomäne sind Arginin 440, Leucin 447 und Glutamin 448 (Gorboulev et al., 2005; Volk et al., 2009). Zwei Studien aus dem Jahr 2005 belegen die Bedeutung der Position 447 einmal am rOCT1 (Gorboulev et al., 2005) und zum anderen am rbOCT2 (Zhang et al., 2005).

Als achte Aminosäure ist Aspartat 475 zu nennen (Gorboulev et al., 1999). Aufgrund

von Mutationsstudien an der Position 475 des rOCT1 wird angenommen, dass das Asp475 innerhalb des Transportweges an der Kationenbindungsstelle positioniert ist oder in einer nahegelegenen Proteindomäne liegt und dadurch die Konformation der Kationenbindungsstelle mittels einer ionischen Interaktion mit einer anderen intramembranen Proteindomäne stabilisiert (Gorboulev et al., 1999).

Neuere Untersuchungen von Volk et al. aus dem Jahre 2009 zeigen, dass die Aminosäuren Phe160 (TMH2), Trp218 (TMH4), Arg440 (TMH10), Leu447 (TM10) und Asp475 (TMH11) in der inneren Kavität der nach außen gerichteten und der nach innen gerichteten Substratbindungstasche liegen. Sie sind an der Bindung von Kortikosteron an beiden Seiten der Plasmamembran beteiligt. Es wird weiterhin aufgrund der Simulationen von Volk et al. vermutet, dass drei dieser Aminosäuren entscheidend an der extrazellulären Bindung des Inhibitors TBuA mitwirken. Dies sind Asp475, Leu447 und Phe160. Vier dieser Aminosäuren scheinen an der MPP<sup>+</sup>-Bindung beteiligt zu sein (Phe160, Trp218, Arg440, Leu447), eine Aminosäure interagiert mit TEA<sup>+</sup> (Asp475) (Gorboulev et al., 1999; Volk et al., 2009).

## 1.4 Zielsetzung

Neben der Identifizierung von Aminosäuren in der modellierten Substratbindungstasche, die sich wahrscheinlich direkt an der Substratbindung beteiligen, wurde eine Aminosäure identifiziert, die außerhalb der Substratbindungstasche liegt, deren Mutation jedoch trotzdem zur Veränderung von Substrataffinitäten führte. Wenn Cystein 451, das am Übergang der zehnten Transmembrandomäne in die kurze intrazelluläre Schleife zwischen der 10. Und der 11. TMH liegt, gegen ein Methionin ausgetauscht wurde, wurde der  $K_m$ -Wert für Cholin erniedrigt. Da Cystein 451 aufgrund seiner Lage im Strukturmodell eigentlich nicht direkt an der Bindung von Substraten beteiligt sein kann, ist es wahrscheinlich, dass Mutationen des Cysteins 451, am Ende der 10. TMH, die Positionen der Aminosäuren Glutamin 448 und Leucin 447 in der Bindungsstelle verändert und dadurch die Affinität von Cholin allosterisch verändert (Sturm et al., 2007). Außerdem könnte es sein, dass eine Veränderung der Substratbindung an Leucin 447 in der 10. TMH die Position bindender Substrate verändert und dadurch deren Interaktion mit einer anderen Aminosäure in der Substratbindungsstelle beeinflusst.

Um diesen angenommenen Mechanismus zu beweisen, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob durch den Austausch des Cysteins 451 in der 10. TMH durch Methionin Effekte von Mutationen in Position 447 beeinflusst werden. Außerdem wurde untersucht, ob die C451M-Mutante die Wirkung einer Mutation in Position 222 in der 4. TMH auf die Kationenbindung verändert. Tyrosin in Position 222 liegt Leucin in Position 447 direkt gegenüber. Mutationen in Position 222 führen zu Veränderung der  $K_m$ - und  $K_i$ -Werten von Substraten (Popp 2004). Außerdem zeigen unveröffentlichte Versuche von Volk, dass die Mutationen in der entsprechenden Position des Transporters rOCT3 zu Veränderungen der Affinität der Hemmung der MPP-Aufnahme durch Kortikosteron führen. Im Folgenden wurde untersucht, wie sich der Austausch von Cystein 451 gegen Methionin auf die Effekte von Mutationen in Position 222 oder 447 bezüglich der Affinität von Kortikosteron oder Tetrabutylammonium auswirkt. Da Kortikosteron die Plasmamembran passiv durchquert, erlauben an Oozyten durchgeführte Hemmversuche mit längeren

Inkubationszeiten keine Aussage darüber, ob sich die beobachteten Hemmeffekte in der nach außen oder nach innen geöffneten Substratspalte abspielen. Der Hemmstoff TBuA kann die Membran nicht passiv durchdringen. Effekte von Mutationen auf die Affinität zeigen deshalb Interaktionen mit der nach außen offenen Substratbindungstasche an.

## 2 Material und Methodik

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Name	Hersteller
Kalziumdichlorid	Sigma-Aldrich, Seelze
Gentamycin	Applichem, Darmstadt
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kortikosteron	Sigma-Aldrich, Seelze
Magnesiumdichlorid	Fluka, Neu-Ulm
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Seelze
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Tetrabutylammonium (TBuA)	Fluka, Neu-Ulm
MOPS	Applichem, Darmstadt
Tricain	Sigma-Aldrich, Seelze

**Tabelle 1:** verwendete Chemikalien

#### 2.1.2 Radiochemikalien

Name	Hersteller
[ <sup>14</sup> C]Tetraethylammonium	Biotrend, Köln

**Tabelle 2:** verwendete Radiochemikalien

#### 2.1.3 Verwendete Arbeitsmaterialien

Name	Hersteller
Einwegplastikgefäße	Eppendorf, Hamburg
Glaskapillaren	Hilgenberg, Malsfeld
Operationsbesteck	Hartenstein, Würzburg
Nahtmaterial (Seide)	Roeko, Langenau
Szintillationscocktail Lumasafe Plus	Lumac LSC, Groningen (Niederlande)
Zählröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht

**Tabelle 3:** verwendete Arbeitsmaterialien

### 2.1.4 Verwendete Enzyme

Name	Hersteller
Kollagenase C	Sigma-Aldrich, Seelze oder ICN Biomedicals, Eschwege

**Tabelle 4:** *verwendete Enzyme*

### 2.1.5 Verwendete Geräte

Name	Hersteller
Flüssigkeitsszintillationszähler Tri-Carb 1600CA	Canberra Packard, Dreieich
Mikroinjektionspumpe	Drummond, USA
Zentrifuge 5414	Eppendorf, Hamburg
Pipettenziehgerät (Puller)	Sutter, Novato, CA, USA

**Tabelle 5:** *Verwendete Geräte*

### 2.1.6 Oozytenringerlösung (ORI)

Die Oozytenringerlösung wurde als zehnfach konzentrierte Lösung angesetzt (Tabelle 6) und autoklaviert. Der pH-Wert wurde mittels NaOH auf 7,4 eingestellt. Um eine Kontamination zu vermeiden wurden die Einfachverdünnungen ebenfalls autoklaviert. Die GentORI wurde erst kurz vor dem Gebrauch mit Gentamycin versetzt, da das Antibiotikum bei zu langer Lagerung seine Wirkung verlieren könnte (Lindl und Bauer, 1987). Das Gentamycin diente zum Eindämmen des Bakterienwachstums, da die Kontamination mit Bakterien ein häufiger Grund für den Verderb der Oozyten darstellt.

Die Oozyten wurden mit kalziumfreier ORI gewaschen und in GentORI gelagert. Während der Versuche wurde gentamycinfreie ORI verwendet.

Name	Zusammensetzung
Oozytenringerlösung (ORI)	100mM NaCl, 3mM KCl, 2mM CaCl <sub>2</sub> , 1mM MgCl <sub>2</sub> , 5mM MOPS, NaOH(pH 7,4)
GentORI	Oozytenringerlösung + 50 mg/l Gentamycin
Kalziumfreie Oozytenringerlösung	100mM NaCl, 3mM KCl, 1mM MgCl <sub>2</sub> , 5mM MOPS

**Tabelle 6:** *ORI-Lösungen*

### 2.1.7 Verwendete Computerprogramme

Name	Hersteller
Betriebssystem Windows Vista	Microsoft, Redmond, Wasington, USA
Excel 2007	Microsoft, Redmond, Wasington, USA
GraphPad Prism 4.0	Graphpad, San Diego, CA, USA
Word 2007	Microsoft, Redmond, Wasington, USA

**Tabelle 7:** *Verwendete Computerprogramme*

### 2.1.8 *Xenopus laevis*



**Abb.5:** *Xenopus laevis* (Kickman et al., 2008)

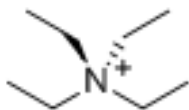
Die in dieser Dissertation verwendeten Oozyten entstammen weiblichen *Xenopus laevis*. *Xenopus laevis* ist eine primär aquatisch lebender Anure, die ihren Ursprung in Afrika hat (Hickman et al., 2008). Bezogen wurden die Frösche von Kähler (Hamburg), Nasco (Fort Atkinson, USA) und African *Xenopus* Fascillity (Knysna, Südafrika). Aufgrund ihrer aquatischen Lebensweise wurden die Versuchstiere in 150 l Plastiktanks mit einer Wassertiefe von ca. 50 cm gehalten. Die Wassertemperatur betrug zwischen 18-20 °C. Um den Tieren einen Biorhythmus zu geben, wurde von 8 Uhr bis 18 Uhr mittels künstlicher Beleuchtung Tageslicht simuliert. Der Ernährung dienten Rinderherzstücke mit Vitaminzusatz. Die Fütterung wurde zweimal pro Woche durchgeführt.

### 2.1.9 Oozyten

Die Oozyten des *Xenopus laevis* wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet, da sie für Zellen mit einem Durchmesser zwischen 1000  $\mu\text{m}$  und 1300  $\mu\text{m}$  eine außerordentliche Größe besitzen. Dies ermöglichte die Mikroinjektion unter dem Mikroskop. Weiterhin sind sie in der Lage, heterologe Expression und posttranslatorische Modifikationen auszuführen, so dass die zu untersuchenden Transporterproteine in funktioneller Form fertiggestellt werden (Gurdon et al., 1971). Ein weiterer Vorteil ist, dass sie relativ wenig endogene Transporterproteine enthalten.

### 2.1.10 Verwendetes Substrat und Inhibitoren

#### 2.1.10.1 Tetraethylammonium (TEA)

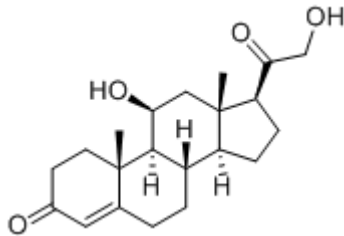


Tetraethylammonium

Tetraethylammonium ist eine quartäre Ammoniumverbindung (Armstrong und Hille, 1972), die als Kation vorliegt. Es besitzt eine relativ kleine Molekülgröße und Masse (130,25 Da). TEA ist eine etablierte Modellsubstanz, die vor allem in der Neurophysiologie ihre Verwendung findet. TEA wird hier zur Blockade spannungsabhängiger Natrium- und Kaliumkanäle verwendet (MacKinnon und Yellen, 1990). [ $^{14}\text{C}$ ]-Tetraethylammonium diente in dieser Dissertation als Substrat des rOCT1. Seine Konzentration im Endansatz betrug 5  $\mu\text{M}$ .



### 2.1.10.2 Kortikosteron

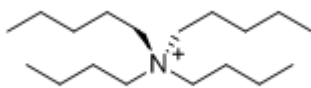


Kortikosteron

Das in dieser Arbeit als Hemmstoff fungierende Kortikosteron wurde in verschiedenen Konzentrationen angesetzt, sie betragen im Endansatz 0,1  $\mu\text{M}$ , 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$  und 1000  $\mu\text{M}$ .

Kortikosteron ist ein Steroidhormon der Nebennierenrinde, das über die Zwischenstufen Pregnenolon und Progesteron aus Cholesterin synthetisiert wird. Es dient als Vorstufe in der Aldosteronsynthese (Stryer et al., 2007). Kortikosteron ist ungeladen und inhibiert die OCTs, wird jedoch selbst nicht transportiert (Koepsell et al., 2007). Seine Masse beträgt 346,45 Da.

### 2.1.10.3 Tetrabutylammonium



Tetrabutylammonium

Tetrabutylammonium (TBuA) ist eine quartäre Ammoniumverbindung, die als Kation vorliegt. In den in dieser Dissertation durchgeführten Versuchen fungierte TBuA als Inhibitor der  $[^{14}\text{C}]$ -TEA-Aufnahme. Tetrabutylammonium wird von dem hOCT1 des Menschen und dem rbOCT1 des Kaninchens transportiert, hingegen nicht vom rOCT1, mOCT1 und rOCT2 (Koepsell et al., 2007). Seine Masse beträgt 242,46 Da.

## 2.2 Methodik

### 2.2.1 cRNA-Synthese

Um die gewünschte cRNA herzustellen, wurde die linearisierte DNA mit dem T7 mMessage mMachine-Kit der Firma Ambion (Austin, TX, USA) transkribiert (Ulzheimer 2002).

### 2.2.2 Die Gewinnung der Oozyten

Nach der Betäubung der Frösche durch 0,1 prozentige Tricainlösung wurden diese in eine Wanne mit Eis gelegt um die Körpertemperatur herunterzukühlen. Nach dem eintretenden Ausfall des Schluckreflexes konnte mit der Präparation der Oozyten begonnen werden. Der ca. 10 mm lange Schnitt wurde etwa 10 mm lateral der Medianlinie und 10 mm kranial der Symphyse durchgeführt. Es wurden Haut, Faszie und Muskulatur durchtrennt. Anschließend konnte ein Teil der Oozyten des ipsilateralen Ovars entnommen und in Oozytenringerlösung zwischengelagert werden. Der Verschluss der Operationswunde erfolgte mittels Einzelknopfnähten. Der Frosch wurde bis zum Auftreten des Fluchtreflexes ca. 15 Minuten in fließendem Wasser gelagert und anschließend einige Stunden isoliert gehalten, bevor er in das Gemeinschaftsbecken zurückgesetzt wurde.

Die entnommenen Oozyten wurden vorsichtig mit Pinzetten aus dem Ovar entfernt und gereinigt. Schließlich wurden sie über Nacht (ca. 15 Stunden) bei 16 °C in eine Lösung aus 1 mg Kollagenase/ml ORI überführt, um das die Oozyten umgebende Bindegewebe anzudauen. Nach der angegebenen Zeit wurden die Oozyten durch vier- bis fünfmaliges Waschen mit kalziumfreier Oozytenringerlösung von angedauten Geweberesten und Verunreinigungen befreit und die Oozyten von Follikelzellen getrennt. Es wurde kalziumfreie ORI verwendet, da die Verbindung zwischen Oozyten und Follikelzellen kalziumabhängig ist und daher diese beim Waschen mit kalziumfreier ORI gelöst wird. Waren die Oozyten gesäubert, wurden sie in Petrischalen, gefüllt mit GentORI, bei 16 °C bis zu Versuchsbeginn aufbewahrt.

### 2.2.3 Auswahl der Oozyten

Die Auswahl der Oozyten war für den Versuchsverlauf von entscheidender Bedeutung. Bei der Auswahl der Versuchsoozyten wurde darauf geachtet, nur Oozyten der Stadien 5 und 6 für die Versuche heranzuziehen.

Der Reifungsprozess der Oozyten lässt sich nach Dumont in sechs Stadien untergliedern (Dumont, 1972). Diese Stadien sollen im Folgenden kurz erläutert werden:

Stadium 1: Die Oozyten dieses Stadiums sind 50-300  $\mu\text{m}$  groß. Sie besitzen ein transparentes Zytoplasma und der Zellkern ist gut erkennbar.

Stadium 2: Die Oozyten dieses Stadiums sind 300-450  $\mu\text{m}$  groß. Die Dotterbildung (Vitellogenese) hat begonnen. Das Zytoplasma ist nun opaque bis weißlich.

Stadium 3: Die dotterbildenden Oozyten dieses Stadiums sind 450-600  $\mu\text{m}$  groß. Das Zytoplasma erscheint homogen hellbraun.

Stadium 4: Die dotterbildenden Oozyten dieses Stadiums sind 600-1000  $\mu\text{m}$  groß. Der animale (dunkle) und der vegetative (hell) Pol sind gut voneinander zu unterscheiden.

Stadium 5: Die dotterbildenden Oozyten dieses Stadiums sind 1000-1200  $\mu\text{m}$  groß. Der Zellkern liegt nun in der animalen Hemisphäre. Es ist eine deutliche Trennung der Hemisphären zu erkennen.

Stadium 6: Die dotterbildenden Oozyten dieses Stadiums sind 1200-1300  $\mu\text{m}$  groß. Es ist die deutliche Trennung der Hemisphären und ein unpigmentierter Gürtel am Äquator zu erkennen.

Des Weiteren wurde während des Auslesevorgangs auf eine homogene Pigmentierung, eine runde Form und einen ausreichenden Turgor geachtet.

### 2.2.4 Injektion der Oozyten

Die Injektion der Oozyten erfolgte unter einem Mikroskop. Die hierfür benutzte Injektionspumpe verfügt über ein Dosiersystem. Die verwendeten Injektionsspitzen wurden aus Glaskapillaren (Innendurchmesser 0,5 mm, Außendurchmesser 1 mm) mittels eines Mikroelektrodenziehgerätes (Puller) gezogen. Anschließend wurde die so

entstandene Spitze unter dem Mikroskop unter Zuhilfenahme einer mit 70 % Ethanol gereinigten Pinzette auf den gewünschten Durchmesser gebracht. Nun wurde die Kapillare blasenfrei mit Mineralöl gefüllt und in die Pumpe eingespannt.

Im Anschluss daran wurde die cRNA aufgetaut, zentrifugiert und 2-4 µl in einen mit Mineralöl gefüllten Deckel eines sterilen Eppendorfgefäßes überführt. Dann wurde die cRNA mit der Pumpe blasenfrei in die Kapillare aufgezogen.

Die Oozyten wurden aus dem Inkubator (16 °C) entnommen und in eine mit ORI gefüllte Schale mit rinnenförmigen Vertiefungen überführt, um eine stabile Lage der Oozyten während des Injektionsvorganges zu gewährleisten.

Die Injektion der Oozyten erfolgte mit 50 nl cRNA. Die Konzentration der RNA betrug 0,2 µg/µl. Jede Oozyte wurde einmal injiziert, wobei eine Injektion in den animalen Pol vermieden wurde um den Zellkern nicht zu touchieren. Durch den Injektionsvorgang verletzte oder dotternde Oozyten wurden aussortiert.

### **2.2.5 Aufbewahrung und Inkubation der Oozyten**

Nach der Injektion wurden die Oozyten in GentORI bei 16 °C gelagert. Die Inkubationszeit betrug zweieinhalb Tage. Depigmentierte oder dotternde Oozyten wurden täglich aussortiert.

### **2.2.6 Messung der Substrataufnahme der Oozyten**

Vor Beginn der Messung wurden die zweieinhalb Tage inkubierten Oozyten nochmalig auf ihre Tauglichkeit untersucht und aussortiert. Anschließend wurden sie je nach Überlebensrate in Achter- bis Zehnergruppen unterteilt und in Eppendorfgefäße mit 190 µl oder 188 µl ORI überführt. Ziel war es, ein Gesamtvolumen nach Zugabe aller Reagenzien von 200 µl zu erreichen, wobei sich die Volumina wie folgt unterteilten (Pipettierschema siehe Tabellen 13 und 14 im Anhang):

- Die Gefäße der Kontrollgruppe der nichtinjizierten Oozyten sowie der Kontrollgruppe der injizierten Oozyten, die keinen Hemmstoff zugesetzt bekamen, enthielten zu Beginn 190 µl ORI.
- Die restlichen Gefäße der Oozyten, die Hemmstoff zugesetzt bekamen,

enthielten zu Beginn 188  $\mu\text{l}$  ORI.

Nach Überführen der Oozyten in die jeweiligen Gefäße wurden den dafür vorgesehenen im Abstand von zwei Minuten 2  $\mu\text{l}$  Hemmstoff zugegeben, wobei jedes Gefäß nur eine Hemmstoffkonzentration enthielt. Die Hemmstoffkonzentrationen können aus Tabelle 15 im Anhang entnommen werden. Nach Zugabe des Hemmstoffes inkubierten die Oozyten 15 Minuten bei Raumtemperatur vor. Nun wurde in jedes Eppendorfgefäß wiederum im zweiminütigen Abstand 10  $\mu\text{l}$  Substrat hinzugegeben. Als Substrat wurde radioaktiv markiertes TEA verwendet. Die Endkonzentration des TEA im Ansatz betrug 5  $\mu\text{M}$ . Nach Zugabe des Substrates wurde der Inhalt des Gefäßes durchmischt und zweimal 10  $\mu\text{l}$  in jeweils separate Röhrengefäße pipettiert. Das Eppendorfgefäß samt Oozyten wurde 30 min unter ständiger Bewegung inkubiert. Danach wurden die Oozyten dem Gefäß entnommen und die Reaktion mittels eiskalter ORI gestoppt. Nun wurden die Oozyten viermal gewaschen und einzeln in Röhrengefäße überführt. Den Röhrengefäßen wurde 100  $\mu\text{l}$  fünfprozentiger Natriumdodecylsulfatlösung (SDS) zugesetzt, um die Oozytenmembran aufzulösen. Die so präparierten Röhrengefäße wurden etwa 30 Minuten auf einen Rüttler gestellt, um den Lysevorgang zu unterstützen. Waren alle Membranen aufgelöst, konnten die Röhrengefäße vom Rüttler genommen und jedem 1 ml Szintillationsflüssigkeit zugesetzt werden. Anschließend wurden sie verschlossen und in den Flüssigszintillationszähler (Tri-Carb 1600CA) gestellt. Als Leerwert diente ein Röhrengefäß mit 100  $\mu\text{l}$  SDS und 1 ml Szintillationsflüssigkeit.

### 2.3 Datenauswertung

Bei sehr starken Schwankungen der Messwerte wurden der höchste und der tiefste Wert von 10 Parallelmessungen gestrichen. Dies begründe ich damit, dass ein sehr niedriger Wert wahrscheinlich auf eine missglückte Injektion und ein zu hoher Wert auf einer Verletzung der Membran beruht. Um die passive Aufnahme zu berücksichtigen, wurde der Transport von nichtinjizierten Kontrolloozyten parallel gemessen und der Mittelwert der passiven Transportrate vom Transport der injizierten Oozyten abgezogen.

Um die Graphen darzustellen und die Parameter SEM (standard error of mean),  $V_{\text{MAX}}$ , sowie nicht-lineare Regression (Hill inhibition log) und Testhypothesen (ANOVA) durchzuführen, wurde die Software GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software; San Diego, Kalifornien, USA) verwendet.

Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes:

Unter dem  $IC_{50}$ -Wert versteht man diejenige Hemmstoffkonzentration, bei der die Substrataufnahme bei einer bestimmten Substratkonzentration auf die Hälfte reduziert wird. Die Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes geschah durch Zugabe des radioaktiven Substrats [ $^{14}\text{C}$ ]-TEA und des entsprechenden nicht radioaktivmarkiertem Hemmstoff (TBuA oder Kortikosteron). Die Inhibitionskurve wurde immer halblogarithmisch dargestellt, um Unterschiede klar erkennbar zu machen. Zur Berechnung der zur halbmaximalen Hemmung benötigten Hemmstoffkonzentration wurde die Hillgleichung benutzt.

Die verwendete Hill-Gleichung lautet:

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

*Gleichung 1: Hill-Gleichung. V: Substrataufnahme pro Zeit,  $V_{\text{max}}$ : maximale Substrataufnahme, I: Hemmstoffkonzentration, P: Hill-Koeffizient,  $IC_{50}$ : mittlere inhibitorische Konzentration.*

Da die für die Transportmessungen gewählte Substrate deutlich unter dem  $K_m$ -Wert für TEA lag, entsprechen die errechneten  $IC_{50}$ -Werte den jeweiligen  $K_i$ -Werten.

Um die an unterschiedlichen Oozytenpräparationen mit stark variierender Expressionskapazität durchgeführten Versuchsreihen miteinander vergleichen zu können, wurden die gemessenen Werte an Hand der ungehemmten TEA-Aufnahme normalisiert. Dargestellt werden die Versuchsergebnisse als Mittelwerte  $\pm$  SEM. Um signifikante Unterschiede zwischen den an verschiedenen Mutanten gemessenen  $IC_{50}$ -Werten zu ermitteln, wurden die aus den Einzelmessungen gewonnenen Werte benutzt, um einen ANOVA Test und einen post hoc Test nach Tukey durchzuführen. Als signifikant wurde ein p-Wert von  $< 0.05$  betrachtet. Die in Abbildung 7-13 dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus allen Messungen.

### 3 Ergebnisse

Zur Charakterisierung der Transporteigenschaften der rOCT1-Mutanten C451M, L447F/C451M, L447Y/C451M und Y222F/L447F/C451M wurden Tracer-Flux-Experimente durchgeführt. Als Substrat der Versuche fungierte das relativ kleine und gut untersuchte Tetraethylammonium. In Hemmkinetiken wurde die Hemmung des Tetraethylammoniums durch die ebenfalls gut untersuchten Stoffe Tetrabutylammonium und Kortikosteron untersucht.

#### 3.1 Hemmung der TEA-Aufnahme durch Tetrabutylammonium

Um festzustellen, wie sich die Mutation an Position 451 auf die Interaktion von TBuA mit dem rOCT1 auswirkt, wurde die Hemmung der TEA-Aufnahme durch TBuA untersucht. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass Tetrabutylammonium (TBuA) wie das Substrat Tetraethylammonium (TEA) eine quartäre Ammoniumverbindung ist. Es besitzt eine permanente positive Ladung und ist somit nicht membranpermeabel. Da TBuA ein nicht transportierter Hemmstoff ist und nicht passiv durch die Plasmamembran gelangen kann, wird durch die vorliegenden Versuche die Bindung an die extrazelluläre Konformation untersucht. Die Hemmung der TEA-Aufnahme durch TBuA entspricht einer kompetitiven Hemmung. Die  $IC_{50}$ -Werte sind der Tabelle 8 zu entnehmen.



Transporter	IC 50 -Wert $\pm$ SEM ( $\mu$ M)
rOCT1 (Gorboulev et al., 1999)	3,0 $\pm$ 2,0
C451M	7,07 $\pm$ 0,93 <sup>°</sup>
L447Y/C451M	2,27 $\pm$ 0,39
L447F/C451M	7,02 $\pm$ 0,39 <sup>*</sup>
Y222F/L447F/C451M	4,17 $\pm$ 0,92 <sup>*°♦</sup>

**Tabelle 8:**  $IC_{50}$ -Wert der rOCT1-Mutanten für die Hemmung der Tetraethylammonium-Aufnahme durch Tetrabutylammonium. Die  $IC_{50}$ -Werte sind in  $\mu$ M angegeben. Pro Mutante wurden 3-7 Versuche durchgeführt und die Hill-Gleichung wurde an die einzelnen Versuche angepasst. Die Mittelwerte der  $IC_{50}$ -Werte und deren Standard-Fehler sind angegeben. Die Signifikanzen wurden durch ANOVA mit post hoc Tukey-Vergleich bestimmt. Es sind die Signifikanzen der selbst ermittelten Daten angegeben.

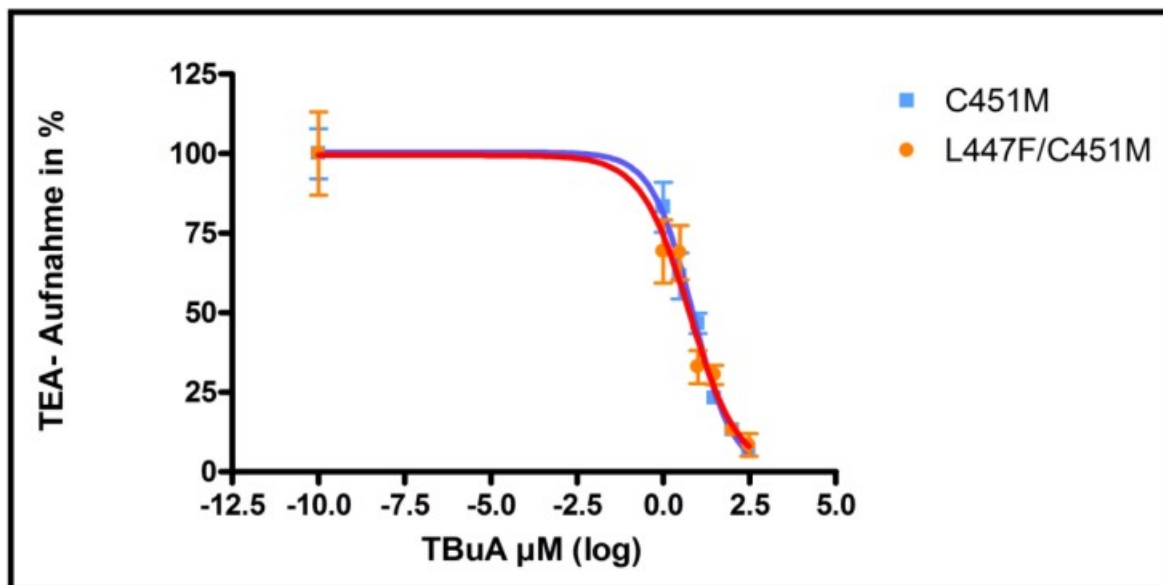
<sup>^</sup>  $p < 0,05$  zu L447Y/C451M

<sup>♦</sup>  $p > 0,05$  zu L447Y/C451M

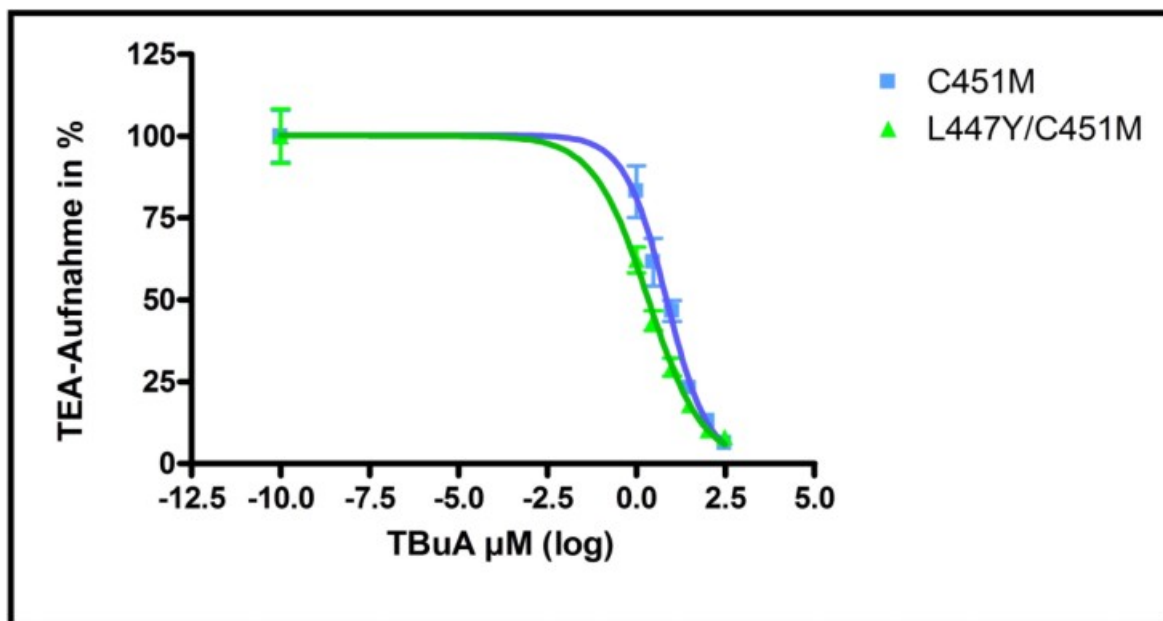
<sup>°</sup>  $p > 0,05$  zu L447F/C451M

<sup>\*</sup>  $p > 0,05$  zu C451M

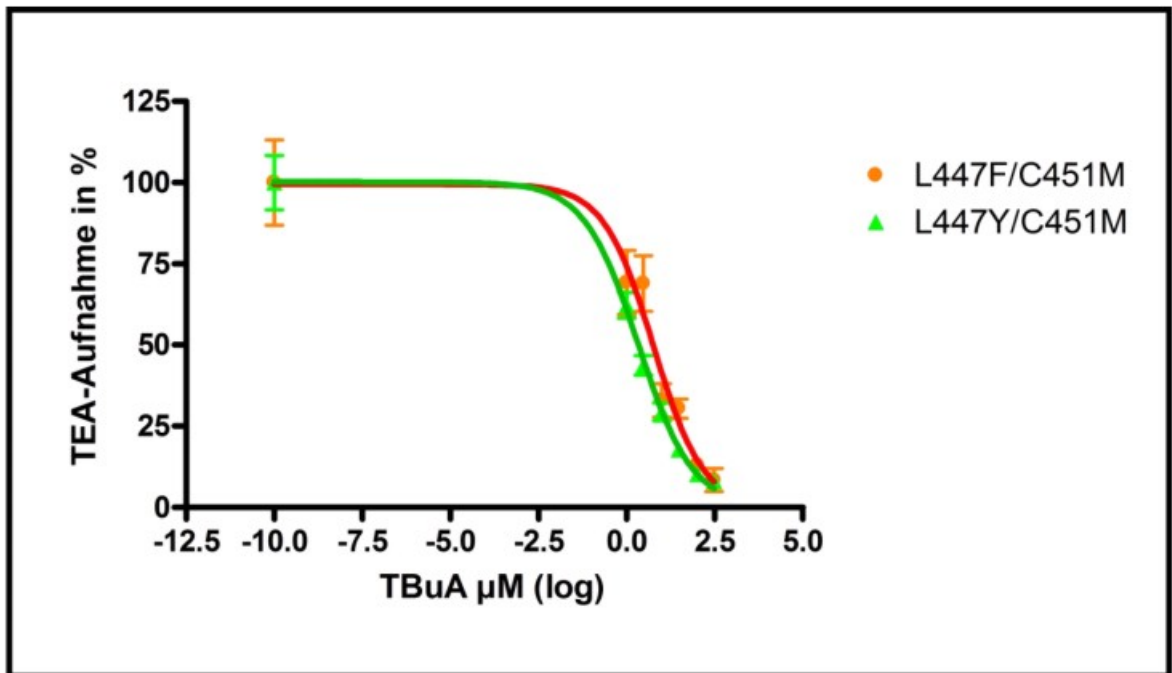
In den Abbildungen 6-8 ist die Hemmung der TEA-Aufnahme durch TBuA für die Mutanten C451M, L447F/C451M und L447Y/C451M dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die Mutante C451M ( $IC_{50} = 7,07 \pm 0,93$  ( $\mu$ M)) zu einer Erniedrigung der Affinität für die Hemmung der TEA-Aufnahme durch TBuA im Vergleich zum rOCT1-Wildtyp ( $IC_{50} = 3,0 \pm 2,0$  ( $\mu$ M); Gorboulev et al., 1999) führt. Bei der Mutante L447F/C451M wurde das Leucin des rOCT1 gegen das Phenylalanin, das natürlicherweise beim rOCT3 und hOCT3 zu finden ist, ausgetauscht. Die Daten zeigen, dass bei der Mutante L447F/C451M ( $IC_{50} = 7,02 \pm 0,39$  ( $\mu$ M)) keine signifikante Affinitätsänderung im Vergleich zur Grundmutante C451M ( $p > 0,05$ ) vorliegt (Abb.6; Tabelle 8). Bei der Mutante L447Y/C451M wurde an Position 447 das Leucin des rOCT1 gegen ein Tyrosin ausgetauscht, wie es beim rOCT2 vorkommt. Interessanterweise jedoch zeigte die Mutante L447Y/C451M ( $IC_{50} = 2,27 \pm 0,39$  ( $\mu$ M)) eine signifikante Affinitätsänderung im Vergleich zur Grundmutante C451M ( $p < 0,05$ ) (Abb.7; Tabelle 8) und zur L447F/C451M-Mutante ( $p < 0,05$ ) (Abb.8, Tabelle 8). Der signifikante Unterschied, vor allem zwischen den beiden Doppelmutanten L447F/C451M und L447Y/C451M ist bemerkenswert, da sich Phenylalanin und Tyrosin strukturell sehr ähneln und sich lediglich dadurch unterscheiden, dass das Tyrosin eine zusätzliche OH-Gruppe am aromatischen Ring besitzt.



**Abb.6:** Affinitäten der Mutanten C451M und L447F/C451M. Die Hemmung der TEA-Aufnahme durch Tetrabutylammonium wurde gemessen ( $N_{C451M}=7$ ;  $N_{L447F/C451M}=3$ ). Zur Anpassung der Kurve an die Messwerte wurde die Hill-Gleichung verwendet.

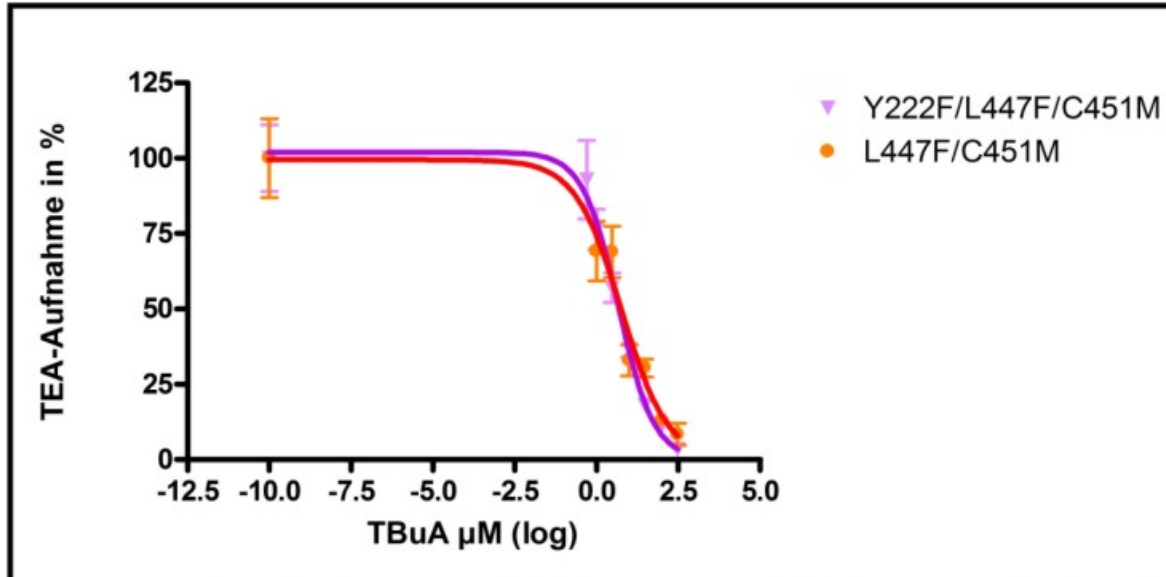


**Abb.7:** Affinitäten der Mutanten C451M und L447Y/C451M. Die Hemmung der TEA-Aufnahme durch Tetrabutylammonium wurde gemessen ( $N_{C451M}=7$ ;  $N_{L447Y/C451M}=3$ ). Zur Anpassung der Kurve an die Messwerte wurde die Hill-Gleichung verwendet.



**Abb.8:** Affinitäten der Mutanten *L447F/C451M* und *L447Y/C451M*. Die Hemmung der TEA-Aufnahme durch Tetrabutylammonium wurde gemessen ( $N_{L447F/C451M}=3$ ;  $N_{L447Y/C451M}=3$ ). Zur Anpassung der Kurve an die Messwerte wurde die Hill-Gleichung verwendet

Wenn Tyrosin 222 im rOCT1-Wildtyp durch Phenylalanin ersetzt wird (Y222F), erhöht sich die Affinität für TEA im Vergleich zum rOCT1-Wildtyp um den Faktor 3,3 (Popp 2004). Die Mutante Y222F zeigte außerdem eine signifikante Affinitätserhöhung bezüglich der Hemmung der TEA-Aufnahme durch Tetrapentylammonium (Popp et al., 2005). Es wurde nun untersucht, wie sich die Mutation von Tyrosin 222 in Phenylalanin auf dem Hintergrund der rOCT1-Mutante C451M auswirkt. Die Abbildung 9 zeigt, die Hemmung der TEA-Aufnahme durch TBuA der Mutanten L447F/C451M und Y222F/L447F/C451M. Vergleicht man die Graphen der Mutanten Y222F/L447F/C451M und L447F/C451M (Abb.9) miteinander, so ist zu erkennen, dass die Mutation an Position 222 keinen signifikanten Affinitätsunterschied bezüglich der Hemmung der TEA-Aufnahme durch TBuA herbeiführt. Die Dreifachmutante Y222F/L447F/C451M ( $IC_{50} = 4,17 \pm 0,92$  ( $\mu\text{M}$ )) zeigte weder zur Grundmutante C451M ( $p > 0,05$ ), noch zur Doppelmutante L447F/C451M ( $p > 0,05$ ) einen signifikanten Affinitätsunterschied (Tabelle 8).



**Abb.9:** Affinitäten der Mutanten L447F/C451M und Y222F/L447F/C451M. Die Hemmung der TEA-Aufnahme durch Tetrabutylammonium wurde gemessen ( $N_{Y222F/L447F/C451M}=4$ ;  $N_{L447F/C451M}=3$ ). Zur Anpassung der Kurve an die Messwerte wurde die Hill-Gleichung verwendet

### 3.2 Hemmung der TEA-Aufnahme durch Kortikosteron

Um festzustellen, wie sich die Mutation an Position 451 auf die Interaktion des Kortikosterons mit dem Transporter rOCT1 auswirkt, wurde die Hemmung der TEA-Aufnahme durch Kortikosteron untersucht. Hierbei ist zu beachten, dass Kortikosteron von den OCTs nicht transportiert wird (Popp, 2004). Es kann jedoch die Membran passiv überwinden (Arndt et al., 2001; Volk et al., 2003). Daher kann bei Tracer-Flux-Experimenten, wie sie hier vorliegen, keine Aussage darüber getroffen werden, ob Kortikosteron den Transporter von extrazellulär oder von intrazellulär hemmt. Bezüglich der Bindung des Kortikosterons an OCTs existieren bereits einige Studien. Untersuchungen belegen, dass Kortikosteron an beide Konformationen der Substratbindungsregion bindet (Koepsell et al., 2003; Volk et al., 2003; Gorboulev et al., 2005). Eine Studie aus dem Jahre 2009 zeigt, dass intrazelluläres Kortikosteron mit einer deutlich niedrigeren Affinität an den rOCT1 bindet, als extrazelluläres Kortikosteron (Volk et al., 2009). Im Gegensatz hierzu bindet Kortikosteron am rOCT2 mit höherer Affinität von intrazellulär (Volk et al., 2003). Die Bindungsstellen des TEAs und des Kortikosterons am Transporter sind teilweise identisch, jedoch nicht komplett. Grund hierfür könnte der deutliche Größenunterschied zwischen dem relativ kleinen TEA-Molekül und dem größeren Kortikosteron sein. So stellt man sich einen Hemmtyp vor, der zwischen einem kompetitiven und einem nichtkompetitiven Hemmtyp liegt. Die Hemmung von TEA durch Kortikosteron wird somit als teilweise kompetitive Hemmung beschrieben (Barendt und Wright, 2002). Die  $IC_{50}$ -Werte sind der Tabelle 9 zu entnehmen.

Transporter	$IC_{50}$ -Wert $\pm$ SEM ( $\mu$ M)
rOCT1 (Gorboulev et al., 2005)	$198 \pm 10$
L447Y (Gorboulev et al., 2005)	$42 \pm 9$
C451M	$27,71 \pm 6,05^\circ$
L447Y/C451M	$36,22 \pm 3,07^\diamond$
L447F/C451M	$1,84 \pm 0,59 * ^\wedge$
Y222F/L447F/C451M	$3,33 \pm 1,22 * \square$

**Tabelle 9:** :  $IC_{50}$ -Wert der rOCT1-Mutanten für die Hemmung der Tetraethylammonium-Aufnahme durch Kortikosteron. Die  $IC_{50}$ -Werte sind in  $\mu$ M angegeben. Pro Mutante wurden 3-4 Versuche durchgeführt und die Hill-Gleichung

wurde an die einzelnen Versuche angepasst. Die Mittelwerte der  $IC_{50}$ -Werte und deren Standard-Fehler sind angegeben. Die Signifikanzen wurden durch ANOVA mit post hoc Tukey-Vergleich bestimmt. Es sind die Signifikanzen der selbst ermittelten Daten angegeben.

\*  $p < 0,01$  zu C451M

°  $p < 0,01$  zu Y222F/L447F/C451M

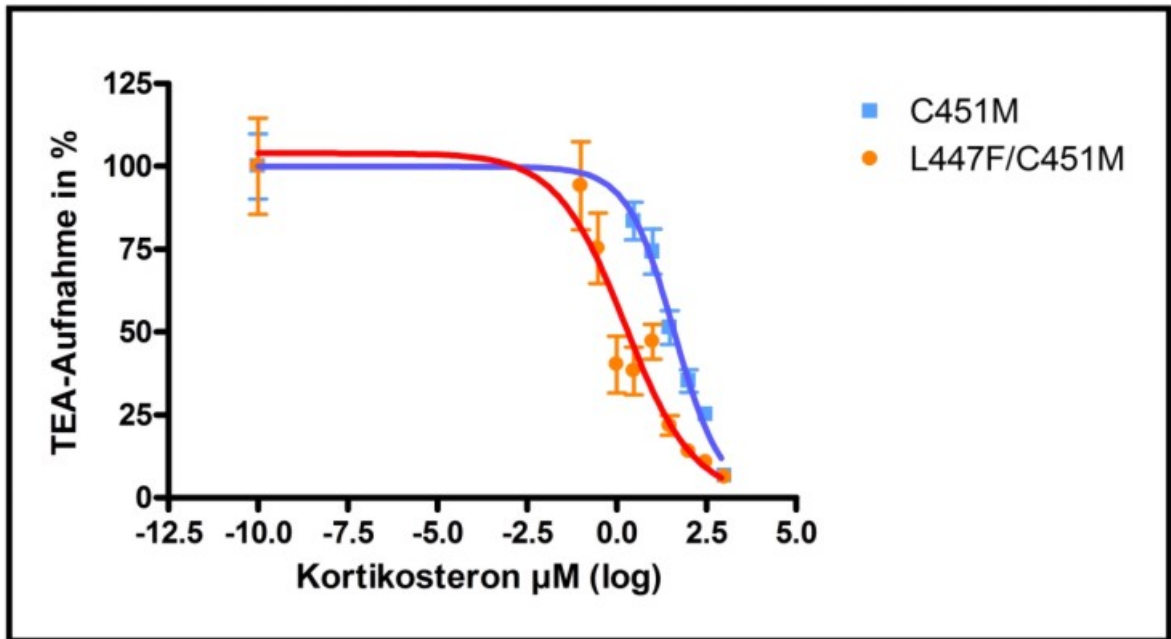
^  $p < 0,001$  zu L447Y/C451M

◆  $p > 0,05$  zu C451M

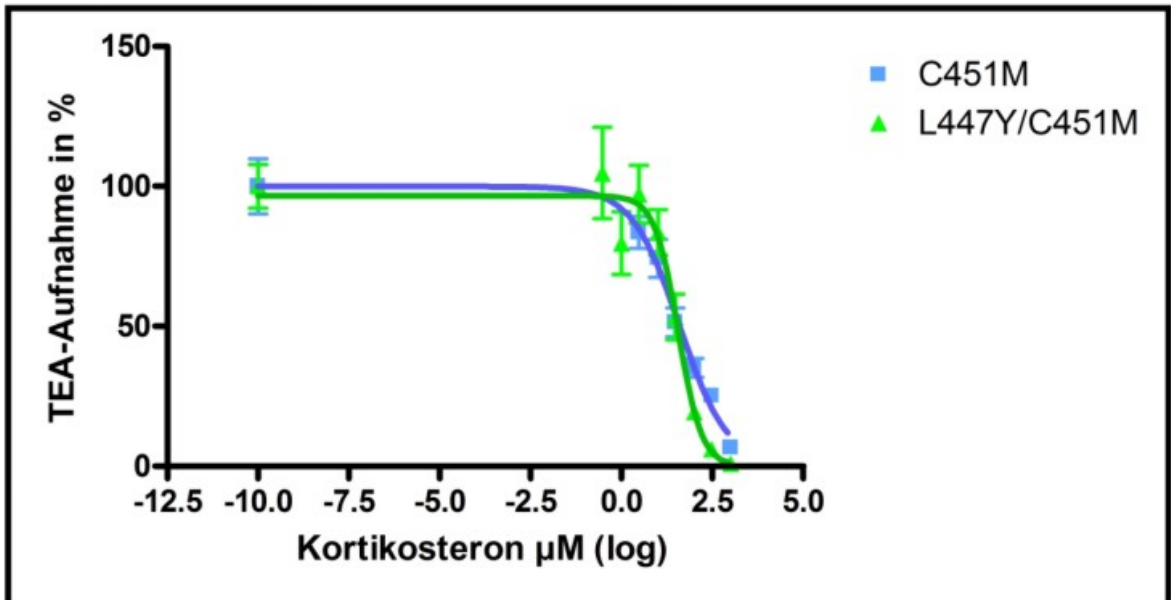
□  $p > 0,05$  zu L447F/C451M

In den Abbildungen 10-12 ist die Hemmung der TEA-Aufnahme durch Kortikosteron der Mutanten C451M, L447F/C451M und L447Y/C451M dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass der Austausch von Cystein 451 gegen Methionin der Mutante C451M ( $IC_{50} = 27,71 \pm 6,05$  ( $\mu\text{M}$ )) eine deutliche Affinitätserhöhung im Vergleich zu dem rOCT1-Wildtyp ( $IC_{50} = 198 \pm 10$  ( $\mu\text{M}$ ); Gorboulev et al., 2005) hervorruft. Man nimmt an, dass die Position 451 nicht direkt an der Substratbindung beteiligt ist. Durch die Mutation C451M scheint es zu einem allosterischen Effekt auf die Substratbindungsregion zu kommen, der die Raumstruktur dahingehend zu verändern scheint, dass die Kortikosteronbindung begünstigt wird, was sich in einer Affinitätserhöhung gegenüber dem rOCT1-Wildtyp äußert.

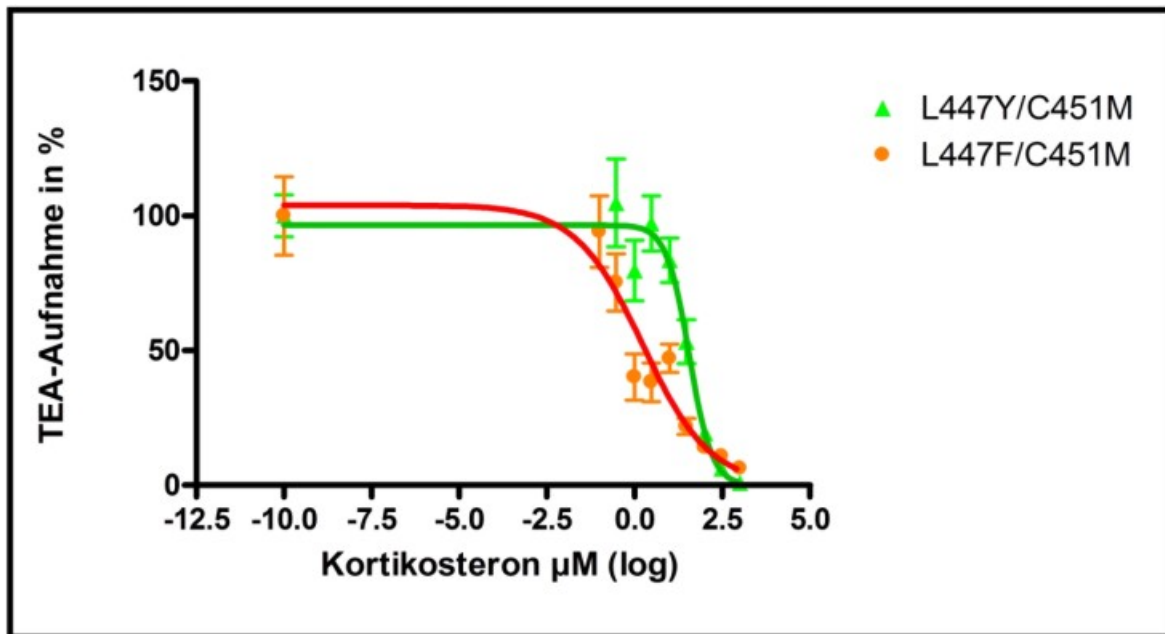
An der Position 447 wurde das Leucin gegen ein Phenylalanin oder gegen ein Tyrosin ausgetauscht. Die Mutante L447Y/C451M ( $IC_{50} = 36,22 \pm 3,07$  ( $\mu\text{M}$ )) zeigte keine signifikante Affinitätsänderung im Vergleich zur rOCT1-Mutante C451M ( $p > 0,05$ ) (Abb.11; Tabelle 9). Die Doppelmutante L447F/C451M ( $IC_{50} = 1,84 \pm 0,59$  ( $\mu\text{M}$ )) hingegen zeigte eine Affinitätsänderung verglichen mit der Mutante C451M ( $p < 0,01$ ) (Abb.10; Tabelle 9). Sie ist ebenfalls deutlich affiner als die Doppelmutante L447Y/C451M ( $p < 0,001$ ) (Abb.12; Tabelle 9). Dies ist interessant, da sich die beiden Mutanten lediglich durch eine OH-Gruppe an Position 447 unterscheiden.



**Abb. 10:** Affinitäten der Mutanten C451M und L447F/C451M. Die Hemmung der TEA-Aufnahme durch Kortikosteron wurde gemessen ( $N_{C451M}=4$ ;  $N_{L447F/C451M}=4$ ). Zur Anpassung der Kurve an die Messwerte wurde die Hill-Gleichung verwendet.



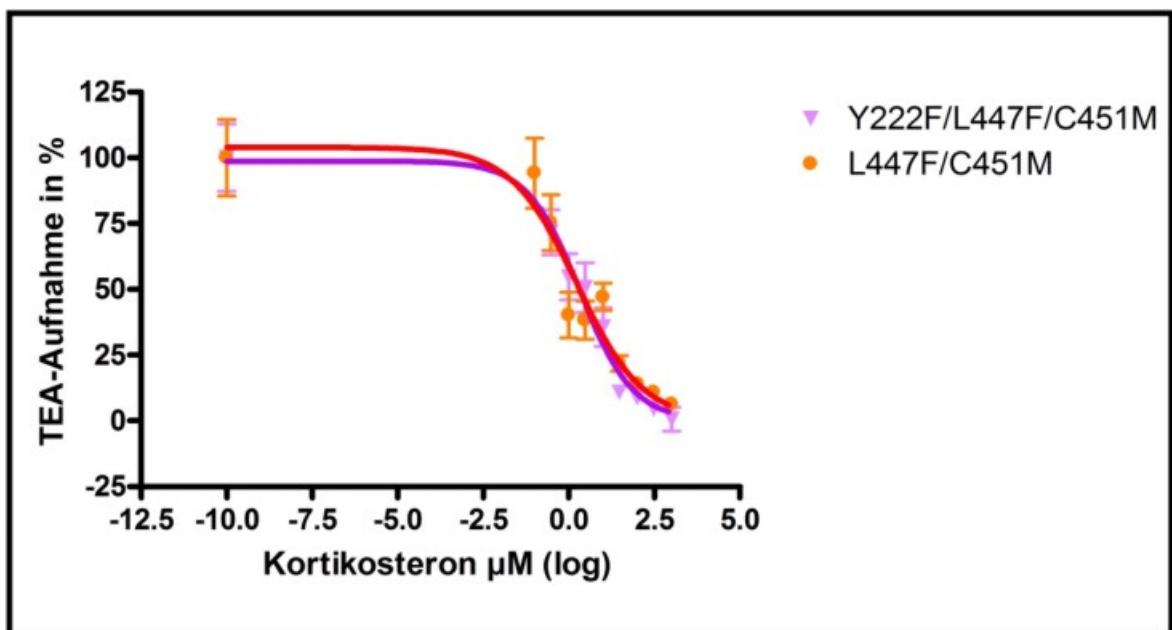
**Abb.11:** Affinitäten der Mutanten C451M zu L447Y/C451M. Die Hemmung der TEA-Aufnahme durch Kortikosteron wurde gemessen ( $N_{C451M}=4$ ;  $N_{L447Y/C451M}=3$ ). Zur Anpassung der Kurve an die Messwerte wurde die Hill-Gleichung verwendet.



**Abb.12:** Affinitäten der Mutanten L447Y/C451M zu L447F/C451M.. Die Hemmung der TEA-Aufnahme durch Kortikosteron wurde gemessen ( $N_{L447F/C451M}=4$ ;  $N_{L447Y/C451M}=3$ ). Zur Anpassung der Kurve an die Messwerte wurde die Hill-Gleichung verwendet.



Elektrische Messungen ergaben, dass sich die Affinität von Kortikosteron weder von außen noch von innen durch den Austausch von Tyrosin 222 gegen Phenylalanin weder im rOCT1-Wildtyp noch in der C451M-Mutante (rOCT1) ändert (Volk et al., 2009). Da Volk ermittelt hatte, dass die Mutation Y222F des rOCT3, der ein Phenylalanin in Position 447 enthält, die Affinität von Kortikosteron erhöht, wurde im Folgenden untersucht, ob in der rOCT1-Mutante L447F/C451M der zusätzliche Austausch von Y222F die Affinität von Kortikosteron erhöht. Abbildung 13 ist zu entnehmen, dass dies nicht der Fall war. Der Vergleich der Mutanten L447F/C451M ( $IC_{50} = 1,84 \pm 0,59$  ( $\mu\text{M}$ )) und Y222F/L447F/C451M ( $IC_{50} = 3,33 \pm 1,22$  ( $\mu\text{M}$ )) (Abb.13) zeigt keinen signifikanten Affinitätsunterschied ( $p > 0,05$ ). Dies bedeutet, dass neben Phe447 in rOCT3 noch andere zwischen rOCT1 und rOCT3 unterschiedliche Aminosäuren an der Bindung von Kortikosteron beteiligt sein müssen.



**Abb.13:** Affinitäten der Mutanten L447F/C451M und Y222F/L447F/C451M. Die Hemmung der TEA-Aufnahme durch Kortikosteron wurde gemessen ( $N_{Y222F/L447F/C451M}=3$ ;  $N_{L447F/C451M}=4$ ). Zur Anpassung der Kurve an die Messwerte wurde die Hill-Gleichung verwendet.

## 4 Diskussion

Bis heute ist noch weitgehend unverstanden, wie die OCTs ihre Substrate und Inhibitoren erkennen und wie die Substrattranslokation von statten geht (Volk et al., 2009). Diese Dissertation soll zur Klärung dieser Frage beitragen.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Hemmung der TEA-Aufnahme durch die Inhibitoren TBuA und Kortikosteron mittels Tracer-Flux-Experimenten durchgeführt. Die Messungen ergaben, dass die Mutante C451M zu einer deutlichen Affinitätssteigerung bezüglich Kortikosteron und zu einer Erniedrigung der TBuA-Affinität führt. Weiterhin wurden die Doppelmutanten L447F/C451M und L447Y/C451M untersucht. Die Mutante L447Y/C451M zeigte eine erhöhte Affinität für TBuA, jedoch keine Affinitätsänderung für Kortikosteron. Bei der Mutante L447F/C451M verhielt es sich genau entgegengesetzt. Sie war deutlich affiner für Kortikosteron, aber zeigte keine Affinitätsänderung für TBuA.

Ebenso wurde die Dreifachmutante Y222F/L447F/C451M untersucht. Sie zeigte keine veränderten Affinitäten verglichen mit der Doppelmutante L447F/C451M.

### **Wechselwirkungen zwischen Liganden und Bindungsstellen in Proteinen**

Die dreidimensionale Struktur von Proteinen entsteht durch Faltung in  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter und Interaktion der Sekundärstrukturen. Die Strukturen werden durch Wasserstoffbrückenbindungen, Ionenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen und Disulfidbrücken gebildet und stabilisiert (Gallivan und Dougherty, 1999). Auch Kation- $\pi$ -Interaktionen sind bedeutende, nonkovalente Bindungsinteraktionen in der Strukturbiologie (Gallivan und Dougherty, 1999; Dougherty, 2007). Sie steuern so ebenfalls einen bedeutenden Beitrag zur Stabilisation der proteinogenen Strukturen bei (Dougherty 1996; Ma und Dougherty, 1997; Gallivan und Dougherty, 1999; Crowley und Golovin, 2005). Die Bindung von Liganden in Proteinbindungsstellen kann ebenfalls durch Wasserstoffbrückenbindungen, Ionenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen und Kation- $\pi$ -Interaktionen erfolgen.

Aromatische Aminosäuren können durch die Elektronen ihrer  $\pi$ -Orbitale mit Kationen, wie zu Beispiel mit Metallen und organischen Ionen, Kation- $\pi$ -Interaktionen ausbilden (Dougherty, 1996; Casanova et al., 2010). Kation- $\pi$ -Interaktionen sind nichtkovalente Interaktionen zwischen einem Kation und den Elektronen eines  $\pi$ -Orbitals des aromatischen Rings. Solche Interaktionen können von den aromatischen Aminosäuren mit dem Substrat (Zhong et al., 1998; Wouters 1998) oder mit positiv geladenen Aminosäureresten des Proteins selbst eingegangen werden (Gallivan und Dougherty, 1999). In der Natur kommen solche Interaktionen vor allem zwischen den kationischen Gruppen von Lysin oder Arginin mit dem  $\pi$ -Orbital eines Phenylalanins, Tyrosins oder Tryptophans vor (Dougherty, 2007; Tantry et al., 2010). Messungen von Dougherty aus dem Jahre 1996 postulierten eine Bindungsenergie zwischen einem Benzolring und einem quartären Ammonium von 19,0 - 22,2 kal/mol und für einen Phenolring von 20,5 kal/mol.

Ebenfalls sind Kation- $\pi$ -Interaktion bei der Bindung der Neurotransmitter Acetylcholin, GABA, Dopamin, NMDA und Adrenalin an ihren Rezeptor (Zhong et al., 1998; Lummis et al., 2005) beteiligt. Für den GABA-Rezeptor wurde eine Kation- $\pi$ -Interaktion eines in der Bindungsregion lokalisierten Tyrosins beschrieben (Lummis et al., 2005). Mutationsstudien am Tyr381 des M1 muskarinergen Achetylcholinrezeptor zeigten, dass das Tyrosin eine Kation- $\pi$ -Interaktion mit dem Acethylcholin eingeht (Ward et al., 1999). Ebenso denkbar wäre eine solche Interaktion zwischen dem Tyrosin und dem TBuA-Molekül. Kritisch anzumerken ist jedoch, dass die Seitenketten des Tetrabutylammoniums relativ lang sind und somit eine Kation- $\pi$ -Interaktion theoretisch möglich, jedoch unwahrscheinlich ist.

#### **4.1 Die Mutation C451M – Die Bedeutung der Position 451 für das Bindungsverhalten von TBuA und Kortikosteron**

Die Position 451 liegt zwischen der 10. Transmembrandomäne und der kurzen Schleife, die die 10. und die 11. TMH verbindet (Sturm et al., 2007). Es wurde die Mutante C451M des rOCT1 als Grundmutante der vorliegenden Versuche gewählt, da sie sich bereits in mehreren Publikationen als gut messbare Mutante herausstellte (Sturm, 2005). So liefert sie bei der voltage-clamp-Methode gute Ströme, ohne die Affinität im Vergleich zum rOCT1-Wildtyp zu verändern.

Die vorliegenden Versuche ergaben, dass der Austausch eines Cysteins gegen ein Methionin an Position 451 des rOCT1 zu einer Veränderung der Affinitäten des Transporters bezüglich der TBuA- und Kortikosteronbindung führt. So wird der Transporter durch die Mutation C451M deutlich affiner im Bezug auf die Kortikosteronbindung. Der  $IC_{50}$ -Wert sinkt von  $198 \pm 10$  ( $\mu\text{M}$ ) (Gorboulev et al., 2005) des rOCT1-Wildtyps auf  $27,71 \pm 6,05$  ( $\mu\text{M}$ ) der Mutante C451M. Bei der TBuA-Affinität verhält es sich gegenläufig. Hier bewirkt die Mutation C451M einen Affinitätsabfall. Die Mutante C451M zeigte einen  $IC_{50}$ -Wert von  $7,07 \pm 0,93$  ( $\mu\text{M}$ ), der Wildtyp von  $3,0 \pm 2,0$  ( $\mu\text{M}$ ) (Gorboulev et al., 1999). Ursächlich hierfür könnte die Tatsache sein, dass das Cystein eine freie SH-Gruppe besitzt, die C451M-Mutante dagegen nicht. Das Cystein wäre also im Prinzip in der Lage Disulfidbrücken auszubilden, durch die die Tertiärstruktur und die Struktur der Bindungstasche verändert werden könnte. So zeigten Hirs et al., dass eine Ribonuclease bei Reduktion der Disulfidbrücken ihre enzymatische Aktivität verlor (Hirs et al., 1960). Sturm et al. untersuchten die Cysteine des rOCT1 mittels MMTS. Dabei stellte sich heraus, dass die Cysteine 451 und 322 keine Disulfidbrücken eingehen, da beide Cysteine mit MMTS modifizierbar waren (Sturm et al., 2007). Somit können Disulfidbrücken als Ursache der nach Austausch des Cysteins 451 gegen Methionin beobachteten Affinitätsänderungen ausgeschlossen werden.

Aufgrund der generierten Modelle wird angenommen, dass sich die Aminosäure in Position 451 nicht direkt an der Substratbindung beteiligt, da sie außerhalb der modellierten Substratbindungsspalte liegt. Postuliert wird zudem, dass die Mutante in

Position 451 einen allosterischen Effekt auf die Substratbindungsstelle hat. Man stellt sich vor, dass es durch den Austausch des Cysteins 451 gegen ein Methionin zu einer räumlichen Verschiebung in der nahegelegenen Substratbindungstasche kommt. So wird angenommen, dass die Mutation C451M unter anderem die Position der Aminosäure 447, die an der Bindung von Liganden beteiligt ist, leicht verändert, so dass die Kortikosteronbindung aufgrund der neuen Raumstruktur der Bindungstasche einfacher bindet. Die Bindung von TBuA hingegen wird durch den von C451M hervorgerufenen allosterischen Effekt erschwert. Dies erklärt die erhöhte Affinität der C451M- Mutante für Kortikosteron und die Affinitätserniedrigung für TBuA.

## 4.2 Bedeutung der Position 447 für das Bindungsverhalten von TBuA und Kortikosteron

Die Aminosäure an Stelle 447 ist Bestandteil der Substratbindungstasche und somit von entscheidender Bedeutung. Es sollte nun untersucht werden, ob der von der Mutante C451M hervorgerufene allosterische Effekt auch die durch Mutationen hervorgerufenen Effekte an Position 447 beeinflusst und ob ein signifikanter Affinitätsunterschied zwischen den Mutanten L447F/C451M und L447Y/C451M existiert. Im Versuch wurde an Position 447 das Leucin des rOCT1 zum einen gegen Tyrosin, das sich bei rOCT2 in dieser Position befindet, und gegen ein Phenylalanin, das sich beim rOCT3 in dieser Position befindet, ausgetauscht. Tyrosin und Phenylalanin sind zwei strukturell sehr ähnliche Aminosäuren. Tyrosin unterscheidet sich lediglich durch eine zusätzliche Hydroxylgruppe am aromatischen Ring vom Phenylalanin. Somit ist Tyrosin eine polare, Phenylalanin hingegen eine unpolare aromatische Aminosäure.

### 4.2.1 Hemmung der TEA-Aufnahme durch TBuA

Für die Hemmung der TEA-Aufnahme durch TBuA zeigte sich, dass der Austausch des Leucins gegen das Phenylalanin der Mutante L447F/C451M ( $IC_{50} = 7,02 \pm 0,39$  ( $\mu\text{M}$ )) keine signifikante Affinitätsänderung ( $p > 0,05$ ) im Vergleich zur Grundmutante C451M ( $IC_{50} = 7,07 \pm 0,93$  ( $\mu\text{M}$ )) herbeiführte. Die Mutante L447Y/C451M ( $IC_{50} = 2,27 \pm 0,39$  ( $\mu\text{M}$ )) hingegen, bei der das Leucin gegen ein Tyrosin ausgetauscht wurde zeigte eine signifikante Affinitätserhöhung ( $p < 0,05$ ). Wie ist dies zu erklären?

Hierfür gibt es zwei Erklärungsansätze. Zum einen (A) könnte diese Affinitätsänderung auf einer Interaktion zwischen dem TBuA-Molekül und der Hydroxylgruppe beruhen, zum anderen (B) könnte die zusätzliche OH-Gruppe zu einer Veränderung der Tertiärstruktur und dadurch zu einem veränderten Bindungsverhalten des Transporters mit dem TBuA-Molekül führen.

(A) Eine Änderung der direkten Interaktion durch den Austausch von Phenylalanin gegen Tyrosin oder entgegengesetzt könnten wie folgt erklärt werden:

- (a) Tyrosin besitzt durch die zusätzliche Hydroxylgruppe eine höhere Elektronendichte als Phenylalanin. Möglich wäre eine ionische Interaktion des Sauerstoffes der Hydroxylgruppe mit dem Stickstoffatom des TBuA-Moleküls, das als Kation vorliegt. Da jedoch Tetrabutylammonium relativ lange Seitenketten besitzt, ist eine solche Bindung als unwahrscheinlich einzustufen.
- (b) Denkbar wäre auch eine Kation- $\pi$ -Interaktion. In der vorliegenden Literatur wurden immer wieder Kation- $\pi$ -Interaktionen zwischen kationischen Substraten und Membranproteinen beschrieben. Man könnte sich somit ebenso eine solche Interaktion zwischen dem Tyrosin an Stelle 447 und dem TBuA-Molekül vorstellen. Mecozzi et al. beschrieben, dass ein Phenol zwar deutlich reaktiver in elektrophiler Weise ist, jedoch im Bezug zu Kation- $\pi$ -Interaktion keine größere Bindungskraft als ein Benzol aufweist. Mecozzi beschreibt aber auch, dass in der Vergangenheit immer wieder beobachtet wurde, dass das Tyrosin im Bezug zu Kationen- $\pi$ -Interaktion dem Phenylalanin vorgezogen wird. Eine mögliche Ursache hierfür könnte demnach sein, dass ein Wasserstoffbrückenbindungsakzeptor mit der Hydroxylgruppe des Phenols des Tyrosins interagiert und somit nicht nur das Tyrosin positioniert, sondern sich auch auf die Kationen- $\pi$ -Interaktion auswirkt (Mecozzi et al., 1996). Er zeigte am Phenol-Formamid, dass die Interaktion des Wasserstoffbrückenbindungsakzeptors mit dem Phenol die negative elektrostatische Ladung des aromatischen Rings erhöht und somit die Kationen- $\pi$ -Interaktion in solch einem System größer ist, als die eines einzelnen Phenols. Übertragen auf den Vergleich zwischen dem Tyrosin und dem Phenylalanin bedeutet dies, dass die Wasserstoffbrückenbindung zur Hydroxylgruppe des Phenols das Tyrosin bei der genauen Positionierung des Ringes unterstützt und somit die Kation- $\pi$ -Interaktionen begünstigt (Mecozzi et al., 1996). Er schreibt jedoch weiterhin, dass bei solchen Zusammenspielen die jeweilige Proteinstruktur berücksichtigt werden muss. Kation- $\pi$ -Interaktionen sind somit auch als Erklärung der Ergebnisse dieser Arbeit ein interessanter Ansatzpunkt. Es müssten hierzu jedoch weitere Studien durchgeführt werden.
- (B) Die zweite Hypothese für die Affinitätsveränderung ist, dass die zusätzliche Hydroxylgruppe des Tyrosins eine Veränderung der Tertiärstruktur hervorruft und somit die Bindung des TBuA-Moleküls verbessert. Diese Tertiärstrukturänderung

könnte einige Ursachen haben:

- (a) Die zusätzliche Hydroxylgruppe und die somit gegenüber dem Phenylalanin erhöhte Elektronendichte könnte zu Abstoßungsreaktionen innerhalb des Transportermoleküls führen, was sich in einer Strukturänderung äußert.
- (b) Tyrosin kann als Donator einer Wasserstoffbrückenbindung fungieren (Lummis et al., 2005). So könnte die Hydroxylgruppe des Tyrosins eine Wasserstoffbrückenbindung mit einem Aminosäurerest innerhalb des rOCT1 ausbilden. Diese würde ebenso zu einer Veränderung der Tertiärstruktur führen. Ähnliche Wasserstoffbrückenbindungen werden zwischen dem Y55 und dem H228, bzw. dem K229 der Serinhydroxymethyltransferase des E.coli (Vivoli et al., 2009) beschrieben.

In beiden Fällen würde durch diese strukturelle Änderung das Tetrabutylammonium-Molekül besser von dem Transporter gebunden, was sich in einer Affinitätserhöhung niederschlägt.

- (c) Möglich wäre aber auch eine Kation- $\pi$ -Interaktion zwischen zwei Aminosäureresten innerhalb des Transportermoleküls, die zu einer Strukturveränderung und dadurch zu einem veränderten Bindungsverhalten führen könnten. So beschreiben Gallivan und Dougherty 1999, dass es innerhalb eines Proteins zu Kation- $\pi$ -Interaktionen zwischen bestimmten Aminosäurepaaren kommt. Sie können zwischen den kationischen Seitenketten eines Arginin oder Lysins mit den aromatischen Seitenketten von Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan auftreten. Als Beispiel sei hier die Kation- $\pi$ -Interaktion zwischen dem Tyrosin an Position 55 und dem Arginin an Position 235 der Serinhydroxymethyltransferase genannt (Vivoli et al., 2009). Gallivan und Dougherty weisen jedoch darauf hin, dass der Unterschied in der Häufigkeit der Ausbildung von Kation- $\pi$ -Interaktionen zwischen Tyrosin und Phenylalanin auf andere Effekte zurückzuführen sein muss. Beispielsweise auf die Fähigkeit der OH-Gruppe des Tyrosins als Donor für Wasserstoffbrückenbindungen zu fungieren, wie es bereits Mecozzi et al. 1996 beschrieben (Mecozzi et al., 1996; Gallivan und Dougherty 1999). Ob Kation- $\pi$ -Interaktionen beim rOCT1 vorkommen und in wie weit sie sich auf das Bindungsverhalten des TBuA-Moleküls oder die Raumstruktur des Transporters auswirken, wäre ein Ansatzpunkt für zukünftige Studien.



- (d) Die Hydroxylgruppe des Tyrosins könnte auch zu einer freieren Beweglichkeit und somit einem besseren Bindungsverhalten dieser Aminosäure führen. Popp postulierte ein ähnliches Verhalten beim Austausch des Tryptophans 218 gegen ein Tyrosin. Im Vergleich zum starren Indolring des Tryptophans ist die Hydroxylgruppe des Tyrosins beweglicher (Popp, 2004). So ist auch das Ringsystem des Phenylalanins relativ starr und unbeweglich im Vergleich zu der Hydroxylgruppe. Es ist vorstellbar, dass die OH-Gruppe freier im Raum beweglich ist und somit günstigere Voraussetzungen für die Bindung des TBuA-Moleküls mit sich bringt.
- (e) Auch eine Lageänderung des Phenylalanins verglichen mit dem Tyrosin könnte zu einem veränderten Bindungsverhalten des TBuA-Moleküls führen. In einer Studie von Vivoli et al. aus dem Jahre 2009 wird an dem Enzym Serinhydroxymethyltransferase ein ähnlicher Austausch beschrieben. Hier wird an Stelle 55 ein Tyrosin gegen ein Phenylalanin ausgetauscht und man konnte kristallographisch zeigen, dass das Phenylalanin im Vergleich zum Tyrosin seine Position verlagert und um 90° gedreht hat. Dies führte zu deutlichen Unterschieden im Bindungsverhalten im Vergleich zu Y55. So ist durchaus denkbar, dass Tyrosin und Phenylalanin an Position 447 unterschiedlich im Raum liegen und daher die Mutation L447Y/C4451M der L447F/C451M-Mutante sterisch im Vorteil im Bezug auf die TBuA-Bindung ist.

#### **4.2.2 Hemmung der TEA-Aufnahme durch Kortikosteron**

Studien belegen, dass es beim Austausch des Leucins gegen ein Tyrosin an Stelle 447 zu einer Affinitätssteigerung für Kortikosteron kommt (Gorboulev et al., 2005; Volk et al., 2009). Diese Affinitätssteigerung wurde sowohl für extra-, als auch für intrazelluläres Kortikosteron gezeigt. Somit schien der Position 447 der zehnten Transmembrandomäne eine bedeutende Rolle bei der Kortikosteronaffinität zuzukommen. Um dies weiter zu untersuchen, wurden die Mutanten L447F/C451M, L447Y/C451M und Y222F/L447F/C451M mittels Tracer-Flux-Experimenten untersucht. Beim Betrachten der Ergebnisse im Kontext der bereits veröffentlichten Daten zu diesem Thema stellen sich nun zwei Fragen: Erstens, die Mutanten C451M, L447Y und L447Y/C451M sind ähnlich affin für die Hemmung der TEA-Aufnahme durch Kortikosteron und deutlich affiner als der rOCT1-Wildtyp, es kommt jedoch

durch die Doppelmutation zu keiner weiteren Affinitätserhöhung. Wie ist das zu erklären (4.2.2.1)? Zweitens, wie ist der deutliche Affinitätsunterschied der Mutanten L447Y/C451M und L447F/C451M zu erklären (4.2.2.2.)?

#### ***4.2.2.1 Vergleich der Einzelmutanten C451M, L447Y mit der Doppelmutante L447Y/C451M***

Die Mutante C451M zeigt einen  $IC_{50}$  von  $27,71 \pm 6,05 \mu\text{M}$ . Der  $IC_{50}$  für die Mutante L447Y, der 2005 von Gorboulev et al. veröffentlicht wurde, beträgt  $42 \pm 9 \mu\text{M}$ . Für die Doppelmutante L447Y/C451M ergab sich ein  $IC_{50}$  von  $36,22 \pm 3,07 \mu\text{M}$ . Die drei Mutanten C451M, L447Y und L447Y/C451M zeigen eine ähnliche Affinität für Kortikosteron, sind jedoch deutlich affiner als der rOCT1-Wildtyp mit einem  $IC_{50}$  von  $198 \pm 10 \mu\text{M}$  (Gorboulev et al., 2005).

Bemerkenswerter Weise unterscheiden sich die oben beschriebenen Daten von Ergebnissen, die von Volk und Mitarbeitern publiziert wurden (Volk et al., 2009). Es wurde nämlich berichtet, dass die Mutation in Position 451 keine Affinitätsänderung für Kortikosteron herbeiführt (Sturm et al., 2007; Volk et al., 2009). Die differierenden Ergebnisse in meiner Arbeit zeigen, dass diese Aussage nicht allgemein gültig ist, sondern nur für die von Volk et al. angewandten Versuchsbedingungen gilt (siehe Anhang \*\*). Weiterhin zeigte sich im Vergleich zu den Ergebnissen von Volk et al. aus dem Jahre 2009 kein signifikanter Affinitätsunterschied zwischen den Mutanten C451M und L447Y/C451M ( $p > 0,05$ ). Dies lässt sich darauf zurückführen, dass hier zwei verschiedene Techniken zur Bestimmung herangezogen wurden. Die Ergebnisse von Volk et al. wurden mittels „voltage-clamp“-Technik, die Daten der vorliegenden Arbeit mittels Tracer-Flux-Experimenten erbracht. Des Weiteren wurde in den Versuchen von Volk et al.  $\text{MPP}^+$  und nicht  $\text{TEA}^+$  als Substrat verwendet. Dennoch ist die Stelle 447 von großer Bedeutung im Bezug auf die Kortikosteron-Bindung.

Aber wie ist nun zu erklären, dass die Doppelmutante keinen Affinitätsanstieg im Vergleich zu den Einzelmutanten C451M und L447Y zeigt?

Es wird angenommen, dass die Mutation C451M einen indirekten Effekt auf die Substratbindungsregion ausübt. So ist wahrscheinlich, dass es durch die Mutation C451M zu einer Verschiebung der zehnten Transmembrandomäne kommt, was die Bindungsregion räumlich verändert. Hierdurch wäre erklärt, warum sich die

Doppelmutante L447Y/C451M von den Einzelmutanten C451M und L447Y nicht maßgeblich unterscheidet. Die Mutation C451M verschiebt die zehnte TMH so, dass es durch die nun veränderte Raumstruktur der Substratbindungstasche zu keiner weiteren Affinitätserhöhung durch die Mutation an Position L447Y kommt.

#### ***4.2.2.2 Wie ist der Affinitätsunterschied der Mutanten L447Y/C451M und L447F/C451M zu erklären?***

Die Mutante L447Y/C451M zeigt, wie bereits beschrieben, keine signifikante Affinitätsänderung im Vergleich zur Grundmutante C451M ( $p > 0,05$ ). Wird aber nun das Leucin an Position 447 nicht gegen ein Tyrosin, sondern gegen das Phenylalanin des rOCT3 ausgetauscht, so ist eine deutliche Affinitätserhöhung zu erkennen ( $p < 0,01$  zu C451M). Tyrosin und Phenylalanin sind beide aromatische Aminosäuren, die sich lediglich durch eine Hydroxylgruppe unterscheiden. Nun kommt die Frage auf, warum nicht auch Tyrosin eine Affinitätsänderung hervorruft. Wie bereits oben beschrieben wird angenommen, dass die Mutation C451M einen indirekten Effekt auf die Substratbindungstasche ausübt, was wahrscheinlich eine Lageänderung der Position 447 bedingt. Diese Lageänderung gilt jedoch sowohl für die Mutation L447F/C451M und L447Y/C451M, da beide als Hintergrundmutation die C451M- Mutation tragen. Somit scheint das Phenylalanin dem Tyrosin bezüglich der Kortikosteronbindung bevorzugt zu sein. Drei Erklärungen sind nun für die Affinitätsänderung ( $p < 0,001$ ) der Mutante L447F/C451M gegenüber der Mutante L447Y/C451M denkbar:

- (a) Die Hydroxylgruppe des Tyrosinrestes geht mit Aminosäureresten innerhalb des Transporters eine Wasserstoffbrückenbindung ein, was sich negativer auf das Bindungsverhalten auswirkt. Dieses negativere Bindungsverhalten könnte somit auf eine veränderte Raumstruktur der Bindungsstelle durch die Hydroxylgruppe zurückzuführen sein. Das Phenylalanin besitzt keine Hydroxylgruppe und kann somit auch keine Wasserstoffbrückenbindung eingehen, die die Raumstruktur negativ beeinflussen könnten.
- (b) Durch die OH-Gruppe des Tyrosins und die dadurch erhöhte Elektronendichte kommt es zu Abstoßungsreaktionen innerhalb des Transporters, was ebenfalls die Struktur des Transporters negativ in Bezug auf das Bindungsverhalten zu Kortikosteron beeinflusst.
- (c) Wie bereits anhand der Serinhydroxymethyltransferase (Vivoli et al., 2009)

beschrieben, könnte auch eine sterische Änderung, bedingt durch eine Lageänderung des Phenylalanins im Vergleich zum Tyrosin, für die Affinitätsunterschiede der Mutanten L447F/C451M und L447Y/C451M zu Kortikosteron ursächlich sein. Somit könnte der Phenylalaninrest für die Kortikosteronbindung günstiger im Raum liegen.

Es lässt sich somit zusammenfassen, dass der Austausch des unpolaren Leucins gegen das polare, aromatische Tyrosin der Mutante L447Y/C451M zu keiner signifikanten Affinitätsänderung verglichen mit der Grundmutante C451M führt, obwohl auch die Einzelmutante L447Y eine deutliche Affinitätserhöhung zum rOCT1-Wildtyp zeigt. Dies ist durch die Annahme zu erklären, dass C451M einen indirekten Effekt auf die Substratbindungstasche ausübt, der sie dahingehend verändert, dass es trotz Doppelmutation L447Y/C451M zu keiner weiteren Affinitätserhöhung kommt. Durch die von C451M hervorgerufene Veränderung der Bindungstasche hingegen scheint das Phenylalanin der Mutante L447F/C451M dem Tyrosin der Mutante L447Y/C451M bezüglich der Kortikosteronbindung im Vorteil zu sein.

### 4.3 Bedeutung der Position 222 für das Bindungsverhalten von TBuA und Kortikosteron

Kortikosteron ist als Inhibitor hundertmal potenter für den hOCT3 als für den hOCT1 oder hOCT2 (Hayer-Zillgen et al., 2002). Man nimmt an, dass das Tyrosin 222 des hOCT3 für dessen erhöhte Kortikosteronaffinität von entscheidender Bedeutung ist. In dieser Arbeit wurde an Position 222 das Tyrosin, das beim rOCT1, rOCT2 und hOCT3 zu finden ist, gegen das Phenylalanin des rOCT3 ausgetauscht. Phenylalanin ist ebenso wie Tyrosin eine aromatische Aminosäure, die jedoch keine hydrophile Hydroxylgruppe besitzt.

Bezüglich der Hemmung der TEA-Aufnahme durch TBuA zeigte sich, dass ein Verlust der Hydroxylgruppe, wie es beim Phenylalanin vorliegt, zu keinem verbesserten Bindungsverhalten zwischen der Position 222 und dem TBuA-Molekül führt. Im direkten Vergleich der Dreifachmutante Y222F/L447F/C451M ( $IC_{50} = 4,17 \pm 0,92$  ( $\mu\text{M}$ )) mit der Doppelmutante L447F/C451M ( $IC_{50} = 7,02 \pm 0,39$  ( $\mu\text{M}$ )) ist kein signifikanter Affinitätsunterschied zu erkennen ( $p > 0,05$ ). Zwar scheint die Dreifachmutante etwas affiner zu sein, jedoch nicht in einem Ausmaß, das als signifikant beurteilt werden könnte. Dieser Effekt könnte darauf beruhen, dass durch die Mutation C451M, die nicht direkt an der Substratbindung beteiligt ist, mittels eines indirekten Effektes die vierte Transmembrandomäne etwas verschiebt, so dass die Aminosäure an Position 222 etwas günstiger für die Bindung des TBuA-Moleküls im Raum liegt. Der Position 222 kommt somit aller Wahrscheinlichkeit nach keine Schlüsselrolle bei der TBuA-Bindung zu.

Auch bei der Hemmung der TEA-Aufnahme durch Kortikosteron zeigte sich keine signifikante Affinitätsänderung ( $p > 0,05$ ) der Mutante Y222F/L447F/C451M ( $IC_{50} = 3,33 \pm 1,22$  ( $\mu\text{M}$ )) gegenüber der Doppelmutante L447F/C451M ( $IC_{50} = 1,84 \pm 0,59$  ( $\mu\text{M}$ )). Somit werden die Ergebnisse von Volk et al. aus dem Jahre 2009 unterstrichen. In diesen Versuchen wurde mittels der rOCT1-Mutante Y222F/C451M untersucht, ob die Position 222 an der Kortikosteronbindung beteiligt ist. Es zeigte sich, dass die Position 222 nicht entscheidend an der Kortikosteronbindung beteiligt zu sein scheint (Volk et al., 2009). Die Affinitätssteigerung der Dreifachmutante im Vergleich zur

Grundmutante C451M ist somit wahrscheinlich in der Mutation an Position 447 (L447F) begründet.

Die Position 222 der vierten Transmembrandomäne scheint weder an der TBuA-Bindung, noch an der Bindung von Kortikosteron in signifikantem Maße beteiligt zu sein. Dies unterstreicht die bereits publizierten Daten (Popp et al., 2005; Volk et al., 2009).

## 5 Klinischer Ausblick

Es ist ein kurzer Ausblick auf die klinische Relevanz der Daten zu geben. So kann diese Arbeit einen Teil zum Verständnis der Funktion des OCT1 beitragen. Die Charakterisierung der Mitglieder der OCT-Familie zielt auf ein besseres Verständnis der Funktion und Pharmakokinetik dieser Transporter ab.

Um den rOCT1 zu untersuchen wurden rOCT1-knock-out-Mäuse kreiert und erforscht. Hiermit erzielten Jonker et al. im Jahre 2001 bedeutende Ergebnisse. Die knock-out-Mäuse waren augenscheinlich gesund und reproduktionsfähig. Jedoch wiesen diese eine stark veränderte Pharmakokinetik für gewisse Pharmaka auf (Jonker et al., 2001).

Eine Mutation der OCTs kann zu einem veränderten Metabolismus führen. Durch die Mutation des Cysteins an Position 451 des rOCT1 konnte hier gezeigt werden, dass die Aminosäure an Position 451 einen indirekten Effekt auf die Substratbindungstasche ausübt. Somit ist denkbar, dass durch die Mutation an Position 451 auch die lange intrazelluläre Schleife zwischen der sechsten und siebten Transmembrandomäne, die mehrere Phosphorylierungsstellen für Proteinkinasen besitzt, verändert wird. Da die Regulation durch Proteinkinasen essentiell für die Regulation der OCTs ist (Mehrens et al., 2000; Cetinkaya et al., 2003), könnte somit eine Möglichkeit der Beeinflussung des Transporters gefunden sein.

Unter den Substraten und Inhibitoren der OCTs befinden sich eine Vielzahl an Pharmaka, die unter anderem in der Dauermedikation zum Einsatz kommen. In diesem Zuge seien als Beispiele das Antidiabetikum Metformin, das Antidepressivum Imipramin und der Kalziumkanalblocker Verapamil genannt. So könnte ein durch Mutation veränderter OCT zu einem veränderten Medikamentenmetabolismus und dadurch zu einem erhöhten oder erniedrigten Medikamentenspiegel im Blut durch verminderte oder erhöhte Aufnahme des Stoffes in seine Zielzelle, zu erheblichen Nebenwirkungen führen. Als Beispiel einer solchen Nebenwirkung sind die durch Metformin induzierte Laktatazidose (Koepsell et al., 2003) bei Metforminmedikation zu nennen. Metformin wird beim Menschen durch OCT1 und OCT2 transportiert

(Dresser et al., 2002; Wang et al., 2003). Diese Metformin-induzierte Laktatazidose kommt dadurch zustande, dass das Biguanid Metformin die Glukoseneubildung in der Leber hemmt (Wang et al., 2003). Dies ist durch die Hemmung des Mitochondrienkomplex I (NADH-Dehydrogenase) zu erklären (El Mir et al., 2000; Owen et al., 2000; Kusuhara und Sigiyama, 2009). Eine beeinträchtigte renale Metforminexkretion, zum Beispiel durch eine Mutation der OCTs 1 und 2, erhöht den Metformin-Plasmaspiegel und führt somit zu einer Laktatazidose. Ein weiteres Beispiel einer solchen Nebenwirkung ist die durch das Zytostatikum Cisplatin hervorgerufene Nephropathie. Cisplatin ist eines der meistgebräuchlichen Chemotherapeutika. Es findet vor allem Anwendung bei der Therapie von Hoden-, Ovarial- und Zervixkarzinomen, sowie von Karzinomen im Kopf und Halsbereich (Fillastre und Raguenez- Viotte, 1989; Pabla und Dong, 2008; Yao et al., 2007). Der Wirkmechanismus des Cisplatins ist noch nicht gänzlich geklärt, jedoch wird angenommen, dass Cisplatin an die DNA bindet, was entweder zu Vernetzungen innerhalb eines DNA-Stranges (Intrastrang-Quervernetzung) oder zu Verknüpfungen zwischen benachbarten DNA-Strängen (Interstrang-Quervernetzung) führt (Cicarelli et al., 1985). Diese führen zum Zelltod (Pabla und Dong, 2008). Die Schädigung der Niere ist bei der Cisplatintherapie die häufigste Nebenwirkung (Arany und Safirstein, 2003). 20% aller Fälle des akuten Nierenversagens von Krankenhauspatienten sind auf die Chemotherapie mit Cisplatin zurückzuführen (Berns und Ford, 1997). Die Nierenschädigung betrifft das S3-Segment des proximalen Tubulus und tritt trotz prophylaktischer Maßnahmen bei einem Drittel der Patienten auf (Arany und Safirstein, 2003). Die Ursache dieser Nephrotoxizität ist noch weitestgehend ungeklärt (Yao et al., 2007). Cisplatin muss jedoch um seinen nephrotoxischen Effekt zu zeigen in die Zellen des proximalen Tubulus gelangen (Ciarimboli et al., 2005). Studien belegen, dass der OCT2 maßgeblich an der Anhäufung von Cisplatin im Nieren- und Gehirngewebe verantwortlich ist, und dass er aktiv Cisplatin transportieren kann (Ludwig et al., 2004; Ciarimboli et al., 2005; Zhang et al., 2006; Filipski et al., 2008 und 2009; Shnitsar et al., 2009).

Anhand dieser Beispiele sollte gezeigt werden, dass es das Ziel ist, und in diesem Zusammenhang sollte diese Arbeit als Beitrag gesehen werden, die Funktion und Pharmakokinetik der OCTs vollständig aufzuklären. Mit diesem Wissen könnten künftig Medikamente mit einem optimalen Arzneimetabolismus und minimalen Nebenwirkungen kreiert werden.



## 6 Zusammenfassung

### 6.1 Deutsche Zusammenfassung

1994 wurde von Gründemann et al. der erste organische Kationentransporter, der rOCT1 beschrieben. Es wurden bereits einige Aminosäuren identifiziert, die bei der Bindung kationischer Substanzen beteiligt sind. Hierbei handelt es sich um Phenylalanin 160 der zweiten Transmembrandomäne, Tryptophan 218, Tyrosin 222 und Threonin 226 der vierten Transmembrandomäne, um Arginin 440, Leucin 447, Glutamin 448 der zehnten und um Aspartat 475 der elften Transmembrandomäne.

Hintergrund der Versuche dieser Arbeit war das im Jahre 2005 von Sturm et al. identifizierte Cystein 451. Es liegt zwischen der zehnten und elften Transmembrandomäne. Cystein 451 ist wahrscheinlich auf Grund seiner Lage im Strukturmodell nicht direkt an der Bindung von Substraten beteiligt. Es wird vermutet, dass die Mutation des Cysteins 451 die Positionen von Aminosäuren in der Bindungsstelle verändert. Daher wurden die Mutante C451M, die Doppelmutanten L447F/C451M, L447Y/C451M und die Dreifachmutante Y222F/L447F/C451M mittels Tracer-Fluxexperimenten hinsichtlich der Hemmung der Tetraethylammonium-Aufnahme durch Kortikosteron und durch Tetrabutylammonium untersucht. Die Mutation C451M steigert verglichen mit dem rOCT1-Wildtyp die Affinität für Kortikosteron, jedoch sinkt bei dieser Mutante die TBuA-Affinität. Man nimmt nun aufgrund dieser Mutageneseversuche und den bereits zuvor generierten Modellen des rOCT1 an, dass aufgrund seiner Lage Cystein 451 nicht direkt an der Bindung von Substraten beteiligt ist, sondern einen indirekten Effekt auf die Substratbindungsregion des Transporters ausübt. Weiterhin wurde festgestellt, dass die Mutanten L447Y/C451M und L447F/C451M gegensätzliche Affinitäten für TBuA und Kortikosteron haben. Tauscht man das Leucin an Position 447 gegen ein Tyrosin aus, so wird der Transporter weniger affin für Kortikosteron, jedoch steigt die TBuA-Affinität. Tauscht man das Leucin gegen ein Phenylalanin aus, verhält es sich

gegensätzlich. Die Position 222 scheint weder an der TBuA-Bindung, noch an der Bindung von Kortikosteron maßgeblich beteiligt zu sein.

## 6.2 Englische Zusammenfassung

In 1994 Gründemann et al. described the first organic cation transporter, called rOCT1. Several previous studies revealed some amino acids, which are critical for substrate binding.

In 2005 Sturm et al. identified the cysteine on position 451. It is located between the tenth and eleventh TMH. Because of its position in the structure model cysteine 451 might not be directly involved in substrate binding. However it is postulated, that mutation of C451 alters the position of amino acids in the substrate binding region. The mutation on C451 is the basis for this work. Concerning the inhibition of the TEA uptake by corticosterone or TBuA the mutants C451M, L447F/C451M, L447Y/C451M and Y222F/L447F/C451M were analyzed by tracer uptake measurements. The TEA uptake measurements showed that the replacement of cysteine 451 by methionine resulted in an increased affinity for corticosterone and a decreased affinity for TBuA. The present work together with the proposed localization of cysteine 451 in the tertiary structure of rOCT1 further support the idea that cysteine 451 is not directly-involved in ligand binding, but it seems to exert an indirect effect on the substrate binding region of the transporter, which alters its affinity for TBuA and corticosterone.

The affinity for corticosterone and TBuA of the mutants L447F/C451M and L447Y/C451M was opposed. When L447 was replaced by a tyrosine the affinity for corticosterone was decreased, but the affinity for TBuA was increased. Though, when leucine was replaced by phenylalanine the affinity for corticosterone was increased and the affinity for TBuA was decreased. The position 222 seems to be unimportant concerning the linkage of corticosterone and TBuA

## 7 Literaturverzeichnis

Abramson J, Smirnova I, Kasho V, Verner G, Kaback HR und Iwata S (2003) Structure and mechanism of lactose permease of E.coli. *Science* **301(5633)**: 610-615.

Alnouti Y, Petrick J und Klaassen C (2006) Tissue distribution and ontogeny of organic cation transporters in mice. *Drug Metab Dispos* **34(3)**: 477–482.

Anzai N, Kanai Y und Endou H (2006) Organic anion transporter family: current knowledge. *J Pharmacol Sci* **100(5)**: 411–426.

Arany I und Safirstein RL (2003) Cisplatin nephrotoxicity. *Semin Nephrol* **23(5)**: 460-464.

Armstrong CM und Hille B (1972) The inner quaternary ammonium ion receptor in potassium channels of the node of ranvier. *J Gen Physiol* **59(4)**: 388-400.

Arndt P, Volk C, Gorboulev V, Budiman T, Popp C, Ulzheimer-Teuber I, Akhoundova A, Koppatz S, Bamberg E, Nagel G und Koepsell H (2001) Interaction of cations, anions and weak base quinine with rat renal cation transporter rOCT2 compared with rOCT1. *Am J Physiol Renal Physiol* **281(3)**: F454-F468.

Augustine L, Markelewicz Jr R, Boekelheide K und Cherrington N (2005) Xenobiotic and endobiotic transporter mRNA expression in the blood-testis barrier. *Drug Metab Dispos* **33(1)**: 182–189.

Barendt WM und Wright SH (2002) The human organic cation transporter (hOCT2) recognizes the degree of substrate ionization. *J Biol Chem* **277(25)**: 22491-22496.

Berns JS und Ford PA (1997) Renal toxicities of antineoplastic drugs and bone marrow transplantation. *Semin Nephrol* **17**: 54-66.

Budiman T, Bamberg E, Koepsell H und Nagel G (2000) Mechanism of electrogenic cation transport by the cloned organic cation transporter 2 from rat. *J Biol Chem* **275(38)**: 29413–29420.

Busch AE, Quester S, Ulzheimer JC, Waldegger S, Gorboulev V, Arndt P, Lang F und Koepsell H (1996) Electrogenic properties and substrate specificity of oft the polyspecific rat cation transporter rOCT1. *J Biol Chem* **271(51)**: 32599-32604.

Busch A, Karbach U, Miska D, Gorboulev V, Akhoundova A, Volk C, Arndt P, Ulzheimer J, Sonders M, Baumann C, Waldegger S, Lang F und H Koepsell (1998) Human neurons express the polyspecific cation transporter hOCT2, which translocates monoamine neurotransmitters, amantadine, and memantine. *Mol Pharmacol* **54(2)**: 342–352.

Casanova E, Priego E-M, Jimeno M-L, Aguado L, Negri A, Gago F, Camarasa M-J und Pérez- Pérez M-J (2010) Intramolecular cation-pi interactions as the driving force to restrict the conformation of certain nucleosides. *J Org Chem* **75(6)**: 1974-81.

Cetinkaya J, Ciarimboli G, Yalçinkaya G, Mehrens T, Velic A, Hirsch JR, Gorboulev V, Koepsell H und Schlatter E (2003) Regulation of human organic cation transporter hOCT2 by PKA, PI3K, and calmodulin-dependent kinases. *Am J Physiol Renal Physiol* **284(2)**: F293-F302.

Choudhuri S, Cherrington NJ, Li N und Klaassen CD (2003) Constitutive expression of various xenobiotic and endobiotic transporter mRNAs in the choroid plexus of rats. *Drug Metab Dispos* **31(11)**: 1337–1345.

Ciarimboli G und Schlatter E (2005) Regulation of organic cation transport. *Pflugers Arch* **449 (5)**: 423–441.

Ciarimboli G, Ludwig T, Lang D, Pavenstädt H, Koepsell H, Piechota H-J, Haier J, Jaehde U, Zisowsy J und Schlatter E (2005) Cisplatin nephrotoxicity is critically mediated via the human organic cation transporter 2. *Am J Pathol* **167(6)**: 1477-1484.

- Ciccarelli RB, Solomon MJ, Varshavski A und Lippard SJ (1985) In vivo effects of cis- and trans-diamminedichloroplatinum (II) on SV 40 chromosomes: differential repair, DNA-protein cross-linking, and inhibition of replication. *Biochemistry* **24**: 7533-7540.
- Crowley PB und Golovin, A (2005) Cation- $\pi$  interactions in protein-protein interfaces. *Proteins* **59(2)**: 231-239.
- Dougherty DA (1996) Cation- $\pi$  interactions in chemistry and biology: a new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp. *Science* **271(5246)**: 163-168.
- Dougherty DA (2007) Cation- $\pi$  interactions involving aromatic amino acids. *J Nutr* **137(6 Suppl 1)**: 1504–1508.
- Dresser MJ, Gray AT und Giacomini KM (2000) Kinetic and selectivity differences between rodent, rabbit and human organic cation transporters (OCT1). *J Pharmacol Exp Ther* **292(3)**: 1146-1152.
- Dresser MJ, Xiao G, Leabman MK, Gray AT und Giacomini KM (2002) Interactions of n-tetraalkylammonium compounds and biguanides with a human renal organic cation transporter (hOCT2). *Pharm Res* **19(8)**: 1244-1247.
- Dumont JN (1972) Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol* **136(2)**: 153-179.
- El Mir MY, Nogueira V, Fontaine E, Avéret N, Rigoulet M, Leverve X (2000) Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J Biol Chem* **275(1)**: 223-228.
- Filipski KK, Loos WJ, Verweij J und Sparreboom A (2008) Interaction of cisplatin with the human organic cation transporter 2. *Clin Cancer Res* **14**: 3875-3880.

Filipski KK, Mathijssen RH, Mikkelsen TS, Schinkel AH und Sparreboom A (2009) Contribution of organic cation transporter 2 (OCT2) to cisplatin-induced nephrotoxicity. *Clin Pharmacol Ther* **86(4)**: 396-402.

Filastre JP und Raguenez- Viotte G (1989) Cisplatin nephrotoxicity. *Toxicol Lett* **46(1-3)**: 163-175.

Gallivan JP und Dougherty DA (1999) Cation-pi interactions in structural biology. *Proc Natl Acad Sci USA* **96(17)**: 9459-9464.

Gorboulev V, Ulzheimer JC, Akhoundova A, Ulzheimer-Teuber I, Karbach U, Baumann C, Quester S, Lang F, Busch AE, and Koepsell H (1997) Cloning and characterization of two human polyspezifische organic cation transporters. *DNA Cell Biol* **16(7)**: 871-881.

Gorboulev V, Volk C, Arndt P, Akhoundova A und Koepsell H (1999) Selectivity of the polyspezifische cation transporter rOCT1 is changed by mutation of aspartate 475 to glutamate. *Mol Pharmacol* **56(6)**: 1254-1261.

Gorboulev V, Shatskaya N, Volk C und Koepsell H (2005) Subtype-specific affinity for corticosteron of rat organic cation transporters rOCT1 and rOCT2 depends on three amino acids within the substrate binding region. *Mol Pharmacol* **67(5)**: 1612-1619.

Gorbunov D, Gorboulev V, Shatskaya N, Mueller T, Bamberg E, Friedrich T und Koepsell H (2008) High-affinity cation binding to organic cation transporter 1 induces movement of helix 11 and blocks transport after mutations in a modeled interaction domain between two helices. *Mol Pharmacol* **73(1)**: 50-61.

Gurdon JB, Lane CD, Woodland HR und Marbaix G (1971) Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* **233(5316)**: 177-182.

Gründemann D, Gorboulev V, Gambaryan S, Veyhl M und Koepsell H (1994) Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. *Nature* **372(6506)**: 549-552.

Hayer-Zillgen M, Brüss M und Bönisch H (2002) Expression and pharmacological profile of the human organic cation transporters hOCT1, hOCT2 and hOCT3. *Br J Pharmacol* **136(6)**: 829-836.

Hickman CP, Roberts LS, Larson A, l'Anson H und Eisenhour DJ (2008) Zoologie. *Pearson Studium , München* **13.Aufl.**: 814.

Hirs CH, Moore S und Stein WH (1960) The sequence of the amino acid residues in performic acid-oxidized ribonuclease. *J Biol Chem* **235**: 633-647.

Hong M, Tanaka K, Pan Z, Ma J, and You G (2007) Determination of the external loops and the cellular orientation of the N- and the C-termini of the human organic anion transporter hOAT1. *Biochem J* **401(2)**: 515–520.

Jonker JW, Wagenaar E, Mol CA, Buitelaar M, Koepsell H, Smit JW und Schinkel AH (2001) Reduced hepatic uptake and intestinal excretion of organic cations in mice with a targeted disruption of the organic cation transporter 1 (OCT1 [Slc22a1]) gene. *Mol Cell Biol* **21(16)**: 5471-5477.

Kaback HR, Dunten R, Frillingos S, Venkatesan P, Kwaw I, Zhang W und Ermolova N (2007) Side-directed alkylation and the alternating access model for LacY. *Proc Natl Acad Sci USA* **104(2)**: 491-494.

Karbach U, Kricke J, Meyer-Wentrup F, Gorboulev V, Volk C, Loffing-Cueni D, Kaissling B, Bachmann S und Koepsell H (2000) Localization of organic cation transporters. OCT1 and OCT2 in rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* **279(4)**: F679-687.

Kekuda R, Prasad PD, Wu X, Wang H, Fei YJ, Leibach FH, und Ganapathy V (1998) Cloning and funktional characterizat0n of a potential-sensitive, polyspecific organic cation transporter (OCT3) most abundantly expressed in placenta. *J Biol Chem* **273(26)**: 15971-15979.

Keller T, Elfeber M, Gorboulev V, Reiländer H und Koepsell H (2005) Purification and functional reconstitution of the rat organic cation transporter OCT1. *Biochemistry* **44(36)**: 12253-12263.

Keller T, Schwarz D, Bernhard F, Dötsch V, Hunte C, Gorboulev V und Koepsell H (2008) Cell free expression and functional reconstitution of eukaryotic drug transporters. *Biochemistry* **47(15)**: 4552-4564.

Koehler MR, Gorboulev V, Koepsell H, Steinlein C und Schmid M (1996) Roct1, a rat polyspecific transporter gene for the excretion of cation drugs, maps to chromosome 1q11-12. *Mamm Genome* **7(3)**: 247-248.

Koepsell H, Schmitt BM und Gorboulev V (2003) Organic cation transporters. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **150**: 36-90.

Koepsell H (2004) Polyspecific organic cation transporters: their functions and interactions with drugs. *Trends Pharmacol Sci* **25(7)**: 375-381.

Koepsell H und Endou H (2004) The SLC22 drug transporter family. *Pflugers Arch* **447(5)**: 666-676.

Koepsell H, Lips K und Volk C (2007) Polyspecific cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm Res* **24(7)**: 1227-51.

Koepsell H (2011) Substrate recognition and translocation by polyspecific organic cation transporters. *Biol Chem* **392(1-2)**: 95-101.



Kusuhara H und Sigiyama Y (2009) In vitro-in vivo extrapolation of transporter-mediated clearance in the liver and kidney. *Drug Metab Pharmacokinet* **24(1)**: 37–52

Lips KS, Volk C, Schmitt BM, Pfeil U, Arndt P, Miska D, Ermert L, Kummer W und Koepsell H (2005) Polyspecific cation transporters mediate luminal release of acetylcholine from bronchial epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* **33(1)**: 79–88.

Ludwig T, Riethmuller C, Gekle M, Schwerdt G und Oberleithner H (2004) nephrotoxicity of platinum complexes is related to basolateral organic cation transport. *Kidney Int* **66(1)**: 196-202.

Lummis SC, Beene DL, Harrison NJ, Lester HA und Dougherty DA (2005) A cation- $\pi$ -binding interaction with a tyrosine in the binding site of the GABAC receptor. *Chem Biol* **12(9)**: 993-997.

Ma JC and Dougherty DA (1997) The cation- $\pi$  interaction. *Chem Rev* **97(5)**: 1303-1324.

Majumdar DS, Smirnova I, Kasho V, Nir E, Kong X, Weiss S und Kaback HR (2007) Single- molecule FRET reveals sugar-induced conformational dynamics in LacY. *Proc Natl Acad Sci USA* **104(31)**: 12640-12645.

MacKinnon R und Yellen G (1990) Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage-activated K<sup>+</sup> channels. *Science* **250(4978)**: 276-279.

Mecozzi S, West AP Jr. und Dougherty DA (1996) Cation- $\pi$  interactions in aromatics of biological and medical interest: electrostatic potential surfaces as a useful qualitative guide. *Proc Natl Acad Sci USA* **93(20)**: 10566-10571.

Mehrens T, Lelleck S, Cetinkaya I, Knollmann M, Hohage H, Gorboulev V, Boknik P, Koepsell H und Schlatter E (2000) The affinity of the organic cation transporter rOCT1 is increased by protein kinase C-dependent phosphorylation. *J Am Soc Nephrol* **11(7)**: 1216-1224.

Meyer-Wentrup F, Karbach U, Gorboulev V, Arndt P und Koepsell H (1998) Membrane localization of the electrogenic cation transporter rOCT1 in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* **248(3)**: 673-678.

Motohashi H, Sakurai Y, Saito H, Masuda S, Urakami Y, Goto M, Fukatsu A, Ogawa O und Inui K (2002) Gene expression levels and immunolocalization of organic ion transporters in the human kidney. *J Am Soc Nephrol* **13(4)**: 866-874.

Nagel G, Volk C, Friedrich T, Ulzheimer JC, Bamberg C und Koepsell H (1997) A reevaluation of substrate specificity of the rat cation transporter rOCT1. *J Biol Chem* **272(51)**: 31953-31956.

Nigam S, Bush KT und Bhatnagar V (2007) Drug and toxicant handling by the OAT organic anion transporters in the kidney and other tissues. *Nat Clin Pract Nephrol*. **3(8)**: 443-8.

Okuda M, Saito H, Urakami Y, Takano M und Inui K (1996) cDNA cloning and functional expression of a novel rat kidney organic cation transporter, OCT2. *Biochem Biophys Res Commun* **224(2)**: 500–507.

Owen MR, Doran E und Halestrap AP (2000) Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J* **348 (Pt 3)**: 607-614.

Pabla N und Dong Z (2008) Cisplatin nephrotoxicity: mechanism and renoprotective strategies. *Kidney Int* **73**: 994-1007.

Pao SS, Paulsen IT und Saier MH Jr. (1998) Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev* **62(1)**: 1–34.

Pelis RM, Suhre WM und Wright SH (2006a) Functional influence of N-glycosylation in OCT2-mediated tetraethylammonium transport *Am J Physiol Renal Physiol* **290(5)**: F1118-26.

Pelis RM, Zhang X, Dangprapai Y und Wright SH (2006b) Cysteine accessibility in the hydrophilic cleft of human organic cation transporter 2. *J Biol Chem* **281(46)**: 35272-35280.

Popp C (2004) Identifizierung von Aminosäuren als Teile der Substratbindungstasche des Kationentransporters 1 der Ratte (rOCT1) und Interaktion des rOCT2 mit der schwachen Base Chinin. Dissertation Universität Würzburg (2004).

Popp C, Gorboulev V, Müller TD, Gorbunov D, Shatskaya N und Koepsell H (2005) Amino acids critical for substrate affinity of rat organic cation transporter 1 line the substrate binding region in a model derived from the tertiary structure of lactose permease. *Mol Pharmacol* **67(5)**: 1600-1611.

Rizwan AN und Burckhardt G (2007) Organic anion transporters of the SLC22 family: biopharmaceutical, physiological, and pathological roles. *Pharm Res* **24(3)**: 450-470.

Schmitt BM und Koepsell H (2005) Alkali cation binding and permeation in the rat organic cation transporter rOCT2. *J Biol Chem* **280(26)**:24481-24490.

Shnitsar V, Eckardt R, Gupta S, Grottker J, Müller GA, Koepsell H, Burckhardt G und Hagos Y (2009) Expression of human organic cation transporter 3 in kidney carcinoma cell lines increases chemosensitivity to melphalan, irinotecan, and vincristine. *Cancer Res* **69(4)**: 1494-1501.

Slitt AL, Cherrington NJ, Hartley DP, Leazer TM und Klaassen CD (2002) Tissue distribution and renal developmental changes in rat organic cation transporter mRNA levels. *Drug Metab Dispos* **30(2)**: 212–219.

Smirnova IN, Kasho VN und Kaback HR (2006) Direct sugar binding to LacY measured by resonance energy transfer. *Biochemistry* **45(51)**:15279-15287.

Stryer L, Berg JM und Tymoczko JL (2007) Stryer Biochemie. Heidelberg; Elsevier, Spektrum, Akad. Verlag, München **6.Aufl.**: 836-840.

Sturm A. (2005) Identifikation zweier für Regulation, Substratspezifität und Transportgeschwindigkeit bedeutsamer Cysteine des organischen Kationen-Transporters rOCT1. Dissertation Universität Würzburg (2005).

Sturm A, Gorboulev V, Gorbounov D, Keller T, Volk C, Schmitt BM, Schlachtbauer P, Ciarimboli G und Koepsell H (2007) Identification of cysteines in rat organic cation transporters rOCT1 (C322, C451) and rOCT2 (C451) critical for transport activity and substrate affinity. *Am J Physiol Renal Physiol* **293(3)**: F767-779.

Sugawara-Yokoo M, Urakami Y, Koyama H, Fujikura K, Masuda S, Saito H, Naruse T, Inui K und Takata K (2000) Differential localization of organic cation transporters rOCT1 and rOCT2 in the basolateral membrane of rat kidney proximal tubules. *Histochem Cell Biol* **114(3)**: 175-180.

Sweet DH und Pritchard JB (1999a) rOCT2 is a basolateral potential-driven carrier, not an organic cation/proton exchanger. *Am J Physiol* **277(6 Pt 2)**: F890-898.

Sweet DH und Pritchard JB (1999b) The molecular biology of renal organic anion and organic cation transporters. *Cell Biochem Biophys* **31(1)**: 89-118.

Sweet DH, Miller DS und Pritchard JB (2000) Basolateral localization of organic cation transporter 2 in intact renal proximal tubules. *Am J Physiol Renal Physiol* **279(5)**: F826-834.

Sweet DH, Miller DS und Pritchard JB (2001) Ventricular choline transport: a role for organic cation transporter 2 expressed in choroid plexus. *J Biol Chem.* **276(45)**: 41611–41619.

Tanaka K, Xu W, Zhou F und You G (2004) Role of glycosylation in the organic anion transporter OAT1. *J Biol Chem* **279(15)**: 14961–14966.

Tantry S, Ding FX, Dumont M, Becker JM und Naider F (2010) Binding of fluorinated phenylalanine alpha-factor analogues to Ste2p: evidence for a cation-pi binding interaction between a peptide ligand and its cognate G protein-coupled receptor. *Biochemistry* **49(24)**: 5007-5015.

Ulzheimer JC (2002) Funktionelle Charakterisierung der Transportproteine für organische Kationen rOCT1 und hOCT2 unter besonderer Berücksichtigung der *cis-/trans*-Symmetrie von rOCT1. Dissertation Universität Würzburg.

Van Montfoort JE, Müller M, Groothuis GM, Meijer DK, Koepsell H und Meier PJ (2001) Comparison of „type I“ and „type II“ organic cation transport by organic cation transporters and organic anion-transporting polypeptides. *J Pharmacol Exp Ther* **298(1)**: 110-115.

Vivoli M, Angelucci F, Ilari A, Morea V, Angelaccio S, di Salvo ML und Contestabile R (2009) Role of a conserved active site cation-pi interaction in *Escherichia coli* serine hydroxymethyltransferase. *Biochemistry* **48(50)**: 12034–12046

Volk C, Gourboulev V, Budiman T, Nagel G und Koepsell H (2003) Different affinities of inhibitors of the outwardly and inwardly directed substrate binding site of organic cation transporter 2. Volk C, Gorboulev V, Kotsch A, Müller TD und Koepsell H *Mol Pharmacol* **64(5)**: 1037-1047.

Volk C, Gourboulev V, Kotsch A, Müller TD und Koepsell H (2009) Five amino acids in the innermost cavity of the substrate binding cleft of organic cation transporter 1 interact with extracellular and intracellular corticosterone. *Mol Pharmacol* **76(2)**: 275-89.

Wang DS, Jonker JW, Kato Y, Kusuhara H, Schinkel AH und Sugiyama Y (2002) Involvement of organic cation transporter 1 in hepatic and intestinal distribution of metformin. *J Pharmacol Exp Ther* **302(2)**: 510-515.

Wang DS, Kusuhara H, Kato Y, Jonker JW, Schinkel AH und Sugiyama Y (2003) Involvement of organic cation transporter 1 in the lactic acidosis caused by metformin. *Mol Pharmacol* **63(4)**: 844–848.

Ward SD, Curtis CA und Hulme EC (1999) Alanine-scanning mutagenesis of transmembrane domain 6 of the M(1) muscarinic acetylcholine receptor suggests that Tyr381 plays key roles in receptor function. *Mol pharmacol* **56(5)**: 1031-1041.

Wouters J (1998) Cation- $\pi$  ( $\text{Na}^+$ -Trp) interactions in the crystal structure of tetragonal lysozyme. *Protein Sci* **7(11)**: 2472-2475.

Wu X, Kekuda R, Huang W, Fei YJ, Leibach FH, Chen J, Conway SJ und Ganapathy V (1998a) Identity of the organic cation transporter OCT3 as the extraneuronal monoamine transporter (uptake2) and the evidence for the expression of the transport in the brain. *J Biol Chem* **273(49)**: 32776-32786.

Wu X, Prasad PD, Leibach FH und Ganapathy V (1998b) cDNA sequence, transport function, and genomic organisation of human OCTN2, a new member of the organic cation transporter family. *Biochem Biophys Res Commun* **246(3)**: 589-595.

Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N und Nugent K (2007) Cisplatin nephrotoxicity: a review. *Am J Med Sci* **334**:115-124.

Zhang L, Dresser MJ, Chun JK, Babbitt PC und Giacomini KM (1997a) Cloning and functional characterization of a rat renal organic cation transporter isoform (rOCT1A). *J Biol Chem* **272(26)**: 16548-16554.

Zhang L, Dresser MJ, Gray AT, Yost SC, Terashita S und Giacomini KM (1997b) Cloning and functional expression of a human liver organic cation transporter. *Mol Pharmacol* **51(6)**: 913-921.

Zhang X, Shirahatti NV, Mahadevan D und Wright SH (2005) A conserved glutamate residue in transmembrane helix 10 influences substrate specificity of rabbit OCT2 (SLC22A2). *J Biol Chem* **280(41)**:34813-34822.

Zhang S, Lovejoy KS, Shima JE, Lagpacan LL, Shu Y, Lapuk A, Chen Y, Komori T, Gray JW, Chen X, Lippard SJ und Giacomini KM (2006) Organic cation transporters are determinants of Oxaliplatin cytotoxicity. *Cancer Res* **66(17)**: 8847-8857.

Zhong W, Gallivan JP, Zhang Y, Li L, Lester HA und Dougherty DA (1998) From ab initio quantum mechanics to molecular neurobiology: a cation- $\pi$  binding site in the nicotinic receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **95(21)**: 12088-12093.

Zhou F, Xu W, Hong M, Pan Z, Sinko PJ, Ma J und You G (2005) The role of N-linked glycosylation in protein folding, membrane targeting, and substrate binding of human organic anion transporter hOAT4. *Mol Pharmacol* **67(3)**: 868–876.

Zhou F und You G (2007) Molecular insights into the structure-function relationship of organic anion transporters OATs. *Pharm Res* **24(1)**: 28-36.

## 8 Anhang

	<b>ORI in <math>\mu\text{l}</math></b>	<b>Hemmstoff in <math>\mu\text{l}</math> (TBuA, Kortikosteron)</b>	<b>TEA (Substrat) in <math>\mu\text{l}</math></b>
Kontrolloozyten uninjeziert	190	-	10
Kontrolloozyten Injeziert	190	-	10
Oozyten Injeziert	188	2	10

**Tabelle 10:** *Pipetierschema*

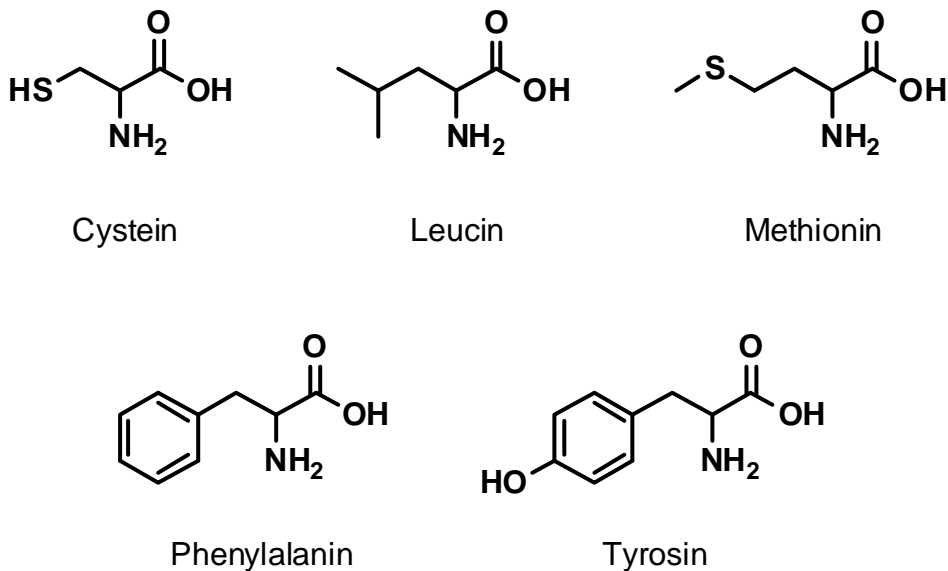
<b>Mutante</b>	<b>Endkonzentration im Ansatz TBuA in <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>Endkonzentration im Ansatz Kortikosteron in <math>\mu\text{M}</math></b>
C451M	1 3 10 30 100 300	3 10 30 100 300 1000
L447Y/C451M	1 3 10 30 100 300	0,3 1 3 10 30 100 300 1000
L447F/C451M	1 3 10 30	0,1 0,3 1 3



	100 300	10 30 100 300 1000
Y222F/L447F/C451M	0,5 1 3 10 30 100 300	0,3 1 3 10 30 100 300 1000

**Tabelle 11:** Endkonzentrationen des Hemmstoffes (in  $\mu\text{l}$ ) im Ansatz

Die Konzentrationen waren so gewählt, dass die Endkonzentrationen für TBuA als Hemmstoff 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  und 300  $\mu\text{M}$  waren. Für Kortikosteron waren die Endkonzentrationen im Ansatz 0,1  $\mu\text{M}$ , 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$  und 1000  $\mu\text{M}$ . Diese wurden den jeweiligen Mutante angepasst und können aus Tabelle 11 entnommen werden.



**Abb.14:** relevante Aminosäuren



**Abb. 15:** Aminosäuresequenz der Transmembrandomänen 4 und 10 der rOCTs

\*\* Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen erhöhten Affinitäten durch den Austausch von Cystein 451 gegen Methionin war überraschend, da Volk et al. für die MPP-Hemmung durch Kortikosteron keine Affinitätsänderung beschrieben hatten (rOCT1 Wildtyp:  $IC_{50MPP} = 7,4 \pm 1,1$  ( $\mu M$ ); C451M :  $IC_{50MPP} = 9,4 \pm 1,3$  ( $\mu M$ )) (Volk et al., 2009). Beim genaueren Hinschauen, bemerkt man, dass sich die unterschiedlichen Ergebnisse nicht widersprechen, sondern höchstwahrscheinlich auf unterschiedlichen Messmethoden beruhen. Volk erbrachte einige seiner Ergebnisse mittels Tracer-Flux-Experimente, andere dagegen mit Voltage-clamp-Technik (Volk et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch ausschließlich Tracer-Flux-Experimente durchgeführt. Des Weiteren verwendete Volk et al. bei seinem Vergleich teilweise MPP und teilweise TEA als Substrate. TEA diente vor allem bei den mittels Voltage-clamp-Technik erbrachten Daten als Substrat, bei den Tracher-Flux-Experimenten wurde MPP als Substrat verwendet (Volk et al., 2009). Aufgrund theoretischer Überlegungen ist klar, dass die Affinität der Hemmwirkung eines Hemmstoffes durchaus durch das für die Transportmessung verwandte Substrat beeinflusst wird. Somit stehen die Daten in keinem Widerspruch zu einander, da Affinitätsänderungen bei Verwendung einer anderen Methode oder eines anderen Substrates keine Seltenheit darstellten. Ein ähnlicher Sachverhalt wurde bereits an der Mutante L447Y/Q448E beobachtet. Diese Mutante wies unterschiedliche  $IC_{50}$ -Werte für die Hemmung der TEA- bzw. der MPP-Aufnahmen durch Kortikosteron auf. Es kam folglich zu einer Veränderung der Affinität der Mutante zu Kortikosteron, je nach

---

dem welches der beiden Substrate verwendet wurde. Dies legte die Vermutung nahe, dass die Kortikosteronaffinität durch den Transport und/oder die Bindung von TEA, bzw. MPP verändert wird (Gorboulev et al., 2005).



## **Danksagung**

*„Keine Schuld ist dringender, als die, Dank zu sagen“*

*Marcus Tullius Cicero*

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Hermann Koepsell, an dessen analytische Fähigkeiten ich niemals heranreichen werde, für die einmalige Gelegenheit in einem solch etablierten Arbeitskreis meine Dissertationsschrift verfassen zu dürfen. Weiterhin danke ich ihm für die hervorragende Betreuung und dafür, dass er für seine Doktoranden stets ein offenes Ohr hat.

Herrn Privatdozenten Dr. Christopher Volk danke ich von ganzem Herzen für die geduldige Einarbeitung in das Themengebiet, für die hervorragende Betreuung, für die zahllosen Stunden der Korrektur dieser Schrift, für den guten Zuspruch und die netten Unterhaltungen.

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. Valentin Gorboulev für die Herstellung der Mutanten und Frau Irina Schatz für die Herstellung der DNA. Frau Ursula Roth für die Hilfe bei der Einarbeitung und für die Unterstützung bei Laborfragen. Frau Dr. Maike Veyhl-Wichmann danke ich für die guten Ratschläge und für den aufmunternden Ansporn. Ein Dank geht auch an Herrn Michael Christof für die graphische Unterstützung.

Ein Dank geht auch an meine Mitdoktoranden für die vielen heiternden Stunden, ohne die die Laborarbeit sicherlich nicht so viel Spaß gemacht hätte. Ein besonderer Dank geht noch an meine Mitdoktorandin Frau Brigitte Egenberger, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Meinem Freund Mark danke ich für die jahrelange Unterstützung im Studium, für die kritische Lektüre dieser Schrift, für den guten Zuspruch sowie die menschliche Wärme.

Ohne meine Familie jedoch wäre das alles nicht möglich gewesen. Nicht genug danken kann ich meiner Mutter Gabriele und meinem Vater Wolfgang für die Engelsgeduld, den guten Zuspruch für dieses Projekt und für die mannigfache Unterstützung in allen nur denkbaren Bereichen. Ohne sie hätte ich es nie so weit gebracht.

## Curriculum Vitae

---

### Persönliche Daten

---

**Name:** Semlanski  
**Vorname:** Christin Martina  
**Geburt:** 06.04.1983  
**Geburtsort:** Mosbach  
**Staatsangehörigkeit:** deutsch

---

### Werdegang

---

**1989 – 1993** Grundschule Neckarzimmern  
**1993 – 2002** Auguste-Pattberg-Gymnasium in Neckarelz mit  
Abschluss **Abitur**  
**Ab 01.10.2003** **Studium der Zahnmedizin** an der Julius-Maximilians-  
Universität Würzburg  
**27.11.2008** **Abschluss des Studiums der Zahnmedizin**  
**Seit April 2009** **Assistenz Zahnärztin**  
**Seit April 2011** **Angestellte Zahnärztin**

Christin Semlanski