

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

**Transportrelevante Substratinteraktionen
des organischen Kationentransporters 1 der
Ratte (rOCT1)**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Marcus Heinz Martin Leistner
aus Würzburg**

Würzburg, April 2011

Referent: Prof. Dr. Hermann Koepsell

Korreferent: Prof. Dr. Erhard Wischmeyer

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2011

Der Promovend ist Arzt.

*Diese Arbeit ist meiner verstorbenen Urgroßmutter und meiner
verstorbenen Großmutter gewidmet –
zwei Menschen, die mir unterschiedliche Blickwinkel auf das
Leben mit auf den Weg gegeben haben.*

1	EINLEITUNG	1
1.1	AKTUELLER KENNTNISSTAND	1
1.1.1	<i>Die SLC22-Transporterfamilie</i>	2
1.1.1.1	Ordnung und allgemeine Charakteristika	2
1.1.1.2	Evolutionärer Stammbaum und Verbindungen	3
1.1.2	<i>Organische Kationentransporter des Menschen und der Ratte</i>	5
1.1.2.1	Gewebeexpressionsmuster und subzelluläre Verteilung	5
1.1.2.2	Transport: Substrat-Polyspezifität und Mechanismus	7
1.1.2.3	Regulation der Transportaktivität	9
1.1.2.4	Pharmakologische Implikationen	10
1.1.3	<i>Rat Organic Cation Transporter 1 (rOCT1)</i>	11
1.1.3.1	Bindungsstellen und Bindungstasche	12
1.2	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	14
2	MATERIAL UND METHODEN	15
2.1	MATERIAL	15
2.1.1	<i>Expressionsmodell: Xenopus-laevis-Oozyten</i>	15
2.1.2	<i>Unbelebtes Material</i>	15
2.2	METHODIK	18
3	ERGEBNISSE	20
3.1	MUTATIONSEFFEKTE AUF DEN $K_{M(MPP)}$ UND DEN $K_{M(TEA)}$	20
3.1.1	<i>rOCT1 Y222F</i>	21
3.1.2	<i>rOCT1 D475E</i>	21
3.1.3	<i>rOCT1 Y222F/D475E</i>	22
3.2	HEMMKINETIK TEA VS. [3 H]MPP: BESTIMMUNG DES $IC_{50(TEA)}$	25
3.2.1	<i>rOCT1 Wildtyp</i>	26
3.2.2	<i>rOCT1 Y222F</i>	27
3.2.3	<i>rOCT1 D475E</i>	27
3.2.4	<i>rOCT1 Y222F/D475E</i>	29
3.2.5	<i>Mutationseffekte: Signifikante Unterschiede?</i>	29
3.3	VERGLEICH VON $K_{M(TEA)}$ UND $IC_{50(TEA)}$	31

3.4	HEMMKINETIK TBuA vs. [³ H]MPP: BESTIMMUNG DES IC ₅₀ (TBuA)	32
3.4.2	<i>rOCT1 Wildtyp</i>	33
3.4.3	<i>rOCT1 Y222F</i>	34
3.4.4	<i>rOCT1 D475E</i>	34
3.4.5	<i>rOCT1 Y222F/D475E</i>	35
3.4.6	<i>Mutationseffekte: Signifikante Unterschiede?</i>	36
4	DISKUSSION	38
4.1	ERSTELLUNG DREIDIMENSIONALER DOCKINGMODELLE	38
4.1.1	<i>Grundlagen der Modellierung</i>	38
4.1.2	<i>Interpretation von Effekten auf K_m- und IC₅₀-Werte</i>	38
4.2	INTERPRETATION DER ERGEBNISSE MIT HILFE DREIDIMENSIONALER DOCKINGMODELLE	40
4.2.1	<i>Sättigungskinetiken von MPP und TEA</i>	40
4.2.2	<i>Hemmung der [³H]MPP-Aufnahme durch TEA</i>	45
4.2.3	<i>Hemmung der [³H]MPP-Aufnahme durch TBuA</i>	48
4.3	GESAMTINTERPRETATION UND AUSBLICK	50
5	ZUSAMMENFASSUNG	51
6	LITERATURVERZEICHNIS	52

1 Einleitung

Die Naturwissenschaften sind bestimmt durch die Zerlegung beobachteter Prozesse in ihre konstituierenden Bestandteile. Dies gilt auch für den Bereich der Biowissenschaften, deren Feld durch die ständige Veränderlichkeit biologischer Systeme ganz im Sinne des heraklitischen „πάντα ρεῖ“ zusätzliche Komplexität erfährt. Ziel aller analytischen Herangehensweise ist es, die gefundenen Teile wieder in ein funktionierendes Ganzes zu integrieren, das mit den Mitteln der Ratio erklärbar und – so nötig – beeinflussbar ist. Beides ist für die Medizin von herausragender Bedeutung, will man doch Krankheiten sowohl diagnostizieren als auch therapieren.

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zum Verständnis des Funktionsmechanismus eines wichtigen Arzneimitteltransporters, des organischen Kationentransporters 1, leisten. Hierzu wird im Folgenden zunächst der gegenwärtige Kenntnisstand zusammenfassend dargestellt.

1.1 Aktueller Kenntnisstand

Seit Rennick et al. (1947) erstmals die renale Absorption und Exkretion des heute als Modells substanz der OCTs benutzten Tetraethylammoniums (TEA) beschrieben, hat sich unser Wissen um die zugrunde liegenden Mechanismen stetig erweitert. Die Aufschlüsselung bediente sich dabei im Laufe der Zeit zahlreicher Blickwinkel und Methoden, von der Substrataufnahmemessung in isolierten Nephronen bis zur molekularen Analyse der für die Aufnahme verantwortlichen Transporter, von der isolierten Mutation dieser Transporter in Expressionssystemen (Oozyten und Zellkulturen) bis zur Erschaffung transgener Mäuse und Ratten. Im Mittelpunkt stand dabei nicht nur Erkenntnismehrung sondern auch, ganz im integrativen Sinne, assoziierte Krankheitsbilder und die mögliche Nutzbarmachung des Wissens für effektive therapeutische Regime.

In diesem Überblick soll ebenso mit Grundlegendem begonnen werden, die Feinheiten und Implikationen werden nachfolgend besprochen werden.

1.1.1 Die SLC22-Transporterfamilie

1.1.1.1 Ordnung und allgemeine Charakteristika

Die „Solute Carrier Transporterfamilie 22“ (SLC22) ist Bestandteil einer großen Gruppe passiver Membrantransportproteine, genannt „Major Facilitator Superfamily“ (MFS), welche Bestandteil des Genoms zahlreicher Mikroorganismen und höherer Lebensformen ist.

Die SLC22-Familie setzt sich, unterteilt in 18 Unterfamilien, zusammen aus sekundär aktiven Transportern mit teils deutlich differierender, teils überlappender, insgesamt aber sehr breiter Substratspezifität (Pao et al. 1998). So finden sich organische Kationentransporter (OCT1-3,6) ebenso wie organische Anionentransporter (OAT1-5, URAT1) und Zwitterionen-/Carnitintransporter (OCTN1-3). Allen gemeinsam ist der strukturdefinierende Aufbau aus 12 Transmembrandomänen (TMDs) sowie je einer extrazellulären (zwischen TMD 1 und 2), glykosylierten Schleife und einer intrazellulären (zwischen TMD 6 und 7) Schleife, welche u. a. regulatorische Phosphorylierungssequenzen enthält (s. u.) (Koepsell et al. 2003) sowie den korrekten Membraneinbau des Proteins gewährleistet (Weinglass et al. 2000). N- und C-Terminus kommen dabei gemäß der „Positive inside rule“ (von Heijne et al. 1988) auf der Zytosol-zugewandten Seite der Zellmembran zu liegen. Betrachtet man den Transportmechanismus, lassen sich reine Uniporter (OCTs) von reinen Antiportern (OAT1, 3, URAT1) und gemischten Uni-/Anti-/Cotransportern (OCTNs) unterscheiden.

OCTs operieren dabei prinzipiell elektrogen, d. h. in diesem Fall potenzialmindernd, natriumunabhängig und bidirektional. (Neuere Daten weisen darauf hin, dass zumindest rOCT2, abhängig von der Höhe des Transmembranpotenzials, auch als unspezifischer Cotransporter kleiner Kationen (z. B. Na⁺) fungieren kann (Schmitt et al. 2009).) Demgegenüber kann sich der Antiportprozess von OAT1 und 3 als elektroneutral zeigen, sofern das Substrat ebenso wie die Austauschsubstanz ein divalentes Anion ist. OCTN1 und 2 wiederum zeichnen sich durch einen elektrogenen Transport organischer

Kationen aus, entweder im Uniport oder im Na⁺-Carnitin-Cotransport durch OCTN2. Für OCTN1 wurde aber ebenso ein protonengradientengekoppelter, elektroneutraler H⁺-OC-Antiport beschrieben (Koepsell 2004).

Man beachte dabei, dass diese im Wesentlichen auf Tracerflux- und elektrophysiologischen Messungen basierenden Beobachtungen zum Transport keine Aussagen über den Ablauf des Vorganges selbst, d. h. das Andocken, die Umfaltung und die transmembranäre Substratfreisetzung, beinhalten. Sie sind jedoch ausreichend, um die wichtige Funktion von Transportproteinen im exprimierenden System zu verdeutlichen, nämlich die Interaktion mit und Verteilung von verschiedensten endogenen (etwa Creatinin) und exogenen (etwa Pharmaka und xenobiotische, evtl. toxische Verbindungen) Substanzen.

1.1.1.2 Evolutionärer Stammbaum und Verbindungen

Mit wachsender Zahl an charakterisierten Transportern offenbarten sich deutliche Sequenz- (v. a. innerhalb der einzelnen Subgruppen) und Strukturähnlichkeiten (gruppenübergreifend) derselben. Abbildung 1-1 zeigt ein phylogenetisches Diagramm eines Teils der bis heute entdeckten SLC22-Transporter des Menschen, deren Verwandtschaftsgrad zunimmt, je peripherer die gemeinsame Verzweigungsstelle liegt.

Sequence-Alignments erbringen demnach beispielsweise für hOCT1 auf Primärstrukturebene eine Gleichheit von ca. 70% mit hOCT2, ca. 50% mit hOCT3 und ca. 30% mit hOCTN1 und hOAT1 (Koepsell 2004, Dresser et al. 2000). Die entwicklungsgeschichtliche Verquickung zeigt sich ebenso in der paarweisen Anordnung vieler Transporter auf engstem genetischem Raum. So liegen z. B. hOAT1 und hOAT3 lediglich 8.3kb voneinander entfernt auf dem langen Arm von Chromosom 11. Vermutlich beruht diese enge Nachbarschaft auf der damit einhergehenden Möglichkeit zur Koregulation der in gleichartig differenzierten Zellen exprimierten Homologe (Eraly et al. 2003).

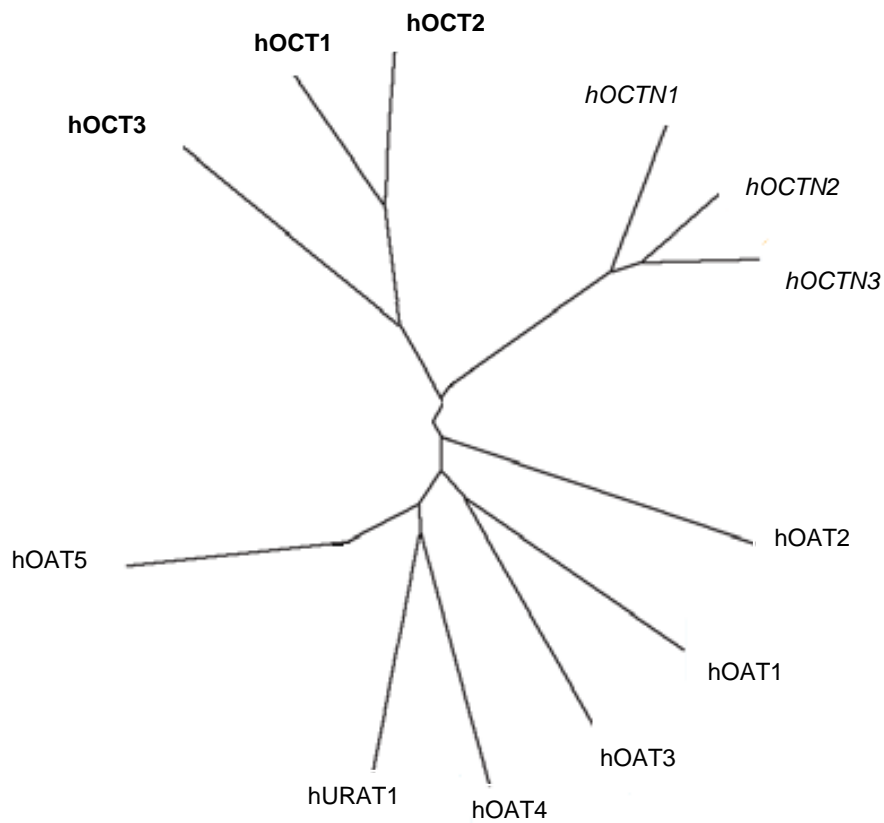


Abbildung 1-1: Dendrogramm der evolutionsbiologischen Konnexion humaner organischer Ionentransporter. Gezeigt sind Kationentransporter in **Fettdruck**, Zwitterionen- / Carnitintransporter in *Kursivdruck* und Anionentransporter in Normaldruck. hOCTN3 wurde für mOCTN3 eingefügt, dessen evolutionärer Abstand hier aufgetragen ist. Modifiziert und vereinfacht nach: Koepsell et al. 2004.

1.1.2 Organische Kationentransporter des Menschen und der Ratte

Die nachfolgenden Abschnitte widmen sich den diversen organischen Kationentransportern (OCTs) von Mensch und Ratte. Hierbei werden Expression, Funktion, Regulation und pharmakologische Bedeutsamkeit erörtert, ebenso im Verlauf einige speziesdefinierende Unterschiede aufgezeigt.

1.1.2.1 Gewebeexpressionsmuster und subzelluläre Verteilung

Wie aus zahlreichen Studien hervorgeht, finden sich OCTs in verschiedensten Gewebetypen, was ihren enormen Nutzen für den jeweiligen Organismus unterstreicht. Dabei sind Expressionsort, d. h. Gewebetyp und Membranlokalisierung, und vermutliche Funktion der Transporter jedoch nicht speziesübergreifend gleichartig.

Einen Überblick über ausgewählte, wichtige Erkenntnisse vermittelt Tabelle 1-1. Im Folgenden werden nur einzelne Beispiele aufgegriffen, denen aufgrund möglicher pharmakokinetischer Implikationen (s. 1.1.2.4) in der Vergangenheit besonders viel Aufmerksamkeit zuteilwurde.

hOCT1 / rOCT1: rOCT1 wurde als erster Transporter der OCT-Familie isoliert und beschrieben, die Transkription der zugehörigen mRNA v. a. in Leber, Niere und Darm der Ratte gezeigt (Gründemann et al. 1994). Meyer-Wentrup et al. (1998) präzisierten die Lokalisation des Transporters selbst innerhalb der Leber auf die sinusoidale Membran der die Zentralvenen flankierenden Hepatozyten. Ebenso konnte rOCT1 mit immunhistochemischen Methoden dem basolateralen Pol proximaler Tubuluszellen der S1- und S2-Segmente zugeordnet werden (Karbach et al. 2000, Sugawara et al. 2000). Die humane Form ist (neben der lateralen Membran jejunaler Enterozyten (Müller et al. 2005)) vornehmlich in der Leber zu finden (Zhang et al. 1997), kürzlich wurde jedoch auch eine renale Expression in der luminalen Tubulusmembran nachgewiesen (Tzvetkov et al. 2009). Sowohl rOCT1 als auch hOCT1 konnten darüber hinaus auf der luminalen Membranseite kleinster Hirnendothelien identifiziert werden (Lin et al. 2010).

hOCT2 / rOCT2: Im Gegensatz zu rOCT1 wird rOCT2 vornehmlich basolateral in den S2- und S3-Segmenten der proximalen Tubuli der Rattenniere exprimiert (Karbach et al. 2000, Sugawara et al. 2000), auch scheint die Transkription des rOCT2-Gens weitestgehend auf diesen Ort beschränkt (Okuda et al. 1996).

hOCT2 konnte in mehreren Organen nachgewiesen werden (s. Tabelle 1), hauptsächlich aber – analog zum Rattenpendant – in der Niere, hier auch in den S1-Segmenten (Motohashi et al. 2002). Damit stellt, gemäß bisherigen Veröffentlichungen, hOCT2 das einzige basolaterale Transportsystem organischer Kationen in der menschlichen Niere dar.

Auch für diesen Subtyp konnten Lin et al. (2010, s. o.) eine intracerebrale Endothelexpression zeigen.

hOCT3 / rOCT3: Das Expressionsmuster des OCT3 ist insgesamt weniger begrenzt als das der Homologe. In der Ratte wurde rOCT3 sowohl im Gehirn, insbesondere der Area postrema (Haag et al. 2004), als auch in Sertoli-Zellen (basolateral) (Augustine et al. 2005) lokalisiert. Die Datenlage bezüglich des humanen OCT3 ist umfassender im Sinne einer sehr breiten Verteilung. Hervorzuheben ist hier insbesondere dessen Expression in nicht-dopaminergen Neuronen und Astrozyten der nigrostriatalen Bahnen (Cui et al. 2009).

hOCT6: Das gegenwärtige Wissen zu diesem Transporter ist limitiert, von besonderer Bedeutung erscheint sein Vorkommen in hämatopoietischen Stammzellen (Gong et al. 2002).

Transporter (Mensch/ Ratte)	hOCT1 / rOCT1	hOCT2 / rOCT2	hOCT3 / rOCT3	hOCT6
Leber (Hepatozyten)	B / B	- / -	B ²⁾ / B	-
Niere (Tubuli)	A / B	B / B	B / B	-
Dünndarm (Epithel)	B / (B)	(B / B)	B / B	-
Lunge ¹⁾ (Bronchialepithel)	A / (A)	A / (A)	A / (A)	-
Herz (Kardiomyozyten)	+ / +	? / -	+ ²⁾ / +	-
Skelettmuskel	+ / +	- / -	+ / +	-
Gehirn (z. B. Astrozyten ³⁾ , Neurone, Gefäßendothel)	+ / + (Blut-Hirn- Schranke)	+ / + (Blut-Hirn- Schranke)	+ / + (Neurone, Astrozyten)	?
Plazenta (Trophoblast)	+ / -	+ / -	B ⁴⁾ / (B)	-
Hoden (Sertolizellen)	? / +	? / -	? / +	+
Tumor- /Stammzellen	+ / ?	+ / ?	+ / ?	+

Tabelle 1-1: Expressions- und Membranlokalisationsmuster der OCTs des Menschen und der Ratte.

Es wurden 10 Organsysteme exemplarisch herausgegriffen und direkt gegenübergestellt.

Referenzen: ¹⁾Lips et al. 2005, ²⁾Gründemann et al. 1998, ³⁾Inazu et al. 2003, ⁴⁾Sata et al. 2005, weitere: siehe Text.

Legende: A = apikale = luminale Membran; B = basolaterale = sinusoidale Membran; + = exprimiert, Membranlokalsation unbekannt bzw. Zellen nicht polar; - = nicht exprimiert; ? = keine Daten verfügbar; Daten in Klammern = vermutete Lokalisation.

1.1.2.2 Transport: Substrat-Polyspezifität und Mechanismus

Eines der kennzeichnenden Merkmale der OCTs (und auch aller weiteren Mitglieder der SLC22 – Familie) ist die sog. Polyspezifität. Hierunter versteht man die Eigenschaft der Transporter, nicht nur ein bestimmtes, strukturell und sterisch eindeutig definiertes Substrat, sondern viele (griech. πολύς) verschiedenartig konfigurierte Substanzen zu akzeptieren. Gemäß früheren Untersuchungen, welche wildtypische Transporter ohne Mutationsanalyse und

molekulare Modellierung untersuchten, ergab sich für die transportierten Moleküle ein vereinfachendes physikochemisches Muster:

1. Die Affinität wird einerseits durch Hydrophobizität, andererseits durch Gruppen, welche zur Ausbildung von Salz- und Wasserstoffbrücken fähig sind (Donor oder Akzeptor) erhöht (Ullrich et al. 1997).
2. Je größer und verzweigter der hydrophobe Anteil, desto höher ist die Affinität (Bednarczyk et al. 2003), umso größer jedoch auch (mit einigen Interspeziesunterschieden) die inhibitorische Potenz eines Substrates (Dresser et al. 2000).
3. Die Gesamtgröße transportierter Substanzen – sog. „Typ-1-Kationen“ – überschreitet regelhaft nicht eine Molekülmasse von ca. 400 Dalton (Wright et al. 2004). Größere „Typ-2-Kationen“ wirken als Transportinhibitoren (Nagel et al. 1997).

Diese recht allgemeinen Beschränkungen ließen eine sehr große Zahl an möglichen Transportsubstraten respektive -inhibitoren zu, seien es Modellsubstanzen wie das Neurotoxin MPP, antidepressive Pharmaka wie das Trizyklikum Desipramin, oder endogen produzierte Steroidhormone (Modell: Corticosteron). Ein tabellarischer Gesamtüberblick über alle bereits messtechnisch erfassten OCT-Substrate ist umfassenderen Reviews zu entnehmen (z. B. Dresser et al. 2001, Koepsell et al. 2007).

Über das Grundprinzip des Transportvorganges der OCTs hingegen existiert derzeit lediglich eine Modellvorstellung. In guter Übereinstimmung mit anderen, intensiver untersuchten Transportproteinen, namentlich LacY (Abramson et al. 2003, Ermolova et al. 2006, Smirnova et al. 2007), geht man nach heutigem Kenntnisstand von dem sog. „Alternating Access Model“ aus. Demnach bindet das Substrat an den Transporter in dessen nach außen geöffneter Bindungstasche. Das Protein durchläuft daraufhin eine Konformationsänderung, durch welche der gebundene Ligand auf der zytoplasmatischen Seite der Lipiddoppelmembran zu liegen kommt. Hierfür nimmt man an, dass der transmembranäre elektrochemische Gradient die Translokation des betreffenden Substrates, etwa durch Beschleunigung der o. g. transportrelevanten Konformationsänderung, erleichtert. Der Transporter kehrt

abschließend mit leerer bzw. von intrazellulär erneut beladener Bindungstasche wieder in seine nach extrazellulär weisende Ausgangskonformation zurück, bereit für einen neuen Transportzyklus (Volk et al. 2003, 2009).

1.1.2.3 Regulation der Transportaktivität

Auf welche Weise nun wird die Aktivität und Effizienz des Transportes geregelt? Wie alle strukturellen und funktionellen Proteinbausteine einer Zelle unterliegen auch die Transporter aus der Unterfamilie der OCTs transkriptionaler, translationaler und posttranslationaler Regulation.

Über die längerfristige, d. h. auf (prä-)transkriptionaler Ebene stattfindende, endokrine Steuerung des organischen Kationentransportes ist noch recht wenig bekannt.

Die ausführlichste Datenlage zu diesem Thema findet sich bezüglich des geschlechtsabhängigen Expressionslevels von rOCT2 (aber nicht rOCT1) in der Rattenniere. Urakami et al. (1999, 2000) beschrieben eine testosteronabhängige Steigerung der rOCT2-Transkription, welche durch eine Androgen-sensible Sequenz in der Promotorregion des Transporters vermittelt ist (Asaka et al. 2006). Hierdurch ist die Transportkapazität für organische Kationen in den Nieren männlicher Ratten unter physiologischen Hormonkonzentrationen höher als bei weiblichen Tieren. Des Weiteren ist bei anhaltend diabetischer Stoffwechsellage die Transkription von rOCT2 reduziert, während die Zahl der rOCT1-Transkripte konstant bleibt. Diese werden jedoch vermindert translatiert (Grover et al. 2004).

Umfangreichere Untersuchungen liegen über die Kurzzeitregulation verschiedener OCTs vor, welche v. a. durch Phosphorylierung / Dephosphorylierung konservierter Serinreste der großen intrazellulären Schleife zwischen TMD 6 und 7 geschieht. So bewirkt die Phosphorylierung durch die Tyrosinkinase, Proteinkinase A (PKA) und Proteinkinase C (PKC) sowohl eine Erhöhung des Substratumsatzes als auch der Substrataffinität (Mehrens et al. 2000). Voraussetzung hierfür ist allerdings das Vorhandensein aller fünf

Serinreste besagter Schleife, wie bislang für PKC gezeigt wurde (Ciarimboli et al. 2005).

Die Aktivierung von Phosphokinasen in Zellsystemen, welche humane OCTs exprimieren, hat andere, teils diametral entgegengesetzte Folgen. Die Substrataufnahme von hOCT2 wird durch Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und PKA inhibiert, während PKC für die Regulation unerheblich ist (Çetinkaya et al. 2002). Für hOCT1 scheint ausschließlich PKA als negativer Regulator relevant (Ciarimboli et al. 2004). Die Substrataufnahmerate von hOCT3 wiederum steigt bei Zugabe exogener alkalischer Phosphatasen zum Zellmedium, welche bereits phosphorylierte Serinreste dephosphorylieren. Phosphokinasen, wie oben genannt, haben demnach keinen regulatorischen Effekt auf hOCT3 (Martel et al. 2001).

Auch für die Untersuchungen zur Expressions- und Aktivitätsregulation lassen sich jedoch keine spezieübergreifenden Aussagen treffen.

1.1.2.4 Pharmakologische Implikationen

Führt man sich die immens breite Expression und Substratspezifität sowie die exakte endogene Regulierbarkeit der OCTs vor Augen, wird ihre Bedeutung für die Pharmakologie kationischer Arzneimittel, welche ca. 30 Prozent aller Pharmaka ausmachen (Choi et al. 2008), offenkundig. Das bestuntersuchte Beispiel hierfür ist das aus der Gruppe der Biguanide einzig auf dem Markt verbliebene Antidiabetikum Metformin (Glucophage®). Metformin wird sowohl von r/hOCT1, als auch r/hOCT2 transportiert (Dresser et al. 2001). Dabei entfaltet es einen Teil seiner pharmakologischen Wirkung in der Leber, indem es die hepatische Glukoneogenese vermindert. Obwohl Metformin primär renal eliminiert wird (Tzvetkov et al. 2009) und rOCT2 zudem eine bis zu einhundertfach höhere Transportkapazität als rOCT1 für Metformin besitzt (Kimura et al. 2005), ist OCT1 deshalb aufgrund seiner hepatischen Expression (in Ratte, Maus und Mensch) von großer pharmakodynamischer und -kinetischer Wichtigkeit. Im Tierversuch zeigen OCT1^{-/-}-Knockout-Mäuse folglich keine Senkung des Blutglukoselevels nach Metformingabe (Shu et al. 2007).

Klinische Studien an – bisher noch begrenzten – Kollektiven legen darüber hinaus nahe, dass auch kinetische Parameter (beispielsweise das Verteilungsvolumen) durch hOCT1-Polymorphismen beeinflusst werden können (Shu et al. 2008). Nicht-synonyme SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), deren Sequenz einen nicht-konservativen Aminosäureaustausch bewirkt, sind dabei für Modifikationen der Transportaktivität und Substratselektivität verantwortlich. So weist etwa die mit einer Allelfrequenz von 18.5% in der kaukasischen Rasse sehr häufige Punktmutation M420del eine verminderte Aufnahmegeschwindigkeit und einen erhöhten K_m -Wert für Metformin auf, während die Parameter des MPP-Transportes unbeeinflusst bleiben (Shu et al. 2007). Noch komplexer gestaltet sich das Zusammenspiel bei Applikation mehrerer Pharmaka, die kollektiv mit einem oder mehreren OCTs interagieren, wie Wang et al. (2008) an einem einfachen Modell zeigen konnten, in welchem sie die Variabilität der Cimetidin-inhibierten renalen Metformin-Clearance zwischen 3 unterschiedlichen OCT2-SNP-Genotypen nachwiesen.

Aufgrund dieser vielgestaltigen Faktoren ist das exakte Verständnis des OCT-Transportes umso bedeutsamer für die Entwicklung individualisierter Therapieregime. Denn je differenzierter die Kenntnisse auf diesem Gebiet sind, desto genauer ist die mögliche Einflussnahme, z. B. in Form der Aktivierung selektierter Ausscheidungswege durch Komedikation subtypspezifischer Substrate oder Inhibitoren (Koepsell 2004).

1.1.3 Rat Organic Cation Transporter 1 (rOCT1)

Um ein Grundverständnis des eigentlichen Transportvorganges zu erlangen und damit gleichzeitig ein detaillierteres Gesamtbild zeichnen zu können, ist die Konzentration auf den zuerst klonierten OCT, rOCT1, sinnvoll, zu dem folglich die größte Datenbasis existiert.

1.1.3.1 Bindungsstellen und Bindungstasche

Wie schon unter 1.1.2.2 knapp beschrieben, scheinen OCTs, und so auch rOCT1, nicht nur einzelne, gleich geartete Substrate zu akzeptieren. Vielmehr gewährt die Interaktionsstelle zwischen Ligand und Transportprotein offenbar vielgestaltige Wechselwirkungen (Polyspezifität). Ob hieran nun unterschiedliche Bindungsstellen bei rigider Konformation der eigentlichen Bindungstasche beteiligt sind, oder eine substratabhängige Adaptationsumgebung – sog. „induced fit“ – vorliegt, ist ebenfalls ungeklärt. Um diesem Phänomen auf den Grund zu gehen, eignen sich insbesondere mittels sog. „site-directed mutagenesis“ manipulierte Transporter, deren veränderte Eigenschaften Rückschlüsse auf die Funktion der mutierten Aminosäure(n) erlauben. Auf diese Weise konnten Gorboulev et al. (1999) erstmals einen für die Substratbindung entscheidenden Rest, Asp475 aus Transmembranhelix (TMH) 11, identifizieren, dessen konservativer Ersatz durch Glutamat die Affinität für diverse organische Kationen, u. a. TEA, signifikant erhöht. (Details siehe 3.1.2). Nachfolgend gelang es, ausgehend von kinetischen Vergleichsmessungen zwischen rOCT1 und 2 durch Arndt et al. (2001), die etwa für Corticosteron einen K_m -Unterschied von Faktor 38 zugunsten von rOCT2 erbracht hatten, durch die Bildung von Chimären aus beiden Transportern drei weitere für die MPP- und TEA-Bindung entscheidende Aminosäuren zu bestimmen (Ala 443, Leu447, Gln448, TMH 10, rOCT1) (Gorboulev et al. 2005). Gleichzeitig sicherten Popp et al. (2005) die Bedeutung dreier Aminosäuren der TMH 4 (Trp218, Tyr222, Thr226). Damit war eine ausreichende Grundlage geschaffen, um in derselben Arbeit erstmals computerbasiert ein Modell der Bindungstasche und des gesamten Transporters auf Analogiebasis der Röntgenkristallstruktur des MFS-Familienmitglieds LacY (Abramson et al. 2003) zu generieren (siehe Abbildung 1-2).

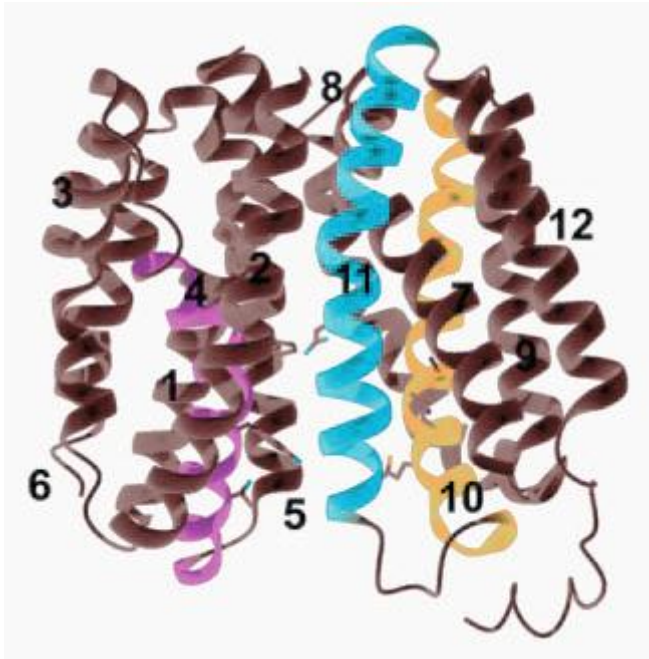


Abbildung 1-2: Modell von rOCT1, abgeleitet von der röntgenkristallographisch verifizierten Tertiärstruktur von LacY in nach innen geöffneter Konformation. Die Zahlen bezeichnen die jeweiligen TMHs, TMH 4 (violett), 10 (gelb) und 11 (zyan) sind farblich hervorgehoben (aus Popp et al. 2005).

Basierend auf obigem Strukturmodell zeigten fluorometrische Messungen der substratbindungsinduzierten Bewegung von Tetramethylrhodamin-6-maleimid (TMRM)-markiertem F483C am Berührungspunkt von TMH 2 und 11 die Existenz zusätzlicher hochaffiner Bindungsstellen für MPP, TEA, Cholin (jeweils eine) und TBuA (zwei), über deren Bedeutung jedoch nur spekuliert werden kann (Sensorfunktion?) (Gorbunov et al. 2008).

Methylmethanthiosulfonat (MMTS)-abhängige Cysteinmodifikationen von Cys322 (Lokalisation: intrazelluläre Schleife) und Cys451 (Lokalisation: Übergangsbereich TMH10 / TMH11) gestatteten zudem eine indirekte Beeinflussung der putativen Interaktionsstelle für Cholin (Sturm et al. 2007).

Das von Gorbunov et al. (2008) durch sog. „rigid body movement“ (Abramson et al. 2003) der Helixpacks TMH 1-6 gegen TMH 7-12 erstellte Modell der nach extrazellulär geöffneten Tasche untersuchten Volk et al. (2009) auf Übereinstimmungen mit bisherigen experimentellen Daten der Corticosteron-Bindung, im Besonderen dessen Interaktion mit Leu447, sowohl auf intra- als auch extrazellulärer Seite. Da sich Experiment und Modell als konsistent erwiesen, konnte unter Berücksichtigung von Phe160, welches ebenso beiderseits der Zellmembran mit Corticosteron interagiert, und starrerem Strukturvorgaben eine Beteiligung von Trp218 und Arg440 an der innersten

Bindungstasche gezeigt werden, welche sich elektrophysiologisch bestätigen ließ (Volk et al. 2009).

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Der oben dargelegte, knappe Überblick über die Thematik organischer Kationentransporter vermittelt eine Vorstellung vom Umfang eines scheinbar kleinen Forschungsgebietes, das sich wesentlich durch das Detail definiert. Lag zu Anfang der Fokus noch auf der Beobachtung stöchiometrischer Eigenschaften zur Charakterisierung des Transportvorganges, rückt heute zunehmend die genetische Manipulation und Mutationsanalyse der OCTs in das wissenschaftliche Blickfeld, mit deren Hilfe die Modellierung der Transporttasche entscheidend vorangetrieben werden konnte. Neben reinem Erkenntnisgewinn besteht hierbei die Hoffnung auf eine medizinisch nutzbare Beeinflussbarkeit (s. „Pharmakologische Implikationen“), deren Exaktheit vom Grad des Verständnisses für die genaue Interaktion von Transporter und Pharmakon abhängt. Eben diese Wechselwirkung ist jedoch bislang nur unzureichend verstanden. Zwar liegen viele Daten zur Stützung des „alternating access models“ vor (s. o.), die genauen Bindungsabläufe innerhalb der Bindungstasche sind jedoch unbekannt. Eine gleichzeitige Interaktion mit mehreren Bindestellen durch einen Liganden ist ebenso denkbar wie ein sequentieller Mechanismus, in welchem nacheinander die verschiedenen Positionen besetzt werden. Auch könnten unterschiedliche Aminosäurereste an der Substratbindung in nach innen respektive außen gerichteter Konformation des Transporters beteiligt sein. Aufgrund der durch Popp et al. (2005) erstellten Modellstrukturen von rOCT1 und der bisher vorliegenden Daten zu den darin dargestellten Einzelmутanten Y222F und D475E, wurden diese als Grundlage für weitere Untersuchungen, auch an einer erstmals erstellten Doppelmutante Y222F/D475E, herangezogen, mit dem Ziel, den Transportmechanismus als sequentiell respektive nicht-sequentiell zu charakterisieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Expressionsmodell: Xenopus-laevis-Oozyten

Als Expressionsmodell der untersuchten Transporter dienten Oozyten des afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis*. Als weithin genutztes und bewährtes Werkzeug zur Charakterisierung membranständiger Proteine gestatten die Oozyten – sofern sie über einen ausreichend langen Zeitraum extrakorporal erhalten werden können – ein weitgehend systemfehlerfreies Arbeiten. Einzig die Aktivität der der Oozytenmembran eigenen Transporter muss bei der Interpretation des Substrattransportes berücksichtigt werden.

Dies wird ermöglicht durch parallele Substrataufnahmemessungen nicht-injizierter Oozyten (~10 je Versuch), deren Mittelwert ausschlaggebend für die Verwertbarkeit der Untersuchungsergebnisse ist, d. h. festlegt, inwieweit die Messwerte tatsächlich die Transportaktivität der durch mRNA-Injektion zugeführten Fremdproteine repräsentieren. Dabei sollte der genannte Mittelwert stets kleiner sein als die geringste Radioaktivitätsaufnahme bei größter InhibitorKonzentration, ferner maximal 10% der Counts ohne Hemmstoff betragen.

2.1.2 Unbelebtes Material

Im Folgenden wird eine tabellarische Übersicht aller weiteren zur Durchführung und Auswertung der dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente benötigten Materialien gewährt.

Platten, Reaktionsgefäße und Petrischalen:

6- / 12- / 24- Vertiefungsplatten

Cellstar "X"-Well Culture Plate

Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen

Petrischalen 150ml / 50ml / 15ml	Cellstar Tissue Culture Dishes Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Reaktionsgefäße 1.5ml / 2.0ml	Eppendorf AG, Hamburg
Szintillationsgefäße	Mini-Vial 6ml Sarstedt AG, Nümbrecht
<u>Geräte und Maschinen:</u>	
Eismaschine	AF 100 Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, USA
Autoklav	Varioklav 300 EP H + P Labortechnik GmbH, Hackermoos
Waage	Jordan Sartorius AG, Göttingen
Zentrifuge	Centrifuge 5414 Eppendorf AG, Hamburg
Inkubator	Peltier-Kühlbrutschrank IPP 400 Memmert GmbH & Co KG, Schwabach
Kaltlichtquelle	KL 1500 electronic Schott AG, Mainz
Mikroskop	Wild M3; Objektiv Zeiss 16x Wild Heerbrugg AG, Heerbrugg, CH
Mikroinjektor	Modell RP Brinkmann Instruments, Mississauga, USA
Glaskanülenausziehgerät für Mikroinjektor	P 30 Sutter Instrument Company, Novato, USA
Wasserbad	Köttermann GmbH & Co KG, Hänigsen
Schüttelgerät	Köttermann GmbH & Co KG, Hänigsen

Szintillationszähler (Counter)	LS 6500 (Drucker Epson LX 650) Beckman Coulter, Inc., Brea, USA
Vortex	Heidolph Instruments, Schwabach
<u>Pipetten und Glaskanülen:</u>	
Pasteurpipetten	150mm Standardpasteurpipetten
Pipetten	500µl / 50µl fest eingestellt 0.5-10µl variabel Eppendorf AG, Hamburg Pipetman 1-20 µl variabel Gilson, Inc., Middleton, USA
Pipettenspitzen	1000µl / 200µl / 10µl Sarstedt AG, Nümbrecht
Glaskanülen für Mikroinjektor	GB 150 F-8P Science Products GmbH, Hofheim
<u>Puffer, Transportsubstrate/ -inhibitoren, Kollagenase, Szintillation, RNA:</u>	
ORI-Puffer	5mM 3-(N-morpholino)propansulfonat- NaOH, 100mM NaCl, 3mM KCl, 2mM CaCl ₂ , 1mM MgCl ₂ , pH 7.4; Eigene Herstellung
[³ H]1-Methyl-4-Phenylpyridinium	0.0585 Ci/mol EtOH
[¹⁴ C]Tetraethylammonium	0.0059 Ci/mol EtOH American Radiolabeled Chemicals, Inc., St. Louis, USA
TEA, TBuA, MPP (unmarkiert) (TBuA = Tetrabutylammonium)	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln
Kollagenase	Collagenase Type 2 PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
Szintillationsflüssigkeit	Lumasafe plus PerkinElmer, Groningen, NL
RNA (diverse, siehe Ergebnisse)	Im Labor hergestellt.

Statistiksoftware:

Software

Prism 4.0

GraphPad Software, La Jolla, USA

2.2 Methodik

Da alle Versuche, deren Ergebnisse im Fortgang der Arbeit dargestellt werden, auf dem gleichen prinzipiellen Aufbau beruhen, wird dieser nachfolgend zusammenfassend dargelegt. Hierbei wird die Abfolge der Einzelschritte eines Versuches gezeigt, ein Versuch erstreckt sich über 6 Kalendertage.

Tag 1: Nach Anästhesie mittels dreiprozentiger Tricain-Lösung wird unter halbsterilen Kautelen durch einen einseitigen paramedianen Unterbauchschnitt einem *Xenopus laevis*-Weibchen die voraussichtlich benötigte Zahl Oozyten entnommen. Anschließend erfolgt der zweischichtige Verschluss der Bauchdecke mit Einzelknopfnähten von Faszie und Haut, der Frosch wird bis zum Erwachen beobachtet und am folgenden Tag in sein Becken zurückgebracht. Die Eier werden zunächst zur groben Abtrennung des Follikelepithels mechanisch mittels zweier Pinzetten präpariert, nachfolgend zwecks enzymatischer Trennung in 1mg/ml Kollagenase-ORI-Pufferlösung bis zum nächsten Tag bei 16.0°C inkubiert.

Tag 2: Nach mehrfacher Behandlung der Oozyten mit calciumfreiem ORI-Puffer zur Lösung Ca^{2+} -abhängiger Interzellularkontakte werden jene nach Reifekriterien selektioniert. Eine klare Abgrenzbarkeit von animaletem und vegetativem Pol gilt hierbei als Gütekriterium. Es werden 96 Oozyten ausgewählt, hiervon werden 80 im Pufferbad mit je 56nl einer RNA-Lösung der Konzentration 0.2µg/ml des jeweils zu untersuchenden Transporters intrazytoplasmatisch mittels Mikroinjektor injiziert, die übrigen 16 dienen als Leerkontrolle. Je nach zur Lagerung verwendeter Platte werden maximal 4 bis 8 Oozyten pro Vertiefung zusammengeführt.

Tag 3 / Tag 4: Während der Inkubationsphase im Brutschrank bei einer konstanten Temperatur von 16.0°C, in welcher die Expression des Transportproteins abgewartet wird, werden tägliche Kontrollen der injizierten

sowie der nicht injizierten Oozyten vorgenommen. Hierbei werden unbrauchbare Eizellen (defekte Membran, zunehmende Pigmentaggregation etc.) aussortiert, die verbleibenden Oozyten in neue Platten umgelagert.

Tag 5: Letztmals wird der Vitalitätszustand der Oozyten lichtmikroskopisch überprüft. Entsprechend den zu testenden Inhibitorkonzentrationen (siehe Ergebnisse) werden Transportlösungen zu 180µl (130µl ORI, 50µl Inhibitor) in 2.0ml-Eppendorf-Gefäßen vorbereitet und je 7-10 Oozyten / Gefäß eingebracht. (Die einzelnen Inhibitorkonzentrationen werden dabei um den vermuteten K_m der jeweils getesteten Mutante (siehe Ergebnisse) gestreut.) Zum Start des Versuchs bei 18.0°C Umgebungstemperatur werden 20µl einer 62.5nM [³H]MPP- bzw. 18.2nM [¹⁴C]TEA-Lösung zugegeben, die anschließende Transportdauer beträgt 30min. Nach Ablauf dieser Zeit wird die Reaktion in Eiswasser gestoppt, die Oozyten vierfach gewaschen und einzeln mit möglichst wenig Waschpuffer durch die Pasteurpipette in Szintillationsgefäße mit 100µl fünfprozentiger SDS-Lösung zur Solubilisierung der Lipidmembran transferiert. Nach 30min auf dem Rüttler werden dem Lysat 1ml Szintillationsflüssigkeit zugegeben, die Komponenten auf einem Vortex vermischt und schließlich der Radioaktivitätsgehalt der einzelnen Gefäße im Szintillationszähler gemessen. Stets werden hierbei zwei Überstandswerte je Inhibitorkonzentration mitbestimmt, um die Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Messgefäßen sicherstellen zu können. Außerdem wird eine radioaktive Kontamination der Versuchskomponenten durch Messung von drei Leerwerten ausgeschlossen (Mittelwert_{Leerwerte} ± SEM = 5.9±0.4; n=111).

Tag 6: Die Messergebnisse werden einer statistischen Auswertung mit Graphpad Prism 4.0 zugeführt. Die gewonnenen Daten werden normalisiert und einer nichtlinearen Analyse auf Basis der Hill-Gleichung unterzogen, die graphische Darstellung ebenfalls mit Prism 4.0 umgesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Mutationseffekte auf den $K_m(\text{MPP})$ und den $K_m(\text{TEA})$

Wie bereits einleitend dargestellt, kann die Analyse der durch Mutation veränderten Eigenschaften eines Transporters Hinweise auf dessen Transportmechanismus geben. Die Auswahl der zu mutierenden Aminosäuren bestimmt dabei im Wesentlichen die Aussagekraft und Interpretierbarkeit der Ergebnisse. Dies zeigt sich anhand eines topographischen Modells, welches die große Anzahl möglicher Mutationsstellen verdeutlicht.

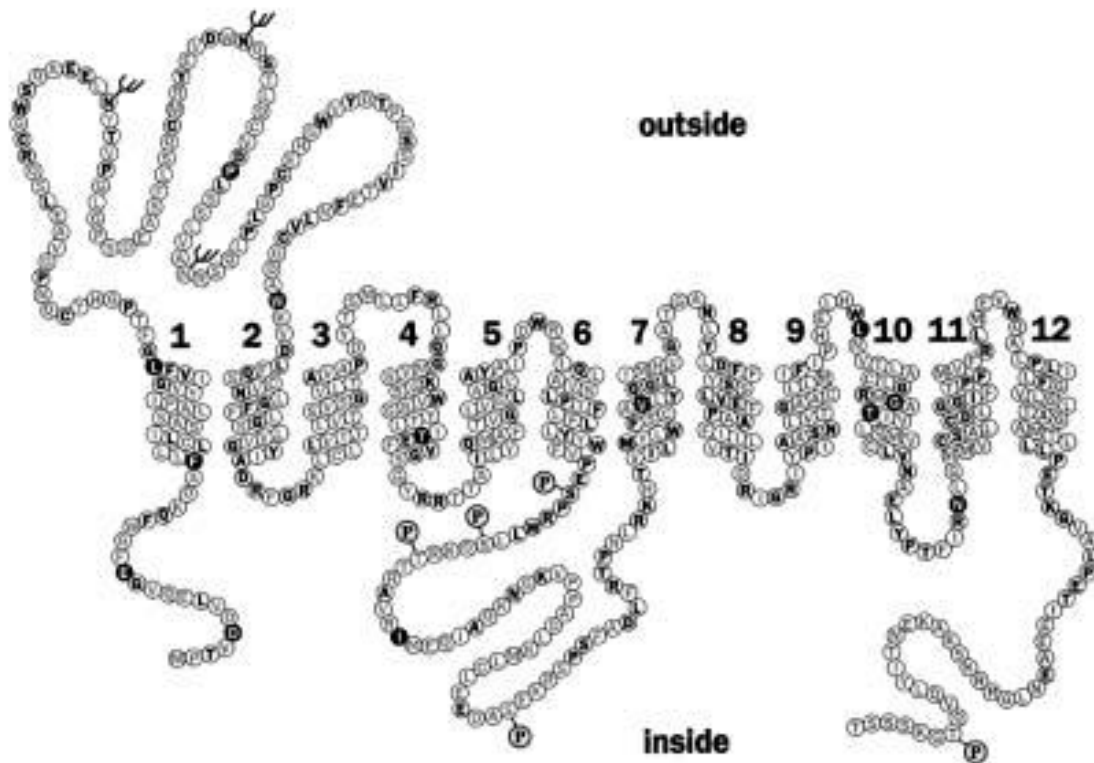


Abbildung 3-1: Topographisches Modell von rOCT1 (Wildtyp) (Koepsell et al. 1998)

Im Folgenden soll dargestellt werden, welche Mutanten des rOCT1 für die vorliegende Arbeit gewählt wurden, basierend auf der Position der veränderten Aminosäuren im Gerüst des Transporters und bestehenden Erkenntnissen zu deren Bedeutung. Es ist zu beachten, dass unten zitierte K_m -Werte neueren

Untersuchungen entstammen, welche jedoch die Interpretation des Datenmaterials nicht in Frage stellen.

3.1.1 rOCT1 Y222F

Diese Mutante wurde erstmals 2005 durch Popp et al. untersucht. Als eine von 18 in dieser Studie untersuchten Aminosäuren befindet sich Tyr222 in Transmembranhelix 4 (Koepsell et al. 1999). Der Austausch gegen Phenylalanin bewirkte eine Erhöhung der Affinität für den Transport von TEA ($K_{m(\text{TEA})[\text{WT}]} = 53 \pm 3 \mu\text{M}$, $K_{m(\text{TEA})[\text{Y222F}]} = 21 \pm 2 \mu\text{M}$).

Der K_m für MPP änderte sich ebenfalls, die Affinität für MPP sank jedoch ($K_{m(\text{MPP})[\text{WT}]} = 5.1 \pm 0.5 \mu\text{M}$, $K_{m(\text{MPP})[\text{Y222F}]} = 9.0 \pm 0.7 \mu\text{M}$).

Die Autoren interpretierten diese Befunde als deutlichen Hinweis, dass Tyr222 an der Substratbindung im aktiven Zentrum des Transporters beteiligt ist (Popp et al. 2005).

Die neben Y222F von Popp et al. charakterisierte Punktmutation Y222L wies ebenso eine K_m -Erniedrigung für MPP auf. Daher wird der Mutante Y222F schlicht aufgrund der bis dato umfangreicheren Datenlage für die nachfolgend vorgestellten Untersuchungen der Vorzug gegeben.

3.1.2 rOCT1 D475E

1999 befassten sich Gorboulev et al. mit der Rolle konservierter saurer Aminosäuren in Transportern der OCT-Familie beim Transportprozess. Ein Vergleich der Primärstrukturen der bekannten OCTs (1, 2, 3) mit denen der OCTNs und OATs zeigte die Konservierung von sechs sauren Aminosäureresten (Glu68, Glu69, Asp95, Asp150, Asp379, Asp475) allein in den organischen Kationentransportern. Nach Auswahl von Asp475 (lokalisiert in Transmembranhelix 11) zur weiteren Charakterisierung wurden die Punktmutationen D475R, D475N und D475E erstellt, jedoch zeigte nur D475E eine messbare Transportaktivität nach Expression in *Xenopus-laevis*-Oozyten.

Die Bestimmung der K_m -Werte für TEA ergab hier eine ähnliche Affinitätsänderung wie bereits für Y222F dargestellt. $K_{m(\text{TEA})[\text{D475E}]}$ war mit $18.0 \pm 1.0 \mu\text{M}$ deutlich kleiner als $K_{m(\text{TEA})[\text{WT}]}$ (s. o.).

Demgegenüber zeigten sich $K_{m(\text{MPP})[\text{D475E}]}$ ($3.1 \pm 0.9 \mu\text{M}$) und $K_{m(\text{MPP})[\text{WT}]}$ ($5.1 \pm 0.5 \mu\text{M}$) nahezu identisch (Gorboulev et al. 1999).

3.1.3 rOCT1 Y222F/D475E

Wie oben dargelegt, zeigten die beiden Einzelmutanten Y222F und D475E eine Affinitätserhöhung für den Transport von TEA, wohingegen die Affinität für den Transport von MPP durch den Austausch der jeweiligen Aminosäuren verringert wurde bzw. unbeeinflusst war. Da also die untersuchten Positionen offensichtlich eine wichtige Rolle für die Affinität von TEA spielen, stellt sich die Frage, in welcher Weise Tyr222 und Asp475 mit dem Substrat interagieren.

Sind beide gleichzeitig an der TEA-Bindung beteiligt oder beobachtet man einen sequentiellen Mechanismus, bei dem zuerst der eine, dann der andere Aminosäurerest mit TEA interagiert? Zur Beantwortung dieser Frage wurde die Kinetik der Doppelmutante Y222F/D475E charakterisiert.

Die Bestimmung der K_m -Werte für TEA und MPP ergaben $K_{m(\text{TEA})[\text{Y222F/D475E}]} = 5.9 \pm 0.4 \mu\text{M}$ und $K_{m(\text{MPP})[\text{Y222F/D475E}]} = 2.9 \pm 0.4 \mu\text{M}$. Abbildungen 3-2 und 3-3 zeigen die Sättigungskinetiken.

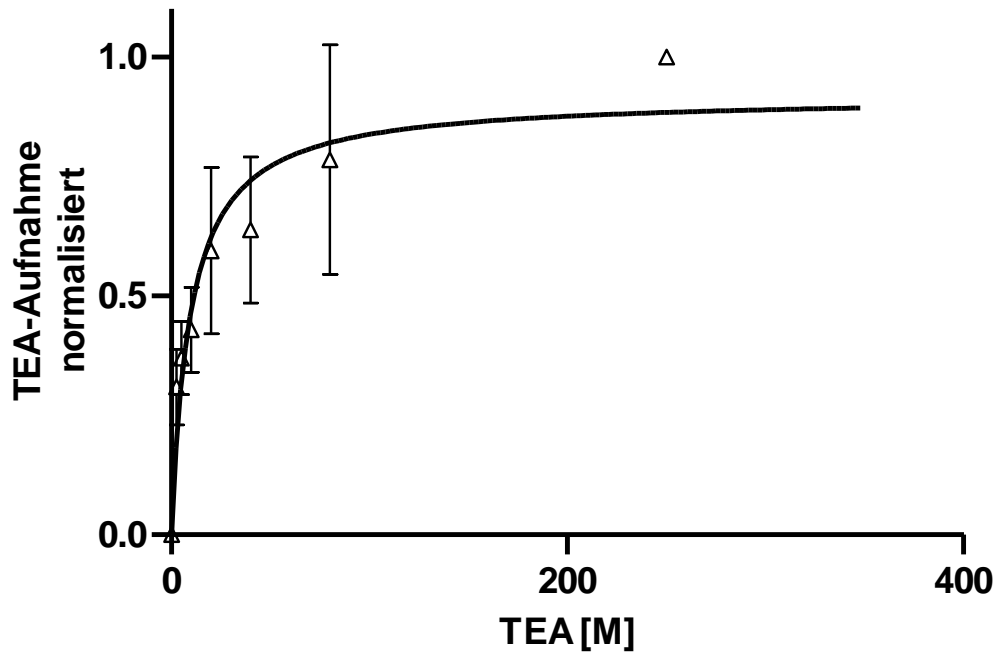


Abbildung 3-2: TEA-Sättigungskinetik für Y222F/D475E

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. aus 4 Einzelexperimenten mit je 8 Messpunkten (0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 250 μ M).

Die Kurve wurde mittels Anpassung der Michaelis-Menten-Gleichung ermittelt.

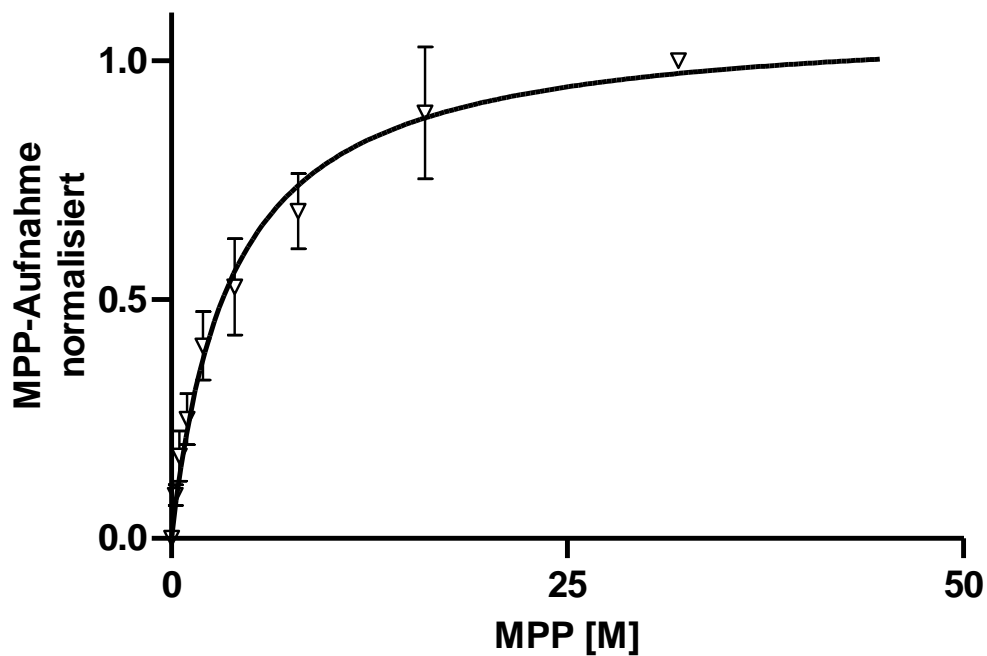


Abbildung 3-3: MPP-Sättigungskinetik für Y222F/D475E

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. aus 4 Einzelexperimenten mit je 9 Messpunkten (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 μ M).

Die Kurve wurde mittels Michaelis-Menten-Fit ermittelt.

Aus dem Vergleich der in dieser Arbeit ermittelten Michaelis-Menten-Konstanten der Doppelmutante Y222F/D475E mit den bereits vorliegenden K_m -Werten zeigt sich erwartungsgemäß keine statistisch fassbare Änderung der Affinität für MPP (vgl. Tabelle 3-1). Vielmehr scheint die Mutation von D475 den Effekt der Y222F Mutante rückgängig zu machen.

Interessant ist weiterhin, dass die gleichzeitige Mutation der zuvor einzeln betrachteten Stellen für $K_{m(\text{TEA})}$ einen signifikant additiven Effekt hat.

Beide Beobachtungen sprechen somit für eine simultane Interaktion der veränderten Aminosäuren mit den transportierten Substraten.

rOCT1-Typ	$K_{m(\text{MPP})}$	$K_{m(\text{TEA})}$
Wildtyp	5.1±0.5 (10)	53.1±2.6 (11)
Y222F	9.0±0.7 (3) **	20.8±1.5 (4) ***
D475E	3.1±0.9 (3) °°°	18.0±1.0 (3) ***
Y222F/D475E	2.9±0.4 (3) °°°	5.9±0.4 (4) ***°

Tabelle 3-1: $K_{m(\text{MPP})}$ und $K_{m(\text{TEA})}$ in μM im Vergleich, Anzahl der jeweiligen Versuch in Klammern ()

** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; p entspricht dem Signifikanzniveau zum Wildtyp.

° $p < 0.05$; °°° $p < 0.001$; p entspricht dem Signifikanzniveau zur Mutante Y222F.

3.2 Hemmkinetik TEA vs. [³H]MPP: Bestimmung des IC_{50(TEA)}

Um Aussagen über den Mechanismus des Substrattransportes eines Transportproteins treffen zu können, muss man zunächst eine modellhafte Vorstellung über den schrittweisen Ablauf dieses Prozesses gewinnen.

Volk et al. (2009) nahmen für rOCT1 einen Mechanismus nach dem „alternating access model“ an, welches bereits 2003 durch Abramson et al. für die Lactose Permease von *E. coli* postuliert wurde. Demnach binden ein oder mehrere Substrate in einer nach außen geöffneten Bindungstasche des Transporters. Dieser vollzieht daraufhin eine Konformationsänderung und besagte Tasche öffnet sich zur Innenseite, um das Substrat / die Substrate in das Zytosol zu entlassen.

Der erste Schritt ist also die Interaktion des zu transportierenden Moleküls mit einer Bindungstasche. Im Falle von rOCT1 werden für diese überlappende Substratbindungsstellen für mehrere Substrate zur gleichen Zeit angenommen, seien sie nun transportiert (z. B. TEA, MPP) oder nicht transportierte Inhibitoren (z. B. Corticosteron). Gestützt wird diese These unter anderem durch die Beobachtung, dass bei einigen untersuchten Mutanten (W218F, W218Y, W218L; Popp et al. 2005; L447Q/Q448E, A443I/L447Q/Q448E; Gorboulev et al. 2005) sowie dem Wildtyp sich der $K_{m(TEA)}$ und der $K_{i(TEA)}$ für die Hemmung der [³H]MPP Aufnahme nicht signifikant unterscheiden. Da kompetitive Effekte aufgrund einer weit unter dem $K_{m(MPP)}$ gewählten Substratkonzentration nahezu ausgeschlossen werden können, beobachtet man offenbar sowohl im sättigungskinetischen als auch im hemmkinetischen Ansatz die gleiche Interaktionsfolge, zumindest für TEA (Popp et al. 2005).

Da auch die Mutanten Y222F, D475E und Y222F/D475E eine Erniedrigung der K_m -Werte für TEA aufweisen (s. o.), wurde untersucht, ob bei diesen Mutanten ebenfalls der K_i -Wert für die Hemmung der MPP-Aufnahme verringert ist.

3.2.1 rOCT1 Wildtyp

Als Vergleichsgrundlage wurde zunächst die Hemmkinetik für den wildtypischen rOCT1 bestimmt. Dabei wurde die Hemmung der Aufnahme von 6.25nM [³H]MPP durch TEA gemessen. Die TEA-Konzentrationen wurden so gewählt, dass sie um den vermuteten IC_{50(TEA)[WT]} streuten.

Da die gewählte MPP-Konzentration weit unter dem K_{m(MPP)} (5.1±0.5µM) liegt, sollte der IC₅₀-Wert dem K_i-Wert entsprechen.

Diese Interpretation gilt allerdings nur, wenn die hochaffinen Bindungsstellen des Transporters für MPP nicht direkt am Transport beteiligt sind (s. Diskussion).

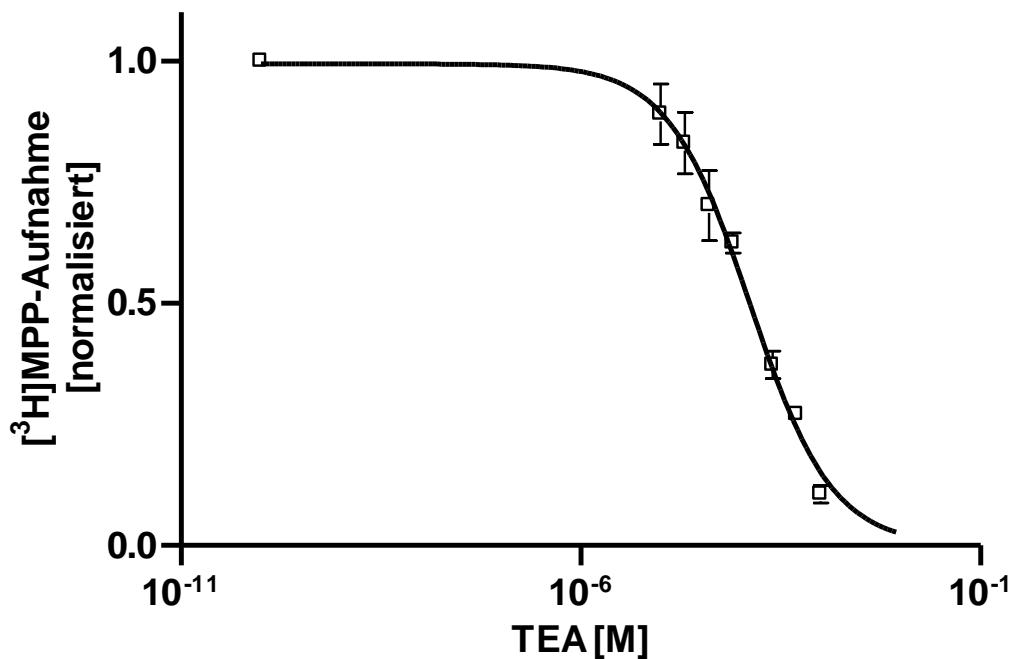


Abbildung 3-4: Wildtyp-TEA-Inhibition der [³H]MPP-Aufnahme

Die normalisierten Mittelwerte±S.E.M. der [³H]MPP-Aufnahme aus 4 Einzelexperimenten sind gegen die TEA-Konzentration (Messpunkte: ~0, 10, 20, 40, 80, 250, 500, 1000µM) aufgetragen. Die Kurve wurde mittels Hill-Gleichung ermittelt, der Hillkoeffizient beträgt 0.85.

Der gemittelte IC_{50(TEA)} für rOCT1 Wildtyp beträgt demnach 131.5±21.3µM.

Im Folgenden werden die Ergebnisse für die untersuchten Mutanten präsentiert.

Die Messungen wurden jeweils analog zum Wildtyp durchgeführt, Unterschiede der gewählten TEA-Konzentrationen sind den Abbildungen zu entnehmen.

3.2.2 rOCT1 Y222F

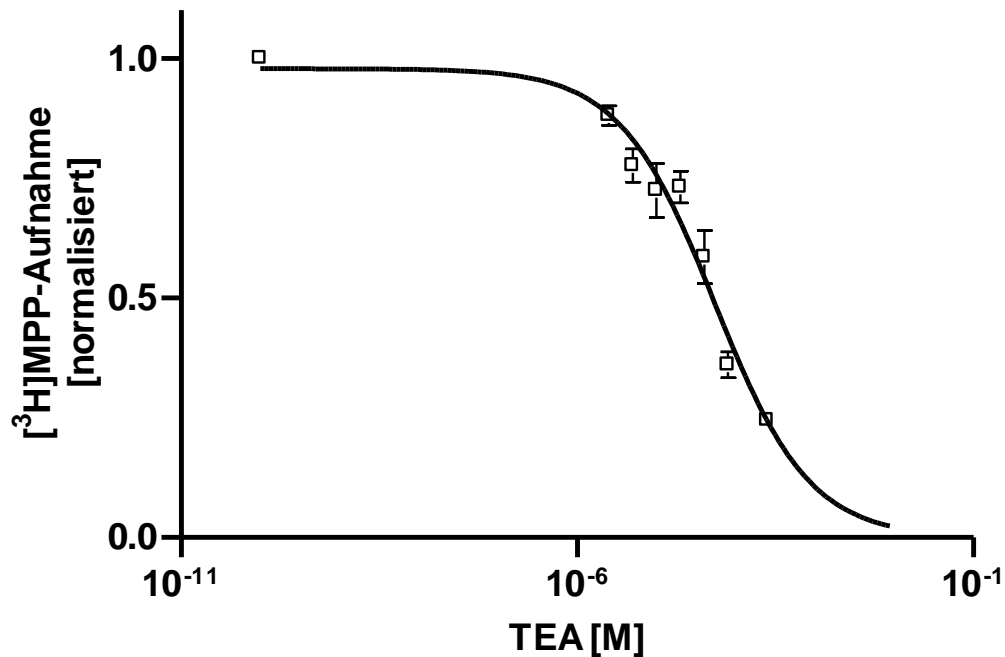


Abbildung 3-5: Y222F-TEA-Inhibition der [³H]MPP-Aufnahme

Die normalisierten Mittelwerte ± S.E.M. der [³H]MPP-Aufnahme aus 4 Einzelexperimenten sind gegen die TEA-Konzentration (Messpunkte: ~0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 250 μM) aufgetragen.

Die Kurve wurde mittels Hill-Gleichung ermittelt, der Hillkoeffizient beträgt 0.73.

Der $IC_{50(TEA)[Y222F]}$ der in Abbildung 3-5 gezeigten Hemmkurve ist $54.3 \pm 9.4 \mu M$ (vgl. Tabelle). Die Mutante Y222F erhöht somit die Affinität des Transporters für TEA als Hemmer der [³H]MPP-Aufnahme.

3.2.3 rOCT1 D475E

Auch für die Einzelmutante D475E beobachtet man eine Affinitätserhöhung unter den gegebenen Messbedingungen. Diese fällt mit einem $IC_{50(TEA)[D475E]}$ von $8.1 \pm 1.2 \mu M$ (vgl. Abb. 3-6 und Tabelle) jedoch deutlich größer (ca. Faktor 7)

aus als bei Y222F. Asp475 scheint also zumindest eine andere Bedeutung in der Substrat- / Inhibitorbindung zuzukommen als Y222F.

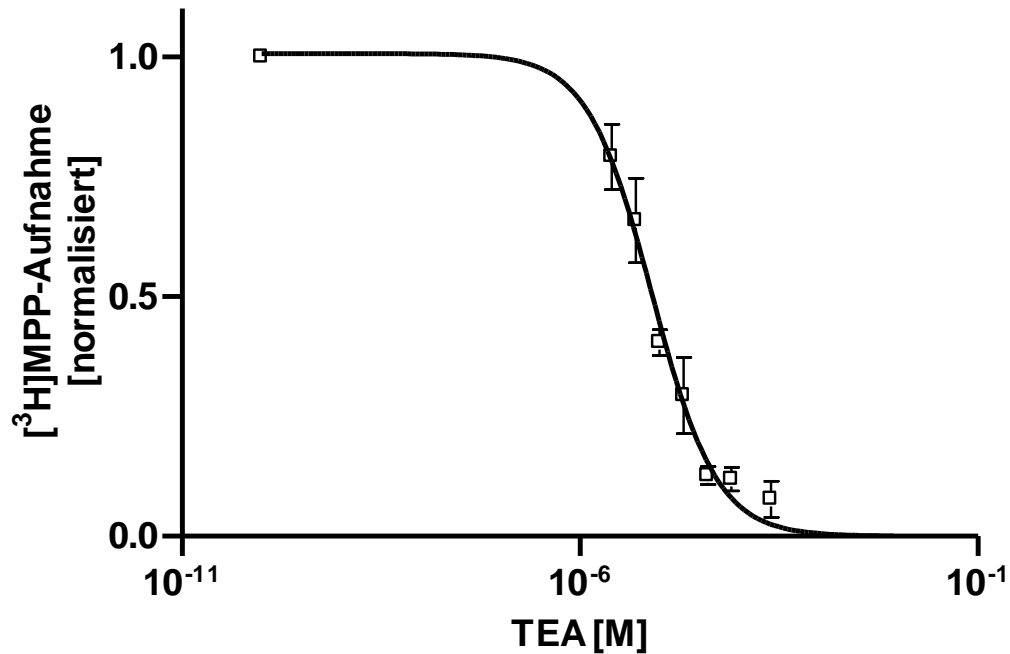


Abbildung 3-6: D475E-TEA-Inhibition der $[^3\text{H}]$ MPP-Aufnahme

Die normalisierten Mittelwerte \pm S.E.M. der $[^3\text{H}]$ MPP-Aufnahme aus 4 Einzelexperimenten sind gegen die TEA-Konzentration (Messpunkte: \sim 0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 250 μM) aufgetragen.

Die Kurve wurde mittels Hill-Gleichung ermittelt, der Hillkoeffizient betragt 1.07.

3.2.4 rOCT1 Y222F/D475E

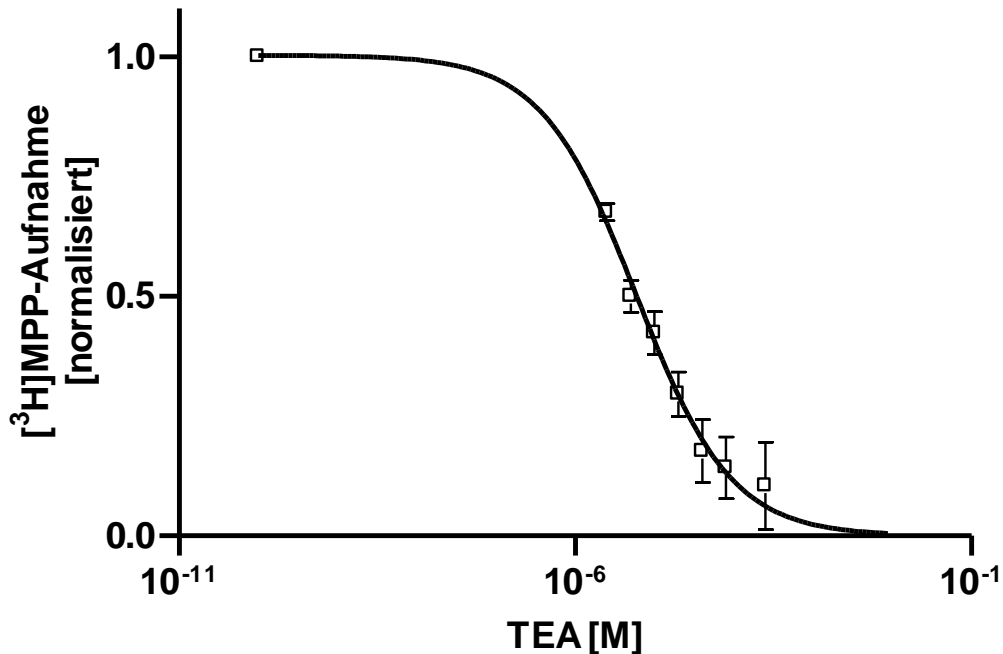


Abbildung 3-7: Y222F/D475E-TEA-Inhibition der [³H]MPP-Aufnahme

Die normalisierten Mittelwerte±S.E.M. der [³H]MPP-Aufnahme aus 4 Einzelexperimenten sind gegen die TEA-Konzentration (Messpunkte: ~0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 250μM) aufgetragen.

Die Kurve wurde mittels Hill-Gleichung ermittelt, der Hillkoeffizient beträgt 0.73.

Mit $5.9 \pm 1.1 \mu\text{M}$ unterscheidet sich der $\text{IC}_{50(\text{TEA})[\text{Y222F/D475E}]}$ nicht signifikant vom $\text{IC}_{50(\text{TEA})[\text{D475E}]}$ (vgl. Tabelle). Folglich wirken sich die Mutationen Y222F und D475E nicht additiv auf die Hemmung der MPP-Aufnahme durch TEA aus.

3.2.5 Mutationseffekte: Signifikante Unterschiede?

Abschließend zum Thema „Hemmkinetik TEA vs. [³H]MPP“ bleibt die Frage der Signifikanz der gesehenen Affinitätsunterschiede zwischen den betrachteten Transportern. Abbildung 3-8 fasst alle bisher gezeigten Hemmkurven zur besseren Übersicht nochmals zusammen, die mittels ANOVA und Tukey-Test bestimmten Signifikanzniveaus sind Tab. 3-2 zu entnehmen.

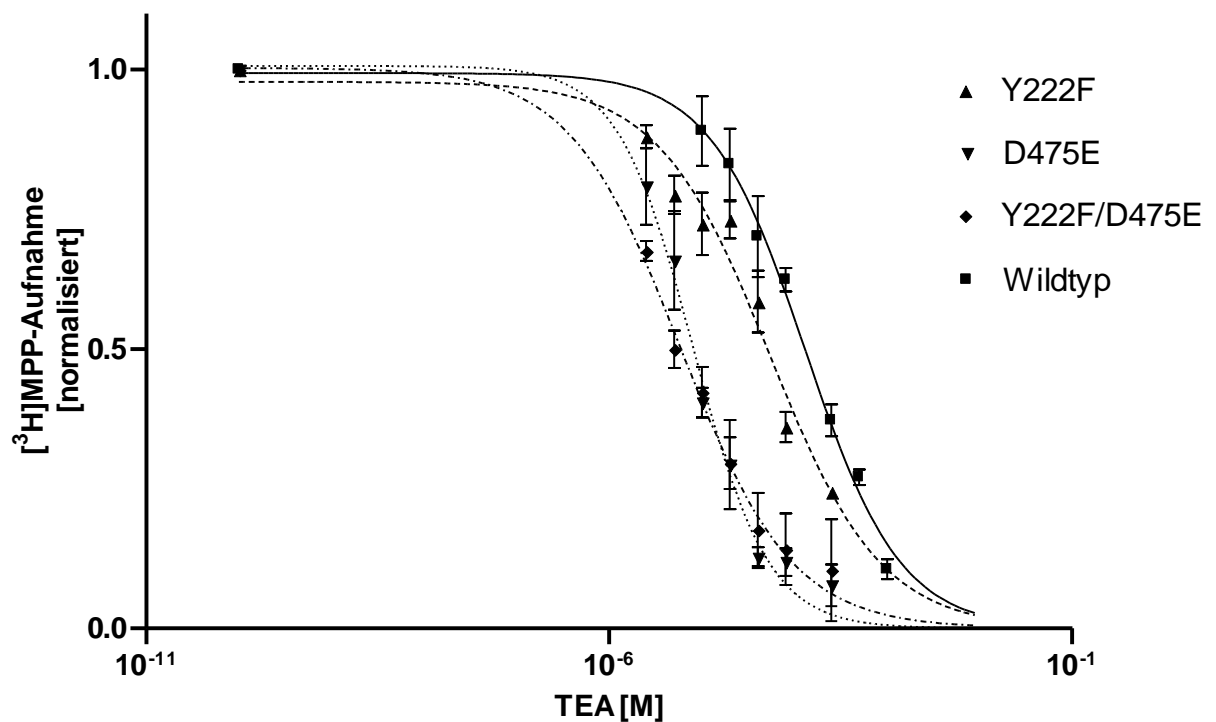


Abbildung 3-8: Überblick über TEA-Hemmkinetiken vs. [³H]MPP

Kurvenzuordnung zu den Transportern (Wildtyp und Mutanten): siehe Legende.

Kurvenauswertungen: siehe Abschnitte 3.2.2. bis 3.2.5.

Man erkennt, dass sich alle Mutanten hochsignifikant vom Wildtyp des rOCT1 unterscheiden ($p < 0.001$). Auch ist auf gleichem Signifikanzniveau ein Unterschied zwischen Y222F einerseits und D475E bzw. Y222F/D475E andererseits zu erkennen. Jedoch besteht, im Gegensatz zur TEA-Aufnahmekinetik, kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Mutanten D475E und Y222F/D475E ($p > 0.05$).

rOCT1-Typ	IC _{50(TEA)}	Wildtyp	Y222F	D475E	Y222F/D475E
Wildtyp	131.5±21.3	-	***	***	***
Y222F	54.3±9.4	***	-	***	***
D475E	8.1±1.2	***	***	-	n. s.
Y222F/D475E	5.9±1.1	***	***	n. s.	-

Tabelle 3-2: Zusammenfassung der IC_{50(TEA)} in µM für [³H]MPP-Aufnahme bei rOCT1 Wildtyp, Y222F, D475E, Y222F/D475E

*** p<0.001; p entspricht dem Signifikanzniveau der IC_{50(TEA)}-Werte der MPP-Aufnahme.

3.3 Vergleich von K_{m(TEA)} und IC_{50(TEA)}

Es folgt ein Vergleich der bekannten K_{m(TEA)}-Werte von rOCT1_{[WT]/[Y222F]/[D475E]/[Y222F/D475E]} mit den entsprechenden IC_{50(TEA)}-Werten. Alle Zahlenwerte sind nochmals in Tabelle 3-3 aufgeführt.

	Wildtyp	Y222F	D475E	Y222F/D475E
K _{m(TEA)}	53±3	21±2	18±1	6±1
IC _{50(TEA)}	132±21	54±9	8±1	6±1
p-Wert	***	***	***	n. s.

Tabelle 3-3: Vergleich von IC_{50(TEA)} des [³H]MPP-Uptake und K_{m(TEA)} von Mutanten und Wildtyp. Werte in µM

*** p<0.001 entspricht dem Signifikanzniveau des t-Tests der jeweiligen Spalten.

In der direkten Gegenüberstellung zeigt sich, dass sowohl die sättigungskinetischen als auch die inhibitionskinetischen Aufnahmemessungen durch o. g. Mutationen gleichartig beeinflusst werden im Sinne einer Affinitätszunahme für TEA. Da die Mutante D475E jedoch den K_{m(TEA)} nicht signifikant verschieden von Y222F senkt (p>0.05, s. Tabelle 3-1), tritt auch ein wichtiger Unterschied zutage: Die Doppelmutante Y222F/D475E wirkt sich nur auf den Substrattransport von TEA additiv aus, nicht aber auf den IC_{50(TEA)}. Dies wiederum zeigt, dass die Interaktion von TEA beim singulären TEA-Transport im Vergleich zur Hemmung der MPP-Translokation durch TEA unterschiedlicher Natur ist.

3.4 Hemmkinetik TBUA vs. [³H]MPP: Bestimmung des IC₅₀(TBUA)

Die von Popp et al. (2005) erstellte Tertiärstruktur von rOCT1 zeigte eine Bindungstasche, in welcher neben Thr226, Leu447 und Glu448 auch die beiden in dieser Arbeit betrachteten Aminosäuren Tyr222 und Asp475 in der zur intrazellulären Seite gerichteten Konformation zugänglich sind.

Die Untersuchungen von Volk et al. (2009) erweiterten das Modell auf Basis eines fixen Interaktionsquartetts für die Corticosteronbindung, bestehend aus Phe160, Trp218, Arg440 und Leu447. Hierbei zeigte sich Asp475 auch in der nach extrazellulär weisenden „innermost cavity“ zugänglich, Tyr222 schien ausschließlich von Zytosolseite als Bindungspartner in Frage zu kommen.

Da es sich bei TEA um einen transportierten Inhibitor handelt, ist keine Differenzierung extra- und intrazellulärer Interaktionen möglich, was die Aussagekraft der TEA-Transportexperimente einschränkt. Deshalb ist zur exakteren Analyse des o. g. Strukturmodells der Einsatz eines nicht transportierten Inhibitors hilfreich. TBUA, ein sterisch „sperriger“ (siehe 1.1.2.2) und daher nicht translozierter Hemmer aller bekannten OCTs, dessen Einfluss auf den Transportprozess somit auf die Applikationsseite beschränkt bleibt, erscheint hierfür gut geeignet.

Die Konzentrationen von TBUA sind so gewählt, dass sie die Interaktion des Inhibitors mit der niederaffinen TBUA-Bindungsstelle wiedergeben (Gorbunov et al. 2008), [³H]MPP fungiert wiederum als radioaktive Tracersubstanz.

3.4.2 rOCT1 Wildtyp

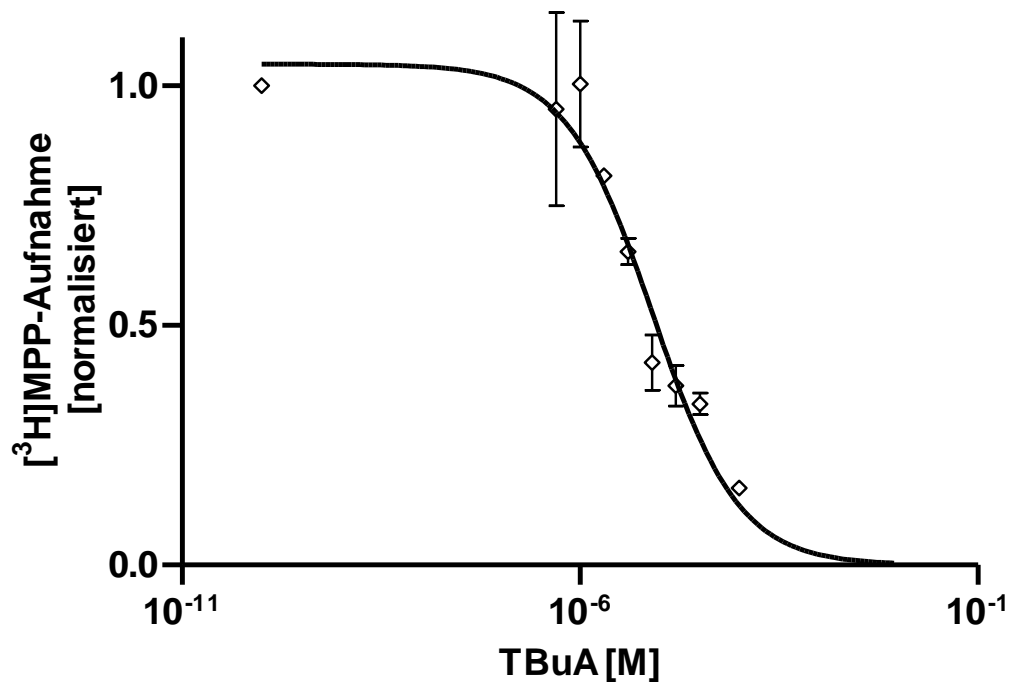


Abbildung 3-9: Wildtyp-TBuA-Inhibition der $[^3\text{H}]$ MPP-Aufnahme

Die normalisierten Mittelwerte \pm S.E.M. der $[^3\text{H}]$ MPP-Aufnahme aus 3 Einzelexperimenten sind gegen die TBuA-Konzentration (Messpunkte: ~ 0 , 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 100 μM) aufgetragen.

Die Kurve wurde mittels Hill-Gleichung ermittelt, der Hillkoeffizient beträgt 0.80.

Aus den gegebenen Messwerten errechnet sich ein $\text{IC}_{50(\text{TBuA})[\text{WT}]}$ von $8.2 \pm 1.8 \mu\text{M}$, welcher sich somit deutlich von dem durch Gorbunov et al. (2008) publizierten Wert von $460 \pm 100 \text{nM}$ unterscheidet. Die Ursache dieser Differenz wurde nicht gefunden.

3.4.3 rOCT1 Y222F

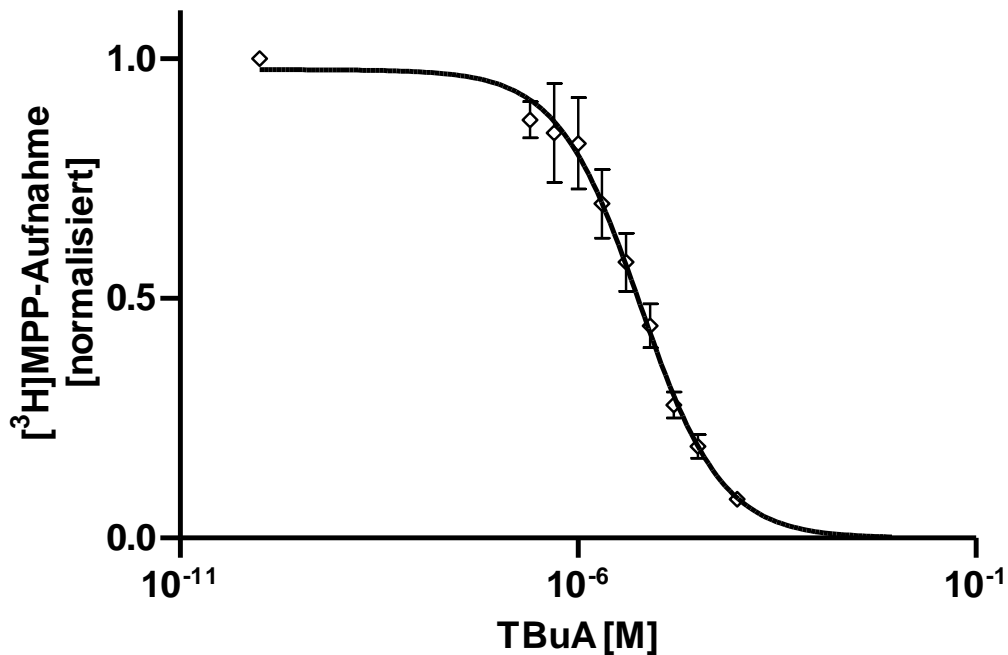


Abbildung 3-10: Y222F-TBuA-Inhibition der [³H]MPP-Aufnahme

Die normalisierten Mittelwerte±S.E.M. der [³H]MPP-Aufnahme aus 4 Einzelerperimenten sind gegen die TBuA-Konzentration (Messpunkte: ~0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 100μM) aufgetragen.

Die Kurve wurde mittels Hill-Gleichung ermittelt, der Hillkoeffizient beträgt 0.84.

Der durch Anpassung an die Hill-Gleichung bestimmte $IC_{50(TBuA)[Y222F]}$ beträgt $6.0 \pm 1.1 \mu M$, scheint mithin keine Veränderung in Bezug auf die Affinität des Transporters zu TBuA wiederzugeben (bzgl. Signifikanz s. 3.4.6). Das Ausbleiben der Affinitätsänderung für TBuA durch den Austausch von Tyr222 gegen Phenylalanin ist relevant für die Lokalisation dieser Aminosäure in der nach außen oder nach innen geöffneten Bindungstasche des dreidimensionalen Strukturmodells (s. 3.4.1).

3.4.4 rOCT1 D475E

Die durchschnittliche halbmaximale TBuA-Hemmkonzentration aus 3 Experimenten ist $0.3 \pm 0.07 \mu M$ (s. Abbildung 3-11). Selbst ohne statistische Sicherung ist dieser Wert erkennbar kleiner als die vorgezeigten

Vergleichswerte des rOCT1-Wildtyps und der Mutante Y222F (ca. Faktor 27 und 20). Die Faktoren bewegen sich in derselben Größenordnung wie derjenige zwischen $IC_{50(TEA)[WT]}$ und $IC_{50(TEA)[D475E]}$ (≈ 16).

Somit (Größe des Faktors, Ähnlichkeit zu TEA) erscheint eine direkte Interaktion auch von TBuA mit Asp475 denkbar.

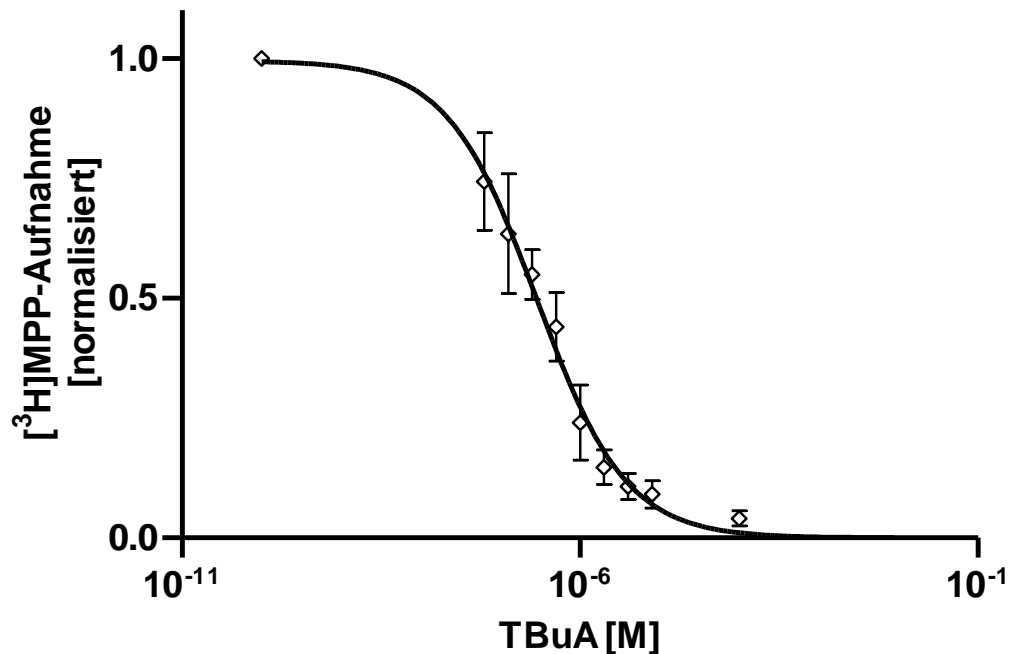


Abbildung 3-11: D475E-TBuA-Inhibition der [³H]MPP-Aufnahme

Die normalisierten Mittelwerte \pm S.E.M. der [³H]MPP-Aufnahme aus 3 Einzelexperimenten sind gegen die TBuA-Konzentration (Messpunkte: -0, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 100 μ M) aufgetragen.

Die Kurve wurde mittels Hill-Gleichung ermittelt, der Hillkoeffizient beträgt 0.77.

3.4.5 rOCT1 Y222F/D475E

Um die Vergleichsgrundlage zwischen dem Inhibitionsverhalten von TEA und TBuA zu vervollständigen, muss auch die Hemmkinetik der Doppelmutante aufgezeichnet werden (s. Abbildung 3-12).

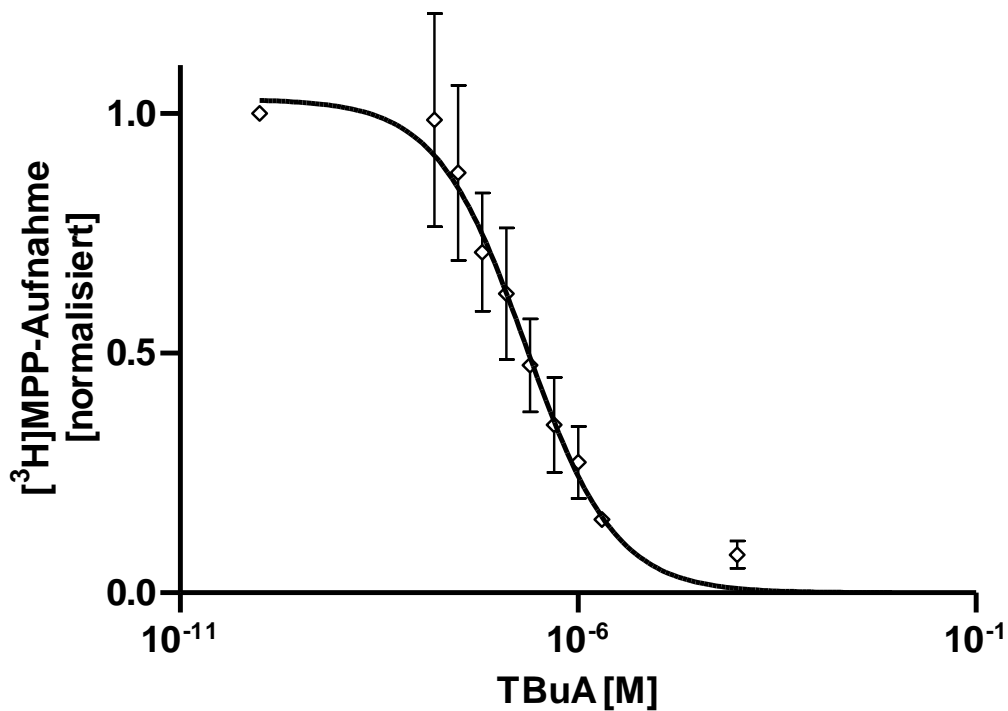


Abbildung 3-12: Y222F/D475E-TBuA-Inhibition der [³H]MPP-Aufnahme

Die normalisierten Mittelwerte ± S.E.M. der [³H]MPP-Aufnahme aus 4 Einzelexperimenten sind gegen die TBuA-Konzentration (Messpunkte: ~0, 0.015625, 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 100 μM) aufgetragen.

Die Kurve wurde mittels Hill-Gleichung ermittelt, der Hillkoeffizient beträgt 0.77.

Erwartungsgemäß weicht der $IC_{50(TBuA)[Y222F/D475E]}$ mit $0.2 \pm 0.08 \mu M$ kaum von der halbmaximalen Hemmkonzentration von TBuA für die Mutante D475E ab. Es scheint also, dass die gleichzeitige Mutation beider Positionen auch für diese Hemmsubstanz keinen additiven Effekt erbringt.

3.4.6 Mutationseffekte: Signifikante Unterschiede?

Wie unter 3.2.6 demonstriert, sollen nun noch einmal alle präsentierten Ergebnisse und möglichen Unterschiede auf ihre statistische Signifikanz hin überprüft werden. Abbildung 3-13 und Tabelle 3-4 geben einen Überblick.

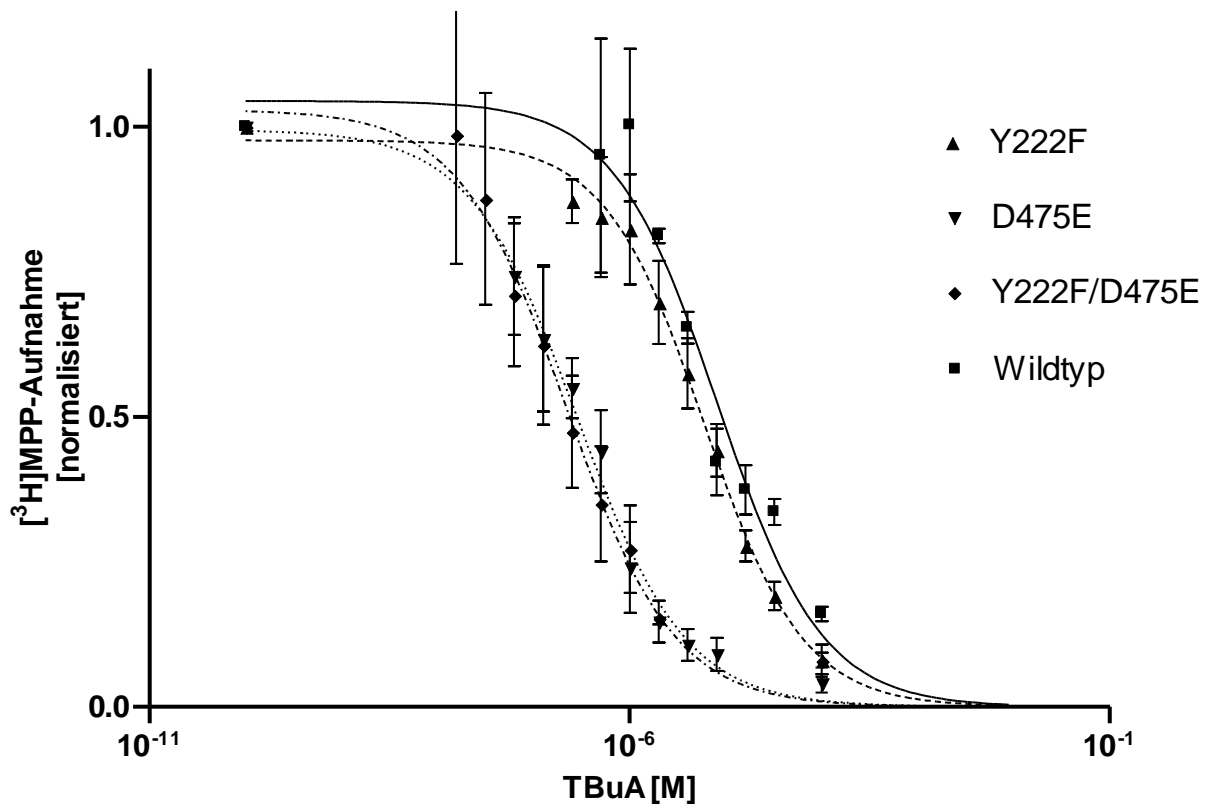


Abbildung 3-13: Überblick über TBuA-Hemmkinetiken vs. [³H]MPP

Kurvenzuordnung zu den Transportern (Wildtyp und Mutanten): siehe Legende.

Kurvenauswertungen: siehe Abschnitte 3.4.2. bis 3.4.5.

rOCT1-Typ	IC _{50(TBuA)}	Wildtyp	Y222F	D475E	Y222F/D475E
Wildtyp	8.2±1.8	-	n. s.	***	***
Y222F	6.0±1.1	n. s.	-	**	**
D475E	0.3±0.07	***	**	-	n. s.
Y222F/D475E	0.2±0.08	***	**	n. s.	-

Tabelle 3-4: Zusammenfassung der IC_{50(TBuA)} in µM für [³H]MPP-Aufnahme bei rOCT1 Wildtyp, Y222F, D475E, Y222F/D475E

** p<0.01; *** p<0.001; p entspricht dem Signifikanzniveau der IC_{50(TBuA)}-Werte der MPP-Aufnahme.

Die Statistik bestätigt also, dass es keinen nachweisbaren Unterschied zwischen den IC₅₀-Werten von TBuA für den Wildtyp und Y222F gibt.

Ebenso bringt die Doppelmutante (wie bereits aufgrund der eng beieinander liegenden Hemmkonzentrationen zu vermuten war) keinen signifikant von D475E verschiedenen, additiven Effekt mit sich.

4 Diskussion

4.1 Erstellung dreidimensionaler Dockingmodelle

4.1.1 Grundlagen der Modellierung

Bisher konnte die Raumstruktur nur weniger Transportproteine von Prokaryoten aufgeklärt werden, die Kristallisierung von Transportern eukaryotischer Lebensformen hingegen gelang nicht. Aus diesem Grund ist man auf die Modellierung eukaryotischer Transporter anhand röntgenkristallographischer Raumstrukturen von Transportproteinen prokaryotischen Ursprungs mit ähnlicher Primärstruktur angewiesen. Die Modellierungen erfolgen mittels Computerprogrammen, welche gemäß adaptiver Algorithmen die Interaktionen der Aminosäuren des zu modellierenden Transporters auf räumlicher und energetischer Ebene berücksichtigen. Im Anschluss müssen diese Modelle durch fortgesetzte Mutageneseversuche verifiziert werden.

Nachdem ein dreidimensionales Modell in beschriebener Weise erstellt worden ist, kann der Versuch unternommen werden, zusätzlich die Bindung von Liganden (sog. „Docking“) einzuarbeiten. Dabei werden wiederum sowohl die sterische Kompatibilität als auch die Bindungsenergien berücksichtigt, welche durch ein interaktives Vorgehen so lange optimiert werden, bis die wahrscheinlichsten Bindungsstellen identifiziert sind (bspw. durch den sog. „Incremental construction algorithm“ des Programmes „FlexX“, Rarey et al. 1996). Weitere Mutageneseversuche ermöglichen dann eine Bestätigung der gefundenen Bindungsstellen.

4.1.2 Interpretation von Effekten auf K_m - und IC_{50} -Werte

Michaelis-Menten-Konstante (K_m):

Zur Ermittlung der Substrataffinität für den Transport wird die Michaelis-Menten-Konstante bestimmt. Da diese Konstante unabhängig vom Mechanismus des Transporters ist, lässt sie keine Unterscheidung zwischen intra- und

extrazellulär gerichtetem Zustand des Transporters zu. Bindung und Lösung des Substrates werden mithin möglicherweise in K_m vereinigt. Mutationsstudien, die auf der beschriebenen „site directed mutagenesis“ beruhen, können also bei einer K_m -Änderung lediglich zeigen, dass ein bestimmter Aminosäurerest direkt oder indirekt am Transportprozess eines Substrates beteiligt ist, jedoch nicht in welcher Weise oder auf welcher Membranseite dies geschieht.

Inhibitionskonstante (IC_{50}): Die Verwendung eines Inhibitors zur genaueren Analyse des Bindungsverhaltens eines Transporters über den IC_{50} bei definierter Substratkonzentration bietet gegenüber dem reinen $K_m(\text{Substrat})$ zusätzliche Information. Im Falle eines translozierten Inhibitors, wie TEA für rOCT1, wird die Wechselwirkung von Bindung und Translokation des Hemmstoffes und des Substrates abgebildet. Der beobachtete Vorgang gewinnt mithin an Komplexität. Bei nicht transloziertem Inhibitor, z. B. TBuA für rOCT1, können mithilfe des Versuchsaufbaus (Oozyten vs. Membranpatch) Rückschlüsse auf die interaktionsrelevante Membranseite gezogen werden.

Dreidimensionale Modelle können dazu beitragen, den Nutzen dieser Zahlenwerte durch deren unmittelbare plastische Zuordnung zu erhöhen und neue Zusammenhänge erkennen zu lassen.

4.2 Interpretation der Ergebnisse mithilfe dreidimensionaler Dockingmodelle

4.2.1 Sättigungskinetiken von MPP und TEA

Unter 3.1.3 wurde gezeigt, dass durch die Mutation Y222F/D475E kein signifikanter Affinitätseffekt für MPP im Vergleich zum Wildtyp und der Einzelmutante D475E erwirkt werden kann, wohingegen die Mutante Y222F einen deutlichen K_m -Anstieg ausweist. Somit interagiert MPP wahrscheinlich mit Y222, jedoch nicht mit D475.

Für TEA zeigt die Doppelmutante eine statistisch fassbare Affinitätserhöhung gegenüber D475E. Zu beiden ist das Substrat deutlich affiner als zu Y222F, zu welcher wiederum höhere Bindungsneigung als zum Wildtyp besteht. TEA interagiert also vermutlich sowohl mit Y222, als auch mit D475 (vgl. hierzu Tabelle 3-1).

Im Folgenden sind jeweils die beiden mutierten Aminosäurereste farbig abgehoben vom roten α -helikalen Grundgerüst des Transporters dargestellt. Die lilafarbenen bzw. weißen Konglomerate stellen „Konformerwolken“ des gebundenen Substrates dar, welche als alle in Frage kommenden Bindungspositionen definiert werden, die der Ligand aufgrund intermolekularer Wechselwirkungen (elektrostatische und Van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen) innerhalb der Tasche einnehmen kann. Die Wahrscheinlichkeit einer direkten Interaktion von MPP bzw. TEA mit einer der beiden Aminosäuren ist umso höher, je näher sie zueinander liegen.

MPP:



Abbildung 4-1a:
Modellierte Bindung von MPP an die nach außen geöffnete Konformation von rOCT1 Y222F/D475E, mutierte Aminosäuren dargestellt, Seitansicht.



Abbildung 4-1b:
Modellierte Bindung von MPP an die nach außen geöffnete Konformation von rOCT1 Y222F/D475E, mutierte Aminosäuren dargestellt, Ansicht von außen.



Abbildung 4-2a:
 Modellierter Bindung von
 MPP an die nach innen
 geöffnete Konformation von
 rOCT1 Y222F/D475E,
 mutierte Aminosäuren
 dargestellt,
 Seitansicht.

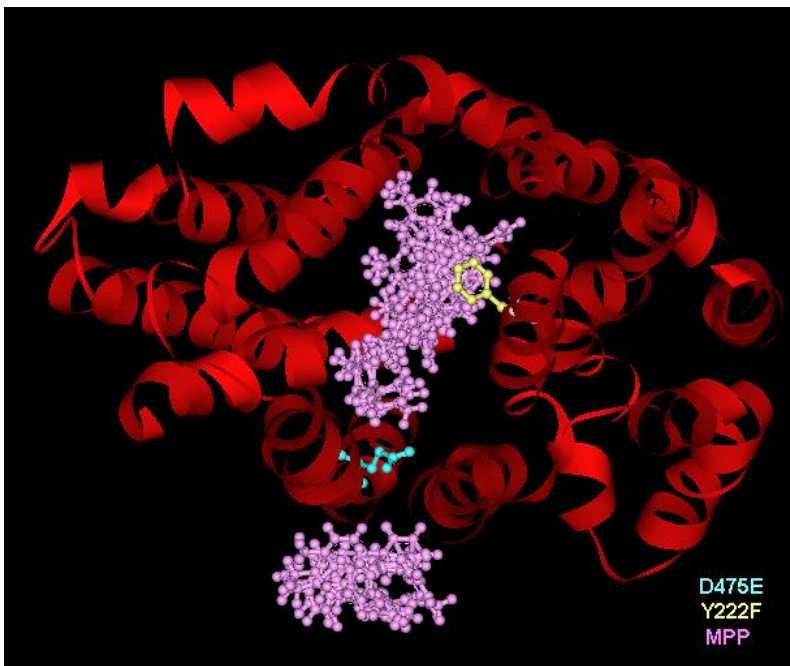


Abbildung 4-2b:
 Modellierter Bindung von
 MPP an die nach innen
 geöffnete Konformation von
 rOCT1 Y222F/D475E,
 mutierte Aminosäuren
 dargestellt,
 Ansicht von innen.

Nach den Modelldarstellungen interagiert MPP in nach extrazellulär gerichteter Transporterkonfiguration sowohl mit E475, als auch mit F222. Von Zytosolseite zeigt sich ebenfalls eine Interaktion mit F222, eine Wechselwirkung zwischen MPP und E475 erscheint zumindest möglich. Dass die Mutation der Aminosäure 475 von Aspartat zu Glutamat keine signifikante K_m -Änderung

bewirkt, könnte entweder auf einen zu konservativen Ersatz zurückzuführen sein oder schlicht nicht maßgeblich für die Michaelis-Menten-Konstante sein. Bei beiden Erklärungsansätzen ist zu beachten, dass D475 am Translokationsprozess beteiligt sein muss, da dessen gleichzeitige Mutation mit Y222 die durch Y222F herbeigeführte Affinitätsminderung egalisiert.

TEA:



Abbildung 4-3a:
Modellierte Bindung von TEA an die nach außen geöffnete Konformation von rOCT1 Y222F/D475E, mutierte Aminosäuren dargestellt, Seitansicht.

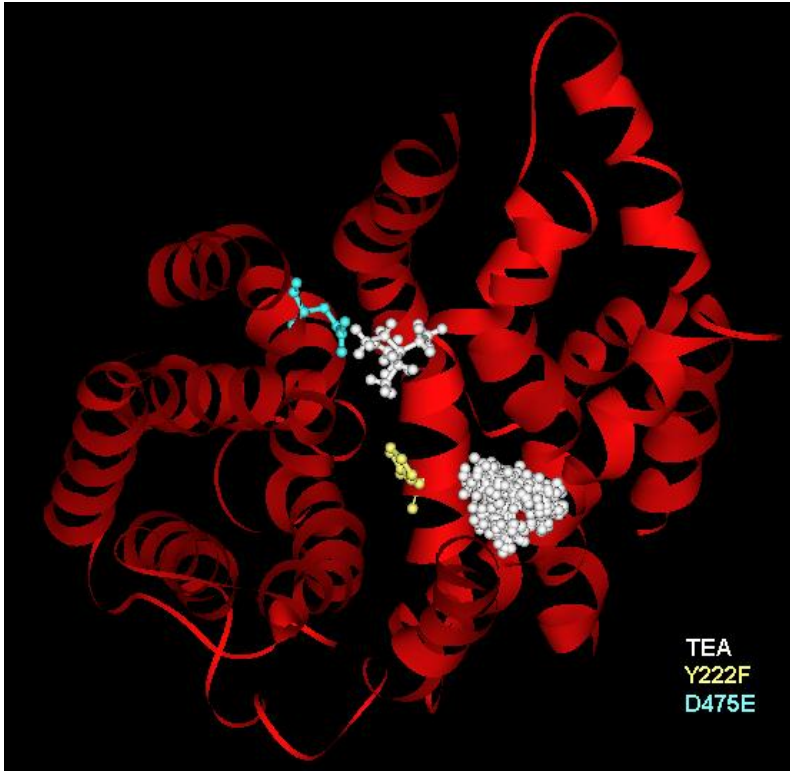


Abbildung 4-3b:
Modellierte Bindung von TEA an die nach außen geöffnete Konformation von rOCT1 Y222F/D475E, mutierte Aminosäuren dargestellt, Ansicht von außen.

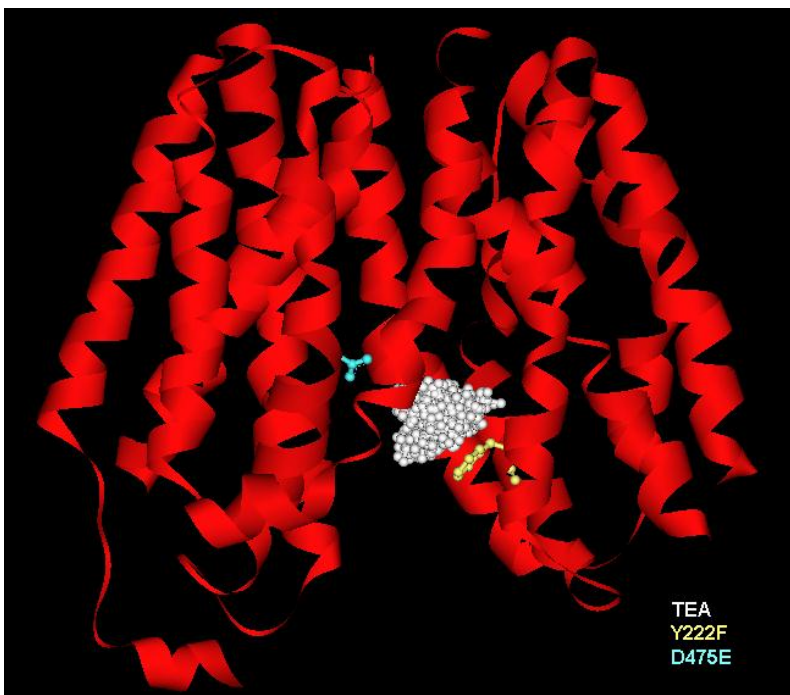


Abbildung 4-4a:
Modellierte Bindung von TEA an die nach innen geöffnete Konformation von rOCT1 Y222F/D475E, mutierte Aminosäuren dargestellt, Seitansicht.

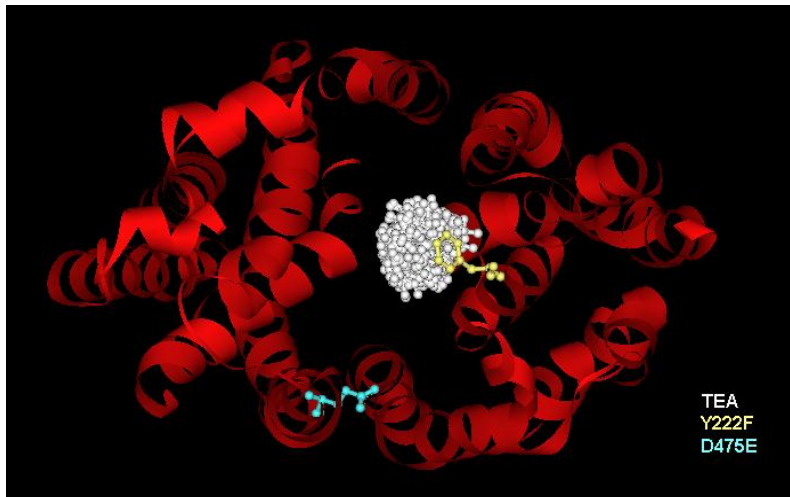


Abbildung 4-4b:
 Modellierte Bindung von
 TEA an die nach innen
 geöffnete Konformation von
 rOCT1 Y222F/D475E,
 mutierte Aminosäuren
 dargestellt,
 Ansicht von innen.

Wie die Abbildungen zeigen, interagiert TEA von extrazellulärer Seite mit E475, bei nach innen gerichteter Konformation von rOCT1 mit F222.

Die Additivität der $K_{m(\text{TEA})}$ -Entwicklung bei Doppelmutation Y222F/D475E beruht deshalb wahrscheinlich nicht auf simultaner Bindung der mutierten Aminosäuren an das Substrat auf einer Seite des Transporters.

Denkbar erscheint jedoch eine Interaktion mit beiden Bindungsstellen im Verlauf der Konformationsänderung des Transporters von außen nach innen im Rahmen eines sequentiellen Substrattransportmechanismus mit der Interaktionsfolge $\text{D475}_{(\text{TEA})} \rightarrow_{(\text{TEA})} \text{Y222}$.

4.2.2 Hemmung der [³H]MPP-Aufnahme durch TEA

Wie in Kapitel 3.3 aufgeführt, scheinen dieselben Aminosäurereste an der Interaktion mit TEA beteiligt, sei dieses alleiniger Ligand oder Inhibitor des MPP-Transportes. Kann diese Beobachtung auch durch Modellstudien untermauert werden? Im Falle deutlicher Überschneidung der Konformerwolken beider Substanzen nahe den fraglichen Interaktionsstellen innerhalb der Transporttasche von rOCT1 stützte das Bildmaterial entscheidend die in 3.3 formulierte These. Hierzu werden die schon bekannten Sättigungsmodelle zu einer gleichzeitigen Darstellung beider Substrate vereint:

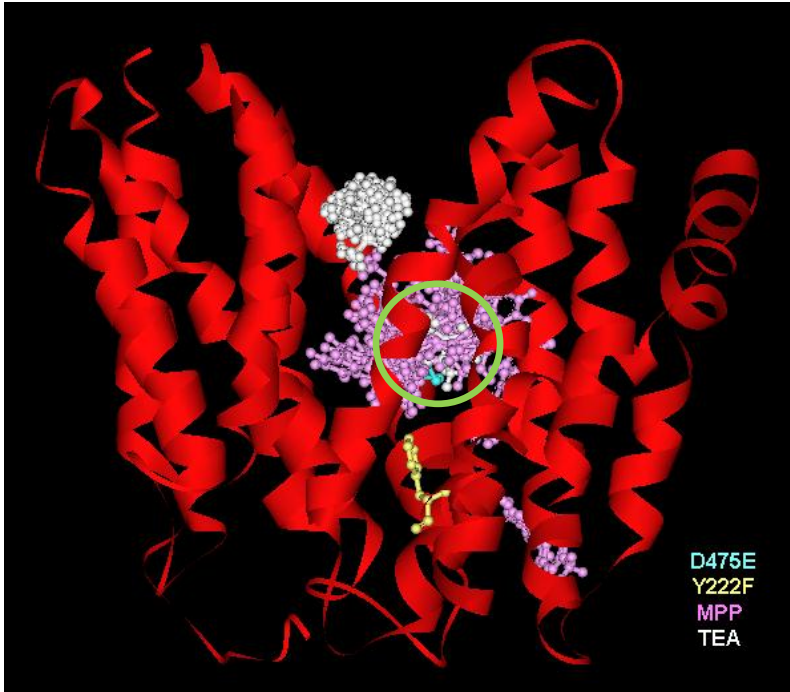


Abbildung 4-5a:
 Modellierte Bindung von MPP und TEA an die nach außen geöffnete Konformation von rOCT1 Y222F/D475E, mutierte Aminosäuren dargestellt, Seitansicht.

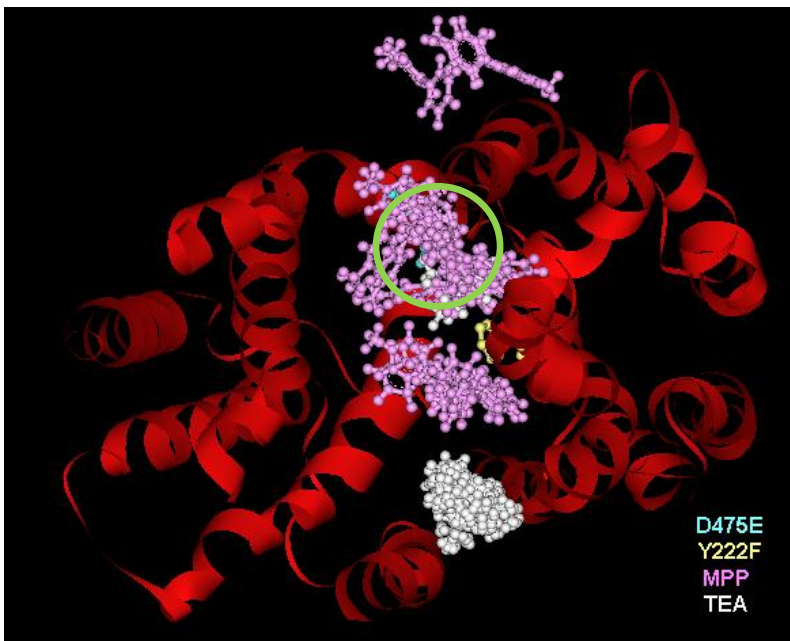


Abbildung 4-5b:
 Modellierte Bindung von MPP und TEA an die nach außen geöffnete Konformation von rOCT1 Y222F/D475E, mutierte Aminosäuren dargestellt, Ansicht von außen.



Abbildung 4-6a:
 Modellierte Bindung von MPP und TEA an die nach innen geöffnete Konformation von rOCT1 Y222F/D475E, mutierte Aminosäuren dargestellt, Seitansicht.

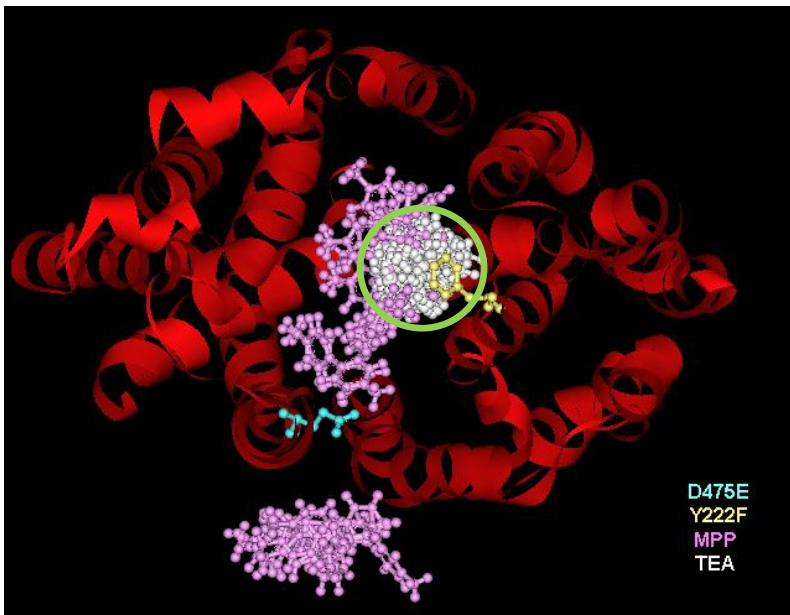


Abbildung 4-6b:
 Modellierte Bindung von MPP und TEA an die nach außen geöffnete Konformation von rOCT1 Y222F/D475E, mutierte Aminosäuren dargestellt, Ansicht von innen.

Die Modelle zeigen zwei mögliche Überschneidungen (grüne Markierungskreise) der Konformerklömmere von MPP und TEA. Demnach kann MPP durch TEA von außen an E475, von innen an F222 verdrängt werden. Daher lässt die gleichzeitige Mutation von E475 und F222 eine

Veränderung der TEA-Hemmung des MPP-Transportes erwarten. Trotz additiven Mutationsverhaltens für die Michaelis-Menten-Konstante von TEA ist der beobachtete Effekt hier jedoch nicht additiv. Ursächlich dafür erscheint die bereits verhältnismäßig größere Verminderung des $IC_{50(TEA)}$ der Einzelmutante D475E im Vergleich zur Auswirkung der Mutation auf die $K_{m(TEA)}$ -Erniedrigung, was wiederum auf einem allosterischen Effekt des MPP, etwa im Bereich dessen hochaffiner Bindungsstellen, beruhen könnte.

4.2.3 Hemmung der [3H]MPP-Aufnahme durch TBuA

Zur Klärung der Frage, ob tatsächlich eine Interaktion von MPP mit E475 von extrazellulär erfolgt, wie die experimentellen Daten nahelegen, wurde die Hemmung der MPP-Aufnahme durch TBuA untersucht:



Abbildung 4-7a:
Modellierte Bindung von MPP und TBuA an die nach außen geöffnete Konformation von rOCT1 Y222F/D475E, mutierte Aminosäuren dargestellt, Seitansicht.

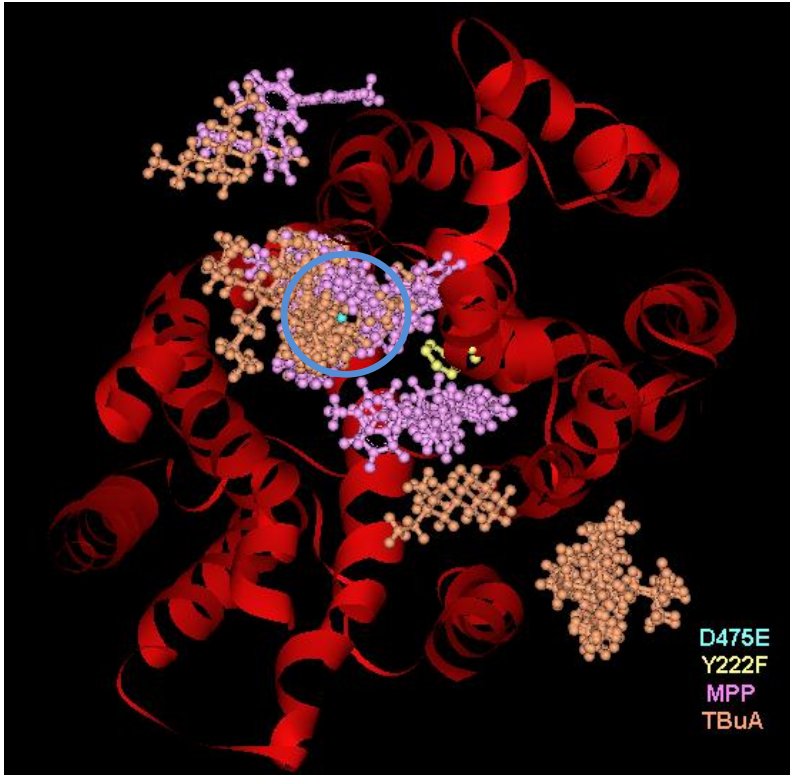


Abbildung 4-7b:
 Modellierte Bindung von
 MPP und TBuA an die nach
 außen geöffnete
 Konformation von rOCT1
 Y222F/D475E, mutierte
 Aminosäuren dargestellt,
 Ansicht von außen.

Die Modelle deuten auf eine Verdrängung von MPP durch TBuA an E475 hin (blaue Markierungskreise), während F222 nicht mit TBuA interagieren kann. Da TBuA zudem nicht transplasmalemmlal transportiert wird, kann es MPP nicht im Verlauf von F222 verdrängen. In Übereinstimmung hiermit wurden gleiche Affinitäten der Hemmung der MPP-Aufnahme durch TBuA für rOCT1 D475E und rOCT1 Y222F/D475E beobachtet. Dies untermauert die Interpretation auch des MPP-Transportes als sukzessiven, metachronen Vorgang und bestätigt überdies die Lokalisation und Zugänglichkeit von Y222 an der Membraninnenseite.

4.3 Gesamtinterpretation und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es, einen Beitrag zur Aufklärung der „genauen Bindungsabläufe innerhalb der Bindungstasche“ von rOCT1 zu leisten. Die erhaltenen Ergebnisse können mit Hilfe der Docking-Modelle wie folgt interpretiert werden:

TEA bindet von extrazellulär an Asp475. Hierdurch wird die transportrelevante Konformationsänderung von rOCT1 induziert, in deren Verlauf der Ligand zu Tyr222 als neuem Bindungspartner wechselt, gewissermaßen „überreicht“ wird. Erst dies gestattet die Freigabe des Substrates in das Zytosol. Gleichzeitig definieren die beschriebenen Abläufe die Positionen der beiden genannten Aminosäurereste in der nach außen (Asp475) bzw. nach innen (Tyr222) geöffneten Bindungstasche.

Die gewonnenen Erkenntnisse sind als weiterer Schritt auf dem Weg zu einem konzeptionellen Verständnis der Funktionsweise organischer Kationentransporter – in Analogie evtl. auch weiterer organischer Transportsysteme – zu verstehen. Bis zu dessen Ende jedoch sind noch einige Hürden zu nehmen. Insbesondere muss die Grundstruktur der Modellberechnungen durch Röntgenkristallographie bestätigt werden, um die Basis für aufwendigere Dockings chemisch komplexerer Substrate wie HIV-Protease-Inhibitoren (z. B. Ritonavir, Koepsell et al. 2007) und anderer, klinisch wichtiger Arzneimittel abzusichern. Die Expressions- und Regulationsforschung (s. 1.1.2.3) lässt auf weitere Einblicke hoffen, die neue Angriffspunkte für medizinische Interventionen bieten könnten.

Maxime aller Bemühungen ist dabei eine Individualisierung moderner Pharmakotherapie durch Anpassung der Medikation an die pharmakokinetischen Voraussetzungen des einzelnen Patienten.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das mechanistische Funktionsprinzip des Rat Organic Cation Transporter 1, stellvertretend für die Gruppe der organischen Kationentransporter, im Hinblick auf die Beteiligung einzelner Aminosäuren der mutmaßlichen Bindungstasche am Transportprozess (Tyr222, Asp475) untersucht. Hierbei stand insbesondere die Frage nach einer gleichzeitigen oder sequentiellen Interaktion der o. g. Aminosäuren mit dem jeweils gewählten Transportliganden im Vordergrund. Bei Mutation der untersuchten Interaktionsstellen (Einzelmutanten Y222F, D475E, Doppelmutante Y222F/D475E) konnten K_m -Änderungen für die zelluläre Aufnahme von MPP und TEA sowie IC_{50} -Änderungen für die Hemmung des MPP-Transportes durch TEA bzw. TBuA im *Xenopus-laevis*-Oozytenmodell mittels radioaktiver Aufnahmemessungen erzielt werden.

Trotz eines signifikant additiven Effektes der Doppelmutation auf die TEA-Affinität des Transporters im Vergleich zu den Einzelmutanten erschien ein sequentieller Transportmechanismus aufgrund der nicht additiven $IC_{50(TEA)}$ -Verminderung für den MPP-Transport und der Sicherung der Lokalisation von Tyr222 und Asp475 auf unterschiedlichen Seiten der Plasmamembran durch TBuA-Inhibitionsversuche der MPP-Aufnahme wahrscheinlich.

Gestützt wurden diese Ergebnisse durch die analoge Modellierung dreidimensionaler Darstellungen des doppelmutierten rOCT1(Y222F/D475E) anhand bereits kristallographisch vermessener Prokaryotentransporter. Diese Modelle bestätigten eine interaktionsrelevante räumliche Position der modifizierten Aminosäurereste innerhalb der Bindungstasche, welche eine metachrone Substrat- bzw. Inhibitorbindung nahelegte.

Demnach interagiert in Kongruenz beider Untersuchungsansätze zunächst Tyr222 auf extrazellulärer Seite mit dem Liganden, während der intramembranären Konformationsänderung des Transporters erfolgt dann eine Transposition des Substrates respektive Inhibitors auf Asp475 auf der Zytosolseite.

6 Literaturverzeichnis

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

Arndt, P., Volk, C., Gorboulev, V., Budiman, T., Popp, C., Ulzheimer-Teuber, I., Akhoundova, A., Koppatz, S., Bamberg, E., Nagel, G., 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* 286: 454-468

Asaka, J., Terada, T., Okuda, M., Katsura, T., Inui, K. (2006): Androgen receptor is responsible for rat organic cation transporter 2 gene regulation but not for rOCT1 and rOCT3. *Pharm Res* 23: 697-704

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

Bednarczyk, D., Ekins, S., Wikel, J. H., Wright, S. H. (2003): Influence of molecular structure on substrate binding to the human organic cation transporter, hOCT1. *Mol Pharmacol* 63: 489-498

Çetinkaya, I., Ciarimboli, G., Yalçinkaya, G., Mehrens, T., Velic, A., Hirsch, J. R., Gorboulev, V., Koepsell, H., Schlatter, E. (2002): Regulation of human organic cation transporter hOCT2 by PKA, PI3K, and calmodulin-dependent kinases. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: 293-302

Choi, M.-K., Song, I.-S. (2008): Organic cation transporters and their pharmacokinetic and pharmacodynamic consequences. *Drug Metab Pharmacokinet* 23: 243-253

Ciarimboli, G., Koepsell, H., Iordanova, M., Gorboulev, V., Dürner, B., Lang, D., Edemir, B., Schröter, R., Le, T., Schlatter, E. (2005): Individual PKC-phosphorylation sites in organic cation transporter 1 determine substrate selectivity and transport regulation. *J Am Soc Nephrol* 16: 1562-1570

Ciarimboli, G., Struwe, K., Arndt, P., Gorboulev, V. (2004): Regulation of the human organic cation transporter hOCT1. *J Cell Physiol* 201: 420-428

Cui, M., Aras, R., Christian, W. V., Rappold, P. M., Hatwar, M., Panza, J., Jackson-Lewis, V., Javitch, J. A., Ballatori, N., Przedborski, S., Tieu, K. (2009): The organic cation transporter 3 is a pivotal modulator of neurodegeneration in the nigrostriatal dopaminergic pathway. *Proc Natl Acad Sci* 106: 8043-8048

Dresser, M. J., Gray, A. T., Giacomini, K. M. (2000): Kinetic and selectivity differences between rodent, rabbit, and human organic cation transporters (OCT1). *J Pharmacol Exp Ther* 292: 1146-1152

Dresser, M. J., Kaushal Leabman, M., Giacomini, K. M. (2001): Transporters Involved in the elimination of drugs in the kidney: Organic anion transporters and organic cation transporters. *J Pharm Sci* 90: 397-421

Eraly, S. A., Hamilton, B. A., Nigam, S. K. (2003): Organic anion and cation transporters occur in pairs of similar and similarly expressed genes. *Biochem Biophys Res Commun* 300: 333-342

Ermolova, N., Madhvani, R. V., Kaback, H. R. (2006): Site-directed alkylation of cysteine replacements in the lactose permease of *Escherichia coli*: Helices I, III, VI, and XI. *Biochemistry* 45: 4182-4189

Gong, S., Lu, X., Xu, Y., Swiderski, C. F., Jordan, C. T., Moscow J. A. (2002): Identification of OCT6 as a novel organic cation transporter preferentially expressed in hematopoietic cells and leukemias. *Exp Hematol* 30: 1162-1169

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

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

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

Gorbunov, D., Gorboulev, V., Shatskaya, N., Müller, T., Bamberg, E., Friedrich, T., 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: 50-61

Grover, B., Buckley, D., Buckley, A. R., Cacini, W. (2004): Reduced expression of organic cation transporters rOCT1 and rOCT2 in experimental diabetes. *J Pharmacol Exp Ther* 308: 949-956

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

Gründemann, D., Schechinger, B., Rappold, G. A., Schömig, E. (1998): Molecular identification of the corticosterone-sensitive extraneuronal catecholamine transporter. *Nat Neurosci* 1: 349-351

Haag, C., Berkels, R., Gründemann, D., Lazar, A., Taubert, D., Schömig, E. (2004): The localisation of the extraneuronal monoamine transporter (EMT) in rat brain. *J Neurochem* 88: 291-297

Heijne, von, G., Gavel, Y. (1988): Topogenic signals in integral membrane proteins. *Eur J Biochem* 174: 671-678.

Inazu, M., Takeda, H., Matsumiya, T. (2003): Expression and functional characterization of the extraneuronal monoamine transporter in normal human astrocytes. *J Neurochem* 84: 43-52

Karbach, U., Kricke, J., Meyer-Wentrup, F., Gorboulev, V., Volk, C., Loffing-Cueni, D., Kaissling, B., Bachmann, S., Koepsell, H. (2000): Localization of organic cation transporters OCT1 and OCT2 in rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: 679-687

Kimura, N., Masuda, S., Tanihara, Y., Ueo, H., Okuda, M., Katsura, T., Inui, K. (2005): Metformin is a superior substrate for renal organic cation transporter OCT2 rather than hepatic OCT1. *Drug Metab Pharmacokinet* 20: 379-386

Kimura, N., Okuda, M., Inui, K. (2005): Metformin transport by renal basolateral organic cation transporter hOCT2. *Pharm Res* 22: 255-259

Koepsell, H., Gorboulev, V., Arndt, P. (1999): Molecular pharmacology of organic cation transporters in kidney. *J Membrane Biol* 167: 103-117

Koepsell, H., Endou, H. (2003): The SLC22 drug transporter family. *Eur J Physiol* 447: 666-676

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

Koepsell, H., Lips, K., Volk, C. (2007): Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm Res* 24: 1227-1251

Lin, C. J., Tai, Y., Huang, M. T., Tsai, Y. F., Hsu, H. J., Tzen, K. Y., Liou, H. H. (2010): Cellular localization of the organic cation transporters, OCT1 and OCT2, in brain microvessel endothelial cells and its implication for MPTP transport across the blood-brain barrier and MPTP-induced dopaminergic toxicity in rodents. *J Neurochem* 114: 717-727

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

Martel, F., Keating, E., Calhau, C., Gründemann, D., Schömig, E., Azevedo, I., (2001): Regulation of human extraneuronal monoamine transporter (hEMT) expressed in HEK293 cells by intracellular second messenger systems. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 364: 487-495

Mehrens, T., Lelleck, S., Cetinkaya, I. (2000): The affinity of the organic cation transporter rOCT1 is increased by protein kinase C-dependent phosphorylation. *J Am Soc Nephrol* 11: 1216-1224

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

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

Müller, J., Lips, K. S., Metzner, L., Neubert, R. H., Koepsell, H., Brandsch, M. (2005): Drug specificity and intestinal membrane localization of human organic cation transporters (OCT). *Biochem Pharmacol* 70: 1851-1860

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

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

Pao, S. S., Paulsen, I. T., Saier, M. H. (1998): Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 1-34

Popp, C., Gorboulev, V., Müller, T. D., Gorbunov, D., Shatskaya, N., 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: 1600-1611

Rarey, M., Kramer, B., Lengauer, T., Klebe, G. (1996): A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *J Mol Biol* 261: 470-489

Rennick, B. R., Moe, G. K., Lyons, R. H., Hoobler, S. W., Neligh, R. (1947): Absorption and renal excretion of the tetraethylammonium ion. *J Pharm Exp Ther* 92: 210-217

Sata, R., Ohtani, H., Tsujimoto, M., Murakami, H., Koyabu, N., Nakamura, T., Uchiumi, T., Kuwano, M., Nagata, H., Tsukimori, K., Nakano, H., Sawada, Y. (2005): Functional analysis of organic cation transporter 3 expressed in human placenta. *J Pharmacol Exp Ther* 315: 888-895

Schmitt, B. M., Gorbunov, D., Schlachtbauer, P., Egenberger, B., Gorboulev, V., Wischmeyer, E., Müller, T., Koepsell, H. (2009): Charge-to-substrate ratio during organic cation uptake by rat OCT2 varies with substrate, voltage and inorganic ions. *Am J Physiol Renal Physiol* 296: 709-722

Shu, Y., Sheardown, S. A., Brown, C., Owen, R. P., Zhang, S., Castro, R. A., Ianculescu, A. G., Yue, L., Lo, J. C., Burchard, E. G., Brett, C. M., Giacomini, K. M. (2007): Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. *J Clin Invest* 117: 1422-1431

Shu, Y., Brown, C., Castro, R. A., Shi, R. J., Lin, E. T., Owen, R. P., Sheardown, S. A., Yue, L., Burchard, E. G., Brett, C. M., Giacomini, K. M. (2008): Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1, OCT1, on metformin pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 83: 273-280

Smirnova, I., Kasho, V., Choe, J.-Y., Altenbach, C., Hubbell, W. L., Kaback, H. R. (2007): Sugar binding induces an outward facing conformation of LacY. *PNAS* 104: 16504-16509

Sturm, A., Gorboulev, V., Gorbunov, D., Keller, T., Volk, C., Schmitt, B. M., Schlachtbauer, P., Ciarimboli, G., 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: 767-779

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

Tzvetkov, M. V., Vormfelde, S. V., Balen, D., Meineke, I., Schmidt, T., Sehr, D., Sabolić, I., Koepsell, H., Brockmüller, J. (2009): The effects of genetic polymorphisms in the organic cation transporters OCT1, OCT2, and OCT3 on the renal clearance of metformin. *Clin Pharmacol Ther* 86: 299-306

Ullrich, K. J. (1997): Renal transporters for organic anions and organic cations. Structural requirements for substrates. *J Membrane Biol* 158: 95-107

Urakami, Y., Nakamura, N., Takahashi, K., Okuda, M., Saito, H., Hashimoto, Y., Inui, K. (1999): Gender differences in expression of organic cation transporter OCT2 in rat kidney. *FEBS Lett* 461: 339-342

Urakami, Y., Okuda, M., Saito, H., Inui, K. (2000): Hormonal regulation of organic cation transporter OCT2 expression in rat kidney. *FEBS Lett* 473: 173-176

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

Volk, C., Gorboulev, V., Kotzsch, A., Müller, T. D., 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: 275-289

Wang, Z. J., Yin, O. Q., Tomlinson, B., Chow, M. S. (2008): OCT2 polymorphisms and in-vivo renal functional consequence: studies with metformin and cimetidine. *Pharmacogenet Genomics* 18: 637-645

Weinglass, A. B., Kaback, H. R. (2000): The central cytoplasmic loop of the major facilitator superfamily of transport proteins governs efficient membrane insertion. *PNAS* 97: 8938-8943

Wright, S. H., Dantzer, W. H. (2004): Molecular and cellular physiology of renal organic cation and anion transport. *Physiol Rev* 84: 987-1049

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

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

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Hermann Koepsell, für die Überlassung des Dissertationsthemas, die zahlreichen Mühen und viele aufbauende wie anregende Gespräche bedanken.

Großer Dank gebührt zudem Herrn Priv.-Doz. Dr. Christopher Volk für die methodische Einarbeitung und vielseitige Hilfestellung bei der experimentellen Umsetzung der Thematik.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Dr. Valentin Gorboulev für die Bereitstellung der rOCT1-Mutanten und die Nachsicht für überzogene Meldetermine.

Ein besonderes Wort des Dankes sei an Frau Ursula Roth und Frau Brigitte Dürner für ihre tatkräftige Unterstützung im Labor gerichtet.

Danken möchte ich außerdem meinen geschätzten Mitdoktoranden und den wissenschaftlichen Mitarbeitern des Lehrstuhls I des Anatomischen Instituts, namentlich Frau Dr. Maike Veyhl-Wichmann und Herrn Dr. Helmut Kipp, die mir eine kollegiale Arbeitsatmosphäre geboten haben.

Schließlich danke ich herzlichst meinen Eltern, die meine Launen während der Anfertigung dieser Dissertation geduldig ertragen und mir dennoch ermutigend zur Seite gestanden haben und deren Förderung und Rückhalt ich mir stets gewiss sein konnte.

Curriculum Vitae

PERSÖNLICHE DATEN:

Name: Marcus Heinz Martin Leistner
Geburtsdatum: 26.04.1984
Geburtsort: Würzburg
Eltern: Bertram und Daniela Leistner
Familienstand: ledig

BILDUNGSWEG:

09/1990 – 07/1994 Besuch der Max-Dauthendey-Grundschule in Würzburg
09/1994 – 05/2003 Gymnasialzeit am Wirsberg-Gymnasium in Würzburg, Abschluss: Abitur, Note 1,0
Bayerisches Hochbegabtenstipendium
10/2003 – 11/2009 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
08 – 09/2005 Physikum, Note 1,0
11/2005 – 04/2011 Doktorarbeit am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Würzburg
Thema: „Transportrelevante Substratinteraktionen des organischen Kationentransporters 1 der Ratte (rOCT1)“
08/2008 – 07/2009 Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Würzburg
10/2009 – 11/2009 2. Staatsexamen, Note 1,5

11/2009	Abschluss des Studiums der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Note 1,3
12/2009	Approbation als Arzt

BESCHÄFTIGUNGSVERHÄLTNISSE:

seit 01/2010	Assistenzarzt der Klinik und Poliklinik für Thorax-, Herz- und Thorakale Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Würzburg
--------------	--

Würzburg, 29.03.2011

Marcus Leistner