

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

**Funktionelle Charakterisierung der Transportproteine für
Organische Kationen rOCT1 und hOCT2
unter besonderer Berücksichtigung der
cis-/trans-Symmetrie von rOCT1**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Jochen C. Ulzheimer

aus

Würzburg

Würzburg, November 2002

Referent: Professor Dr. med. H. Koepsell

Koreferent: Professor Dr. med. M. Gekle,

Dekan: Professor Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Mai 2003

Der Promovend ist Arzt.

für Carmen

Inhalt

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	18
2.1	Molekularbiologische Methoden	19
2.2	Oozyten von <i>Xenopus laevis</i> als Expressionssystem für Transportproteine	27
2.2.1	Präparation von <i>X. laevis</i> - Oozyten	28
2.2.2	Kultur von <i>X. laevis</i> - Oozyten	29
2.2.3	Mikroinjektion von <i>X. laevis</i> - Oozyten	30
2.3	Fluxmessungen mit radioaktiv markierten <i>Tracer</i> -Substraten	
2.3.1	Influxmessungen	33
2.3.2	Effluxmessungen	35
2.4	Datenauswertung	38
2.5	Bezugsquellen	42
3.	Ergebnisse	45
3.1	Spezifitäten der Transportkinetik von rOCT1	
3.1.1	Substrattransport	46
3.1.2	<i>cis</i> - Hemmung	55
3.1.3	<i>trans</i> - Effekte	59
3.2	Spezifitäten der Transportkinetik von hOCT2	
3.2.1	Substrattransport	68
3.2.2	<i>cis</i> - Hemmung	75
3.2.3	<i>trans</i> - Effekte	79
3.3	Elektrochemische Eigenschaften von rOCT1	85
3.4	Symmetrieverhalten im Bindungs- und Transportmechanismus von rOCT1	
3.4.1	<i>cis</i> - und <i>trans</i> -Verhalten von Transportsubstraten.....	89
3.4.2	<i>cis</i> - und <i>trans</i> -Verhalten kompetitiver und nicht-kompetitiver Hemmstoffe	93
4.	Diskussion	100
4.1	rOCT1 und hOCT2 - Gemeinsamkeiten und Unterschiede	101
4.2	<i>cis/trans</i> - Asymmetrie von rOCT1	106
5.	Zusammenfassung	112
7.	Literatur.....	113
8.	Appendix	121

Verwendete Abkürzungen:

AMG	α -Methyl-D-Glucose
APDA	N-(4,4'-azo-n-pentyl)-21-deoxy-ajmalinium
ATP	Adenosintriphosphat
BBM	<i>brushborder membrane</i> , Bürstensaummembran
BES	2-[Bis-(2-hydroxyethyl)-amino]-ethansulfonsäure
BLM	basolaterale Membran
CI	Chloroform-Isoamylalkohol- Mischung (24:1)
Cyanin863	1-Ethyl-2-([1,4-dimethyl-2-phenyl-6-pyrimidinyliden]methyl)- chinolinium-Chlorid
Decynium22	1,1'-Diethyl-2,2'-cyanin-Iodid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dpm	<i>decays per minute</i> , Zerfälle pro Minute (60 dpm = 1 Bq)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> , Ethylendiamintetraessigsäure
GentORi	Gentamicin-Oozyten-Ringerlösung
GIPM	Glucosylisophosphonamidmustard (β -D-Glucopyranosyl-N,N'-bis-(2-chloroethyl)-phosphoro- diamidsäure
hOCT	<i>organic cation transporter</i> , Human-Homolog
MDR	<i>Multidrug resistance</i>
MPP	N ₁ -methyl-4-phenylpyridinium
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure
NMN	N ¹ -methylnicotinamid
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol- Mischung (25:24:1)

OATP	<i>organic anion transport protein</i> , Organischer Anionentransporter
OCTN	<i>organic cation and carnitine transporter</i>
OD _λ	<i>optical density</i> , Lichtabsorption bei Wellenlänge λ nm
ORi	Oozyten-Ringerlösung
PCG-ORi	Pyruvat-Cholin-Gentamicin-Oozyten-Ringerlösung
rOCT	<i>organic cation transporter</i> , Ratten-Homolog
SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>standard error of mean</i> , Standardfehler des arithmetischen Mittels
TBuMA	Tributylmethylammonium
TEA	Tetraethylammonium
TMA	Tetramethylammonium
TPeA	Tetrapentylammonium
TRIS	Tris-(hydroxymethyl-)methylamin
upm	Umdrehungen pro Minute

1.

Einleitung

Niere und Leber stellen im Säugerorganismus die wesentlichen Organe dar, in denen die Homöostase von Nährstoffen, Stoffwechselprodukten, Neurotransmittern und Giftstoffen bewerkstelligt wird. Die renale und hepatische Elimination potentiell toxischer Substanzen wie endogener Metabolite und exogener Fremdstoffe erfolgt hierbei prinzipiell durch glomeruläre Filtration bzw. durch transepitheliale Sekretionsmechanismen [KOEPEL H., 1998; PRITCHARD J.B. & MILLER D.S., 1993 und 1997]. Letztere werden ermöglicht durch einen transzellulären Transport, welcher in der Summe energieabhängige Translokationsprozesse über zwei Plasmamembranen erfordert. Im proximalen Tubulus der Säugerniere erfolgt zunächst die Aufnahme in die Epithelzelle über die basolaterale Membran, sodann die Ausscheidung über die luminale Membran. Beim Hepatozyten entsprechen dem die sinusoidale beziehungsweise die kanalikuläre Membran.

Einen wesentlichen Anteil an ausscheidungspflichtigen Metaboliten und Fremdstoffen stellen die sog. organischen Kationen dar. Hierunter werden aliphatische oder aromatische Kohlenwasserstoffverbindungen subsumiert, welche pH-abhängig oder ständig ein- oder mehrfach positiv geladen sind sowie deren undissoziierte ungeladene Derivate. Meist erhalten organische Kationen diese Ladung durch sekundäre (dissoziierbare) oder quartäre (permanent kationische) Aminogruppen. Zu den Organischen Kationen zählen körpereigene Verbindungen

wie Cholin oder Methylnicotinamid, Neurotransmitter wie Dopamin oder Noradrenalin, Medikamente wie Amantadin oder Isoprenalin, aber auch Toxine wie Methyl-Phenyl-Pyridinium (MPP) oder d-Tubocurarin.

In den letzten Jahrzehnten waren die renalen und hepatischen Transportmechanismen für organische Kationen überwiegend rein funktionell und global anhand von Aufnahmemessungen an *in vivo*- und *ex vivo*-Paradigmen (wie z.B. Nierentubuli und Membranvesikeln) charakterisiert worden [BESSEGHIR K. *et al.*, 1990a und 1990b; WRIGHT S.H. & WUNZ T.M., 1987]. Erst mit der Klonierung des ersten Transportproteins für organische Kationen aus der Rattenniere, rOCT1 [GRÜNDEMANN D., 1994 (Diss.), GRÜNDEMANN D. *et al.*, 1994] 1994 wurden Möglichkeiten eröffnet, diese Transportprozesse auf enzymchemischem und biophysikalischem Niveau isoliert zu untersuchen. Interessant und notwendig erscheint die Aufklärung der detaillierten Transportprozesse in medizinischer Hinsicht, um die prospektive Pharmakokinetik (v.a. Elimination) in Entwicklung befindlicher Therapeutika abzuschätzen. Durch gezielte Beeinflussung dieser Transportproteine (insbesondere Hemmung) im Rahmen therapeutischer Ansätze lässt sich auch die Pharmakokinetik von Medikamenten und Ausscheidung von Toxinen und Metaboliten verändern.

Renale Transportsysteme für organische Kationen

In der Niere erfolgt die Sekretion organischer Kationen hauptsächlich im proximalen Tubulus, in weitaus geringerem Ausmaß jedoch auch im distalen Tubulus und im Sammelrohr. Bislang konnten im proximalen Tubulus der Niere funktionell mehrere verschiedene Transportsysteme für Organische Kationen charakterisiert werden, die sich in Lokalisation (basolateral oder luminal), Energieabhängigkeit (ATPase, Cotransport- und Austauschsysteme) und Spezifität (Substratspektrum/Hemmbarkeit) unterscheiden. Ein Hauptproblem hierbei stellte stets die Polyspezifität vieler Transportsysteme dar, welche zumeist auch Überlappungen im

Substratspektrum aufweisen. Daher ist es oft schwierig, klonierte Transportproteine den zuvor funktionell beschriebenen Systemen zuzuordnen.

Im S1-Segment des proximalen Tubulus erfolgt das Gros der Sekretion von organischen Kationen [ITO S., 1999]. Den ersten Schritt, die Kationenaufnahme über die basolaterale Plasmamembran vermittelt der potentialabhängige, pH- und natriumunabhängige rOCT1 [GRÜNDEMANN D. *et al.*, 1994] und sein Homolog rOCT2 [OKUDA M. *et al.*, 1996]. Er transportiert in polyspezifischer Weise eher kleine und hydrophile organische Kationen. Diese Absorption über die basolaterale Membran erfolgt typischerweise elektrogen. Intrazellulär kann eine Kompartimentierung über vesikuläre H⁺-Kationen-Austauscher erfolgen. Der zweite Schritt, die luminale Sekretion, wird hauptsächlich von zuletzt genanntem protonengekoppelten Austauscher [DAVID C. *et al.*, 1995], einem H⁺-Guanidin-Austauscher, sowie eine ATPase der MDR- (*multidrug-resistance*-) Proteinfamilie bewerkstelligt. Sie erfolgt typischerweise elektroneutral [KOEPSELL H. *et al.*, 1998; KOEPSELL H. *et al.*, 1999]. Bei niedrigen Plasmakonzentrationen erfolgt auch eine Rückresorption von organischen Kationen, v.a. Neurotransmitter und Cholin über ein potentialabhängiges Cholin-Transportsystem, über den polyspezifischen Transporter für amphiphile Substrate OATP sowie über eine aus der Kaninchen-BBM beschriebene Ekto-ATPase. Möglicherweise sind hier auch natriumabhängige Transporter der Carnitin-Transporter-Familie OCTN beteiligt [TAMAI I. *et al.*, 2000] Diese Mechanismen dürften auch zur Nephrotoxizität verschiedener Chemotherapeutika beitragen [ZHANG L. *et al.*, 1998a; INUI K.I. *et al.*, 2000].

Hepatische Transportsysteme für organische Kationen

Studien an isolierten Rattenhepatozyten hatten bereits früh die Existenz zweier getrennter Transportsysteme für organische Kationen in der Leber gezeigt [STEEN H. *et al.*, 1992; GROOTHUIS G.M.M. *et al.*, 1996]. Ein Typ-1 System vermittelt die sinusoidale Aufnahme kleiner, hydrophiler organischer Kationen wie TEA, TBuMA,

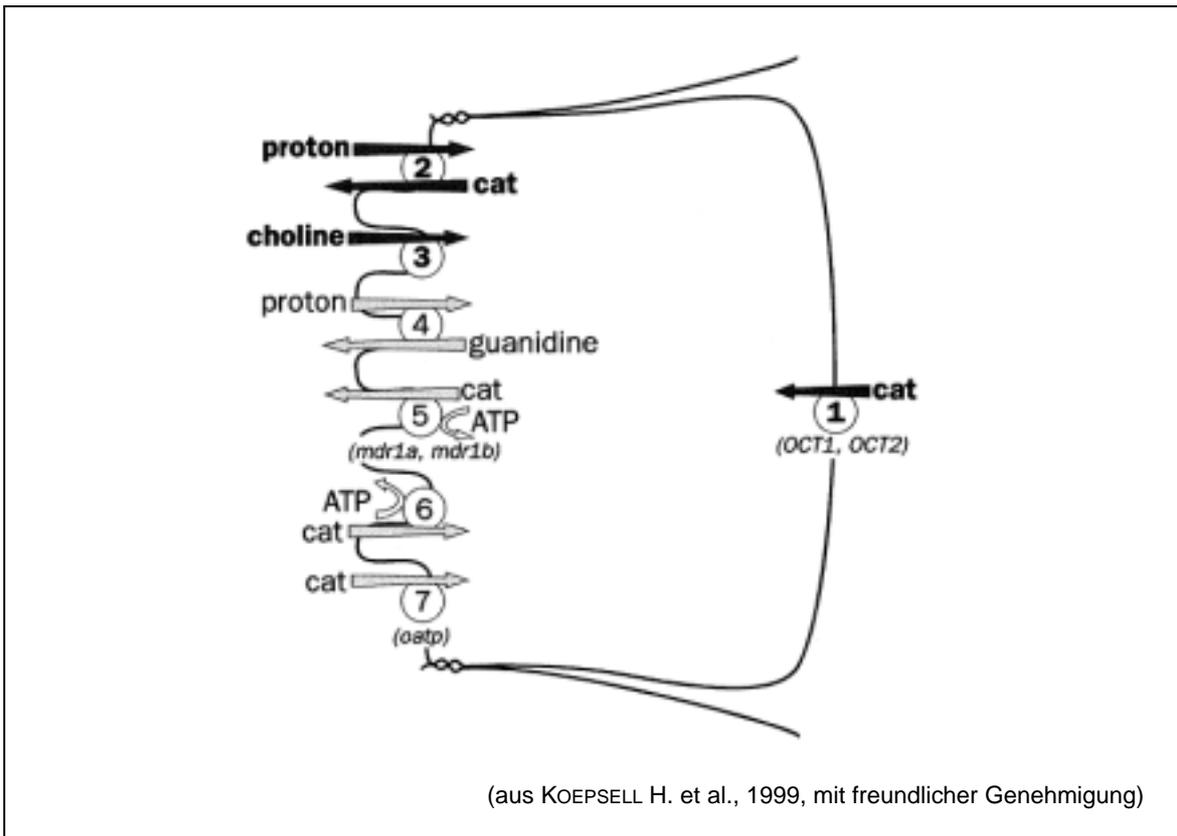


Abb. 1: Transportsysteme für organische Kationen in den Plasmamembranen des proximalen Tubulus. Nur wenige der aufgezeigten Transportsysteme sind bislang ausreichend charakterisiert (schwarz hervorgehoben). In Klammern bereits klonierte Proteine als Kandidaten für die jeweiligen Systeme.

- 1) Das basolaterale, potentialabhängige polyspezifische System, entspricht den klonierten Homologen rOCT1 und rOCT2.
- 2) und 4) Zwei luminal H⁺-Kationen-Austauschersysteme sezernieren kleine organische Kationen.
- 5) Luminal lokalisierte ATPasen der MDR-Familie (*multidrug resistance proteins*) vermitteln die Sekretion großer hydrophober Kationen.
- 3) Ein elektrogenes System mit Präferenz für Cholin,
- 6) ein ATP-abhängiges Aufnahmesystem für organische Kationen und
- 7) der polyspezifische Transporter *oatp*, der sowohl organische Anionen als auch Kationen befördert, vermitteln dagegen die Reabsorption.

Cimetidin, Procainamid und Guanidin. Ein Typ-2 System vermittelt dagegen den Transport sperriger, hydrophober organischer Kationen wie Chinin, Chinidin, d-Tubocurarin, Vecuronium und Digitoxin. Das Typ-2 System ist darüberhinaus typischerweise durch Taurocholat und k-Strophanthosid hemmbar, jedoch nicht durch Typ-1-Substrate. Demgegenüber sind die meisten Typ-2-Substrate potente Inhibitoren des Typ-1-Systems, welches jedoch nicht durch Taurocholat und k-Strophanthosid gehemmt wird [OUDE ELFERINK R.P. *et al.*, 1995]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass in der Rattenleber rOCT1 dem Typ-1-System und Oatp2 dem Typ-2-System entspricht [VAN MONTFOORT J.E. *et al.*, 2001]. Eine Übertragung dieses Modells auf den Menschen scheint jedoch nicht ohne größere Modifikationen möglich. Zwar weist einerseits hOCT1 ein dem rOCT1 vergleichbares Substratspektrum auf, es bestehen jedoch andererseits zwischen hOCT1 und OATP-A, dem humanen Homolog von Oatp2, große Überlappungen. Darüberhinaus unterscheiden sich wiederum die Substratspektren von Oatp2 und den humanen OATPs in wesentlichen Punkten [VAN MONTFOORT J.E. *et al.*, 2001].

Neuronale Transportsysteme für Neurotransmitter

Viele Neurotransmitter fallen ebenfalls unter die Gruppe der organischen Kationen, hier sind insbesondere die Monoamine zu nennen. In Glia und Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems befinden sich mehrere Transportsysteme, die die Rückresorption synaptisch freigesetzter Transmitter bewerkstelligen. Hierzu gehören sowohl natriumabhängige Transporter wie der hochaffine, cocainsensitive neuronale Catecholamin-Transporter (*uptake₁*-System) als auch natriumunabhängige, polyspezifische Transporter der OCT-Familie, die durch Corticosteron hemmbar sind und unter anderem auch Catecholamine transportieren. Der polyspezifische Kationentransporter OCT3 vom Menschen entspricht dabei dem funktionell an Herzmuskelzellen charakterisierten niederaffinen und hochkapazitären Noradrenalin-*uptake₂*-System (bisweilen auch „EMT“ genannt) [GRÜNDEMANN D. *et al.*, 1998; WU X. *et al.*, 1998]. OCT3 wurde primär aus der Placenta der Ratte kloniert [KEKUDA R. *et al.*, 1998], wird jedoch neben dem Herzen

auch im Zentralnervensystem (hier neuronal [WU X. *et al.*, 1998]) und in der Niere exprimiert [WU X. *et al.*, 2000]. Wie mittlerweile gezeigt werden konnte, sind die mit rOCT1 verwandten Homologe hOCT2 und rOCT2 ebenfalls neuronal lokalisiert [BUSCH A.E. *et al.*, 1998]. Alle Transporter haben die Polyspezifität als gemeinsames Charakteristikum, wobei sich die Substratspektren zum Teil deutlich überschneiden [GRÜNDEMANN D. *et al.* 1999; ARNDT P. *et al.*, 2001; DRESSER M.J. *et al.*, 2000].

Die OCT-Familie

rOCT1 ist der Prototyp einer neuen, mittlerweile großen Familie von polyspezifischen Transportproteinen, zu denen auch Transporter für organische Anionen [zu diesen siehe als Review BURCKHARDT G. *et al.*, 2000] und möglicherweise auch H⁺-Kationen-Austauscher gehören [KOEPEL H. *et al.*, 1999]. Diese auch SLC22 (für *solute carrier family 22*) genannte OCT-Familie gehört wiederum zur *major facilitator superfamily* MFS [PAO S.S. *et al.*, 1998; SAIER M. *et al.*, 2000; SAIER M. *et al.*, 2001]. Hierin werden Transportproteine subsumiert, die durch 12 α -helikale Transmembrandomänen gekennzeichnet sind, und bakterielle *drug-resistance*-Proteine, H⁺-Cotransporter sowie Transporter für Saccharide und Intermediate des Zitronensäurezyklus umfassen. Seit 1994 wurden ca. 20 Genprodukte mit Homologie zu rOCT1 identifiziert. Die höchste Homologie zeigen mOCT1 aus der Maus mit 95%, rbOCT1 aus dem Kaninchen mit 81% und schließlich hOCT1 vom Menschen mit 78% Homologie zu rOCT1. Aus der Ratte kloniert wurden rOCT2 [OKUDA M. *et al.*, 1996 und GORBOULEV V. *et al.*, 1997] mit 67% und rOCT3 [KEKUDA R. *et al.*, 1998] mit 48% Homologie zu rOCT1. Am nächsten verwandt mit rOCT2 sind mOCT2 aus der Maus (69%), pOCT2 aus dem Schwein (67%) und nicht zuletzt das humane Homolog hOCT2 (68%) [GORBOULEV V. *et al.*, 1997]. Wie mittlerweile gezeigt werden konnte, ist rOCT1 in der Ratte nicht nur in der Niere sondern hauptsächlich in der Leber lokalisiert [KARBACH U. *et*

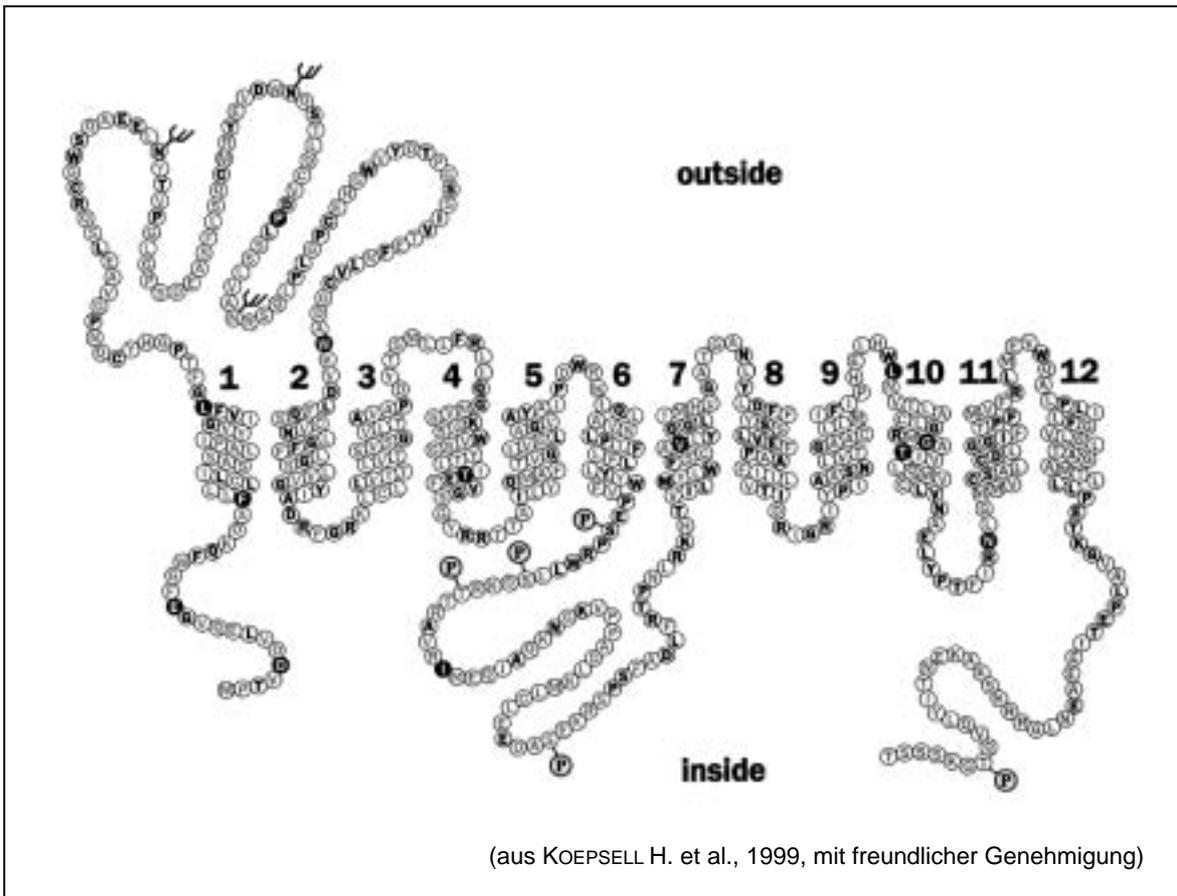


Abb. 2: Aminosäuresequenz von rOCT1 und mutmaßliches Modell der Membraninsertion (*outside*, extrazelluläre Seite; *inside*, zyttoplasmatische Seite) Erkennbar sind die zwölf helikalen Transmembrandomänen sowie eine auffällig große extrazelluläre Linkerregion nahe dem N-Terminus. Fett hervorgehobene Aminosäuren sind konserviert in den OCT1/OCT2- und OCT3-Subfamilien, schwarz hervorgehoben diejenigen auch in der OCTN-Subfamilie, aber nicht bei den Anionentransportern konservierten Aminosäuren. PKC-Phosphorylierungsstellen sind mit (P), N-Glykosylierungsstellen mit (Ψ) hervorgehoben.

al., 2000]. Dort befindet er sich in der sinusoidalen Membran vor allem perivenöser Hepatozyten [MEYER-WENTRUP F. *et al.*, 1998]. In der Niere dagegen ist rOCT1 in der basolateralen Membran vor allem des S1 und S2-Segments proximaler Tubuli des Nierencortex lokalisiert, während sein Homolog rOCT2 dagegen überwiegend in der Niere, und zwar in der basolateralen Membran vor allem des S2 und S3-Segments der proximalen Tubuli des äußeren Markstreifens [KARBACH U. *et al.*, 2000; SUGAWARA-YOKOO M. *et al.*, 2000], exprimiert wird. Beim Menschen ist hOCT1 in der Leber und hOCT2 in Niere und Gehirn nachweisbar. In der Niere konnte hOCT2 kürzlich immunhistochemisch in der basolateralen Membran des proximalen Tubulus des Cortex und des Markstreifens lokalisiert werden [MOTOHASHI H. *et al.*, 2002]. Dort ist er abschnittsweise auch mit den Anionentransportern hOAT1 und hOAT3 kolokalisiert.

Die Gene vieler Vertreter der OCT-Familie wurden mittlerweile lokalisiert. In der Ratte ist rOCT1 auf Chromosom 1 (q11-q12) codiert [KOEHLER M.R. *et al.*, 1996, *GenBank*TM *Accession number* X78855]. Die humanen OCT1 und OCT2-Homologe liegen in direkter Nachbarschaft auf Chromosom 6q26 (dem Gen des IGF2-Rezeptors benachbart), die Gene wurden als SLC22A1 bzw. SLC22A2 beschrieben [KOEHLER M.R. *et al.*, 1997; *GenBank*TM *Accession numbers* U77086 und X98332]. OCT3 ist als Slc22a3 in der Maus auf Chromosom 17 und als SLC22A3 im Menschen auf Chromosom 6q26-q27 lokalisiert. Letzterer ist nicht nur in der menschlichen Plazenta (vor allem im ersten und letzten Trimenon), sondern auch in Skelettmuskel, Prostata, Aorta, Leber, fetaler Lunge, Speicheldrüsen und Nebenniere lokalisiert [VERHAAGH S. *et al.*, 1999; *GenBank*TM *Accession number* AF078749]. Viele Transportproteine der OCT-Familie sind außerdem während der Embryonalentwicklung in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert [PAVLOVA A. *et al.*, 2000].

Einführung in die Biophysik von Transportproteinen

Die Translokation nicht-diffusibler Substrate über eine Zellmembran kann über verschiedene Wege erfolgen. Entsprechend der Translokationsrichtung des Substrats werden dabei die jeweiligen Membranseiten definiert: Das zu beobachtende Substrat wird von der *cis*-Seite der Membran auf deren *trans*-Seite transloziert. Poren (z.B. durch Connexine gebildete „*gap junctions*“) erlauben die unregulierte Passage geeigneter Moleküle zwischen benachbarten Zellen. Kanalproteine ermöglichen den raschen und hochkonduktiven Durchtritt von Ionen, wobei eine Regulation letztendlich durch eine Änderung der Öffnungswahrscheinlichkeit erfolgen kann. In erregbaren Membranen z.B. von Nervenzellen gibt es Kanalproteine, deren Öffnungswahrscheinlichkeit unter anderem durch das Membranpotential reguliert wird, insofern wird hier von spannungsabhängigen Kanalproteinen gesprochen. Beispiele hierfür sind die am Ranvierschen Schnürring lokalisierten spannungsabhängigen Na⁺-Kanäle Na_v1.6 und Na_v1.8 oder die juxtaparanodal lokalisierten K⁺-Kanäle K_v1.1 und K_v1.2. Daneben existieren auch ligandengesteuerte Kanäle, wobei die Öffnungswahrscheinlichkeit durch die Bindung eines zweiten, nicht translozierten Substrats verändert wird. Ein Beispiel hierfür sind ATP-abhängige K⁺-Kanäle. Ein Substrattransport ist bei Kanalproteinen nur entlang eines entsprechenden elektrochemischen Gradienten möglich, wobei durchaus eine Translokationsrichtung bevorzugt sein kann, z.B. bei den K_{ir}-Kanälen.

Transportproteine hingegen entsprechen eher Enzymen und bewerkstelligen die Substrattranslokation durch einen Zyklus von Konformationsänderungen, wobei es zuerst zu einer Bindung des Substrates auf der *cis*-Seite kommt [STEIN W.D., 1990]. Nach einer Konformationsänderung des Transporters von *cis* nach *trans* erfolgt die Dissoziation des Substrates aus seiner Bindung auf der *trans*-Seite. Um in einen neuen Transportzyklus einzutreten, ist eine anschließende Reorientierung des Transporters von *trans* nach *cis* erforderlich. Wird für das Durchlaufen eines Transportzyklus Energie benötigt, z.B. in Form von ATP-Hydrolyse, insbesondere wenn der Substrattransport entgegen eines entsprechenden Gradienten erfolgt, wird von einem primär aktiven Transporter gesprochen. Ein Beispiel hierfür ist das auch

Multidrug-Transporter genannte p-Glykoprotein. Eine Translokation eines Substrates A entgegen dessen Gradienten A ist jedoch auch durch Kopplung des Transports von A von *cis* nach *trans* an die Translokation eines zweiten („treibenden“) Substrates B entlang dessen elektrochemischen Gradienten B möglich. Diese kann entweder gleichsinnig im Sinne eines Cotransports (oder Symport), oder gegenläufig als Countertransport (oder Austausch) zur Transportrichtung von A erfolgen. Hierbei wird von einem sekundär aktiven Transport gesprochen, da der „treibende“ Gradient von Substrat B meist erst durch einen weiteren, primär aktiven Transportmechanismus aufgebaut bzw. aufrecht erhalten wird. Beispiele hierfür sind der Na⁺-D-Glucose-Cotransporter SGLT bzw. der oben erwähnte H⁺-Austauscher für organische Kationen.

Ein Substrattransport höhermolekularer Substrate parallel zu einem Gradienten ohne unmittelbare Aufwendung von Energie kann neben den oben erwähnten Kanälen auch durch Transportproteine vermittelt werden. Diese weisen einen enzymähnlichen Transportmechanismus auf und sind somit sättigbar, in ihrer Transportkapazität und –geschwindigkeit begrenzt und von dem Substratangebot auf der *cis*- und *trans*-Seite abhängig. Für sie gilt wie für Enzyme die MICHAELIS-MENTEN-Gleichung:

$$v = \frac{V_{\max.} \cdot S}{K_M + S}$$

wobei v die Transportgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der angebotenen Substratkonzentration S ist. Für jedes Transportsubstrat ist der spezifische Transport durch einen Carrier durch die Konstanten K_M und $V_{\max.}$ charakterisiert. Hierbei ist $V_{\max.}$ als die maximale Transportgeschwindigkeit bei Sättigung definiert, ihre Dimension ist mol/min (oder in der vorliegenden Arbeit soweit nicht anders angegeben pmol h⁻¹ Oocyte⁻¹). K_M stellt die Substratkonzentration dar, bei der die halbmaximale Transportrate erzielt wird. Sie ist direkt proportional zur Dissoziationskonstante des Substrats und somit indirekt proportional zur Substrataffinität. Seine Dimension ist mol/l [STEIN W.D., 1990, S. 135ff.]. Bei vielen

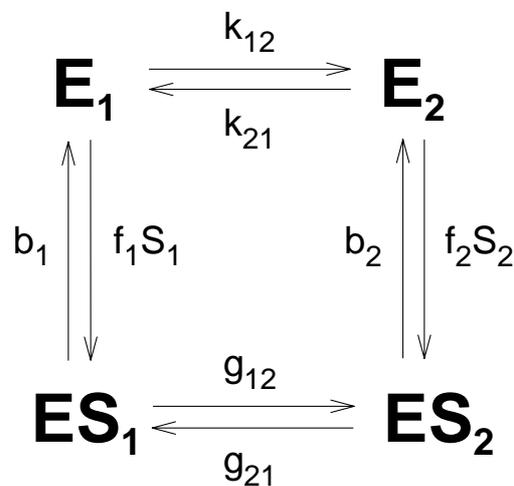
Transportproteinen zeigen diese Parameter auch eine Abhängigkeit vom Membranpotential [BORST-PAUWELS G.W., 1993].

Nach der Translokation des Substrates A von der *cis*-Seite nach *trans*, welche nach allgemein gültiger Theorie durch eine Konformationsänderung des Transportproteins erfolgt, ist eine Reorientierung zur *cis*-Seite erforderlich, um in einen neuen Transportzyklus von *cis* nach *trans* einzutreten. Obligatorische Austauscher („*exchanger*“) benötigen die Anwesenheit eines transportablen Substrates B auf der *trans*-Seite, um eine rasche Reorientierung des Transportproteins auf die *cis*-Seite zu vollziehen, wobei das Substrat B von „*trans*“ nach „*cis*“ (aus der Sicht des Substrates A) transportiert wird. In unbeladenem Zustand vermag der Austauscher diese Reorientierung nach *cis* nicht oder nur stark verlangsamt durchzuführen. Uniporter dagegen sind in der Lage, diese Konformationsänderung in unbeladenem Zustand durchzuführen. Sie funktionieren somit auch unter der sogenannten „*trans-zero*“-Bedingung, d.h. in Abwesenheit eines Substrates B auf der *trans*-Seite.

Ein praktikables Unterscheidungsmerkmal von Transportern gegenüber Kanalproteinen ergibt sich ebenfalls aus den genannten *cis/trans*-Kriterien: die *trans*-Stimulierbarkeit. Hierunter versteht sich eine Beschleunigung des Transportes von Substrat A von *cis* nach *trans* durch die Zugabe eines ebenfalls transportablen Substrates B auf der *trans*-Seite. Grund hierfür ist nach bisheriger Theorie, dass die Reorientierung des Carriers von *trans* nach *cis* in beladenem Zustand schneller erfolgt und somit der Eintritt in den nächsten Transportzyklus rascher erfolgt. Dies setzt jedoch nicht das Vorliegen eines obligaten Austauschers voraus. Umgekehrt kann hieraus auch geschlossen werden, dass ein gegebenes Substrat B, welches den Transport eines bekannt transportablen Substrates A zu *trans*-stimulieren vermag, selbst transportabel sein muss. Im Gegensatz hierzu würde bei einem Kanalprotein eine Erhöhung der Substratkonzentration auf der *trans*-Seite zu einer Reduktion des treibenden Gradienten und somit zu einer Verlangsamung der Substrattranslokation führen. Bis auf wenige sehr spezielle Ausnahmen würde kein klassischer Kanal eine *trans*-Stimulation zeigen (Zum theoretischen Hintergrund siehe hierzu STEIN W.D.,

1990, S. 133 – 143 und S. 167 - 169). *Trans*-Stimulierbarkeit war in der Vergangenheit bereits für mehrere Carrier anhand funktioneller Messungen gezeigt worden, so z.B. am Nukleosidtransporter in humanen Erythrozyten [PLAGEMANN P.G. *et al.*, 1982].

Allgemein kann der einfache Uniporter mit einem kinetischen Modell mit vier energetisch differenten Bindungs- und Orientierungszuständen dargestellt werden. Dieses vereinfachte Schema ist auch für die sog. Makroskopische oder apparente Kinetik komplexerer Transportermodelle anwendbar [HERNÁNDEZ J.A., 1998]:



Hierbei repräsentiert E_n den Transporter in seinem jeweiligen Orientierungszustand zu den Membranseiten n (1 für die extrazelluläre Seite bzw. 2 für die zytoplasmatische Seite) sowie S_n die Konzentration des Transportsubstrats auf der jeweiligen Membranseite n . Die Parameter $k_{nn'}$ und $g_{nn'}$ stellen die Zeitkonstanten für die Konformationsänderung des Transporters von der Membranseite n zur Membranseite n' dar. Die Parameter b_n und f_n sind die Dissoziations- und Bildungskonstanten des Transporter-Substrat-Komplexes ES_n . Diese Parameter lassen sich nicht isoliert experimentell bestimmen, jedoch schlägt sich ihr Zusammenspiel in messbaren Faktoren nieder. Resistenzfaktoren ($R_{nn'}$), welche proportional zur Dauer eines Transportzyklus in jeder der vier denkbaren Modi sind, lassen sich durch sie beschreiben (nach STEIN W.D., 1990, S. 167 f.): Hierbei steht R_{12} für den Zyklus beladen einwärts und unbeladen auswärts, R_{21} unbeladen einwärts

und beladen auswärts, R_{ee} beladen in beide Richtungen, entsprechend der Gleichgewichtssituation („*equilibrium exchange*“) sowie R_{00} unbeladen in beide Richtungen¹. R_{nn} verhält sich jeweils reziprok zur entsprechenden Maximalgeschwindigkeit (V_{max}), welche experimentell gemessen werden kann. Hierbei entspricht $1/R_{12}$ der V_{max} beim *trans-zero*-Einwärtstransport, $1/R_{21}$ der V_{max} beim *trans-zero*-Auswärtstransport und $1/R_{ee}$ der V_{max} im Fließgleichgewicht. R_{00} ist nicht experimentell messbar. Sofern eine Symmetrie der Transportrichtung ($b_1 f_2 g_{21} k_{12} = b_2 f_1 g_{12} k_{21}$) vorliegt, gilt jedoch $R_{ee} + R_{00} = R_{12} + R_{21}$. Zusammen mit der Michaelis-Menten-Konstante, die sich aus den o.g. Zeit-, Dissoziations- und Bildungskonstanten zusammensetzt², kann jeder unidirektionale Fluß allgemein definiert werden. Zum Beispiel gilt für den Einwärtstransport (Influx):

$$v_{12} = \frac{KS_1 + S_1S_2}{K^2R_{00} + KR_{12}S_1 + KR_{21}S_2 + R_{ee}S_1S_2}$$

(Für die Flußgeschwindigkeit der Gegenrichtung (Efflux) sind lediglich die Indices (1 gegen 2) zu vertauschen. Für die Geschwindigkeit des *trans-zero* Einwärtstransports v_{12}^{tz} gilt aufgrund $S_2 = 0$ nach entsprechender Vereinfachung:

$$v_{12}^{tz} = \frac{S_1}{KR_{00} + R_{12}S_1}$$

Dies entspricht genau der Michaelis-Menten-Gleichung, da

$$V_{max.}^{tz} = \frac{1}{R_{12}} \quad \text{und} \quad K_m^{tz} = \frac{KR_{00}}{R_{12}}$$

Dieses allgemeine Modell gilt für den einfachen Uniporter und den Transport eines neutralen Substrates. Für OCT und die an Oozyten durchgeführten Messungen

1) Für die einzelnen Resistenzfaktoren gilt (modifiziert nach STEIN W.D., 1990, S. 167 f.):

$$\begin{aligned} R_{12} &= \frac{1}{b_2} + \frac{1}{k_{21}} + \frac{1}{g_{12}} + \frac{g_{21}}{b_1g_{12}} \\ R_{21} &= \frac{1}{b_1} + \frac{1}{k_{12}} + \frac{1}{g_{21}} + \frac{g_{12}}{b_2g_{21}} \\ R_{ee} &= \frac{1}{b_1} + \frac{1}{b_2} + \frac{1}{g_{12}} + \frac{1}{g_{21}} + \frac{g_{12}}{b_1g_{21}} + \frac{g_{21}}{b_2g_{12}} \\ R_{00} &= \frac{1}{k_{12}} + \frac{1}{k_{21}} \end{aligned}$$

2) Die Michaelis-Menten-Konstante lässt sich beschreiben als (modifiziert nach STEIN W.D., 1990, S. 167 f.):

$$K_M = \frac{k_{12}}{f_1} + \frac{k_{21}}{f_2} + \frac{b_1k_{12}}{f_1g_{12}}$$

muss jedoch einschränkend festgehalten werden, dass die meisten Transportsubstrate wie z.B. TEA und MPP eine einfache positive Ladung tragen und deren Translokation somit eine Membranpotentialänderung $\Delta\psi$ entsprechend dem aufgebauten Konzentrationsgradienten S_2/S_1 verursacht [BORST-PAUWELS G.W., 1993], welche durch die Nernst-Gleichung beschrieben werden kann:

$$\Delta\psi = \frac{R T}{Z F} \ln\left(\frac{S_2}{S_1}\right)$$

Um Effekte des Kationentransports auf das Membranpotential auszuschließen müsste strenggenommen das Membranpotential mittels *voltage-clamp*-Technik konstant gehalten werden, was jedoch nicht Thema der vorliegenden Arbeit war. Desweiteren ist methodenbedingt die Messung des *trans-zero*-Influxes an der Oozyte nicht möglich. Es ist davon auszugehen, dass im Dotter der Oozyte potenziell *trans*-stimulierende Substanzen (z.B. Cholin) im Überschuss vorliegen. Daher musste zur Abschätzung der Transportersymmetrie jeweils die *trans*-stimulierte Bedingung herangezogen werden.

Polyspezifität von OCT

Ein wesentliches Charakteristikum der OCT-Familie ist die Polyspezifität hinsichtlich des Spektrums an Transportsubstraten und Hemmstoffen. Eine Vielzahl von organischen Kationen waren in der Vergangenheit in funktionellen Messungen an Nierentubuli und Zellkulturen eingesetzt worden [ULLRICH K.J. *et al.*, 1991; ULLRICH K.J. *et al.*, 1992; ULLRICH K.J. & RUMRICH G., 1992; GROVES C.E. *et al.*, 1994; GROVES C.E. & WRIGHT S.H., 1995]. Zur sinnvollen Charakterisierung von OCT ist daher eine repräsentative Auswahl von zu untersuchenden Transportsubstraten zu treffen, welche nach verschiedenen Gesichtspunkten zu erfolgen hat. Der Natriumkanalblocker Tetraethylammonium (TEA) ist als aliphatisches organisches Kation eine etablierte Modellsubstanz für die Untersuchung von Kationentransportmechanismen in verschiedenen Paradigmen [FAUTH C. *et al.*, 1988]. Für den endogenen Nicotinamidnukleotid-Metaboliten N-

Methylnicotinamid (NMN) war bereits der basolaterale Transport an isolierten proximalen Tubuli gezeigt worden [BESSEGHIR K. *et al.*, 1990a und b]. Cholin wird in der Niere bidirektional transportiert und diente ebenfalls in verschiedenen Paradigmen als Modellsubstanz für den Transport von organischen Kationen [TAKANO M. *et al.*, 1993]. Weiterhin ist insbesondere die Pharmakokinetik von 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP) interessant, ein Metabolit des Neurotoxins MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin), welcher selektiv dopaminhaltige Neurone der Substantia nigra durch Blockade mitochondrialer Atmungskettenenzyme schädigt und zu deren Untergang führt. Dies hat wiederum die Entwicklung eines Parkinson-Syndroms bei den betroffenen Patienten zur Folge [LANGSTON J.W. *et al.*, 1984]. MPP dient seither als Modellsystem für Untersuchungen der neuronalen Degeneration bei Parkinson-Syndromen. Transport von MPP war bereits für renale BBM-Vesikel [SOKOL, P.P. *et al.*, 1987] und für den damals als *uptake*₂-System bekannten extraneuronalen Noradrenalin-Transporter [RUSS H. *et al.*, 1992] gezeigt worden. Insofern schien auch MPP ein sehr wichtiges und medizinisch relevantes Testsubstrat für OCT.

Ebenso war eine repräsentative Auswahl an Hemmstoffen zu treffen. Die Isocyanin und Pseudoisocyaninderivate Cyanin863 und Decynium22 waren bereits als hochaffine Hemmstoffe des Monoamintransports beschrieben [RUSS H. *et al.*, 1993a und 1993b; SCHÖMIG E. *et al.*, 1993]. Für Chinin und sein Diastereomer Chinidin war bereits eine stereospezifische Hemmung des basolateralen Kationentransporters beschrieben worden [SOMOGYI A.A. *et al.*, 1996]. Tetrapentylammonium dient als Modell für hydrophobe aliphatische Hemmstoffe des basolateralen Kationentransporters [GROVES C.E. & WRIGHT S.H., 1995]. Tubocurarin stellt ein typisches Typ-2-Substrat und Hemmstoff des Typ-1-Transportsystems dar [OUDE ELFERINK R.P. *et al.*, 1995]. Ansonsten wurden zum Zweck des direkten Vergleichs an hOCT2 die von Gründemann an rOCT1 verwendeten Hemmstoffe verwendet [GRÜNDEMANN D., 1994 (Diss.)].

Zielsetzung dieser Arbeit

Mit rOCT1 stand erstmals ein Prototyp der polyspezifischen, potentialabhängigen, pH- und natriumunabhängigen elektrogenen Kationentransporter zur isolierten enzymkinetischen Analyse zur Verfügung. Nach der Klonierung von rOCT1 1994 waren im Rahmen der Basischarakterisierung [GRÜNDEMANN D. *et al.*, 1994] zwar bereits einige Daten zum TEA-Transport und zum Hemmstoffspektrum erhoben worden. Zum einen war anhand des Hemmstoffspektrums und einer einzelnen Transportmessung von NMN zwar eine Polyspezifität vermutet worden, diese jedoch nicht durch weitere Transportmessungen und insbesondere –kinetiken bestätigt worden. Zum anderen war nur relativ wenig über seinen detaillierten Transportmechanismus bekannt. Insbesondere war zwar vermutet aber nicht gezeigt worden, dass es sich bei rOCT1 um einen Uniporter und nicht um einen obligaten Austauscher handelt. Desweiteren war nichts über Symmetrieverhalten und Hemmmechanismen dieser interessanten Transporterspezies bekannt. Als die Arbeiten für diese Dissertation 1995 begonnen wurden, ließen sich somit hinsichtlich rOCT1 folgende Zielsetzungen formulieren:

1. Charakterisierung der Polyspezifität von rOCT1 durch Transportmessungen,
2. Enzymkinetische Klassifizierung von rOCT1 bezüglich des *cis-/ trans*-Verhaltens,
3. Analyse der direktionalen Transportersymmetrie anhand Influx- und Effluxmessungen,
4. Korrelation von Transportverhalten und elektrischer Aktivität von rOCT1.

Nach der Charakterisierung von rOCT1 aus der Ratte lag es nahe, auch humane Homologe zu finden und vergleichend zu analysieren. Als erster humaner Verwandter von rOCT1 wurde 1996 hOCT2 (zunächst Klon N42 genannt) kloniert [GORBOULEV V. *et al.*, 1997]. Demnach war es ab 1997 von höchstem allgemeinem

Interesse, die Transport- und Hemmcharakteristika von hOCT2 im direkten Vergleich aufzuklären. Somit lassen sich weiterhin als Zielsetzungen für die zwischen 1997 und 1998 durchgeführten Arbeiten formulieren:

5. Charakterisierung der Polyspezifität von hOCT2 durch Transportmessungen,
6. Charakterisierung des Hemmstoffspektrums von hOCT2 durch Hemmkinetiken,
7. Enzymkinetische Klassifizierung von hOCT2 anhand des *cis-/ trans*-Verhaltens.

Zum Erreichen dieser Zielsetzungen wurden beide Transporter im Expressionssystem *Xenopus-laevis*-Oozyte mittels [³H]- bzw. [¹⁴C]-Tracermessungen untersucht. Die für Punkt 4 notwendigen elektrophysiologischen Untersuchungen wurden im Rahmen einer Kooperation mit Herrn PD Dr. Andreas Busch am Physiologischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt. Die vorliegende Arbeit stellt hierbei eine detaillierte Sichtung und kritische Reevaluation der zwischen 1996 und 1998 vom Autor selbst erhobenen Befunde und der damaligen Interpretationen dar, welche mittlerweile in mehreren internationalen Fachzeitschriften veröffentlicht wurden [BUSCH A.E., ... ULZHEIMER J.C. *et al.*, 1996a; BUSCH A.E., ... ULZHEIMER J.C. *et al.*, 1996b; GORBOULEV V., ULZHEIMER J.C. *et al.*, 1997; NAGEL G., ... ULZHEIMER J.C. *et al.*, 1997; BUSCH A.E., ... ULZHEIMER J.C. *et al.*, 1998] und auf internationalen Kongressen präsentiert wurden [GORBOULEV V., ... ULZHEIMER J.C. *et al.*, 1996; KOEPESELL H., ... ULZHEIMER J.C. *et al.*, 1996; LANG F., ... ULZHEIMER J.C. *et al.*, 1996;]. Im Vergleich mit den zitierten Originalarbeiten wird hier der Beitrag des Autors am Gesamtprojekt isoliert dargestellt und anhand mittlerweile publizierter neuerer Ergebnisse reevaluiert.

2.

Material und Methoden

- 2.1 Molekularbiologische Methoden
- 2.2 Oozyten von *Xenopus laevis* als Expressionssystem für Transportproteine
 - 2.2.1 Präparation von *X. laevis*- Oozyten
 - 2.2.2 Kultur von *X. laevis*- Oozyten
 - 2.2.3 Mikroinjektion von *X. laevis*- Oozyten
- 2.3 Transportmessungen an *Xenopus*-Oozyten mit radioaktiv markierten Tracer-Substraten
 - 2.3.1 Influxmessungen
 - 2.3.2 Effluxmessungen
- 2.4 Datenauswertung
- 2.5 Bezugsquellen

2.1 Molekularbiologische Methoden

Die klonierten OCT-Transporter liegen in Form eines DNA-Plasmidinsertes in einer Phagenbibliothek vor [GRÜNDEMANN D. (Diss.), 1994]. Um OCT-Proteine funktionell in *Xenopus-laevis*- Oozyten zu exprimieren, ist zunächst die Linearisation der isolierten Plasmid-cDNA notwendig. Aus der cDNA muß sodann eine cRNA transkribiert werden, welche dann in geeigneter Verdünnung zur Mikroinjektion in die Oozyte zur Verfügung steht.

Lösungen

Für die nachfolgenden Prozeduren wurden folgende Lösungen und Standardansätze verwendet. Hierbei wurden alle Lösungen, die mit RNA in Kontakt kommen sollten, mit DEPC-H₂O angesetzt. DEPC (Diethylpyrocarbonat) inaktiviert Enzyme durch Histidin-Ethoxyformylierung, modifiziert ssRNA und zerfällt durch Autoklavieren in CO₂ und Ethanol.

DEPC-H ₂ O:	0,1%	Diethylpyrocarbonat in entionisiertem H ₂ O übernacht geschüttelt, dann autoklaviert
TE-Puffer (für DNA):	10 mM 1 mM	TRIS EDTA HCl ad pH 8,0
TEA-Puffer (für RNA):	10 mM 1 mM	Triethanolamin EDTA DEPC-Behandlung HCl ad pH 7,5
TAE-Puffer (für DNA-Gelelektrophorese):	40 mM 1 mM	TRIS EDTA Essigsäure ad pH 8,5

CW-Laufmarker (für DNA-Gelelektrophorese):

10%	Glycerol
0,01%	Bromphenolblau
0,05%	Orange G
	in TAE-Puffer

BES-Puffer (für RNA-Gelelektrophorese):

10 mM	BES
0,1 mM	EDTA
	NaOH ad pH 6,7

DLG-Denaturierungslösung (für RNA-Gelelektrophorese):

50 µg/ml	Ethidiumbromid
50%	DMSO
1 M	Glyoxal
	in BES-Puffer

Linearisation von cDNA

Die 1,9 kb große rOCT1-cDNA war zunächst im pBluescript SK(-)-Vektor (2,96 kb) zwischen einer NotI- und einer EcoRI-Schnittstelle unterhalb des SP6-Promoters einkloniert. Später erfolgte zugunsten einer besseren Proteinexpression in den *Xenopus*-Oozyten die Umklonierung in den pRSSP-Vektor, der 5'- und 3' nichttranslatierte Sequenzen des *Xenopus* β -Globin-Gens trägt [Arbeiten von V. Gorboulev und A. Akhoundova, vgl. hierzu GORBOULEV V. *et al.*, 1997]. Hier befand sich die rOCT1-Sequenz zwischen dem SP6-Promoter und einer MluI-Schnittstelle. Somit musste eine Linearisation von rOCT1 in pBluescript durch Restriktion mit NotI erfolgen bzw. von rOCT1 in pRSSP mit MluI erfolgen: 10 µg rOCT1/pBluescript bzw. rOCT1/pRSSP wurden mit ca. 15U NotI- bzw. 20 U MluI-Restriktionsendonuklease im firmenseitig mitgelieferten Reaktionspuffer (Gesamtvolumen 30 µl pro 10 µg DNA) über 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Hierbei war zu beachten, dass die glycerolhaltige Enzymlösung im Gesamtansatz mindestens 10fach verdünnt ist. Die Restriktion wurde durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA gestoppt und der Ansatz bei Bedarf bei -20°C gelagert.

hOCT2 war zunächst ebenfalls im pRSSP-Vektor unterhalb einer KpnI-Schnittstelle einkloniert, wurde dann aber (N42 genannt) in den ebenfalls *Xenopus*-

β -Globin-Sequenzen tragenden pOG2-Vektor umkloniert, und zwar unterhalb des T7-Promoters und oberhalb einer NotI-Schnittstelle [Arbeiten von V. Gorboulev, siehe GORBOULEV V. *et al.*, 1997]. Demnach erfolgte die Linearisation der hOCT2-cDNA mit Restriktion durch NotI entsprechend obigem Protokoll.

Die linearisierte cDNA wurde unmittelbar nach Ende der Restriktion durch Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt: Hierzu wurde jeweils frisch eine Phenol/Chloroform-Mischung („PCI“) aus einem Teil Phenol (vakuumdestilliert, äquibriert mit TE-Puffer, versetzt mit 0,1% 8-Hydroxychinolin als Antioxidans) und einem Teil Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) („CI“) hergestellt. Die DNA-Lösung (meist 31 μ l) wurde 1:1 mit PCI vermischt (Vortex) und 2 min zentrifugiert (13000 upm). Die Oberphase (ohne Interphase) wurde vorsichtig abgezogen und asserviert, die Unterphase nach Versetzen mit dem halben Volumen an TE-Puffer reextrahiert. Die vereinigten Oberphasen (ca. 45 μ l) wurden 1:1 mit CI vermischt und 2 min zentrifugiert. Wieder wurde die Oberphase (mit Interphase) abgezogen und der Fällung mit Natriumacetat zugeführt. Hierzu wurde die Lösung mit dem 0,1-fachen Volumen an 3M Natriumacetat und dem 2,5-fachen Volumen an 100% Ethanol vermischt und 30 min bei Raumtemperatur und 13000 upm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig vom sichtbaren DNA-Pellet abgezogen. Das Pellet wurde mit 100 μ l 70% Ethanol gewaschen, nochmals zentrifugiert, und nach Abziehen des Überstandes 10 min bei 60°C getrocknet. Danach wurde die linearisierte cDNA in 10 μ l TEA-Puffer aufgenommen und photometrisch quantifiziert. Durch Bestimmung der Absorption bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge kann die Konzentration und die Reinheit einer DNA-Lösung bestimmt werden. Die OD₂₆₀ von Wasser wird auf 0 genormt, sodann entspricht eine OD₂₆₀ von 1,0 einer DNA-Konzentration von 50 μ g/ml. Zur Analyse der Reinheit wurde der Koeffizient k berechnet. Bei 1,6 < k < 2,0 ist die DNA als rein anzusehen [GRÜNDEMANN D., 1994 (Diss.)]:

$$k = \text{OD}_{260}(\text{DNA}) / (\text{OD}_{280}(\text{DNA}) - \text{OD}_{280}(\text{H}_2\text{O}))$$

Der Erfolg der Linearisation wurde sodann mittels DNA-Gelelektrophorese überprüft: Ein 0,7% Agarose-TAE-Gel wurde jeweils frisch hergestellt (50 ml TAE-

Puffer mit 0,35 g Agarose) und in einer Elektrophoresekammer mit TAE überschichtet. Die zu analysierenden DNA-Proben (jeweils ca. 500 ng, entsprechend 0,5 µl in TEA) wurden mit 3µl CW-Laufmarker versetzt, 10 min bei 60°C denaturiert und parallel zu einem DNA-Standard (Boehringer VII oder GIBCO 1,0 kb, ebenso mit CW-Laufmarker versetzt) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 60 min konstant bei 75 V wobei ab 10 min nach dem Start der TAE-Puffer zur Vermeidung eines pH-Gradienten mittels einer Rollerpumpe von der Anode zur Kathode kontinuierlich umgewälzt wurde. Nach dem Ende der Laufzeit wurde das Gel in ausreichend 1µg/ml Ethidiumbromid in Leitungswasser 10 min bei 60°C von der Unterseite her gefärbt. Das gewaschene Gel wurde auf einem UV-Leuchttisch mit einer Sofortbildkamera und einem Orangefilter fotografiert (Abbildung 3). Korrekt linearisierte cDNA läuft bei 4,9 kb. Der DNA-Standard wurde meist soweit mit CW-Laufmarker und TEA-Puffer verdünnt, sodaß jede Bande 50 ng DNA entspricht. Anhanddessen war zusätzlich eine Konzentrationsabschätzung der eingesetzten DNA-Probe möglich. Diese korrelierte gut mit dem Ergebnis der photometrischen Bestimmung.

Transkription von cRNA

Als nächster Schritt musste die linearisierte cDNA durch DNA-abhängige RNA-Polymerase in eine cRNA übersetzt werden. Die in vitro-Transkription erfolgte zunächst wie bei GRÜNDEMANN D., 1994 (Diss.) beschrieben, das Protokoll wurde dann jedoch aus Gründen der Reproduzierbarkeit und einfacheren Handhabung bei gleicher Ausbeute auf ein kommerzielles Transkriptionskit (Stratagene #200341) umgestellt. Modifizierend beibehalten wurde die Zugabe von Anorganischer Pyrophosphatase, welche die RNA-Ausbeute deutlich zu steigern schien [GRÜNDEMANN D., 1994 (Diss.)]. Als Polymerase wurde für rOCT1 SP6, für hOCT2 T7 verwendet. Der übliche Transkriptionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

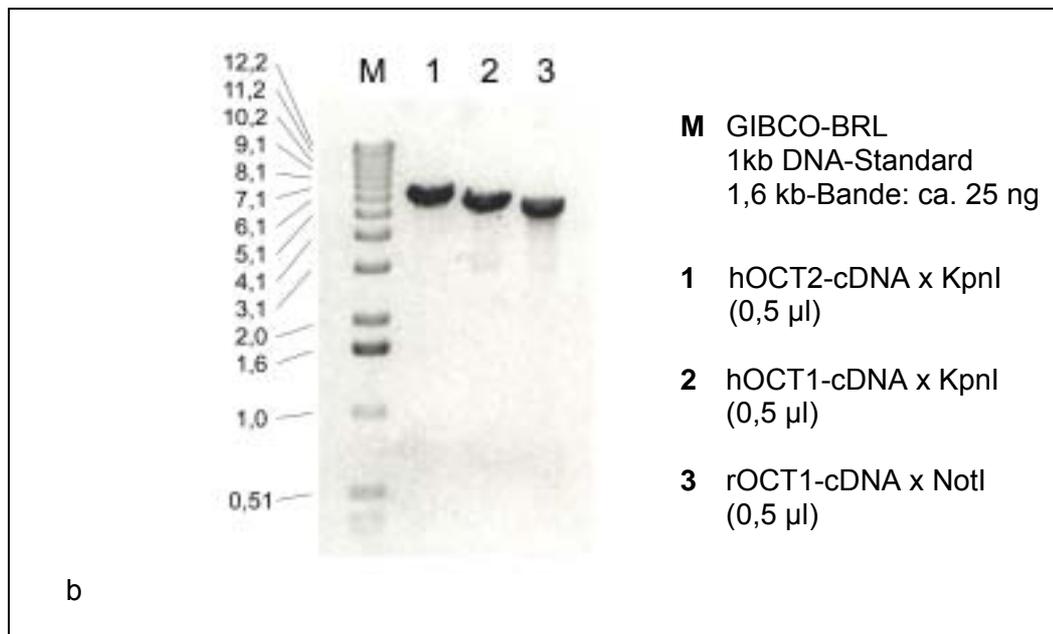
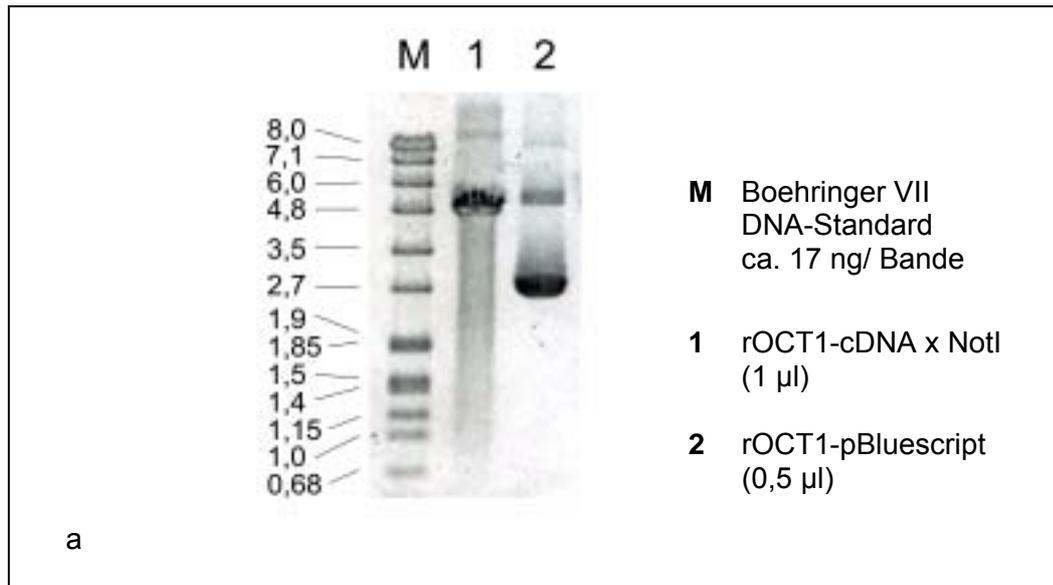


Abb. 3a: DNA-Gelelektrophorese von rOCT1 in pBluescript vor und nach Linearisation mit NotI. Unlinearisiertes Plasmid zeigt zwei Banden: bei 2,7 kb in "super-coiled" und bei 5,0 kb in "nicked" Konformation. Masse einer Marker-Bande: 50 ng, geschätzte Masse der rOCT1-Banden: ca. 1 µg.

Abb. 3b: DNA-Gelelektrophorese von rOCT1, hOCT1 und hOCT2 nach Linearisation mit NotI bzw. KpnI. Linearisierte rOCT1-cDNA läuft bei 4,9 kb. Geschätzte Masse der Banden: 500, 750 bzw. 750 ng. Photometrisch bestimmte Konzentrationen: rOCT1 1 µg/µl, hOCT1: 1,7 µg/µl, hOCT2: 1,4 µg/µl. Die Reinheitskoeffizienten lagen bei 1,7 bzw. 1,9.

- 10 μ l 5x Transkriptionspuffer (bestehend aus 200 mM Tris-HCl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 40 mM MgCl₂, 10 mM Spermidin)
- 2 μ l rNTP-Mischung (bestehend aus 10 mM rATP, 10 mM rUTP, 10 mM rCTP, 3 mM rGTP)
- 10 μ l mCAP-Analog (3 mM 5'-7MeGpppG-5')
- 2 μ l 0,75 M Dithiothreitol
- 4 μ g linearisierte DNA
- 20 U RNase-Block (40 U/ μ l)
- 40 U SP6-Polymerase bzw.
- 20 U T7-Polymerase
- DEPC-H₂O ad 50 μ l

Der Transkriptionsansatz wurde 120 min bei 37°C inkubiert. Eine anschließende Zugabe von 30 U DNase (RNase-frei) und Inkubation für weitere 30 min stoppte die Transkription. Die DNase wurde durch Zugabe von 10 mM EDTA (pH 8.0) auf ein Endvolumen von 150 μ l inaktiviert. Die Extraktion der RNA durch Phenol/ Chloroform erfolgte analog zur DNA-Extraktion unter Verwendung von DEPC-H₂O. Die Zentrifugation nach der Fällung erfolgte bei -20°C, das resultierende Pellet wurde in 15 μ l DEPC-H₂O resuspendiert.

Der Erfolg der Transkription wurde anschließend in einer denaturierenden Glyoxal-RNA-Gelelektrophorese [GRÜNDEMANN D. & KOEPESELL H., 1994] kontrolliert: Ein 1% Agarose-BES-Gel wurde jeweils frisch hergestellt (0,5 g Agarose auf 50 ml BES-Puffer), wobei nach dem Aufkochen 50 mg Jodacetat als RNase-Inhibitor zugegeben wurde, und in einer gut gereinigten und mit DEPC-H₂O gespülten Elektrophoresekammer mit ausreichend BES-Puffer überschichtet. Die Proben wurden zunächst mit Glyoxal/DMSO denaturiert. Hierzu wurden jeweils 0,5 μ l der zu analysierenden RNA-Lösung mit 2 μ l DLG (die Zugabe von Ethidiumbromid zum DLG-Ansatz erfolgte jeweils unmittelbar vor Verwendung)

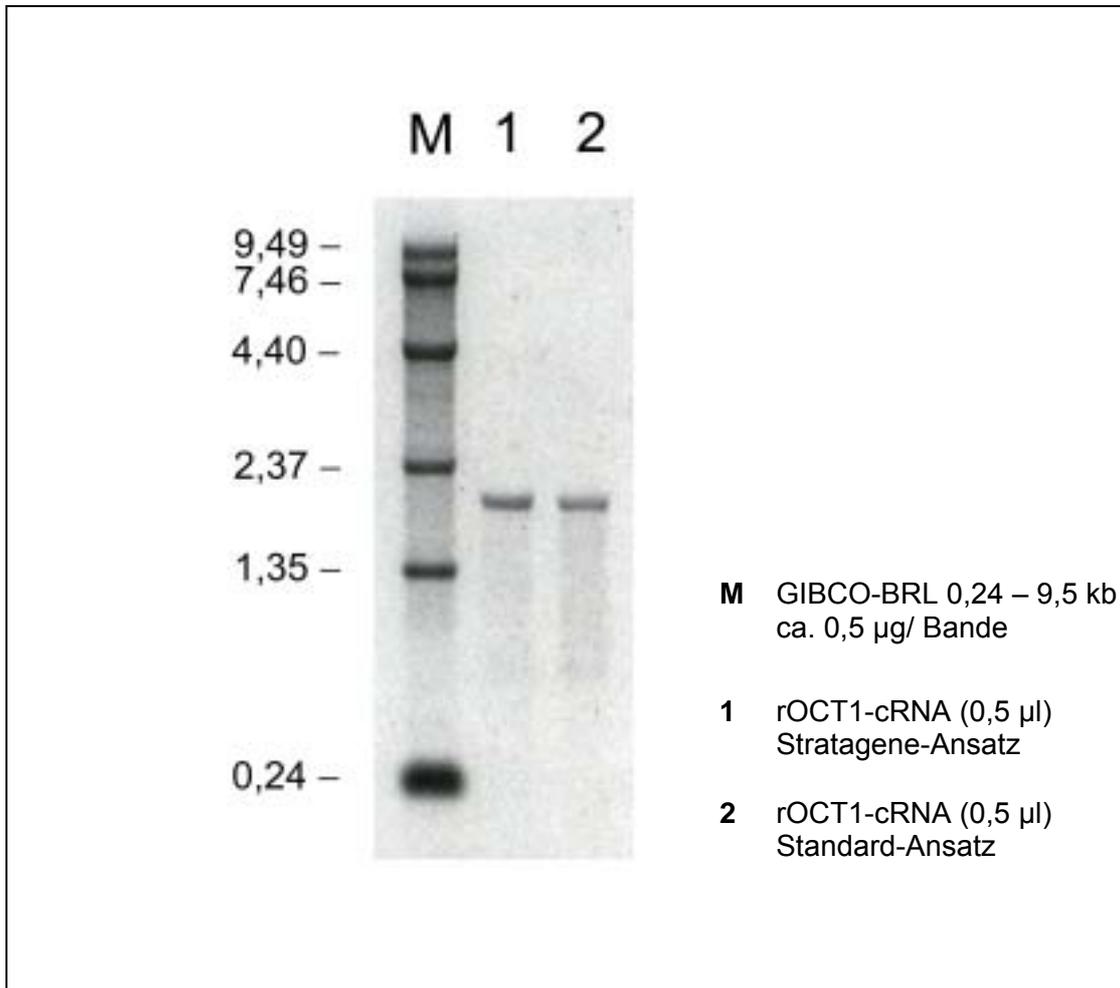


Abb. 4: Denaturierende BES-Glyoxal-Gelelektrophorese in vitro

transkribierter cRNA von rOCT1. Auf Spur 1 sind 0,5 µl der mittels kommerziellem Transkriptionskit der Fa. Stratagene hergestellten cRNA-Lösung aufgetragen. Zum Vergleich zeigt die auf Spur 2 aufgetragene, mittels bisherigem Protokoll hergestellte cRNA (ebenfalls 0,5 µl) keine bessere Ausbeute. Die Reinheit scheint bei ersterem Ansatz etwas besser zu sein. Semiquantitativ ist die Masse der rOCT1-cRNA-Banden mit ca. 0,25 µg für Spur 1 und ca. 0,2 µg für Spur 2 zu schätzen. Daraus ergibt sich eine Konzentration von 0,5 µg/µl für die analysierte cRNA-Lösung nach dem Stratagene-Protokoll.

versetzt und 60 min bei 50°C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von jeweils 1 µl Bromphenolblau als Laufmarker und die Auftragung auf das Gel. Die Elektrophorese erfolgte für ca. 2,5 Stunden bei 80V unter Verwendung einer Umwälzpumpe von Anode zur Kathode. Nach Ende der Laufzeit wurde das Gel unter Leitungswasser gewaschen und auf einem UV-Leuchttisch fotodokumentiert (siehe Abbildung 4). Korrekt transkribierte rOCT1-cRNA läuft bei 1,9 kb. Anhand des RNA-Längenstandards (GIBCO-BRL 0,24 - 9,4 kb, 1 µg/µl), von welchem 3 µg aufgetragen wurden, konnte die Masse der aufgetragenen RNA-Probe geschätzt werden. Eine Bande des Standards entspricht dabei 0,5 µg. Nur selten war in Zweifelsfällen eine photometrische Quantifizierung notwendig. Diese erfolgte analog zur DNA-Quantifizierung (s.o.), jedoch entspricht eine OD₂₆₀ von 1,0 einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Von einer ausreichenden Reinheit der RNA wurde ebenso bei $1,6 < k < 2,0$ ausgegangen [GRÜNDEMANN D., 1994 (Diss.)].

2.2 Oozyten von *Xenopus laevis* als Expressionssystem für Transportproteine

Die Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* eignen sich aus mehreren Gründen ausgezeichnet als Expressionssystem für Membranproteine [siehe hierzu SIGEL E., 1990]. Zunächst ist die relativ problemlose Verfügbarkeit und die außerordentliche Größe (durchschnittlicher Durchmesser 1,2 mm, Volumen ca. 1 μ l, davon wässriges Kompartiment ca. 0,5 μ l) vorteilhaft für die praktische Handhabung. Ab Reifungsstadium III zeigen die Oozyten eine auffällige Pigmentierung, wobei die animale Hemisphäre dunkelbraun bis schwarz, die vegetative Hemisphäre weiß bis gelb erscheint. Oozyten der am besten für Expressionsexperimente verwendbaren Reifungsstufe VI zeigen zusätzlich ein helles Äquatorialband. Der durch Mikrovilli vergrößerten Plasmamembran liegt eine Vitellinhülle aus Glykoproteinen und Mukopolysacchariden auf, es folgt eine Umhüllung aus Follikelzellen. Aufgrund ihrer Omnipotenz und Undifferenziertheit besitzt die *Xenopus*-Oocyte die Fähigkeit, cytosolisch injizierte heterologe RNA effizient zu translatieren. Darüberhinaus ist die Oocyte zu vielfältigen posttranslationalen Modifikationen und zu einem korrekten *protein sorting* in Richtung Zellmembran befähigt. Die hohe Dichte der Insertion von integralen Membranproteinen konnte u.a. am Beispiel des Natrium-D-Glucose-Cotransporters elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden [ESKANDARI S. *et al.*, 1998].

Lösungen

Für die alle Prozeduren an Oozyten wurden als Standardlösungen verwendet:

ORi (Oozyten-Ringer):	5 mM	TRIS
	100 mM	NaCl
	3 mM	KCl
	2 mM	CaCl ₂
		HCl ad pH 7,4

Kulori:	20 mg/l	Penicillin G
	25 mg/l	Streptomycin in ORi
Gentori:	50 mg/l	Gentamicin in ORi
PCG-ORi:	2,5 mM	Natriumpyruvat
	1 mM	Cholin in Gentori
ORi 130:	130 mM	NaCl sonst wie ORi

2.2.1 Präparation von *X. laevis*-Oozyten

Xenopus laevis-Weibchen wurden entsprechend der Richtlinien in temperierten 200 l-Aquarien gehalten, zweimal wöchentlich mit Rinderherz und Multivitaminsirup gefüttert. Zur Entnahme von Oozyten wurden abends zwei Tiere in Eiswasser verbracht (eines zur OP, ein weiteres als Reserve, falls keine Oozyten vorhanden), nach Sistieren der Spontanaktivität auf Eis gebettet und mit Eis bedeckt. Nach Sistieren des Schluckreflexes auf Bestreichen der Kehle wurde die Leistenregion einer Seite von Eis befreit, eine ca. 1 cm lange parainguinale Hautinzision mittels Präparierschere angelegt, die darunterliegende Faszie und die Muskelschichten gleichsinnig durchtrennt. Unmittelbar kamen die Lobuli des großen Ovars mit sichtbaren Oozyten zum Vorschein, welche mit Pinzetten vorsichtig extrahiert, abgeschnitten und in Schälchen mit Kulori verbracht wurden. Die Faszien- und Hautinzision wurde unverzüglich mittels steriler Nähseide mit 3-4 einschichtigen Einzelknopfnähten verschlossen. Die Erholung des Tieres erfolgte zunächst in handwamem Leitungswasser (Aufwachphase) und anschließend übernacht in einem dunklen Behälter mit Meerwasser (Leitungswasser mit 0,5g/l Meersalz) mit einer Spatelspitze Streptomycin. Die Ovarlappen wurden anschließend manuell disseziert und übernacht in 10 ml Kulori mit 20 mg Kollagenase (Clostridiopeptidase A, Sigma-Aldrich Taufkirchen, 1000 – 3000 *collagen digesting*

units/ mg) bei 19°C inkubiert. Am darauffolgenden Morgen wurden die Oozyten mehrmals durch sanftes Schwenken in ORi gewaschen bis ihnen kein Bindegewebe mehr anhaftete. Zusätzlich erfolgte zwei- bis dreimalige Waschung in calciumfreiem ORi (zur Ablösung der Follikelzellen, deren Interzellulärkontakte calciumabhängig sind). Danach wurden aus der Präparation inspektorisch einwandfreie Oozyten des Stadiums V und VI selektiert – wobei insbesondere zu beachten war, dass die selektierten Oozyten keinen Metaphasefleck tragen – und in Schälchen mit PCG-ORi gelagert. Der Transfer von Oozyten erfolgte einfach mittels Pasteurpipetten, deren Spitze durch Anschmelzen über einer Gasflamme von scharfen Kanten befreit wurde.

2.2.2 Mikroinjektion von *X. laevis*-Oozyten

Die Injektion der zu exprimierenden cRNA in die Oozyten erfolgte mittels fein ausgezogener (Kapillarpuller der Fa. Sutter) Borosilikat-Glaskapillaren (Rohling: Innendurchmesser 0,5 mm) und einer mikrohydraulischen Mikroinjektionspumpe mit elektronischem Zähl- und Dosiersystem (Eigenbau W. Hampel, Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt am Main), welche auf einem Mikromanipulator montiert war. Bei Montage der Glaskapillare war streng auf die luftblasenfreie Füllung mit Mineralöl zu achten. Die zu injizierende cRNA-Lösung wurde mit DEPC-H₂O auf die erforderliche Konzentration verdünnt, sodass bei einem Injektionsvolumen von 50 nl pro Oozyte die gewünschte RNA-Menge (soweit nicht anders angegeben, 10 ng/Oozyte) appliziert wird. Ein Tropfen (ca. 2 µl) der RNA-Lösung wurde in einen autoklavierten Deckel eines 1,5-ml-Reaktionsgefäßes gegeben und mit Mineralöl (*heavy white paraffin oil*, Sigma-Aldrich Taufkirchen) überschichtet. Die RNA-Lösung wurde bei maximaler Geschwindigkeit (300 nl/min) in die Glaskapillare luftblasenfrei aufgezogen.

Die zu injizierenden Oozyten wurden in hyperosmolarem ORi 130 inkubiert und in die Rillen eines Injektionsschälchens aufgereiht. Die Injektion von 50 nl pro Oozyte erfolgte in der Äquatorialzone mit einer Geschwindigkeit von 300 nl/min.

Um einen Druckausgleich zu gewährleisten und den Austritt von Dotter (und damit auch von injizierter RNA) zu vermeiden wurde nach der Injektion die Kapillare für einige Sekunden in der Oozyte belassen und erst anschließend vorsichtig extrahiert. Das Injektionsloch verschloss sich in der Regel aufgrund der Membranfluidität und der vorbereitenden hypertonen Schrumpfung rasch und vollständig. Dotternde Oozyten wurden aussortiert.

Um die Genauigkeit der Mikroinjektion zu überprüfen und die optimale und dabei effizienteste Injektionsgeschwindigkeit zu ermitteln, bei der eine möglichst geringe Schwankung der tatsächlich injizierten cRNA-Menge im Oozytenvergleich resultiert, wurden jeweils 7 bis 10 Oozyten mit 40 nl eines radioaktiven Tracers ($[^{14}\text{C}]\text{-}\alpha\text{-Methyl-Glucose}$) injiziert (Abbildung 5). Hierbei ergab sich, dass die Schwankung der tatsächlich injizierten Menge bei einer Injektionsgeschwindigkeit von 240 nl/min am niedrigsten ist (4,2%), während bei 50 und 100 nl/min einerseits die Schwankung größer und andererseits die tatsächlich injizierte Menge absolut niedriger war als bei den höheren Geschwindigkeiten, was möglicherweise auf leckbedingte Rückdiffusion während der längeren Injektionsdauer bedingt ist. Da die Schwankung bei 300 nl/min nicht wesentlich höher als bei 240 nl/min war und immer noch unter 5% lag, wurde für die RNA-Injektionen angesichts höherer Effizienz 300 nl/min gewählt.

2.2.3 Kultur von *X. laevis*-Oozyten

Die mit cRNA und DEPC-H₂O injizierten Oozyten wurden in 60mm-Schälchen mit Kulori, Gentori oder PCG-ORi überführt und dunkel bei 19°C gelagert. Für die Expression und Membraninsertion der Transportproteine wurden die Oozyten drei Tage kultiviert. Dabei wurde täglich das Medium gewechselt und inspektorisch schlechte Oozyten aussortiert. Kriterien für eine Negativselektion

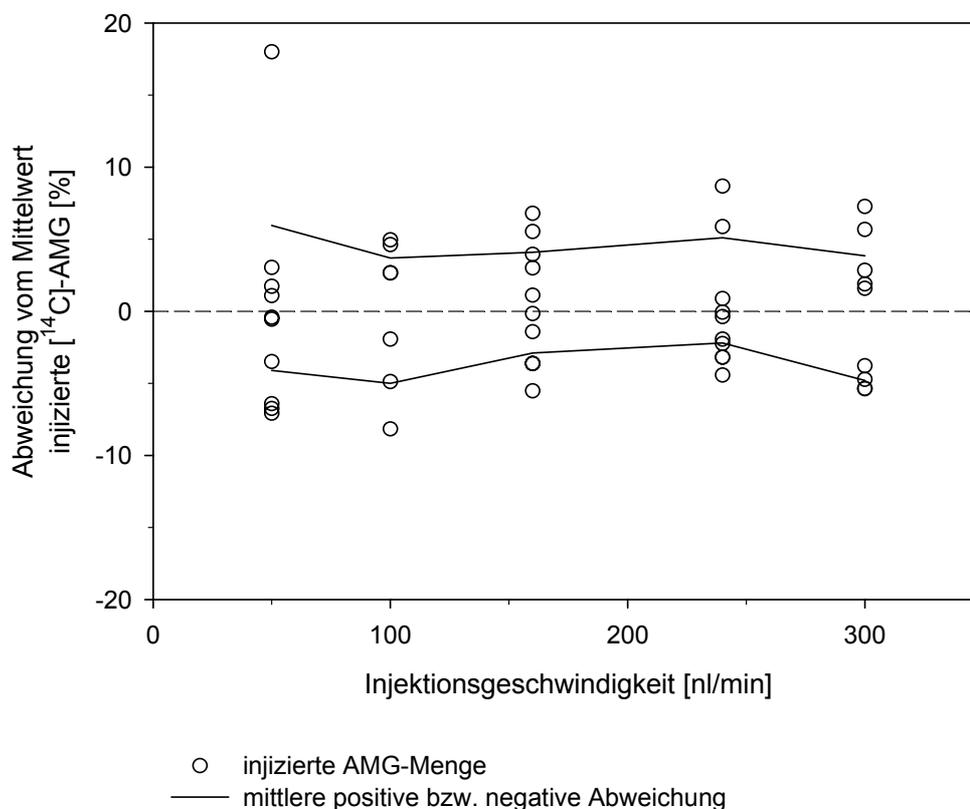


Abb. 5: Genauigkeit der Injektion von 40 nl einer Lösung von 200 μM [^{14}C]- α -Methyl-Glucose (AMG) in *Xenopus*-Oozyten in Abhängigkeit von der Injektionsgeschwindigkeit. Aufgetragen ist die Abweichung der pro Oozyte gemessenen Aktivität (dpm) vom Mittelwert:

Injektionsgeschwindigkeit	Mittlere Aktivität [^{14}C]-AMG	Standardabweichung	n
50 nl/ min	306,7 dpm	7,4 %	10
100 nl/ min	304,9 dpm	5,1 %	7
160 nl/ min	316,5 dpm	4,2 %	10
240 nl/ min	320,2 dpm	4,2 %	10
300 nl/ min	317,0 dpm	4,9 %	9

waren Turgorverlust, Erscheinen eines Metaphaseflecks (als Zeichen der Oozytenreifung) oder strukturelle Desintegration mit Dotterverlust der Oozyte. Eine sogenannte Tigerung (Verschiebung der homogen dunkelbraunen Pigmentierung des animalen Pols in eine Tüpfelung) dagegen ist für Stadium VI-Oozyten physiologisch und erwünscht. Beim Mediumwechsel wurde täglich von Kulori auf Gentori oder umgekehrt gewechselt, mit Ausnahme der PCG-ORi-kultivierten Oozyten.

Nach Umklonierung von rOCT1 in den pRSSP-Vektor bzw. von hOCT2 in den pOG-Vektor resultierte eine wesentlich höhere Expression von OCT in der Oozyte. Bei den hiermit injizierten Oozyten wurde ein auffälliger, im Laufe der Kulturdauer zunehmender Turgorverlust beobachtet. Strukturell waren die Oozyten ab dem dritten Tag für verlässliche Transportmessungen nicht mehr verwertbar. Es war anzunehmen, dass die Oozyten aufgrund der hohen Transportaktivität von OCT während der Kulturzeit endogene Energieträger oder Cytosolbestandteile verlieren. Cholin ist zum einen ein wesentlicher Bestandteil des Oozytencytosols und zum anderen Transportsubstrat für OCT. Somit lag nahe, die Oozyten mit diesen Substanzen zu substituieren. Aus diesem Grund wurde ein Kulturmedium entwickelt, welches der Cholin- und Energieverarmung der Oozyten vorbeugt: Nach Zusatz von 1 mM Cholin und 2,5 mM Natriumpyruvat zu Gentori konnten die nachteiligen sekundären Veränderungen der Oozyten deutlich reduziert werden. Das entsprechende Kulturmedium wurde PCG-ORi genannt. Allerdings stellte der Anteil an Pyruvat ein Risiko für eine Überwachsung der Kultur durch Pilze dar. Somit musste auf strikte Sauberkeit beim Umgang mit Oozyten geachtet werden. Darüberhinaus wurden PCG-ORi-kultivierte Oozyten zwecks besserer Isolation nicht mehr in großen 60mm-Gewebekulturschalen sondern zu kleineren Aliquots in *24-well-plates* kultiviert. Vor der Transportmessung wurden die Oozyten einmalig in normalem ORi gewaschen und auf strukturelle Integrität kontrolliert.

2.3 Transportmessungen an *Xenopus*-Oozyten mit radioaktiv markierten Tracersubstraten

2.3.1 Influxmessungen

Zur Messung der Substrataufnahme in die Oozyten (Influx) wurden 7 bis 10 Oozyten in 1,5 ml-Polystyrolbecher mit zunächst 186 – 199 μl ORi (entsprechend der Differenz zum späteren Endvolumen von exakt 200 μl nach Substratzugabe, s.u.) überführt. Zu definierten Zeitpunkten erfolgte die Zugabe des Hemmstoffs zwecks Vorinkubation. Hierdurch sollten unspezifische Bindungsstellen der großflächigen Oozytenmembran zunächst abgesättigt werden um eine gleichmäßige Wirkung des Hemmstoffs auf alle exprimierten OCT-Proteine zu gewährleisten. Zum Zeitpunkt $t = 0$ erfolgte durch Zugabe des radioaktiv markierten Transportsubstrats der Start des Influxes. Das Gesamtvolumen während des Influxes betrug stets exakt 200 μl . Gegen Ende der Meßdauer wurden jeweils zweimal 10 μl Überstand aus der Badlösung entnommen und der Szintillationsanalyse zugeführt. Nach Ablauf der gewünschten Meßdauer (soweit nicht anders angegeben 60 min) wurden zum Stoppen der temperaturabhängigen carriervermittelten Aufnahme 1 bis 1,5 ml eiskalter ORi in das Meßgefäß pipettiert, die Oozyten entnommen und dreimal in eiskaltem ORi gewaschen. Die Oozyten wurden einzeln in die Szintillationsgefäße pipettiert, in die jeweils 100 μl 10% SDS vorgelegt worden war. Anschließend erfolgte die Lysierung der Oozyten durch Vortexen und Schwenken der gefüllten Szintillationsgefäße auf einem Exzenter-Schüttler. Nach Lyse der Oozyten wurde jedes Vial mit 1 ml Szintillationscocktail beschickt, verschlossen und in einem TRICARB Canberra Packard Flüssigkeitsszintillationszähler analysiert. Der Ausdruck der Rohdaten erfolgte über die Software DataLink 1500 Version 2.51.

Die pro Meßansatz einzusetzende Aktivität des Tracers wurde so bemessen, daß ca. 10 KBq pro Ansatz (200 μl) einer Messung von 25000 dpm in 10 μl der Badlösung (bei 3H-MPP) entsprechen. Hierbei war auch der geräte- und

tracerspezifische Quenchfaktor (siehe technisches Handbuch) des Szintillationszählers zu berücksichtigen.

Die Umrechnung der pro Oozyte erhaltenen Messwerte (in dpm) in eine Transportrate (in pmol/h) erfolgte nach der Formel

$$n_{\text{transp.}} = \frac{a_{\text{transp.}} \cdot M_{\text{Üb.}} \cdot V_{\text{Üb.}} \cdot 60 \text{ min/h}}{a_{\text{Üb.}} \cdot t_{\text{transp.}}}$$

wobei $n_{\text{transp.}}$ für die transportierte Stoffmenge (in pmol / Oozyte), $a_{\text{transp.}}$ für die in der Oozyte gemessene Traceraktivität (in dpm), $a_{\text{Üb.}}$ für die im Überstand gemessene Traceraktivität (in dpm), $M_{\text{Üb.}}$ und $V_{\text{Üb.}}$ für die Konzentration des Tracers in der Badlösung (in pmol/ μ l = μ M) bzw. das Volumen der abgenommenen Überstandsprobe (10 μ l) sowie $t_{\text{transp.}}$ für die Meßdauer (in min) stehen.

Bei Transportkinetiken wurden in der Regel die Substrataufnahme in ungehemmte Oozyten bei 10 Konzentrationsstufen gemessen, zusätzlich hierzu bei jeweils mindestens 4 Konzentrationsstufen in hemmstoffvorinkubierte und wasserinjizierte Kontrolloozyten, wobei für jede Versuchsbedingung 7 bis 10 Oozyten pro Meßgefäß eingesetzt wurden. Für Influx-Hemmkinetiken wurden die Oozyten für jeweils 14 min in einer Badlösung mit der gewünschten Hemmstoffkonzentration vorinkubiert, bevor die Transportmessung durch Zugabe des Tracersubstrates gestartet wurde. Hierbei wurde die Substrataufnahme in ungehemmte Oozyten und bei mindestens 8 Konzentrationsstufen des Hemmstoffs gemessen. Für jede Versuchsbedingung wurden 7 bis 10 Oozyten pro Meßgefäß eingesetzt. Das Transportsubstrat wurde, sofern möglich, in einer Konzentration im Bereich des jeweiligen K_M eingesetzt.

Bei allen Influx-Transportmessungen wurden Oozyten verwendet, die während der Kulturphase mit Cholin und Pyruvat (in PCG-ORi) substituiert wurden. Daß Cholin hierbei kompetitiv hemmen könnte ist vernachlässigbar, da im Oozytendotter bereits potentielle OCT-Substrate zu vermuten sind. Deren eventuelle und variable Inhibition wird durch die konstante Vorbeladung mit Cholin eher noch nivelliert.

2.3.2 Effluxmessungen

Um das Symmetrieverhalten von rOCT hinsichtlich der *cis*- und *trans*-Verhältnisse zu untersuchen, war es notwendig, ein experimentelles Paradigma zu entwickeln, welches eine Determinierung der Substratverhältnisse auf der *trans*-Seite erlaubt. Beim Influxparadigma ist dies nicht möglich, da sich das Oozyteninnere von seiner Zusammensetzung hinsichtlich organischer Kationen nicht einmal annähernd abschätzen lässt. Auch ist eine *trans-zero* Situation beim Influx prinzipiell ausgeschlossen. Eine Kontrolle der *trans*-Seite ist dagegen einfach möglich beim Auswärtstransport (Efflux) eines sich intrazellulär befindlichen Tracer-Substrates, da hierbei die Badlösung die *trans*-Seite darstellt.

Für die Einbringung des Tracer-Substrates in die Oozyte wurde aus wichtigen Gründen die Mikroinjektion gewählt. Eine Vorinkubation mit Tracer-Substrat (wie in ARNDT P. *et al.*, 2001) erschien für Efflux-Versuche mangelhaft, da hierdurch die intrazelluläre Tracer-Konzentration ungenügend steuerbar ist. Für eine ausreichende Füllung der Oozyte auf „physiologischem“ Wege via Einwärtstransport wäre eine lange Inkubationszeit notwendig, während der sich unkontrollierbare Sekundäreffekte wie Kompartimentierung des Tracers (mit der Folge niedrigerer effektiver Konzentration an der Transporterinnenseite und geringerer Verfügbarkeit für den Efflux sowie geringerem Aktivitätssignal in der Badlösung), Verschiebungen des Membranpotentials und Induktion sekundärer Transportmechanismen einstellen können. Demgegenüber erfolgt die Mikroinjektion schnell, mit kontrolliertem Volumen und kontrollierter Injektionsgeschwindigkeit. Das Injektionsloch verschließt sich – wie bei der cRNA-Injektion – durch Membranfluidität selbständig und rasch, was visuell kontrollierbar ist. Ein eventueller Mikroleckefflux ist durch direkten Vergleich mit tracerinjizierten, rOCT1-negativen Oozyten kontrollierbar.

Wie oben beschrieben kultivierte *Xenopus*-Oozyten wurden einzeln mit jeweils 50 nl einer Tracer-Lösung von [³H]-MPP (7,4 kBq/μl, 2,4 μM) bei einer Geschwindigkeit von 80 nl/min injiziert. Dies entspricht bei einem angenommenen durchschnittlichen Oozytenvolumen von 1 μl mit einem wässrigen Kompartiment

von 500 nl einer intrazellulären Konzentration von 0,24 μM . Somit liegt die für den Efflux effektive [^3H]-MPP-Konzentration noch unterhalb des entsprechenden K_M , sodaß noch keine Sättigung für MPP erreicht ist. Da aber anzunehmen ist, dass der Transporter durch weitere intrazellulär vorhandene Transportsubstrate, insbesondere Cholin (zumal sämtliche Oozyten während der Kulturphase cholin- und pyruvatsubstituiert wurden, s.o.) im Sättigungsbereich bzw. im *steady state* läuft, würde eine weitere Erhöhung der intrazellulären MPP-Konzentration in Richtung des K_M (durch Mischung mit nicht markiertem MPP) nur zu einer Abnahme des in der Badlösung detektierbaren Aktivitätssignals aber nicht zu einer Steigerung der Transportgeschwindigkeit führen. Demgegenüber wird eine eventuelle kompetitive Inhibition durch endogene Oozytensubstrate durch die Cholinsubstitution auf ein konstantes Maß nivelliert und ist somit vernachlässigbar, zumal die Oozyten auch im Influxparadigma gleichermaßen (potentiell kompetierendes) Cholin enthalten.

Aufgrund der entsprechend erforderlich hohen spezifischen Aktivität des zu verwendenden Tracers waren Effluxmessungen nur mit [^3H]-MPP (37 kBq/ μl , 3,1 GBq/ μmol) und nicht z.B. mit [^{14}C]-TEA (3,7 kBq/ μl , 0,185 MBq/ μmol) als Tracer möglich. Bei Injektion von 10 nl Stammlösung pro Oozyte sind mit [^3H]-MPP 370 Bq pro Oozyte bei 120 fmol pro Oozyte (0,24 μM) erreichbar. Im Vergleich hierzu wären selbst bei Injektion von 50 nl Stammlösung [^{14}C]-TEA nur 185 Bq pro Oozyte bei bereits 1000 pmol pro Oozyte erreichbar. Dies würde einer intrazellulären TEA-Konzentration von 2 mM entsprechen, was bereits 20-fach über dem entsprechenden K_M läge. Aufgrund des hohen endogenen Cholin-Transports der Oozyten wurde auch auf die Durchführung von Cholin-Effluxversuchen verzichtet.

Zur Effluxmessung wurden pro Versuchsbedingung 3 bis 5 cholinsubstituierte, optisch einwandfreie Oozyten einzeln injiziert und gemessen. Nach Tracerinjektion wurde die Oozyte kurz in ORi gewaschen und in ein Polystyrolgefäß mit konischem Boden verbracht, in welches 100 μl ORi-Badlösung mit der gewünschten Konzentration an *trans*-Substrat vorgelegt war. Hiermit wurde die Effluxzeit t gestartet. Es erfolgte somit keine Vorinkubation des *trans*-Substrates. Zu den Zeitpunkten $t = 1, 2, 3, 4$ und 5 min wurde die Badlösung (100 μl) komplett entfernt,

in ein Szintillationsgefäß pipettiert und sofort durch 100 µl frische Badlösung ersetzt. Nach Abnahme der letzten Badlösung ($t = 5$ min) wurde der Efflux durch Zugabe von 1 bis 1,5 ml eiskaltem ORi auf die Oozyte gestoppt. Unmittelbar danach wurde die Oozyte aus dem Meßgefäß entfernt, dreimal in eiskaltem ORi gewaschen, lysiert und wie oben beschrieben der Szintillationsanalyse zugeführt.

Die Messwerte wurden in einen kumulativen Efflux $n_e(t)$ (in fmol) zum jeweiligen Zeitpunkt t umgerechnet. Hierzu wurde die Aktivität, die im zum Zeitpunkt t entnommenen Überstand gemessen wurde, zu den entsprechenden Werten der zuvor entnommenen Überstände addiert. Alle Überstandsaktivitäten wurden zum Messwert der Oozyte selbst addiert um die zum Zeitpunkt $t = 0$ in der Oozyte vorhandene Aktivität zu erhalten. Diese entspricht der injizierten Tracermenge (in fmol). Hierdurch konnte durch einfachen Dreisatz die zum Zeitpunkt t aus der Oozyte kumulativ ausgeflossene Tracermenge berechnet werden. Über die Zeit verläuft der kumulative Efflux exponentiell (annähernd linear während der ersten zwei Minuten) und nähert sich einem Maximum an, welches extrapolativ bei ca. 20 min nach dem Start liegt. Dies läßt sich durch die relativ geringe intrazelluläre Tracerkonzentration erklären, die durch den OCT-vermittelten Transport rasch signifikant erniedrigt wird. Somit ist davon auszugehen dass die Transportaktivität von OCT nur initial der eingesetzten Substratkonzentration entspricht. Daher wurde an die kumulativen Effluxwerte die monoexponentielle Funktion

$$n_e = a \cdot \exp(-k \cdot t) + r$$

angepasst. Die durch das Fitting (Software Biosoft Fig.P Version 6.0) erhaltenen Parameter a , k und r beschreiben somit die Efflux-Kennkurve jeder einzelnen Oozyte. Hieraus wurde durch die erste Ableitung die Steigung der Kurve bei $t = 0$ errechnet, welche der initialen Effluxrate entspricht:

$$\frac{dn_e}{dt}(t = 0) = -a \cdot k$$

Die initialen Effluxraten aller Oozyten der gleichen Versuchsbedingung wurden gemittelt und die Standardabweichung bzw. der Standardfehler berechnet.

2.4 Datenauswertung

Alle Tracerkinetiken wurden mittels Biosoft Fig.P Version 6.0 an die entsprechenden Gleichungen angepasst. Für die Gesamtaufnahmen der Transportkinetiken wurde die MICHAELIS-MENTEN-Gleichung mit unspezifischer Bindung zugrundegelegt:

$$v = \frac{V_{\max.} \cdot S}{K_m + S} + b \cdot S$$

Hierbei bezeichnet v die Transportgeschwindigkeit (in pmol/h oder fmol/min), S die Substratkonzentration, b die Rate der unspezifischen Aufnahme oder Bindung. Genauere Ergebnisse wurden jedoch erhalten, wenn von der Gesamtaufnahme via OCT-exprimierende Oozyten die unspezifische Aufnahme in wasserinjizierte oder cyaningehemmte Oozyten subtrahiert und die so erhaltene Differenzkurve an die reine MICHAELIS-MENTEN-Gleichung angepasst wurde.

$$v = \frac{V_{\max.} \cdot S}{K_m + S}$$

Hemmkinetiken wurden in der Regel gegen die Aufnahme von TEA oder MPP jeweils am K_M gemessen, d.h. bei 100 μM TEA bzw. 14 μM MPP. Die Substrataufnahme durch hemmstoffexponierte Oozyten ($v_{\text{inh.}}$) wurde – nach Korrektur um die unspezifische Aufnahme in wasserinjizierte Kontrolloozyten ($v_{\text{H}_2\text{O}}$) – zur Aufnahme in ungehemmte Oozyten (v_0) in Relation gesetzt und als Relativhemmwert ($0 \geq v_{\text{rel.}} \leq 1$) ausgedrückt:

$$v_{\text{rel.}} = \frac{V_i}{V_0} = \frac{v_{\text{inh.}} - v_{\text{H}_2\text{O}}}{v_0 - v_{\text{H}_2\text{O}}}$$

Die so ermittelten Relativhemmwerte wurden gegen die Hemmstoffkonzentration halblogarithmisch aufgetragen und an die Gleichung des entsprechenden Inhibitionsmodells angepasst. Sofern am K_M gemessen wurde, gilt für die

kompetitive Hemmung [nach GRÜNDEMANN D., 1994 (Diss.)] in Abhängigkeit von der Hemmstoffkonzentration I:

$$\frac{V_i}{V_0} = \frac{1}{1 + \frac{I}{2 \cdot K_i}}$$

Sofern jedoch nicht direkt am K_M gemessen wurde, sondern die Substratkonzentration ein Vielfaches oder ein Bruchteil des K_M betrug ($S = m \cdot K_M$), muß eine allgemeinere Form der obigen Hemmkinetik verwendet werden. Diese lässt sich wie folgt herleiten:

Die MICHAELIS-MENTEN-Gleichung lässt sich mit $S = m \cdot K_M$ formulieren als

$$V_0 = \frac{V_{\max} \cdot m}{1 + m}$$

Für die Geschwindigkeit des kompetitiv gehemmten Transports gilt:

$$\frac{1}{V_i} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) \cdot \left(\frac{1}{S}\right)$$

was sich mit $S = m \cdot K_M$ nach Umformung schreiben lässt als

$$\frac{1}{V_i} = \frac{(1 + m) \cdot K_i + I}{V_{\max} \cdot m \cdot K_i}$$

Als Quotient mit V_0 ergibt sich nach Umformung:

$$\frac{V_i}{V_0} = \frac{1}{1 + \frac{I}{(1 + m) \cdot K_i}}$$

Demgegenüber gilt für die nicht-kompetitive Hemmung unabhängig von der Konzentration des eingesetzten Transportsubstrates [nach GRÜNDEMANN D., 1994 (Diss.)]:

$$\frac{V_i}{V_0} = \frac{1}{1 + \frac{I}{K_i}}$$

Bei Hemmstoffen, deren Hemmmechanismus (kompetitiv oder nicht-kompetitiv) noch nicht bekannt ist, wurde die Hemmkinetik an eine monoexponentielle Funktion angepasst:

$$\frac{V_i}{V_0} = a \cdot e^{(-k \cdot I)} + r$$

Als IC_{50} wird die halbmaximale Hemmkonstante bezeichnet, d.h. die Hemmstoffkonzentration, bei der der Transport auf die Hälfte reduziert wird ($V_i/V_0 = 0,5$). Sie errechnet sich aus der obigen Gleichung als

$$IC_{50} = - \frac{\ln \left(\frac{0,5 - r}{a} \right)}{k}$$

Mittelwerte und Fehlerberechnung

Bei Influxmessungen an *Xenopus*-Oozyten wurden bisweilen einzelne Messwerte beobachtet, die klar außerhalb des Bereichs der übrigen Oozyten der gleichen Versuchsbedingung liegen. Diese Ausreißer können in negativer Richtung durch verminderte OCT-Expression aufgrund akzidenteller intranukleärer Injektion der cRNA oder Verlust von injizierter cRNA durch das Injektionsloch bzw. in positiver Richtung durch Schäden in der Oozytenmembran bedingt sein. Auf das arithmetische Mittel würden sich solche Ausreißer deletär auswirken, sodaß diesem Problem auf zwei Wegen begegnet werden musste. Zum einen ist der Median der

Messwerte (der mittlere Wert aller in aufsteigender Reihe geordneten Messwerte einer Gruppe) wesentlich robuster gegen Ausreißer, sodaß dieser, sofern nicht anders angegeben, mit dem entsprechenden Standardfehler zur Darstellung der Influxergebnisse verwendet wurde [SACHS L., 1992]. Andererseits beeinflussen Ausreißer auch die Qualität der Standardabweichung (SD), sodaß Signifikanztests bisweilen erschwert werden. Deshalb wurde bei einer Häufung von Ausreißern in einem Versuch konstant bei allen Gruppen des Versuchs der oberste und unterste Messwert gestrichen, was bei konstanter Durchführung und Plausibilität der Ausreißer statistisch erlaubt ist.

Bei Effluxmessungen lag aufgrund des erheblichen technischen Versuchsaufwandes die n-Zahl der pro Versuchsbedingung eingesetzten Oozyten niedriger als beim Influx (n = 3 bis 5), sodaß das gleiche Vorgehen wie beim Influx nicht möglich war. Sofern nicht anders angegeben, wurden für Effluxwerte das arithmetische Mittel der errechneten initialen Effluxraten der einzelnen Oozyten und der entsprechende Standardfehler ($SEM = SD / n^{0,5}$) angegeben.

Bei Verrechnung von mit Fehlern versehenen Werten ist eine Fehlerfortpflanzung erforderlich. Bei Verrechnung zweier Messwerte durch Addition, Subtraktion, Multiplikation oder Division (z.B. bei Relativhemmwerten oder Differenzwerten) erfolgte die Fehlerfortpflanzung durch das geometrische Mittel der relativen Einzelfehler $E_{rel.}$:

$$E_{rel. \Sigma} = (E_{rel. 1}^2 + E_{rel. 2}^2)^{0,5}$$

Bei Verrechnung eines Messwertes mit einer Konstanten wurde der relative Fehler weitergegeben und mit dem Ergebnis verrechnet.

Darstellung

Die Diagramme wurden mit Biosoft Fig.P[®] 6.0 und SigmaPlot[®] 7.0 erstellt.

2.5 Bezugsquellen

Standardchemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von Sigma-Aldrich, Taufkirchen, oder Fluka, ebd., bezogen.

Enzyme:

MluI-Restriktionsendonuklease:	Fermentas
NotI-Restriktionsendonuklease:	Fermentas #ER0592 (8U/μl) GIBCO-BRL #15441-017 (15U/μl)
RNase-Block:	Stratagene #300151
Transkriptions-Kit:	Stratagene #200350
SP6-Polymerase:	Fermentas Epicentre Technologies (25 U/μl)
T7-Polymerase	Stratagene
DNase I, RNase-frei:	Stratagene #600031

DNA-Standards:

DNA-Standard VII:	Boehringer Mannheim #1209264 (15 Banden, 250 ng/μl)
GIBCO:	GIBCO-BRL 1,0 kb, (22 Banden, 1 μg/μl) Life-Technologies #15615-016
RNA-Standard:	GIBCO-BRL 0,24-9,5 kb (6 Banden, 1 μg/μl) Life-Technologies #15620-016

Xenopus laevis Weibchen (Größe 10 – 11 cm):

H. Kähler, Hamburg

Glaskapillaren für die Mikroinjektion: Innendurchmesser 0,5 mm,
Aussendurchmesser 1,0 mm
Fa. Hilgenberg, Malsfeld

Radioaktiv markierte Transportsubstrate (Tracer):

[me- ³ H]-MPP -Acetat:	3,1 TBq/mmol, 37 MBq/ml New England Nuclear, #NET-914
[¹⁴ C]-TEA -Bromid:	1,96 GBq/mmol, 3,7 MBq/ml New England Nuclear #NEC-298
[¹⁴ C]-TEA -Bromid:	2,1 GBq/mmol, 39,22 MBq/ml Biotrend ARC-577
[¹⁴ C]-TEA -Bromid:	185 MBq/mmol, 3,7 MBq/ml New England Nuclear #NEC-298
[me- ³ H]-Cholinchlorid:	2,55 TBq/mmol, 37 MBq/ml Amersham #TRK-593
[9- ³ H]-Chinin:	555 GBq/mmol, 18,5 MBq/ml ARC American Radiolabeled Chemicals Inc., St. Louis, MO, #ART-451
[³ H]-Chinidin:	536 GBq/mmol, 37 MBq/ml ARC American Radiolabeled Chemicals Inc., St. Louis, MO, #ART-452
[me- ³ H]-NMN -Chlorid:	111 GBq/mmol, 37 MBq/ml ICN #27081
[³ H]-Dopamin:	2,1 TBq/mmol, 37 MBq/ml Biotrend #ARC-577
[2,5- ³ H]-Histamin:	1,9 TBq/mmol, 37 MBq/ml Amersham #TRK-631
[³ H]-Acetylcholin:	740 GBq/mmol, 37 MBq/ml ARC American Radiolabeled Chemicals Inc., St. Louis, MO, #ART-204
[³ H]-Corticosteron:	3,18 TBq/mmol, 37 MBq/ml Amersham #TRK-406
DL-[4- ³ H]-Propranolol:	714 GBq/mmol, 37 MBq/ml Amersham #TRK-495
[21- ³ H]-APDA:	92,5 GBq/mmol, 1,1 MBq/ml Prof. D.K.F. Meijer, Groningen
[¹⁴ C]-Ifosfamid:	57 MBq/mmol, 222 kBq/mg ASTA Medica/ Prof. M. Wießler, DKFZ Heidelberg

[¹⁴ C]-Ifosfamid:	444 MBq/mmol, 19,3 MBq/ml ASTA Medica/ Prof. M. Wießler, DKFZ Heidelberg
[¹⁴ C]-GIPM:	419 MBq/mmol, 109,3 MBq/ml ASTA Medica/ Prof. M. Wießler, DKFZ Heidelberg
[³ H]-D-Phe-Ala:	333 GBq/mmol, 120 MBq/ml Prof. H. Daniel, Gießen
[¹⁴ C]-AMG:	10,8 GBq/mmol, 7,4 MBq/ml Amersham #CFB-76

Nicht radioaktiv markierte Hemmstoffe und Transportsubstrate wurden ebenfalls von Sigma bzw. Fluka bezogen, außer:

MPP-Iodid:	Biotrend RBI #D-048
Vecuroniumbromid:	Organon-Teknika, Eppelheim

3.

Ergebnisse

- 3.1 Spezifitäten der Transportkinetik von rOCT1
 - 3.1.1 Substrattransport
 - 3.1.2 *cis*-Hemmung
 - 3.1.3 *trans*-Effekte

- 3.2 Spezifitäten der Transportkinetik von hOCT2
 - 3.2.1 Substrattransport
 - 3.2.2 *cis*-Hemmung
 - 3.2.3 *trans*-Effekte

- 3.3 Elektrochemische Eigenschaften von rOCT1

- 3.4 Symmetrie im Bindungs- und Transportmechanismus von rOCT1
 - 3.4.1 *cis*- und *trans*-Verhalten kompetitiver und nicht-kompetitiver Hemmstoffe
 - 3.4.2 *cis*- und *trans*-Verhalten von Transportsubstraten

3.1 Spezifitäten der Transportkinetik von rOCT1

3.1.1 Substrattransport

In der Erstbeschreibung von rOCT1 [GRÜNDEMANN D., 1994] war bereits durch Influxmessungen an rOCT1-exprimierenden Oozyten der Transport von TEA kinetisch charakterisiert und die Transportabilität von MPP und NMN gezeigt worden. Unter den Bedingungen fehlender Cholinsubstitution und Expression im *Bluescript*-Vektor war für TEA ein K_M von $95 \pm 10 \mu\text{M}$ und eine $V_{\text{max.}}$ von $81 \pm 5 \text{ pmol/h}$ bestimmt worden. Für MPP und NMN wurde kein K_M berechnet. Insbesondere wurde nicht geklärt, welche der Hemmstoffe selbst transportiert werden und welche nicht. Insofern war keine Aussage über eventuelle Unterschiede im Bindungs- und Transportverhalten von OCT möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Versuchsbedingungen für die funktionelle Expression von rOCT1 in *Xenopus*-Oozyten weiter optimiert. Eine Voraussetzung hierfür war die Umklonierung von rOCT1 in den oozytenspezifischen Vektor pRSSP (siehe Methodik). Hierunter zeigte sich eine bei gleicher Menge injizierter cRNA eine wesentlich höhere Transportkapazität. Deshalb wurde die optimale zu injizierende cRNA-Menge für rOCT1 neu ermittelt. Hierzu wurden Oozyten mit unterschiedlichen Mengen rOCT1/pRSSP-cRNA injiziert und die Aufnahme von [^3H]-MPP gemessen (Abbildung 6). Hierbei zeigte sich, dass eine Injektionsmenge von 5,6 ebenso wie 11,3 ng/Oozyte zu einer über 3-fach stärkeren Transportaktivität als 12,5 ng der aus *pBluescript* transkribierten rOCT1-cRNA vermittelt. Eine Verdopplung der injizierten cRNA-Menge auf 22,5 ng/Oozyte erbrachte jedoch keine weitere Verdopplung der vermittelten Transportaktivität, sodaß im folgenden standardmäßig 10 ng/Oozyte injiziert wurden. Aus den Versuchen von GRÜNDEMANN war bereits bekannt, dass sich das Expressionssystem

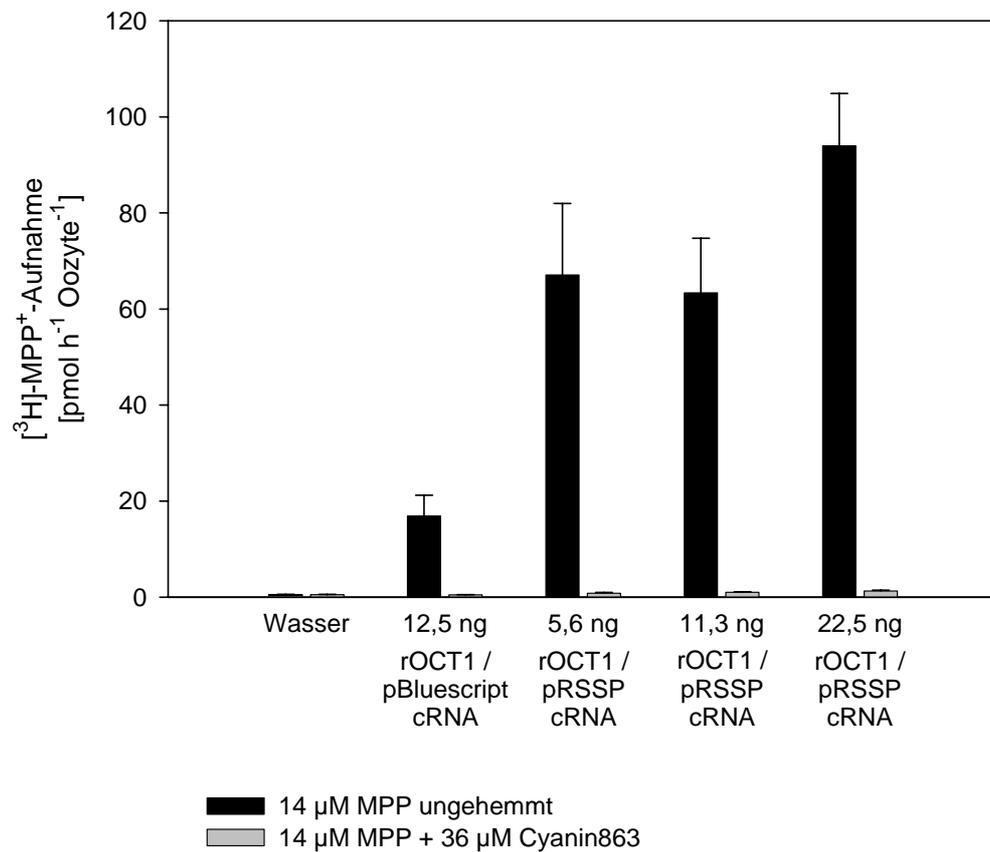
Xenopus-Oozyte

Abb. 6: Abhängigkeit der MPP-Aufnahme in *X.-laevis*-Oozyten von der Menge der injizierten cRNA. Dargestellt ist die Aufnahme von 14 μM [³H]-MPP über 60 min ± S.E.M. ungehemmt und gehemmt durch Zugabe von 36 μM Cyanin863. Es fällt auf, dass cRNA, die aus RSSP-Plasmid-cDNA transkribiert wurde, eine wesentlich stärkere Expression von rOCT1 vermittelt als die aus *pBluescript* gewonnene.

durch eine sehr hohe Aufnahmekapazität für organische Kationen im Influx-Paradigma auszeichnet, sodaß ein Einwärtstransport über sehr lange Zeit linear zu verlaufen vermag. Deshalb können Transportmessungen an der Oozyte im Rahmen von bis zu 60 oder 90 Minuten erfolgen. Im Vergleich hierzu müssen Aufnahmemessungen an Vesikeln oder Zellkulturen nach wenigen Sekunden gestoppt werden, um nicht in den Sättigungsbereich zu kommen. Um die Linearität der Substrataufnahme im Zeitverlauf für die verschiedenen Substrate von rOCT1 nachzuweisen, wurde für MPP, NMN und TEA für verschiedene Konzentrationen Zeitkinetiken angefertigt (siehe Abbildung 7). Hierbei zeigte sich, dass die Aufnahme von MPP in *Xenopus*-Oozyten bei 14, 60 und 160 μM für mindestens 60 Minuten, bei 60 μM sogar bis mindestens 90 Minuten linear verläuft. Ebenso konnte für NMN die Linearität über mindestens 90 Minuten bei 1 mM und über mindestens 60 Minuten bei 6 mM gezeigt werden. Die Aufnahme von TEA (1 mM) war ebenso für mindestens 60 Minuten linear. Demgegenüber war die entsprechende Substrataufnahme in wasserinjizierte Kontrolloozyten und in cyaningehemmte rOCT1-exprimierende Oozyten nicht linear, sondern erreichte rasch ein Maximum, was am ehesten der Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen in der Oozytenmembran entspricht. Insofern konnten alle nachfolgenden Substrataufnahmeversuche standardisiert mit einer Fluxdauer von 60 min durchgeführt werden.

Unter optimierten Versuchsbedingungen, insbesondere Cholin- und Pyruvatsubstitution, wurden zunächst Substratkinetiken für den Einwärtstransport von MPP, Dopamin, Histamin, Cholin und NMN durchgeführt. Hierzu wurde die Aufnahme der Tracer-Substrate Oozyten der gleichen Charge über 60 min bei jeweils 10 verschiedenen Konzentrationen gemessen. Jeder Versuch wurde an 8 – 10 Oozyten durchgeführt und diese isoliert gemessen. Von der ungehemmten Aufnahme subtrahiert wurden die Aufnahmewerte unter Hemmung mit einer supramaximalen Hemmkonzentration von Cyanin 863 (37 μM). Aus der Differenzkurve wurden nach nichtlinearer Anpassung an die MICHAELIS-MENTEN-Gleichung die K_M -Werte und

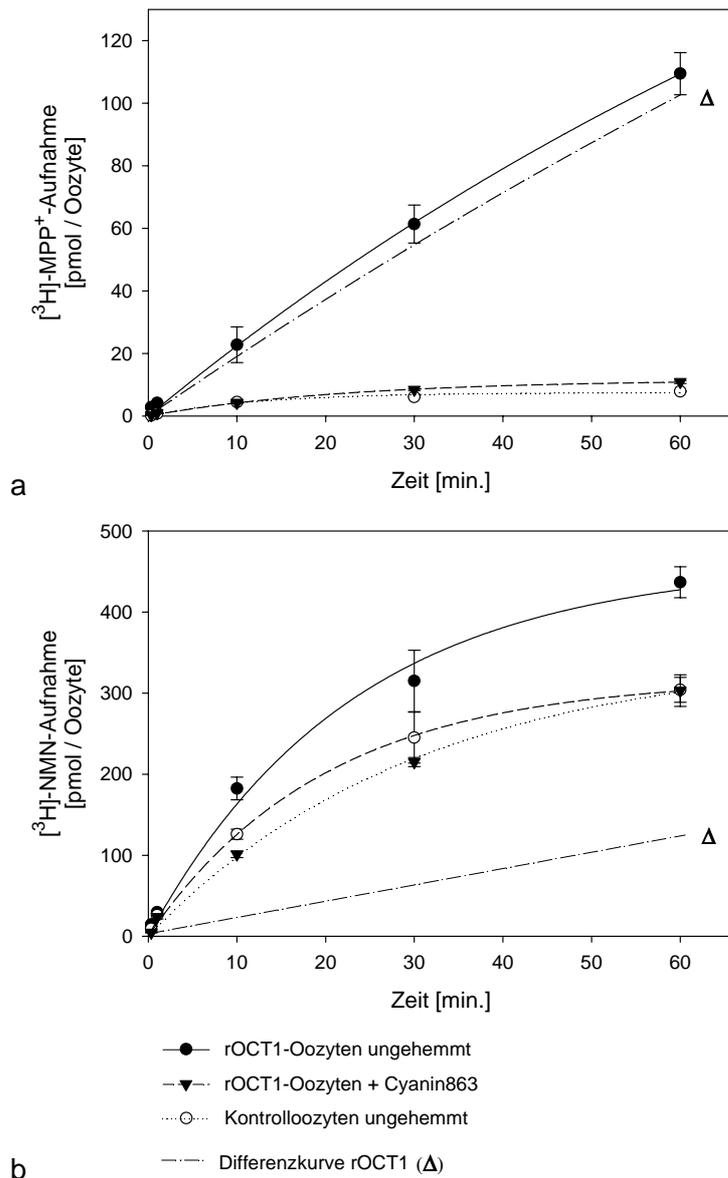


Abb. 7: Zeitkinetiken von rOCT1 für MPP (a) und NMN (b). Aufgetragen sind gegen die Aufnahmedauer die Mediane \pm S.E.M. der Aufnahme von [³H]-MPP (bei 160 μ M) bzw. [³H]-NMN (bei 6 mM) in cholinsubstituierte, rOCT1-exprimierende Oozyten, jeweils ungehemmt und unter 37 μ M Cyanin863, sowie in wasserinjizierte Kontrolloozyten (jew. n = 8). Es erfolgte jeweils eine Anpassung an eine monoexponentielle Funktion sowie die Errechnung einer Differenzkurve der streng rOCT1-spezifischen Aufnahme (Δ). Der jeweilige rOCT1-spezifische Transport ist über mindestens 60 min als linear anzusehen.

der Standardfehler der Anpassung berechnet. Hierbei fanden sich (in absteigender Substrataffinität) als K_M für MPP $9,60 \pm 1,51 \mu\text{M}$, für Dopamin $51,0 \pm 14,6 \mu\text{M}$, für NMN $403 \pm 150 \mu\text{M}$, für Histamin $544 \pm 136 \mu\text{M}$ und für Cholin $620 \pm 139 \mu\text{M}$ (siehe Tabelle 4). Repräsentativ hierfür sind die Transportkinetiken für MPP und Dopamin abgebildet (Abbildungen 8 und 9).

Um die relative Transportkapazität von rOCT1 für die einzelnen Substrate zu vergleichen, wurde in einem Parallelversuch die Maximaltransportgeschwindigkeit für diese Substrate an der gleichen Oozytencharge bei der jeweils aus der Substratkinetik abgelesenen Sättigungskonzentration gemessen. Auch hier wurde jeweils der cyaninhemmbare Anteil der Aufnahme über 60 min in 8 – 10 cholinsubstituierte Oozyten berechnet. Hierbei ergaben sich (in absteigender Transportkapazität) als V_{max} für NMN $916 \pm 47 \text{ pmol/h}$ (6 mM), für Cholin $819 \pm 39 \text{ pmol/h}$ (10 mM), für TEA $679 \pm 93 \text{ pmol/h}$ (1 mM), für Histamin $542 \pm 39 \text{ pmol/h}$ (1 mM), für MPP $407 \pm 37 \text{ pmol/h}$ (160 μM) und für Dopamin $161 \pm 10 \text{ pmol/h}$ (500 μM). Siehe hierzu auch Tabelle 1. Bei einzelnen Konzentrationsstufen wurde rOCT1 auf Transport (im Influx-Paradigma) von verschiedenen weiteren pharmakologisch und physiologisch interessanten Modells substraten getestet. Hierbei fand sich ein geringer aber statistisch signifikanter, rOCT1-spezifischer und cyaninhemmbarer Transport des Dipeptids D-Phe-Ala bei 0,27 μM . Die Aufnahmeraten betragen $0,152 \pm 0,017 \text{ pmol/h}$ ungehemmt und $0,127 \pm 0,016 \text{ pmol/h}$ unter Cyanin 863 ($p < 0,05$) bzw. $0,127 \pm 0,042 \text{ pmol/h}$ in wasserinjizierte Kontrolloozyten ($p < 0,02$). Kein rOCT1-spezifischer oder cyaninhemmbarer Transport wurde gefunden für Chinidin (14 μM), Corticosteron (10 μM), Ifosfamid (1 mM), Glucosyl-Isophosphoramidmustard (GIPM, 150 μM , siehe hierzu POHL J. et al., 1995), N-(4,4-azo-n-pentyl)-21-deoxy-[21- ^3H]-ajmalinium (N-APDA, 0,35 μM), Lidocain (18 μM , weder bei pH 6,5 noch bei pH 8,5 wobei der Anteil an nichtionisiertem Lidocain 5,2-fach höher ist) und Propranolol (0,13 μM).

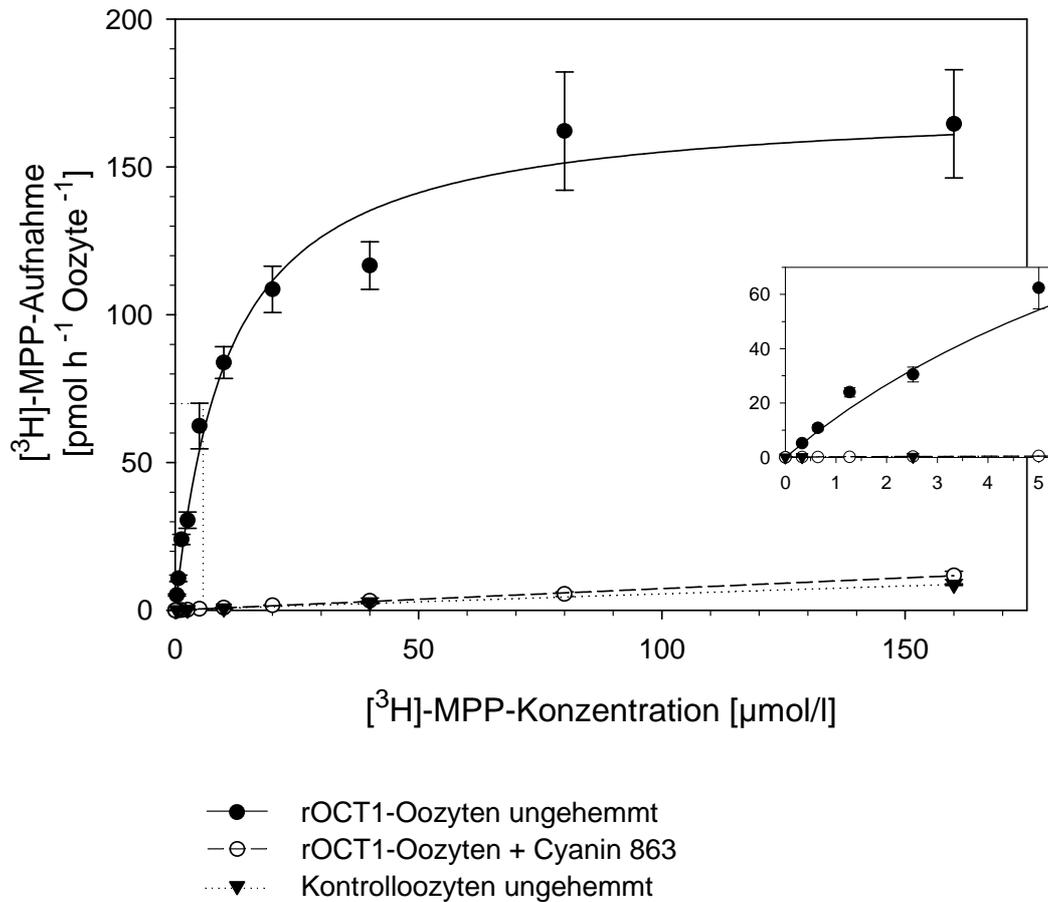


Abb. 8: Konzentrationsabhängigkeit des MPP-Transports durch rOCT1. Aufgetragen sind die Mediane \pm S.E.M. der $[^3\text{H}]\text{-MPP}$ -Aufnahme (60 min) in rOCT1-exprimierende, cholinsubstituierte Oozyten, jeweils ungehemmt und unter $37 \mu\text{M}$ Cyanin863, sowie in wasserinjizierte Kontrolloozyten (jew. $n = 7 - 10$). Die MICHAELIS-MENTEN-Gleichung wurde an die ungehemmte Aufnahme angepaßt, die Hemmung und die Wasserkontrolle wurden einer linearen Regression unterworfen. Das Fitting ergab für die differenzielle (siehe Methodik), rOCT1-spezifische MPP-Aufnahme einen K_M von $9,6 \pm 1,5 \mu\text{M}$. Das Inset zeigt einen vergrößerten Ausschnitt aus dem unteren Konzentrationsbereich (gestrichelter Rahmen).

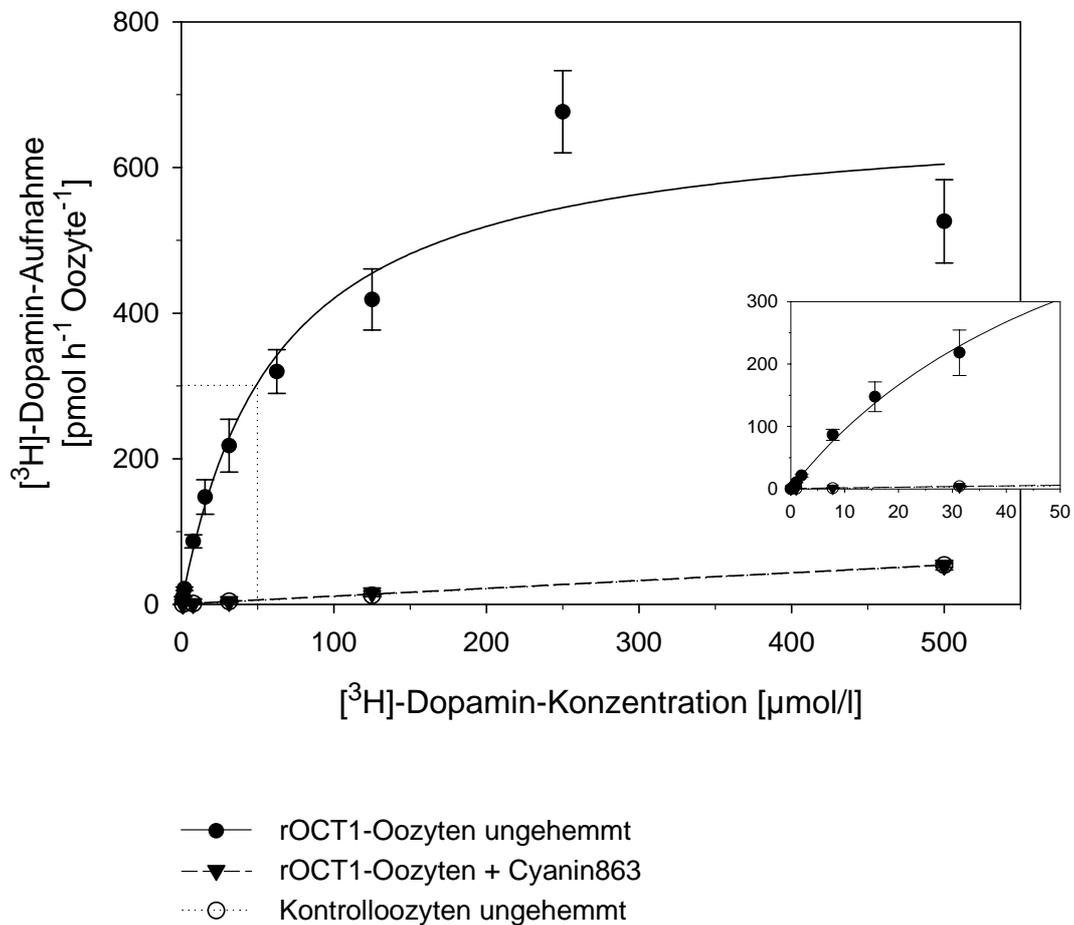


Abb. 9: Konzentrationsabhängigkeit des Dopamin-Transports durch rOCT1.. Aufgetragen sind die Mediane \pm S.E.M. der $[^3\text{H}]$ -Dopamin-Aufnahme (60 min) in rOCT1-exprimierende, cholinsubstituierte Oozyten, jeweils ungehemmt und unter $37 \mu\text{M}$ Cyanin863, sowie in wasserinjizierte Kontrolloozyten (jew. $n = 8$). Die MICHAELIS-MENTEN-Gleichung wurde an die ungehemmte Aufnahme angepaßt, die Hemmung und die Wasserkontrolle wurden der linearen Regression unterworfen. Das Fitting ergab für die differenzielle, rOCT1-spezifische Dopamin-Aufnahme einen K_M -Wert von $51,0 \pm 14,6 \mu\text{M}$. Das Inset zeigt einen vergrößerten Ausschnitt aus dem unteren Konzentrationsbereich (gestrichelter Rahmen).

Substrat	Konzentration	rOCT1 $V_{\max.}$ [pmol/h] \pm S.E.M.
TEA	1 mM	679 \pm 93
MPP	160 μ M	407 \pm 37
Dopamin	500 μ M	161 \pm 10
Histamin	1 mM	544 \pm 39
Cholin	10 mM	819 \pm 39
NMN	6 mM	916 \pm 47

Tab. 1: Abgleich der maximalen Transportgeschwindigkeiten von rOCT1 für verschiedene Transportsubstrate ($V_{\max.}$). Angegeben ist jeweils der cyaninhemmbar Anteil der Traceraufnahme bei den genannten Sättigungskonzentration über 60 min. Alle Werte wurden innerhalb einer Oozytencharge bestimmt.

Sonderfall Chinin

Für Chinin konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals eine über 60 min lineare, rOCT1-spezifische und cyaninhemmbar Aufnahme in Oozyten bei 0,3 μM gezeigt werden. Die Aufnahmerate betrug hierbei ungehemmt 1301 ± 65 pmol/h gegenüber 665 ± 33 pmol/h unter Cyanin 863 sowie 539 ± 40 pmol/h in wasserinjizierte Kontrolloozyten. Angesichts der hohen unspezifischen Aufnahme der Kontrolloozyten konnte jedoch nicht sicher unterschieden werden, ob es sich um einen echten Transport ins Zellinnere oder nur um eine äußere Bindung an die Oozytenmembran handelt, welche durch Expression des Chinin bindenden (oder eben mutmaßlich transportierenden) OCT-Proteins erhöht ist. Zur Differenzierung zwischen Transport und Bindung eignen sich sehr gut Abwaschversuche. Hierbei wird nach 30-minütiger Inkubation mit dem fraglichen Tracersubstrat eine 60-minütige Nachinkubation mit dem gleichen Substrat angeschlossen, welches hierbei unmarkiert und im Überschuß eingesetzt wird. Ein oberflächlich an Membran und Membranproteine gebundenes Substrat wird sich hierbei mit dem von außen im Überschuß zugegebenen nicht radioaktiven Substrat ins Diffusionsgleichgewicht setzen (bzw. letzteres kompetiert mit dem gebundenem Tracer) und somit von den Bindungsstellen abdiffundieren. Bei membranärer Bindung würde sich somit der Tracergehalt der Oozyte durch die Nachinkubation verringern. Bei einem Transport des Tracers nach intrazellulär ist eine solcher Abwaschvorgang nicht möglich. Deshalb wurde für rOCT1 wurde ein Abwaschversuch mit Chinin durchgeführt. Durch eine Nachinkubation mit 100 μM unmarkiertem Chinin nach Ende der Aufnahmephase von Tracer-Chinin (0,3 μM) konnte die Menge gebundenen oder aufgenommenen Tracers nicht reduziert werden. In einem Kontrollversuch konnte an wasserinjizierten Kontrolloozyten die unspezifische, membranäre MPP-Bindung durch Chinin-Nachinkubation verdrängt werden, während die rOCT1-vermittelte Aufnahme von MPP (14 μM) nicht durch Chinin-Nachinkubation ausgewaschen werden konnte. Insgesamt entspricht diese Konstellation entweder einer rOCT1-vermittelten Translokation von Chinin nach intrazellulär oder zumindest einer rOCT1-abhängigen Kompartimentierung des hydrophoben Chinins. Eine reine oberflächliche Bindung an das membrangebundene Transportprotein erscheint

demgegenüber eher unwahrscheinlich, da nach 60 min Inkubation mit Tracer-Chinin immer noch keine Sättigung erzielt werden konnte. Bei Annahme einer Proteinbindung wäre angesichts der aus den Hemmversuchen bekannten hohen Affinität von Chinin eine schnelle Absättigung aller rOCT1-Bindungsstellen zu erwarten, während nur die hohe Aufnahmekapazität der großvolumigen Oozyte eine lineare Zunahme über 60 min ermöglicht, sofern der Tracer nach intrazellulär transportiert wird.

3.1.2 *cis*-Hemmung

Ein Charakteristikum von rOCT1 ist seine Polyspezifität. Diese erstreckt sich nicht nur auf das Spektrum der Transportsubstrate sondern auch auf das der Hemmstoffe. In Ergänzung zu GRÜNDEMANN 1994 wurden nun unter optimierten Versuchsbedingungen die Hemmkonstanten für weitere organische Kationen bestimmt. Hierbei wurde die Hemmung der 60-minütigen Aufnahme von TEA in Oozyten gemessen, wobei die TEA-Konzentration im Bereich des K_M -Wertes gehalten wurde und die Hemmstoffkonzentration in 9 Stufen variiert wurde. Transportsubstrat und Hemmstoff wurden in die Badlösung zugegeben, sodaß beide Substrate am Transportprotein von der gleichen Seite (außen) angreifen. Somit wurde die *cis*-Hemmung bestimmt. Ein Problem bei der Hemmung von OCT von außen ergibt sich wiederum aus seiner Polyspezifität. Die mutmaßlichen Hemmstoffe sind sehr heterogen hinsichtlich Hydro- bzw. Lipophilität. Somit könnte z.B. ein sehr lipophiles Substrat sich sehr schnell in der Membran anreichern und in einer relativ hohen intramembranären Konzentration am OCT-Protein angreifen. Demgegenüber bräuchte ein hydrophileres Substrat längere Zeit für eine entsprechende Membrananreicherung und würde somit initial in einer relativ geringeren Konzentration am OCT-Protein angreifen. Ebenso würde das lipophilere Substrat wesentlich besser mit einem von der gleichen Seite (*cis*) zugegebenen Transportsubstrat kompetieren können. In einem solchen Fall würde das lipophile

Substrat eine scheinbar höhere Affinität (einen geringeren K_i) gegenüber OCT zeigen als das hydrophile. Um solche schwerwiegenden Sekundäreffekte zu vermeiden, erfolgte eine Vorinkubation der Oozyten mit dem Hemmstoff stets für mindestens 14 min vor Zugabe des Tracersubstrates, wodurch eine Äquilibration von Membran und Badlösung gewährleistet wird. Hierdurch entstehen vergleichbare Konzentrationsbedingungen für lipophile wie hydrophile Substrate und lediglich die Dissoziationskonstante der jeweiligen Substanz bezüglich OCT ist limitierend für Hemmwirkung auf den OCT-vermittelten Transport.

Die Berechnung der Hemmkonstanten erfolgte nach nichtlinearer Anpassung der relativen Aufnahmewerte (in Bruchteilen der ungehemmten Aufnahme) an eine monoexponentielle Gleichung, woraus die IC_{50} bestimmt wurde. Hierbei ergaben sich für d-Tubocurarin eine IC_{50} von $72,6 \pm 19,4 \mu\text{M}$, für 3-O-Methylisoprenalin eine IC_{50} von $73,3 \pm 20,8 \mu\text{M}$, für Pancuronium eine IC_{50} von $1710 \pm 390 \mu\text{M}$ und für Cyanin863 eine IC_{50} von $0,85 \pm 0,29 \mu\text{M}$. Da für Cyanin863 bereits die nicht-kompetitive Hemmung gezeigt worden war [TEUBER I., 2002 (Diss.)], ist es hier auch zulässig, nach Anpassung an das nicht-kompetitive Inhibitormodell einen K_i von $0,72 \pm 0,18$ zu berechnen (siehe Tabelle 2). Exemplarisch sind in Abbildung 10 die Hemmkinetiken für d-Tubocurarin und für 3-O-Methylisoprenalin dargestellt. In Einzelversuchen konnte darüberhinaus eine leichte aber signifikante Hemmung des rOCT1-vermittelten Transports für Taurocholat nachgewiesen werden. Hierbei senkte 100 μM Taurocholat die MPP-Aufnahme (14 μM) auf 60,2% des Ausgangswertes (Aufnahmeraten $118 \pm 7 \text{ pmol/h}$ bzw. $71 \pm 9 \text{ pmol/h}$, $p=0,0053$). Keine eindeutige hemmende Wirkung konnte für Spermin (100 μM auf 14 μM MPP) und Paraquat (120 μM auf 14 μM MPP und 100 μM TEA) gefunden werden.

Hemmstoff	Hemmung des TEA-Transportes via rOCT1 Dissoziationskonstante [$\mu\text{mol/l} \pm \text{S.E.}$]		
	IC_{50}	$K_{i \text{ nc}}$	$K_{i \text{ c}}$
d-Tubocurarin	$72,6 \pm 19,4$	$55,3 \pm 10,5$	$27,8 \pm 5,3$
3-OMI	$73,3 \pm 20,8$	$70,0 \pm 7,1$	$35,0 \pm 3,6$
Pancuronium	1710 ± 394	2110 ± 637	1055 ± 318
Cyanin863	$0,85 \pm 0,29$	$0,72 \pm 0,18$	-

Tab. 2: Hemmkonstanten von rOCT1 für verschiedene organische Kationen, deren Inhibitionsmechanismus auf rOCT1 noch nicht aufgeklärt ist (allosterisch / kompetitiv), sowie für Cyanin863 bezüglich der rOCT1-vermittelten Aufnahme von TEA (95 μM). Je nach zugrundegelegtem Inhibitionsmodell liefert die nichtlineare Anpassung der Hemmkinetik unterschiedliche Ergebnisse. Dargestellt sind die halbmaximale Hemmkonstante IC_{50} bei monoexponentieller Anpassung, jeweils der K_i für das nicht-kompetitive Modell ($K_{i \text{ nc}}$) und das kompetitive Modell ($K_{i \text{ c}}$). Für Cyanin863 wurde keine Anpassung an das kompetitive Modell durchgeführt, da für dieses bereits der nicht-kompetitive Hemmmechanismus gezeigt werden konnte [TEUBER I., 2002 (Diss.)]. Jede Kinetik wurde mit 9 Meßpunkten zu jeweils 7 - 10 Oozyten erstellt.

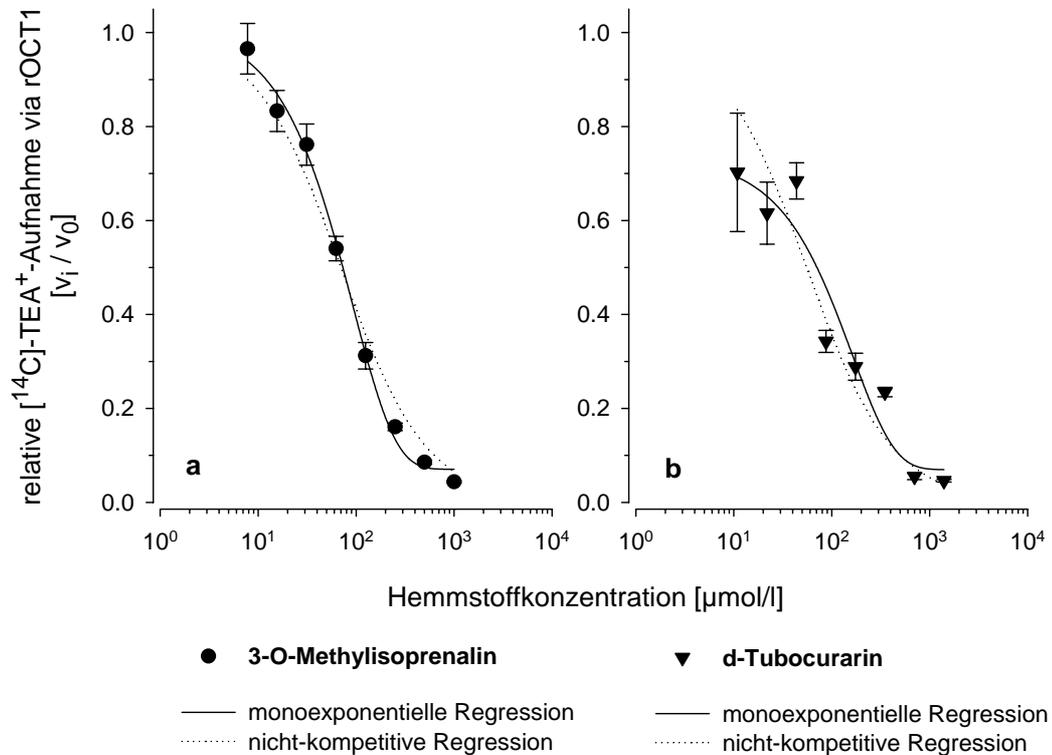


Abb. 10: Hemmung des TEA-Transportes via rOCT1 durch 3-O-Methylisoprenalin (a) und d-Tubocurarin (b). Mediane \pm S.E.M. der relativen Aufnahme von 95 μM $[^{14}\text{C}]\text{-TEA}$ in rOCT1-exprimierende Oozyten über 60 min (jeweils $n = 10$ bzw. 8). Die ungehemmte TEA-Aufnahme betrug 381,6 bzw. 148,7 pmol h^{-1} Oozyte $^{-1}$. Bei nichtlinearer Anpassung der Relativhemmwerte an eine monoexponentielle Funktion bzw. an das nicht-kompetitive Modell errechnet sich für 3-OMI eine IC_{50} von $73,3 \pm 6,8$ μM bzw. ein K_i von $70,0 \pm 7,1$ μM , für d-Tubocurarin eine IC_{50} von $72,6 \pm 19,4$ μM bzw. ein K_i von $55,3 \pm 10,5$ μM .

Amantadin und Dopamin

Da rOCT1 auch Dopamin transportiert, könnte ihm bei noch nachzuweisender Expression in Neuronen oder Gliazellen eine Bedeutung in der Rückresorption von Neurotransmittern zukommen. Amantadin wird zur Behandlung des Morbus Parkinson eingesetzt, welcher durch ein Unterangebot an Dopamin in verschiedenen cerebralen Kerngebieten gekennzeichnet ist und durch dopaminerge Medikation behandelbar ist. Daher erschien es interessant zu untersuchen, ob Amantadin den OCT-vermittelten Transport zu hemmen vermag. Durch einen solchen Mechanismus, welcher die Dopamin-Konzentration im synaptischen Spalt zu erhöhen vermag, könnte zumindest eine Wirkkomponente des diesbezüglich noch kontrovers diskutierten Amantadins erklärt werden. Tatsächlich ließ sich die Dopaminaufnahme in rOCT1-exprimierende Oozyten recht hochaffin mit einer IC_{50} von $25,2 \pm 5,0 \mu\text{M}$ hemmen (siehe Abbildung 17).

3.1.3 *trans*- Effekte

Bislang war für rOCT1 ebenfalls noch nicht gezeigt worden, über welchen Mechanismus der Substrattransport erfolgt. Aus funktionellen Untersuchungen an perfundierten Tubuli war bekannt, dass der basolaterale TEA-Transport im Sinne eines potentialabhängigen, nicht H^+ - oder Na^+ -gekoppelten und nicht primär aktiven Transportmechanismus erfolgt. Für rOCT1 war zu diesem Zeitpunkt jedoch die subzelluläre Lokalisation noch nicht geklärt. Weiterhin war nicht bekannt, ob rOCT1 als Uniporter einzustufen ist, d.h. unter *trans-zero*-Bedingung transportiert, und ob rOCT1 *trans*-stimulierbar ist. Mit konventionellen Influx-Experimenten an *Xenopus*-Oozyten war diese Fragestellung jedoch nicht zu lösen, da hierbei die Substratverhältnisse auf der *trans*-Seite der Oozytenmembran nicht kontrollierbar sind. Aus diesem Grund wurden Efflux-Versuche mit Oozyten durchgeführt, die zum

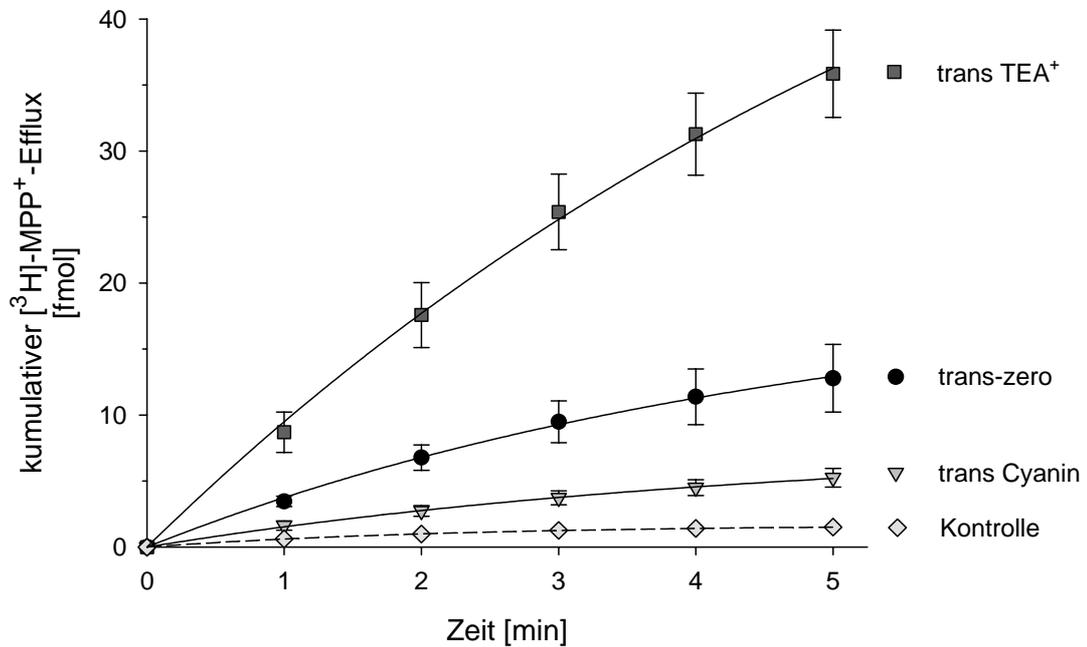


Abb. 11: *trans*-Stimulation des MPP-Effluxes via rOCT1. Dargestellt ist der rOCT1-vermittelte Transport von MPP unter *trans-zero*-Bedingung, unter *trans*-Stimulation durch TEA (1,6 mM) und unter *trans*-Hemmung durch Cyanin 863 (41 μ M). Mittelwerte \pm S.E.M. (jeweils $n = 4$) des kumulativen [³H]-MPP-Effluxes aus mit 120 fmol MPP vorinjizierten und cholinsubstituierten Oozyten. Der Efflux aus wasserinjizierten Kontrollozyten (*trans*-TEA) ist als gestrichelte Linie orientierend dargestellt.

Bedingung	rOCT1	H ₂ O	p	Signifikanz
<i>trans-zero</i>	4,59 ± 0,60	1,48 ± 0,17	0,0108	**
<i>trans-MPP</i>	9,80 ± 0,69	1,20 ± 0,41	0,0001	***
<i>trans-TEA</i>	10,88 ± 1,79	0,76 ± 0,05	0,0108	**
<i>trans-Cyanin</i>	1,97 ± 0,34	0,87 ± 0,08	0,0439	*

t-Test :

Bedingung	verglichen mit	p	Signifikanz
rOCT1 <i>trans-zero</i>	rOCT1 <i>trans-MPP</i>	0,0013	**
rOCT1 <i>trans-zero</i>	rOCT1 <i>trans-TEA</i>	0,0327	*
rOCT1 <i>trans-zero</i>	rOCT1 <i>trans-Cyanin</i>	0,0141	**
rOCT1 <i>trans-MPP</i>	rOCT1 <i>trans-TEA</i>	0,6036	n.s.

Tab. 3: Abhängigkeit der Geschwindigkeit des rOCT1-vermittelten MPP-Transports vom *trans*-Substrat. Initiale Raten des MPP-Effluxes aus rOCT1-exprimierenden und wasserinjizierten, cholionsubstituierten Oozyten (aus Abbildung 11). Die *cis*-Konzentration von [³H]-MPP betrug 240 nM, die *trans*-Konzentrationen von MPP 164 µM, TEA 1,64 mM, Cyanin863 41 µM. Die initialen Raten wurden aus den Efflux-Kennlinien jeder einzelnen Oozyte errechnet und mittels t-Test miteinander verglichen.

Zeitpunkt $t=0$ mit Tracersubstrat vorinjiziert wurden. Gemessen wurde der *pre-steady-state*-Auswärtstransport von Tracer in die Badlösung in Ab- oder Anwesenheit von Transportsubstraten auf der *trans*-Seite (außerhalb der Oozyte).

Mit [^3H]-MPP Tracersubstrat (120 fmol/Oozyte, 370 Bq/Oozyte) injizierte rOCT1-exprimierende Oozyten zeigten in einer Badlösung aus ORi ohne transportables Substrat (*trans-zero*-Bedingung, siehe Abbildung 11) einen signifikanten, über fünf Minuten exponentiell sich einer Sättigung nähernden Efflux von MPP mit einer initialen Transportrate von $4,59 \pm 0,60$ fmol/min ([^3H]-MPP via rOCT1 *trans-zero*, $n=4$). Wasserinjizierte Kontrolloozyten dagegen zeigten einen endogenen, möglicherweise leckbedingten, nach drei Minuten jedoch nicht mehr wesentlich zunehmenden Tracer-Efflux mit einer initialen Rate von $1,48 \pm 0,17$ fmol/min. Die initiale Rate des rOCT1-vermittelten [^3H]-MPP-Effluxes unterscheidet sich signifikant von diesem Leck-Efflux ($p<0,02$) und ist signifikant hemmbar durch Zugabe von Cyanin 863 in der Badlösung (*trans* 41 μM). Hierbei findet sich eine initiale Rate von $1,97 \pm 0,34$ fmol/min ([^3H]-MPP via rOCT1 *trans*-Cyanin 863, $n=4$, $p<0,02$). Diese wiederum unterscheidet sich noch signifikant von dem entsprechenden Leck-Efflux aus Kontrolloozyten (initiale Rate $0,87 \pm 0,08$ fmol/min, $p<0,05$). Dies lässt sich erklären durch eine nicht vollständige Hemmung des rOCT1-vermittelten Transportes durch von der *trans*-Seite zugegebenes Cyanin 863 bei 41 μM . Zusammenfassend findet sich unter *trans-zero*-Bedingung ein rOCT1-spezifischer, cyaninhemmbarer Transport (Efflux) von MPP (vergleiche hierzu auch Abbildung 11 und Tabelle 3). Somit vermag rOCT1 als Uniporter zu funktionieren und ist definitiv nicht als obligater Austauscher an ein auch endogen in *Xenopus*-Oozyten vorhandenes Substrat wie z.B. Cholin gekoppelt.

Darüberhinaus fanden sich in Anwesenheit sättigender Konzentrationen von MPP (164 μM) und TEA (1,64 mM) in der Badlösung (*trans*) signifikant gesteigerte [^3H]-MPP-Effluxes, die sich ebenfalls in exponentieller Weise einer Sättigung nähern und initiale Raten (siehe Tabelle 3) von $9,80 \pm 0,69$ bzw. $10,88 \pm 1,79$ fmol/min zeigen ($n=4$, $p<0,002$ bzw. $p<0,05$ gegenüber *trans-zero*). Wasserinjizierte

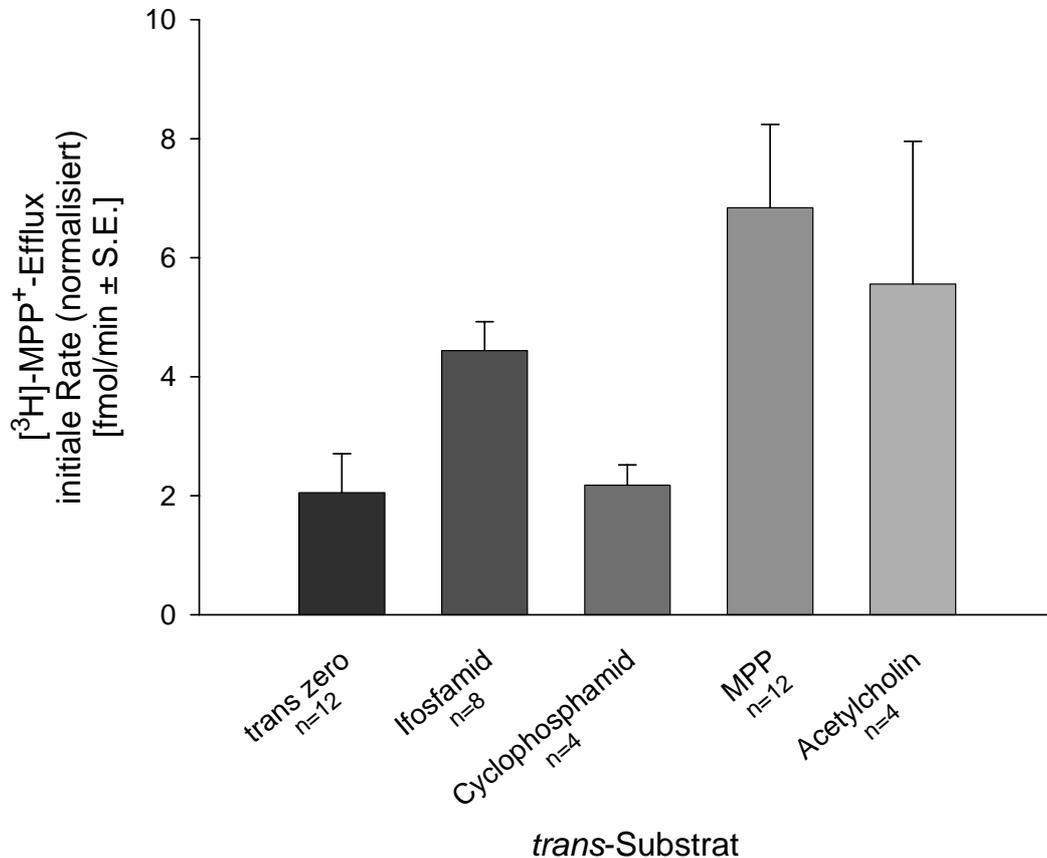


Abb. 12: *trans*-Stimulation des rOCT1-vermittelten MPP-Transports. Initiale Raten des MPP-Effluxes via rOCT1 nach *trans*-Zugabe von Ifosfamid (5 mM), Cyclophosphamid (4mM), MPP (200 μ M) und Acetylcholin (500 μ M). Auf den Mittelwert der entsprechenden *trans-zero*-Raten normalisierte und um den endogenen Efflux korrigierte Mittelwerte \pm S.E.M. der initialen Raten des kumulativen [3 H]-MPP-Effluxes aus mit 120 fmol MPP vorinjizierten und cholinsubstituierten Oozyten. Bemerkenswert ist, dass neben MPP und Acetylcholin auch das neutrale Zytostatikum Ifosfamid im Gegensatz zu Cyclophosphamid zu einer reproduzierbaren *trans*-Stimulation des MPP-Transports führt.

Kontrolloozyten zeigten dagegen keine Steigerung des endogenen [³H]-MPP-Leck-Effluxes durch *trans*-MPP oder -TEA (vergleiche hierzu Abbildung 9). Die stimulierenden Konzentrationen von MPP und TEA lagen beide 17-fach über dem jeweiligen K_M . Der Grad der jeweils erzielten *trans*-Stimulation war dementsprechend nicht signifikant voneinander verschieden. Zusammengefasst findet sich eine signifikante *trans*-Stimulation des rOCT1-vermittelten Transportes durch sättigende Konzentrationen transportabler Substrate, sodaß eine Klassifikation von rOCT1 als Uniporter erwiesen ist. Lediglich Effekte eines eventuell leicht veränderten Membranpotentials auf den Substrattransport können methodenbedingt nicht ausgeschlossen werden, was auch nicht Bestandteil der Zielsetzungen dieser Arbeit war sondern weiterführenden Studien übertragen wurde.

Neben MPP und TEA war auch das neutrale Zytostatikum Ifosfamid (bei 5 mM) in der Lage, den [³H]-MPP-Efflux zu *trans*-stimulieren (siehe Abbildung 12). Die entsprechende initiale Rate berechnete sich auf $6,11 \pm 0,38$ fmol/min ([³H]-MPP via rOCT1 *trans* Ifosfamid, n=4) gegenüber $3,46 \pm 0,47$ fmol/min unter *trans-zero* Bedingung (n=4, $p < 0,01$). Der unspezifische Leck-Efflux wasserinjizierter Kontrolloozyten war demgegenüber nicht stimulierbar durch Ifosfamid (initiale Raten $1,99 \pm 0,04$ bzw. $1,54 \pm 0,08$ fmol/min). Da Ifosfamid keine dissoziierbare Gruppe besitzt, ist es ungeladen und kann somit keinen direkten Effekt auf das Membranpotential ausüben. Hiermit wird zugleich gezeigt, dass das Phänomen der *trans*-Stimulation nicht durch eine direkte Änderung des Membranpotentials durch Substratsuperfusion erzeugt wird. Andererseits kann aus diesem Befund geschlossen werden, dass zu den potentiellen Transportsubstraten von rOCT1 auch neutrale Substanzen gehören.

Im gleichen Versuch fand sich eine erwartungsgemäße *trans*-Stimulation durch 200 μ M MPP auf $13,54 \pm 1,42$ fmol/min (mit n=3 und $p < 0,02$). Demgegenüber war keine *trans*-Stimulation durch Cyclophosphamid (4 mM) zu beobachten. Die initialen Effluxraten betragen hierbei für rOCT1 *trans-zero* $3,24 \pm 1,08$ fmol/min, für rOCT1 *trans*-Cyclophosphamid $3,13 \pm 0,48$ fmol/min, für die entsprechenden Kontrollen wasserinjizierter Oozyten $1,84 \pm 0,48$ bzw. $1,65 \pm 0,04$ fmol/min. Bei

trans-Stimulation durch Acetylcholin (500 μ M, siehe Abbildung 12) zeigte sich der Zeitverlauf des kumulativen [3 H]-MPP-Effluxes via rOCT1 über 5 min signifikant verschieden gegenüber dem *trans-zero*-Efflux und der *trans*-Stimulation durch 200 μ M MPP (ANOVA Multivariat-Analyse für wiederholte Messungen: $p < 0,05$). Nach Berechnung der initialen Raten konnte im t-Test die entsprechende Nullhypothese jedoch nicht verworfen werden, sodaß eine *trans*-Stimulation durch Acetylcholin zwar vermutet, jedoch nicht statistisch bewiesen werden konnte. Hieraus ist zu schließen, dass der Effekt der *trans*-Stimulation hochspezifisch bezüglich der chemischen Substratstruktur ist: Ifosfamid *trans*-stimuliert, während das strukturverwandte Cyclophosphamid dies nicht tut.

Um den Effekt der *trans*-Stimulation zu quantifizieren und in enzymkinetischer Hinsicht mit den entsprechenden *cis*-Verhältnissen zu vergleichen, wurden *trans*-Kinetiken angefertigt. In diesen konnte die Konzentrations-abhängigkeit des Stimulationseffektes nachgewiesen werden und jeweils eine dem K_M vergleichbare Stimmulationskonstante K_S berechnet werden. Hierzu wurden für die einzelnen *trans*-MPP-Konzentrationsstufen die jeweiligen initialen Effluxraten der gemittelten zeitabhängigen Effluxkurven jeweils einer Oozytencharge ($n = 4 - 5$) berechnet. Diese wurden in Abhängigkeit von der *trans*-MPP-Konzentration aufgetragen, um die jeweilige Effluxrate der wasserinjizierten Kontrolloozyten korrigiert und an das Michaelis-Menten-Modell angepasst. Aus dem automatischen *Curve-Fitting* (Biosoft Fig.P Version 6.0) konnten die entsprechenden Stimmulationskonstanten K_S mit Standardfehler berechnet werden. Auf diese Weise ergab sich für die *trans*-Stimulation des [3 H]-MPP-Effluxes via rOCT1 durch MPP eine Stimmulationskonstante $K_S = 12,4 \pm 7,2 \mu$ M. (vergleiche hierzu Kapitel 3.4.1 und Abbildung 21). Das bedeutet konkret, dass eine *trans*-Substratkonzentration von 12,4 μ M MPP den gegenläufigen Substrattransport (von MPP) von *cis* nach *trans* gegenüber der *trans-zero*-Bedingung verdoppelt.

Bei Zugabe sättigender Konzentrationen von Chinidin (40 μ M), Chinin (40 μ M), d-Tubocurarin (1,4 mM), Tetrapentylammonium (40 μ M), Cyanin 863 (40 μ M) und Decynium 22 (250 μ M) in der Badlösung (*trans*) konnte jeweils eine nahezu

vollständige Hemmung des [³H]-MPP-Effluxes beobachtet werden. Dieser Mechanismus wäre folglich als *trans*-Hemmung zu bezeichnen. Auch diese *trans*-Hemmung ist konzentrationsabhängig, wie im Kapitel 3.4.2 gezeigt wird. Zum Vergleich mit den Hemmkonstanten K_i der *cis*-Hemmung wurden *trans*-Kinetiken nach oben genanntem Verfahren durchgeführt und *trans*-Hemmkonstanten berechnet. Hierzu wurden der [³H]-MPP-Auswärtstransport von tracerinjizierten Oozyten nach Zugabe verschiedener Hemmstoffkonzentrationen in die Badlösung (*trans*) gemessen. Die aus den Efflux-Kennlinien der einzelnen Oozyten errechneten initialen Effluxraten wurden gegen die entsprechende Leckeffluxrate wasserinjizierter Kontrolloozyten korrigiert, mit der *trans-zero*-Rate in Relation gesetzt und die so erhaltenen Relativhemmwerte halblogarithmisch gegen die *trans*-Hemmstoffkonzentration aufgetragen. Die Kurven wurden an das nicht-kompetitive Inhibitionsmodell angepasst und *trans*- K_i -Werte errechnet. Die entsprechenden Werte für Decynium22, Cyanin863, Tetrapentylammonium und Chinin sind der Tabelle 8 zu entnehmen. Insbesondere für Chinin und Cyanin863 ergeben sich im direkten Vergleich deutliche Unterschiede zwischen *cis*- und *trans*-Hemmung, was später zu diskutieren sein wird. Repräsentativ ist in Abbildung 13 die *trans*-Hemmkinetik für Cyanin863 aufgetragen.

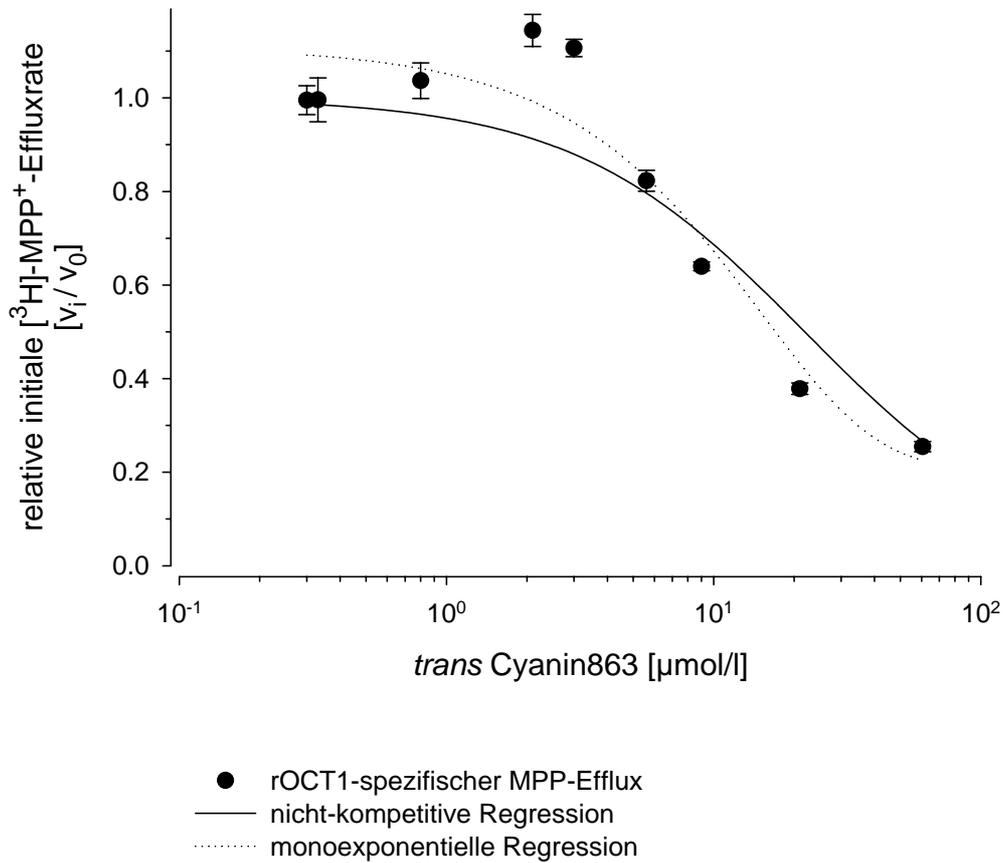


Abb. 13: Konzentrationsabhängigkeit der *trans*-Hemmung des MPP-Effluxes via rOCT1 durch Cyanin863. Die Mittelwerte \pm S.E.M. der initialen Raten des kumulativen $[^3\text{H}]$ -MPP-Effluxes aus mit 120 fmol $[^3\text{H}]$ -MPP vorinjizierten, cholinsubstituierten Oozyten (jeweils $n = 4$ bzw. 8, siehe Kapitel Methodik) wurden um die endogene Effluxrate bereinigt und mit der *trans-zero*-Rate in Relation gesetzt. Bei Anpassung an das nicht kompetitive Modell errechnet sich ein $K_{i \text{ trans}}$ für Cyanin863 von $21,9 \pm 6,5$ μM . Zum Vergleich beträgt die aus monoexponentieller Anpassung errechnete IC_{50} $16,2 \pm 6,1$ μM . Die mittlere rOCT1-spezifische *trans-zero*-Rate betrug $2,35 \pm 0,05$ fmol/min.

3.2 Spezifitäten der Transportkinetik von hOCT2

Ausgehend von rOCT1 konnten mit entsprechend abgeleiteten Primern cDNA-Bibliotheken aus humanen Geweben gescreent werden. Auf diese Weise wurde 1997 aus der Niere das erste humane Homolog von rOCT1 kloniert [GORBOULEV et al., 1997]. Aufgrund seiner größeren Homologie zum Rattenhomolog rOCT2 wurde dieses Konstrukt hOCT2 genannt. Nach mittlerweile vorliegenden Ergebnissen ist hOCT2 hauptsächlich in Niere und Leber lokalisiert. In der Folge sollte nun hOCT2 im direkten Vergleich zu rOCT1 bezüglich seiner Transport- und Hemmcharakteristika untersucht werden.

3.2.1 Substrattransport

Analog zu rOCT1 wurden alle Transportmessungen mit hOCT2 an *Xenopus*-Oozyten durchgeführt, welche während der Kultur in ORi mit Cholin und Pyruvat substituiert wurden (PCG-ORi). Insbesondere hOCT2-Oozyten zeigten bei fehlender Substitution eine auffällig schlechtere Morphologie insbesondere hinsichtlich des Zellturgors. In normalem Gentori (ohne Cholin und Pyruvat) kultivierte Oozyten waren für verlässliche Tracerfluxexperimente nicht verwendbar. Somit musste noch gezeigt werden, dass die durch Pyruvatsubstitution verhinderte hOCT2-vermittelte Verarmung an Energieträgern zu einer besseren Transportaktivität von PCG-ORi-kultivierten Oozyten beiträgt. Zunächst wurde die MPP- und TEA-Aufnahme in PCG-ORi-kultivierte Oozyten mit derselben in Gentori plus 1 mM Cholin kultivierter und somit energieverärmerter Oozyten verglichen. Hierbei zeigte sich für TEA eine 1,8-fach, für MPP eine 1,3-fach höhere Aufnahme in pyruvatsubstituierte

Substrat	rOCT1 K_M [$\mu\text{mol/l}$] \pm S.E.	hOCT2 K_M [$\mu\text{mol/l}$] \pm S.E.
TEA	95 ± 10 ³	$75,8 \pm 12,5$
MPP	$9,60 \pm 1,51$	$19,4 \pm 2,5$
Dopamin	$51,0 \pm 14,6$	373 ± 27
Histamin	544 ± 136	1310 ± 290
Cholin	620 ± 139	210 ± 45
NMN	403 ± 150	298 ± 62

Tab. 4: Vergleich der K_M -Werte von rOCT1 und hOCT2 für verschiedene organische Kationen. Ermittelt aus der nichtlinearen Anpassung der jeweiligen Substratkinetik (cyaninhemmbarer Anteil) an die MICHAELIS-MENTEN-Gleichung. Die eingesetzte Konzentration von Cyanin863 betrug für rOCT1 $37 \mu\text{M}$, für hOCT2 $75 \mu\text{M}$. Jede Kinetik wurde mit 10 Meßpunkten erstellt und pro Meßpunkt und Bedingung wurden 8 bis 10 Oozyten eingesetzt. Angegeben ist der Standardfehler der nichtlinearen Anpassung.

³ Wert übernommen aus GRÜNDEMANN D., 1994 (Diss.)

hOCT2-exprimierende Oozyten (203 gegenüber 112 pmol/h für MPP bzw. 92 gegenüber 71 pmol/h für TEA, jeweils OCT-spezifische, cyaninhemmbare Aufnahmewerte). Demgegenüber fand sich für rOCT1 kein wesentlicher Unterschied in den MPP- und TEA-Transportraten von PCG-ORi- und Cholin-Gentori-kultivierten Oozyten (112 gegenüber 115 bzw. 149 gegenüber 164 pmol/h OCT-spezifische, cyaninhemmbare MPP- bzw. TEA-Aufnahme).

Unter den so optimierten Versuchsbedingungen wie Cholin- und Pyruvatsubstitution wurden Substratkinetiken für den Einwärtstransport von MPP, TEA, NMN, Cholin, Acetylcholin, Dopamin und Histamin und durchgeführt. Hierzu wurde die Aufnahme der Tracer-Substrate in Oozyten der gleichen Charge über 60 min bei jeweils 10 verschiedenen Konzentrationen gemessen. Jeder Versuch wurde an 8 – 10 einzeln gemessenen Oozyten durchgeführt. Von der ungehemmten Aufnahme subtrahiert wurden die Aufnahmewerte unter Hemmung mit einer supramaximalen Hemmkonzentration von Cyanin 863 (75 μ M). Aus der Differenzkurve wurden nach nichtlinearer Anpassung an die MICHAELIS-MENTEN-Gleichung die K_M -Werte und der Standardfehler der Anpassung berechnet. Hierbei fanden sich (in absteigender Substrataffinität) als K_M für MPP $19,4 \pm 2,5$ μ M, für TEA $75,8 \pm 12,5$ μ M, für Cholin 210 ± 45 μ M, für NMN 298 ± 62 μ M, für Dopamin 373 ± 27 μ M und für Histamin 1310 ± 290 μ M. Diese Werte sind vergleichend mit rOCT1 in Tabelle 4 aufgetragen. Repräsentativ hierfür sind die Transportkinetiken für MPP und Dopamin abgebildet (Abbildungen 14 und 15).

Um die relative Transportkapazität von hOCT2 für die einzelnen Substrate untereinander und mit rOCT1 zu vergleichen, wurden in einem Parallelversuch die Maximaltransportgeschwindigkeiten für die vier wichtigsten Substrate sowohl für hOCT2 als auch für rOCT1 an der gleichen Oozytencharge bei der jeweils aus der Substratkinetik abgelesenen Sättigungskonzentration gemessen. Auch hier wurde jeweils der cyaninhemmbare Anteil der Aufnahme über 60 min in 8 – 10 Oozyten berechnet (Tabelle 5). Hierbei ergaben sich (in absteigender Transportkapazität für hOCT2) als V_{max} für MPP 206 ± 28 pmol/h (160 μ M), für TEA 611 ± 91 pmol/h

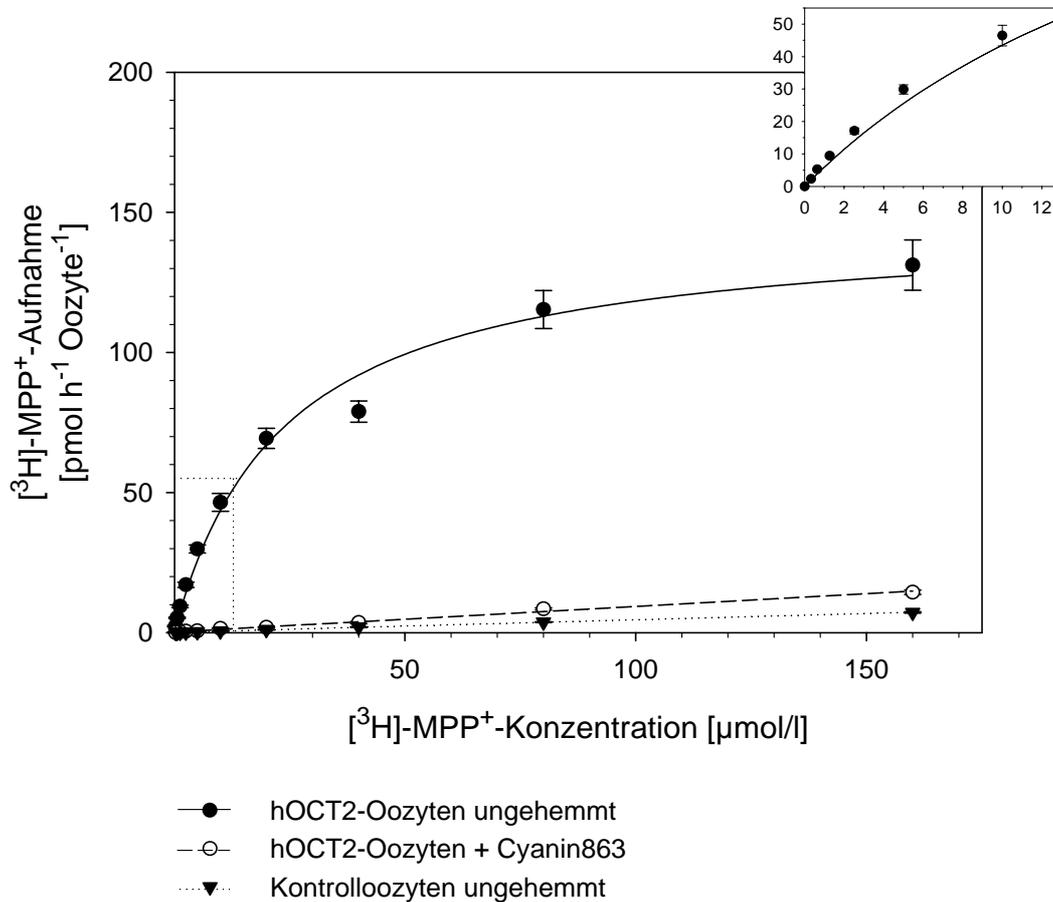


Abb. 14: Transportkinetik von hOCT2 für MPP. Aufgetragen sind die Mediane \pm S.E.M. der $[^3\text{H}]\text{-MPP}^+$ -Aufnahme (60 min) in hOCT2-exprimierende, cholinsubstituierte Oozyten, jeweils ungehemmt und unter $75 \mu\text{M}$ Cyanin863, sowie in wasserinjizierte Kontrolloozyten (jeweils $n = 7 - 10$). Die MICHAELIS-MENTEN-Gleichung wurde an die ungehemmte Aufnahme angepaßt, die Hemmung und die Wasserkontrolle wurden linear angepaßt. Zur Ermittlung der rOCT1-spezifischen Aufnahme wurde die Aufnahme unter Hemmung von der ungehemmten Aufnahme subtrahiert. Das Fitting ergab für diese differenzielle, rOCT1-spezifische MPP-Aufnahme einen K_M von $19,4 \pm 2,5 \mu\text{M}$. Das Inset zeigt eine Vergrößerung des Kurvenverlaufs (MPP ungehemmt) im unteren Konzentrationsbereich (gestrichelter Rahmen).

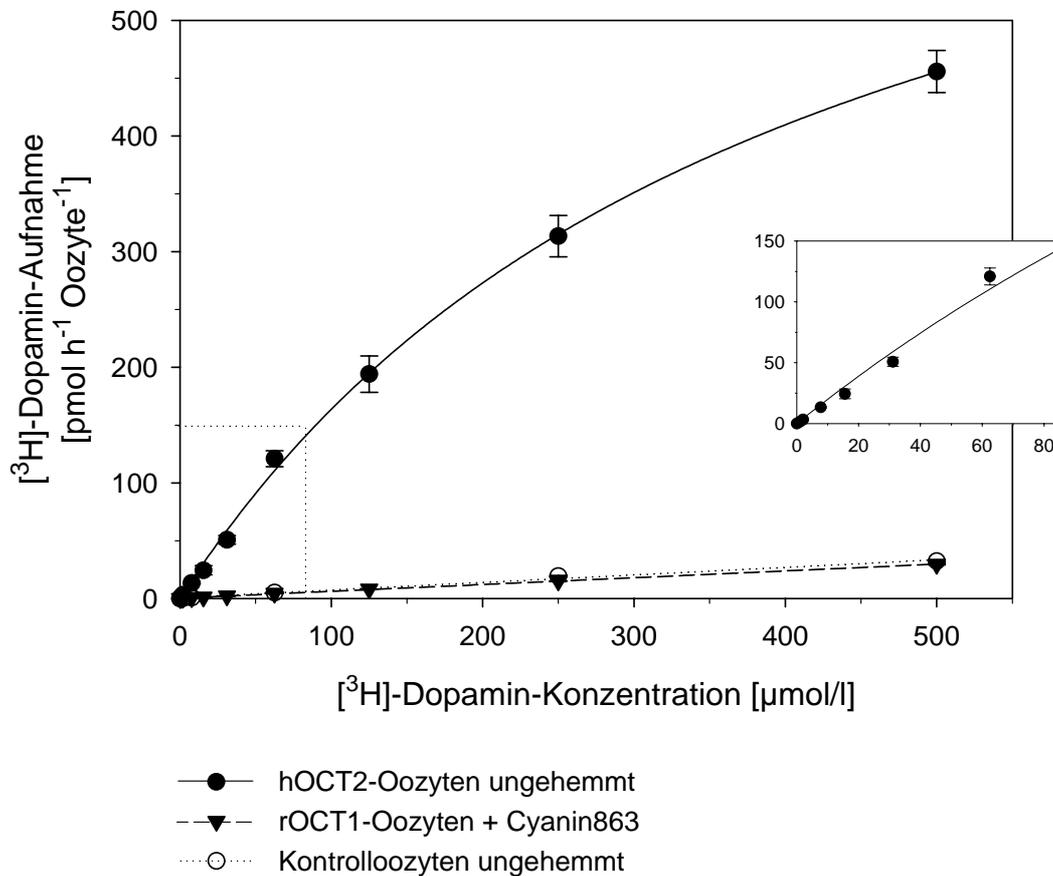


Abb. 15: Transportkinetik von hOCT2 für Dopamin. Aufgetragen sind die Mediane \pm S.E.M. der [³H]-Dopamin-Aufnahme (60 min) in hOCT2-exprimierende, cholinsubstituierte Oozyten, jeweils ungehemmt und unter 75 μ M Cyanin863, sowie in wasserinjizierte Kontrolloozyten (jew. n = 9 - 10). Die MICHAELIS-MENTEN-Gleichung wurde an die ungehemmte Aufnahme angepaßt, die Hemmung und die Wasserkontrolle wurden linear angepaßt. Zur Ermittlung der rOCT1-spezifischen Aufnahme wurde die Aufnahme unter Hemmung von der ungehemmten Aufnahme subtrahiert. Das Fitting ergab für diese differenzielle ungehemmte Dopamin-Aufnahme einen K_M -Wert von $373 \pm 27 \mu$ M. Das Inset zeigt eine Vergrößerung des Kurvenverlaufs (Dopamin ungehemmt) im unteren Konzentrationsbereich (gestrichelter Rahmen).

Substrat	Konzentration	rOCT1	hOCT2
		$V_{\max.}$ [pmol/h] \pm S.E.M.	$V_{\max.}$ [pmol/h] \pm S.E.M.
TEA	1 mM	282 \pm 68	611 \pm 91
MPP	160 μ M	184 \pm 64	206 \pm 28
Cholin	15 mM	565 \pm 283	1433 \pm 262
NMN	6 mM	444 \pm 194	1190 \pm 178

Tab. 5: Vergleich der maximalen Transportgeschwindigkeiten von rOCT1 und hOCT2 für verschiedene Transportsubstrate ($V_{\max.}$). Angegeben ist jeweils der cyaninhemmbare Anteil der Traceraufnahme bei den genannten Sättigungskonzentration über 60 min. Die Werte wurden an der gleichen Oozytencharge gemessen und sind untereinander somit direkt, mit den Werten des internen $V_{\max.}$ -Abgleichs für rOCT1 (Tabelle 1) nur indirekt vergleichbar, da dieser an einer anderen Oozytencharge erfolgte.

(1 mM), für NMN 1190 ± 178 pmol/h (6 mM) und für Cholin 1433 ± 262 pmol/h (15 mM). Die V_{\max} -Werte für rOCT1 dürfen nur in relativer Hinsicht verwertet werden, da der interne V_{\max} -Abgleich für die rOCT1-Substrate an einer anderen Oozytencharge erfolgte und die Zielsetzung des in Tabelle 5 veranschaulichten Versuchs der Vergleich zwischen hOCT2 und rOCT1 und nicht der interne Vergleich der Transportkapazitäten für rOCT1 war. Für alle gemessenen Substrate fand sich jedoch für hOCT2 eine höhere Transportkapazität als rOCT1.

Bei einzelnen Konzentrationsstufen wurde hOCT2 auf Transport (im Influx-Paradigma) von verschiedenen weiteren pharmakologisch und physiologisch interessanten Modellsubstraten getestet. Im Konzentrationsbereich von 3,9 bis 250 μM vermittelt hOCT2 einen spezifischen, cyaninhemmbaren Transport von Acetylcholin mit einem K_M von 215 ± 49 μM und einer differentiellen V_{\max} von 473 ± 62 pmol/h. Diese Werte sind jedoch nur mit gewisser Einschränkung vergleichbar, da die entsprechenden Aufnahmewerte vor allem im höheren Konzentrationsbereich (500 μM bis 2 mM) bei wasserinjizierten, hOCT2-freien Kontrolloozyten sogar ca. 3-fach höher lagen als bei hOCT2-injizierten Oozyten. Die Ursache hierfür kann nur vermutet werden. Am wahrscheinlichsten erscheint eine parallel zu OCT erfolgende niederaffine Aufnahme durch einen endogenen Transporter für Cholinderivate, dessen Expression in hOCT2-Oozyten durch die Expression der heterologen cRNA supprimiert ist. Jedoch zeigt sich im unteren Konzentrationsbereich ein signifikanter Unterschied in der Acetylcholin-Aufnahme zwischen ungehemmten und cyaningehemmten hOCT2-Oozyten, welcher bei wasserinjizierten Kontrolloozyten nicht erscheint.

Im Gegensatz zu rOCT1 vermittelt hOCT2 keinen Transport des Dipeptids D-Phe-Ala (0,27 μM). Die Aufnahmeraten betragen $0,125 \pm 0,012$ pmol/h ungehemmt und $0,124 \pm 0,016$ pmol/h unter Cyanin863 (n.s.) bzw. $0,127 \pm 0,042$ pmol/h in wasserinjizierte Kontrolloozyten (n.s.). Ebenfalls kein hOCT2-spezifischer oder cyaninhemmbarer Transport wurde gefunden für Phlorizin (0,41 μM).

3.2.2 *cis*-Hemmung

Ebenso wie rOCT1 zeichnet sich hOCT2 auch durch Polyspezifität gegenüber Hemmstoffen aus. Im Vergleich zu rOCT1 wurden unter den gleichen optimierten Versuchsbedingungen die Hemmkonstanten für wichtige organische Kationen bestimmt. Hierbei wurde die Hemmung der 60-minütigen Aufnahme von TEA in Oozyten gemessen, wobei die TEA-Konzentration im Bereich des K_M -Wertes gehalten wurde und die Hemmstoffkonzentration in 9 Stufen variiert wurde. Transportsubstrat und Hemmstoff wurden in die Badlösung zugegeben, sodaß beide Substrate am Transportprotein von der gleichen Seite (außen) angreifen. Somit wurde die *cis*-Hemmung bestimmt. Um Sekundäreffekte durch Unterschiede in der unspezifischen Membranbindung der einzelnen Hemmstoffe und dadurch veränderte Konkurrenz mit dem Transportsubstrat an der spezifischen Bindungsstelle zu vermeiden, erfolgte eine Vorinkubation der Oozyten mit dem Hemmstoff für mindestens 14 min vor Zugabe des Tracersubstrates.

Die Berechnung der Hemmkonstanten erfolgte nach nichtlinearer Anpassung der relativen Aufnahmewerte (in Bruchteilen der ungehemmten Aufnahme) an eine monoexponentielle Gleichung, woraus die IC_{50} bestimmt wurde. Hierbei ergaben sich die in Tabelle 6 im direkten Vergleich zu rOCT1 angegebenen Werte. Bei Substanzen, deren Transportabilität durch hOCT2 gezeigt werden konnte, z.B. MPP und NMN, erfolgte die Anpassung an das kompetitive Inhibitormodell und die Berechnung eines kompetitiven K_i -Wertes. Für Substanzen, für die bereits die nicht-kompetitive Hemmung gezeigt wurde, wie z.B. Cyanin863, Decynium22 und Chinin [TEUBER I., 2002 (Diss.)], erfolgte die Anpassung an das nicht-kompetitive Inhibitormodell und die Berechnung des K_i -Wertes. Repräsentativ sind die Hemmkinetiken für Decynium22, Chinin und Procainamid in Abbildung 16 graphisch dargestellt.

Hemmstoff	rOCT1	hOCT2
	$K_{i\text{nc}} / K_{j\text{c}} / IC_{50} [\mu\text{M}] \pm \text{S.E.}$	$K_{i\text{nc}} / K_{j\text{c}} / IC_{50} [\mu\text{M}] \pm \text{S.E.}$
Chinin	$0,93 \pm 0,08^4$	$6,66 \pm 2,82$
Cyanin863	$0,72 \pm 0,18$	$1,08 \pm 0,34$
Decynium22	$0,36 \pm 0,08^4$	$0,191 \pm 0,021$
Desipramin	$2,8 \pm 0,6^4$	$33,3 \pm 6,4$
Mepiperphenidol	$5,2 \pm 0,3^4$	$16,8 \pm 7,3$
MPP	13 ± 2^4	$2,68 \pm 0,62$
NMN	1000 ± 200^4	299 ± 34
3-OMI	$73,3 \pm 20,8$	1540 ± 360
Pancuronium	1710 ± 390	586 ± 289
Procainamid	13 ± 2^4	$90,2 \pm 19,0$
TMA	1000 ± 100^4	360 ± 136
TPeA	$0,43 \pm 0,09^4$	$3,44 \pm 1,32$

Tab. 6: Hemmkonstanten von rOCT1 und hOCT2 für verschiedene organische Kationen auf den Transport von [^{14}C]-TEA. Ermittelt aus der nichtlinearen Anpassung der jeweiligen Hemmkinetik bei erwiesenen transportablen Substanzen (*kursiv*) an das kompetitive Inhibitormodell ($K_{j\text{c}}$), bei erwiesenen nicht transportablen Substanzen (**fett**) an das nicht-kompetitive Inhibitormodell (**$K_{i\text{nc}}$**) bzw. bei noch nicht näher einzustufenden Substanzen an eine monoexponentielle Gleichung mit Bestimmung der IC_{50} . Gemessen wurde die TEA-Aufnahme im Bereich des jeweiligen K_M -Wertes: Bei rOCT1 wurden $100 \mu\text{M}$, bei hOCT2 $60 \mu\text{M}$ [^{14}C]-TEA eingesetzt. Jede Kinetik wurde mit 9 Meßpunkten zu jeweils $n = 7 - 9$ Oozyten erstellt.

⁴ Werte aus GRÜNDEMANN D., 1994 (Diss.). Alle nach kompetitivem Modell errechnet.

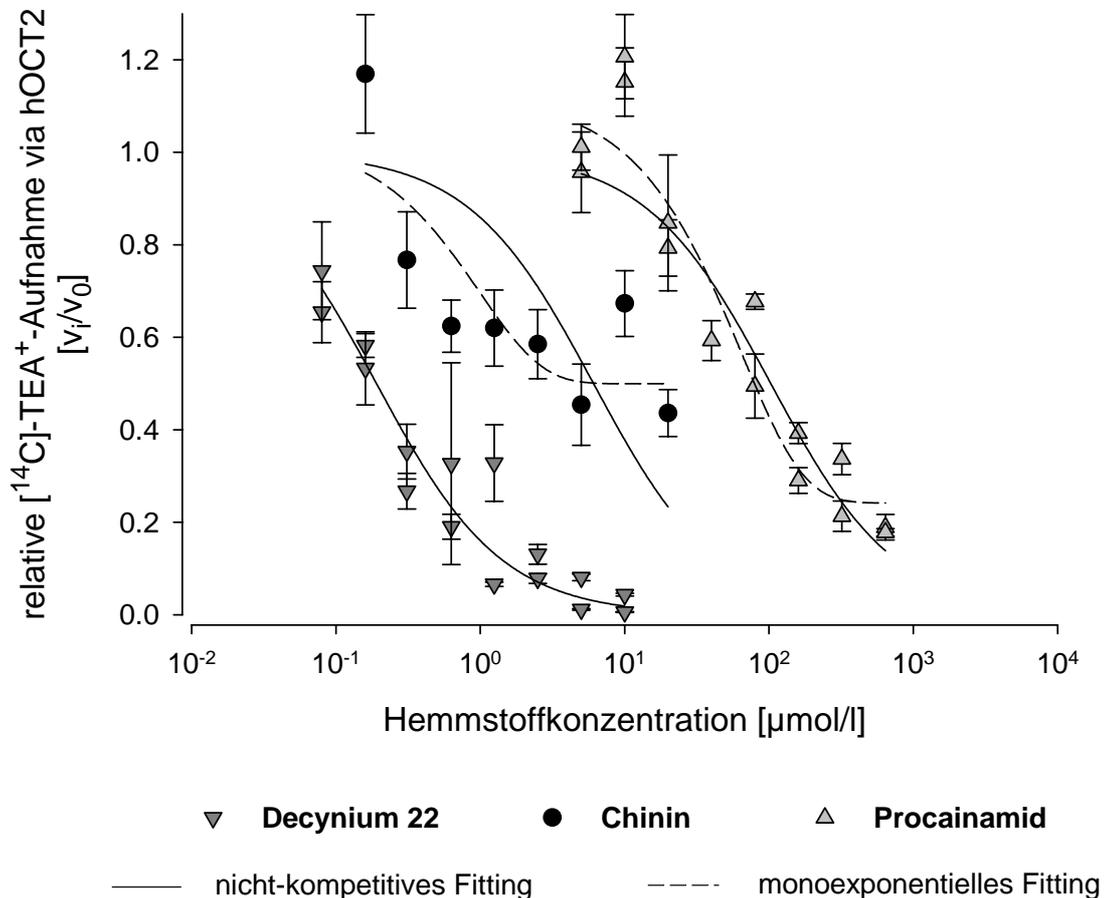


Abb. 16: Hemmung des TEA-Transportes via hOCT2 durch Decynium22, Chinin und Procainamid. Aufgetragen sind die Mediane \pm S.E.M. der relativen Aufnahme von 60 μM [^{14}C]-TEA in rOCT1-exprimierende Oozyten über 60 min (jeweils $n = 7 - 9$). Für Decynium22 und Procainamid sind die Mediane zweier separater Versuche aufgetragen. Die ungehemmte TEA-Aufnahme betrug im Mittel $233,8 \text{ pmol h}^{-1} \text{ Oozyte}^{-1}$. Die Relativaufnahmewerte wurden der nichtlinearen Regression entsprechend dem nicht-kompetitiven Modell bzw. einer einfachen monoexponentiellen Funktion unterworfen. Hierbei errechnet sich für Decynium22 ein K_i von $0,191 \pm 0,021 \mu\text{M}$, für Chinin ein K_i von $6,66 \pm 2,82 \mu\text{M}$, für Procainamid eine IC_{50} von $90,2 \pm 19,0 \mu\text{M}$ bzw. ein K_i von $109 \pm 20 \mu\text{M}$. Entsprechend dem monoexponentiellen Fitting scheint Chinin maximal eine 50-prozentige Hemmung zu erzielen.

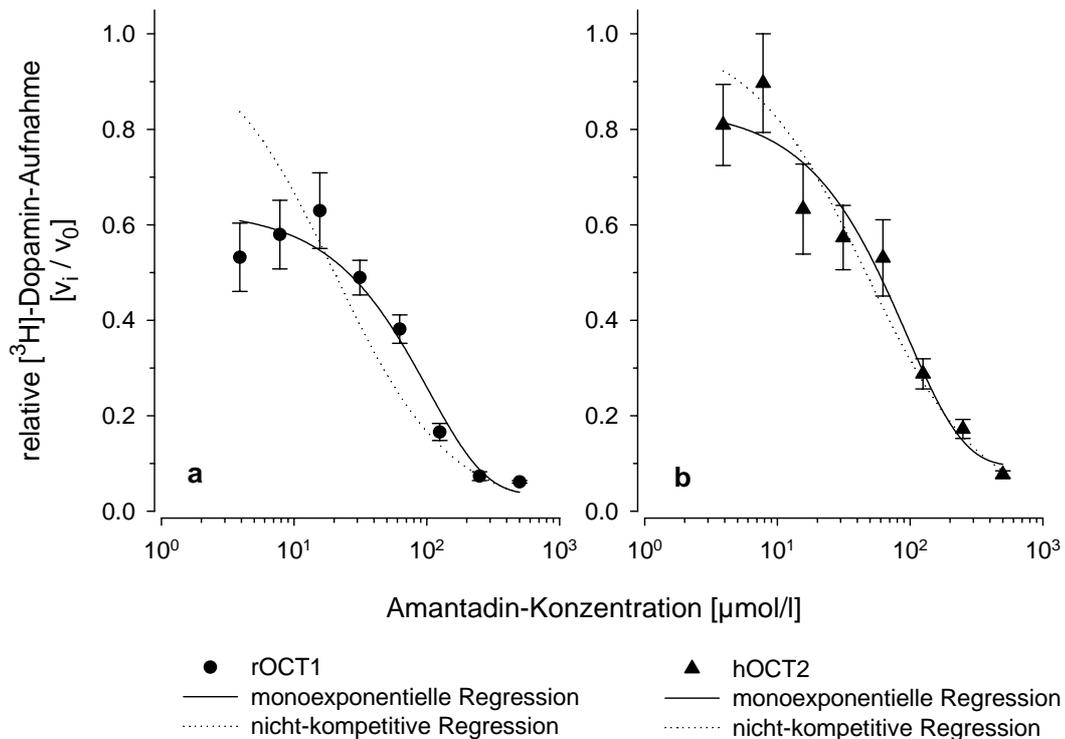


Abb. 17: Hemmung des Dopamin-Transportes via rOCT1 (a) und hOCT2 (b) durch Amantadin. Mediane \pm S.E.M. der relativen $[^3\text{H}]$ -Dopamin-Aufnahme (60 min) in rOCT1-exprimierende Oozyten bei 20 μM bzw. in hOCT2-exprimierende Oozyten bei 200 μM (jeweils $n = 8$ bzw. 9). Die ungehemmte Dopaminaufnahme betrug via rOCT1 219 pmol h^{-1} Oozyte $^{-1}$ bzw. via hOCT2 129 pmol h^{-1} Oozyte $^{-1}$. Nach nichtlinearer Anpassung der Relativhemmwerte an eine monoexponentielle Funktion errechnet sich für Amantadin bei rOCT1 eine IC_{50} von $25,2 \pm 5,0 \mu\text{M}$ bzw. bei hOCT2 eine IC_{50} von $59,1 \pm 12,0 \mu\text{M}$. Bei vergleichshalber dargestellter Anpassung an das nicht-kompetitive Modell errechnen sich K_i -Werte von $20,1 \pm 6,0$ für rOCT1 bzw. $46,4 \pm 7,2 \mu\text{M}$ für hOCT2. Auf rOCT1 scheint Amantadin zusätzlich noch eine partielle hochaffine Hemmkomponente aufzuweisen.

Amantadin und Dopamin

Da hOCT2 auch Dopamin transportiert und in Neuronen exprimiert wird [BUSCH A.E. *et al.*, 1998], könnte ihm eine Bedeutung in der Rückresorption von Neurotransmittern zukommen. Amantadin wird zur Behandlung des Morbus Parkinson eingesetzt, welcher durch ein Unterangebot an Dopamin in verschiedenen cerebralen Kerngebieten gekennzeichnet ist und durch dopaminerge Medikation behandelbar ist. Daher erschien es interessant zu untersuchen, ob Amantadin nicht nur den rOCT1-vermittelten, sondern auch den hOCT2-vermittelten Transport von Dopamin zu hemmen vermag. Durch einen solchen Mechanismus, welcher die Dopamin-Konzentration im synaptischen Spalt erhöhen könnte, könnte zumindest eine Wirkkomponente des diesbezüglich noch kontrovers diskutierten Amantadins erklärt werden. Tatsächlich ließ sich die Dopaminaufnahme (bei 200 μM) in hOCT2-exprimierende Oozyten durch Amantadin mit einer IC_{50} von $59,1 \pm 12,0 \mu\text{M}$ hemmen (siehe Abbildung 17.). Hiermit findet sich bei hOCT2 eine etwas niedrigere Affinität für Amantadin als bei rOCT1.

3.2.3 *trans*- Effekte

Analog zu rOCT1 war für hOCT2 zu zeigen, ob auch letzterer enzymkinetisch zur Klasse der Uniporter zu rechnen ist oder etwa obligat an ein Austauschsubstrat gebunden ist. Deshalb wurden auch mit hOCT2 Effluxversuche durchgeführt um zu testen, ob hOCT2 wie rOCT1 unter *trans-zero*-Bedingung zu transportieren vermag und *trans*-stimulierbar ist.

Für hOCT2 wurden die gleichen Versuchsbedingungen wie für rOCT1 gewählt, insbesondere wurden für die Effluxversuche nur optisch einwandfreie, cholinsubstituierte (PCG-ORi-kultivierte) Oozyten verwendet. Mit 120 fmol/Oozyte [^3H]-MPP-Tracer (370 Bq/Oozyte) injizierte hOCT2-exprimierende Oozyten zeigten

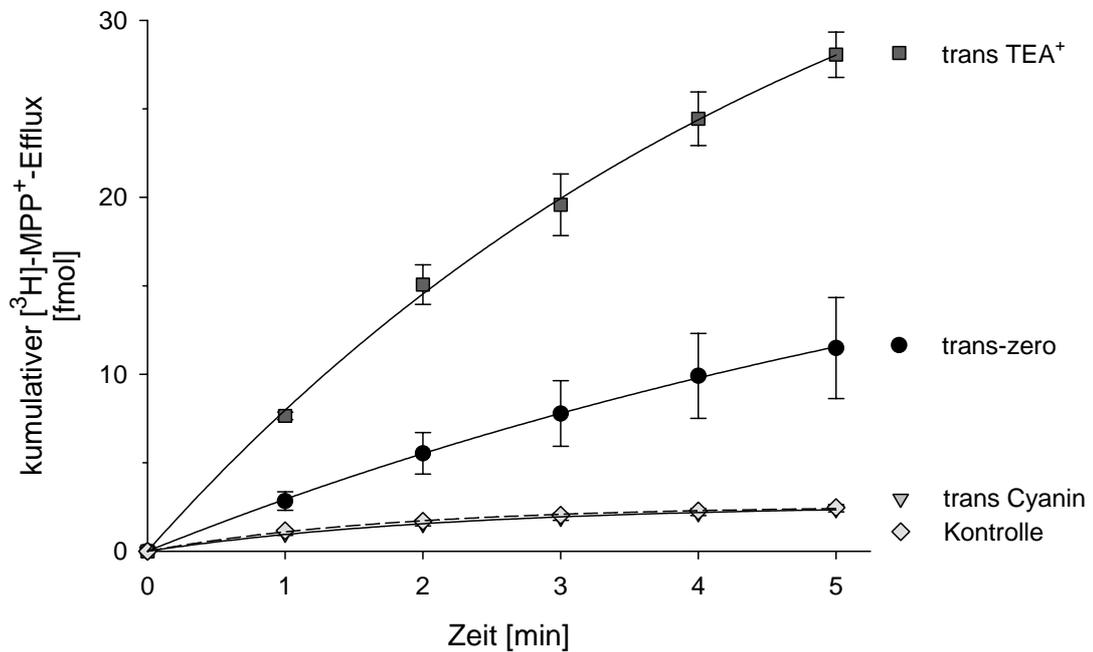


Abb. 18: MPP-Efflux via hOCT2 unter *trans-zero*-Bedingung, unter *trans*-Stimulation durch TEA (1,5 mM) und unter *trans*-Hemmung durch Cyanin 863 (75 μ M). Mittelwerte \pm S.E.M. (jeweils $n = 4$) des kumulativen [3 H]-MPP-Effluxes aus mit 120 fmol MPP vorinjizierten, cholinsubstituierten Oozyten. Der Efflux aus wasserinjizierten Kontrolllozyten (*trans*-TEA) ist als gestrichelte Linie orientierend dargestellt.

Bedingung	hOCT2	H ₂ O	p	Signifikanz
<i>trans-zero</i>	3,80 ± 0,91	1,17 ± 0,11	0,0608	(5)
<i>trans-MPP</i>	6,75 ± 1,09	1,72 ± 0,50	< 0,02	**
<i>trans-TEA</i>	10,33 ± 0,47	1,40 ± 0,42	< 0,0001	***
<i>trans-Cyanin</i>	1,18 ± 0,14	1,11 ± 0,09	0,1923	n.s.

t-Test :

Bedingung	verglichen mit	p	Signifikanz
hOCT2 <i>trans-zero</i>	hOCT2 <i>trans-MPP</i>	0,0840	(5)
hOCT2 <i>trans-zero</i>	hOCT2 <i>trans-TEA</i>	0,0020	***
hOCT2 <i>trans-zero</i>	hOCT2 <i>trans-Cyanin</i>	0,0609	(5)

Tab. 7: Vergleich der initialen Raten des hOCT2-vermittelten MPP-Effluxes aus cholinsubstituierten Oozyten (aus Abbildung 18). Die *cis*-Konzentration von [³H]-MPP betrug 240 nM, die *trans*-Konzentrationen von MPP 200 µM, TEA 1,5 mM, Cyanin863 75 µM. Die initialen Raten wurden aus den Efflux-Kennlinien jeder einzelnen Oozyte errechnet und mittels t-Test miteinander verglichen.

⁵ Aufgrund eines injektionsbedingt geringfügig höheren Leckeffluxes bei einer der vier Oozyten der *trans-zero*-Bedingung ist diese Gruppe mit einer höheren Standardabweichung behaftet, sodaß diese Gruppe einschließende t-Tests überproportional häufig die Nullhypothese nicht verwerfen lassen.

in einer Badlösung aus ORi ohne transportables Substrat auf der *trans*-Seite (*trans-zero*-Bedingung, siehe Abbildung 18) einen signifikanten, über fünf Minuten nahezu linearen Efflux von MPP mit einer initialen Transportrate von $3,80 \pm 0,91$ fmol/min ($[^3\text{H}]$ -MPP via hOCT2 *trans-zero*, n=4). Wasserinjizierte Kontrolloozyten dagegen zeigten einen endogenen, möglicherweise leckbedingten, nach drei Minuten jedoch nicht mehr wesentlich zunehmenden Tracer-Efflux mit einer initialen Rate von $1,17 \pm 0,11$ fmol/min. Dieser hOCT2-spezifische Efflux war hemmbar durch Zugabe von $75 \mu\text{M}$ Cyanin863 in der Badlösung. Hierbei errechnet sich eine initiale Rate von $1,18 \pm 0,14$ fmol/min ($[^3\text{H}]$ -MPP via hOCT2 *trans-Cyanin863*, n=4). Somit findet sich unter *trans-zero*-Bedingung ein hOCT2-spezifischer, cyaninhemmbarer Transport (Efflux) von MPP (vergleiche hierzu auch Abbildung 18 und Tabelle 7). Somit vermag auch hOCT2 als Uniporter zu funktionieren und ist definitiv nicht als obligater Austauscher an ein auch endogen in *Xenopus*-Oozyten vorhandenes Substrat wie z.B. Cholin gekoppelt.

Darüberhinaus fanden sich in Anwesenheit sättigender Konzentrationen von TEA ($1,5 \text{ mM}$) und MPP ($200 \mu\text{M}$) in der Badlösung (*trans*) deutlich gesteigerte $[^3\text{H}]$ -MPP-Effluxe, die sich in exponentieller Weise einer Sättigung nähern und initiale Raten (siehe Abbildung 18) von $10,33 \pm 0,47$ bzw. $6,75 \pm 1,09$ fmol/min zeigen (n=4, für TEA $p < 0,02$ gegenüber *trans-zero*). Wasserinjizierte Kontrolloozyten zeigten dagegen keine Steigerung des endogenen $[^3\text{H}]$ -MPP-Leck-Effluxes durch *trans*-MPP oder -TEA (vergleiche hierzu Tabelle 7). Die unterschiedlich starke *trans*-Stimulation von hOCT2 durch TEA und MPP mag darin begründet liegen dass die *trans*-Konzentration von MPP nur ca. 10-fach über dem entsprechenden K_M des Einwärtstransports ($19,4 \pm 2,5 \mu\text{M}$) lag, während TEA in ca. 20-fach höherer Konzentration ($K_M 74,8 \pm 12,5 \mu\text{M}$) angeboten wurde. Auch hier scheint somit eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit der *trans*-Stimulation vorzuliegen. Zusammengefasst findet sich eine signifikante *trans*-Stimulation des hOCT2-vermittelten Transportes durch sättigende Konzentrationen transportabler Substrate, sodaß hOCT2 als Transporter vom Uniporter-Typ zu klassifizieren ist.

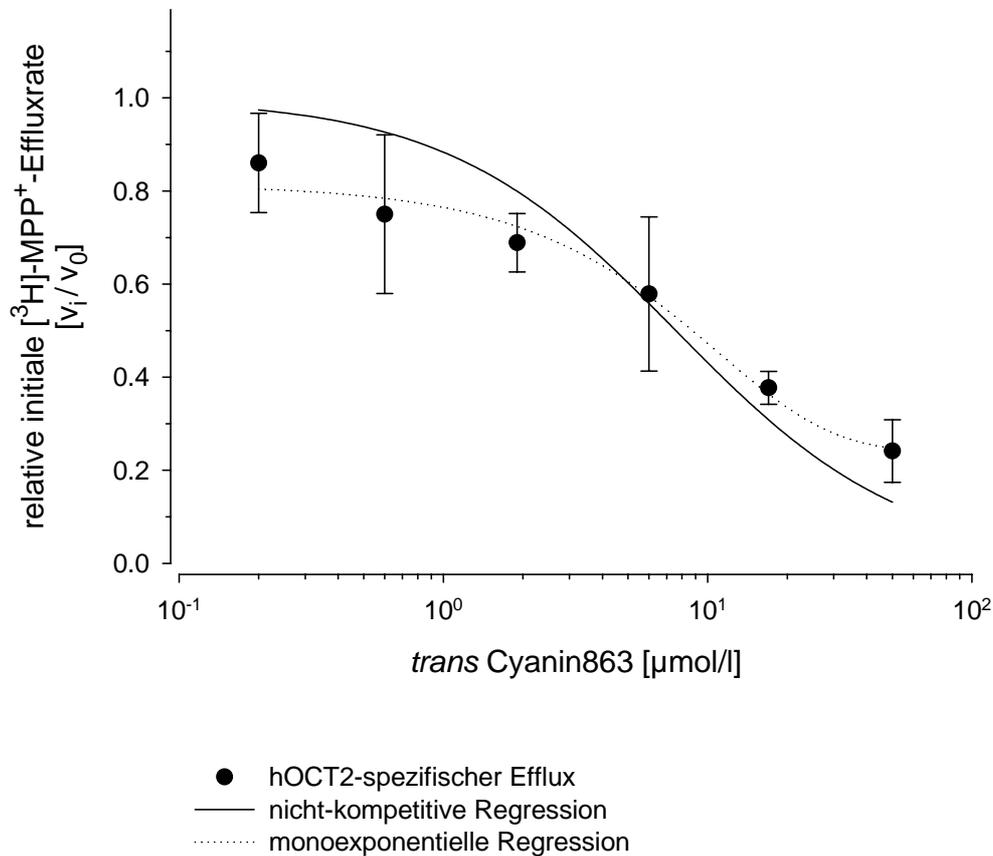


Abb. 19: Konzentrationsabhängigkeit der *trans*-Hemmung des MPP-Effluxes via hOCT2 durch Cyanin863. Die Mittelwerte \pm S.E.M. der initialen Raten des kumulativen $[^3\text{H}]$ -MPP-Effluxes aus mit 120 fmol $[^3\text{H}]$ -MPP vorinjizierten Oozyten (jeweils $n = 4$) wurden um die endogene Effluxrate bereinigt und mit der *trans*-zero-Rate in Relation gesetzt. Bei Anpassung an das nicht kompetitive Modell errechnet sich ein $K_{i \text{ trans}}$ für Cyanin863 von $7,58 \pm 2,35 \mu\text{M}$. Zum Vergleich beträgt die aus monoexponentieller Anpassung errechnete IC_{50} $8,75 \pm 2,98 \mu\text{M}$. Die mittlere hOCT2-spezifische *trans*-zero-Rate betrug $4,46 \pm 0,47 \text{ fmol/min}$.

Wie aus Abbildung 18 und Tabelle 7 ersichtlich, ist der hOCT2-vermittelte wie auch der rOCT1-vermittelte Efflux von MPP durch Zugabe sättigender Konzentrationen von Cyanin863 (75 μM) in der Badlösung (*trans*) nahezu vollständig hemmbar (*trans*-Hemmung). Auch diese *trans*-Hemmung ist konzentrationsabhängig, wie durch ein MPP-Efflux-Experiment bei unterschiedlichen *trans*-Konzentrationen von Cyanin863 gezeigt werden konnte (Abbildung 19). Für jede einzelne Konzentrationsstufe von *trans*-Cyanin863 und *trans-zero* wurden 4 Oozyten eingesetzt. Für jede einzelne Oozyte wurde die Kennlinie des [^3H]-MPP-Effluxes über die initialen 5 min. erstellt, diese an eine monoexponentielle Funktion angepasst und hieraus die initiale Effluxrate errechnet. Das arithmetische Mittel der initialen Raten jeder Gruppe wurde um die jeweilige initiale Rate der wasserinjizierten Kontrolloozyten ($n = 3$) bereinigt und mit der mittleren differentiellen initialen Effluxrate der *trans-zero*-Bedingung ($4,46 \pm 0,47$ fmol/min) in Relation gesetzt. Die resultierenden Relativhemmwerte wurden in Abhängigkeit von der *trans*-Cyanin863-Konzentration aufgetragen. Die resultierende *trans*-Hemmungskurve wurde an das nicht-kompetitive Modell angepasst. Hierbei findet sich ein *trans*- K_i -Wert für Cyanin863 von $7,58 \pm 2,35$ μM . Dieser ist verschieden vom entsprechenden *cis*- K_i -Wert von Cyanin863, welcher bei $1,08 \pm 0,34$ μM liegt. Allerdings wurde dieser auf den Transport von TEA und nicht von MPP bestimmt, sodaß die direkte Vergleichbarkeit eingeschränkt ist. Detailliertere Untersuchungen zur *cis-trans*-Asymmetrie von OCT wurden im Rahmen dieser Arbeit repräsentativ an rOCT1 durchgeführt.

3.3 Elektrochemische Eigenschaften von rOCT1

Die Transporter der OCT-Familie sind zum einen potentialabhängige Carrier, d.h. der Substrattransport erfolgt in Abhängigkeit vom Membranpotential unterschiedlich stark. Darüberhinaus konnte mittlerweile gezeigt werden, dass die Affinitäten für Transportsubstrate (K_M -Werte) und Hemmstoffe (K_i -Werte) in gewissem Rahmen potentialabhängig sind [BUSCH A.E. *et al.*, 1996a]. Darüberhinaus transportiert OCT in elektrogener Weise Substanzen, welche pH-abhängig oder permanent positiv geladen sind, sodaß Transport- und Inhibitionsmessungen an OCT-exprimierenden Oozyten auch elektrophysiologisch möglich sind. Im Rahmen der Kooperation mit PD Dr. Andreas E. Busch, Physiologisches Institut der Universität Tübingen wurden rOCT1, hOCT2 und hOCT1 ausführlich elektrophysiologisch charakterisiert. Kationische Transportsubstrate wie z.B. MPP oder TEA induzieren bei Superfusion rOCT1-exprimierender Oozyten einen Einwärtsstrom, der durch im *voltage-clamp*-Paradigma durch den Strom charakterisiert wird, der notwendig ist, um das geklemmte Membranpotential der Oozyte auf dem eingestellten Wert zu halten. Hierbei konnten auch für den substratinduzierten Strom Konzentrationsabhängigkeit und Sättigbarkeit gemessen und entsprechende K_M - und I_{max} -Werte ermittelt werden [BUSCH A.E. *et al.*, 1996a].

Allgemein wurde bislang angenommen, dass dem bei Substratsuperfusion gemessenen Strom zusammen mit dem Substrat Ladung im Verhältnis 1:1 transportiert wird. Aufgrund dieser Hypothese wurden oft elektrophysiologisch und mittels Tracerflux gewonnene transportkinetische Parameter unkritisch als austauschbar behandelt. Erstmals fielen jedoch Diskrepanzen auf, als an hOCT2-exprimierenden Oozyten elektrophysiologisch ein von den Tracerfluxergebnissen größenordnungsverschiedener K_M -Wert für MPP ermittelt wurde [GORBOULEV V. *et al.* 1997]: Der MPP-induzierte Einwärtsstrom von hOCT2-Oozyten zeigte einen K_M von 1,2 μM , während im Tracer-Influx (im Rahmen dieser Arbeit, s.o.) für die

Aufnahme von MPP ein K_M von $19,4 \pm 3 \mu\text{M}$ ermittelt wurde. Parallel dazu wurden an anderen Transportproteinen kationeninduzierte Zustände elektrischer Leitfähigkeit unabhängig vom Substrattransport beschrieben [MAGER S. *et al.* 1994; WRIGHT E.M. *et al.* 1996]. Somit ist es notwendig, einen neuen Parameter zu beschreiben, der für die Interaktion zwischen einem gegebenen Transportprotein und einem gegebenen Transportsubstrat charakteristisch ist, das Strom-Transport-Verhältnis.

Um dieses Strom-Transport-Verhältnis für rOCT1 zu bestimmen, wurden in einem Simultanversuch an der gleichen Oozytencharge für mehrere organische Kationen der induzierte Maximalstrom I_{max} mit der jeweiligen maximalen Aufnahme V_{max} bei gleicher Substratkonzentration verglichen (Abb. 20). Bei den elektrophysiologischen Messungen wurde jede Bedingung an jeweils 5 Oozyten gemessen, die Tracerfluxversuche wurden an 7 Oozyten pro Bedingung durchgeführt. Für MPP (160 μM) wurde eine cyaninhemmbare Aufnahme von $109,6 \pm 20,6 \text{ pmol/h}$ gemessen, für NMN (6 mM) $434,8 \pm 42,5 \text{ pmol/h}$ und für TEA $298,6 \pm 50,7 \text{ pmol/h}$ (Mediane \pm S.E.M.). Parallel wurden folgende, mit dem jeweiligen Klemmpotential verrechnete substratinduzierte Ströme gemessen (arithmetisches Mittel, Werte von Dr. A.E. Busch): MPP (160 μM): $14 \pm 3 \text{ nA}$, NMN (6 mM): $40 \pm 8 \text{ nA}$, TEA (1 mM): $42 \pm 8 \text{ nA}$. Die Aufnahme von Ladungseinheiten pro Zeiteinheit (Q_e) lässt sich einfach aus dem gemessenen Strom I und den Konstanten e (Elementarladung, $e = 1,602 \cdot 10^{-19} \text{ C}$) und N_A (Avogadro-Konstante, $N_A = 6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$) errechnen:

$$Q_e = I / (e \cdot N_A)$$

Der Ionenfluss Q_i (in mol/s) ergibt sich dann aus dem Ladungsfluss Q_e durch Division durch die Ladung des Ions z . Da es sich bei allen gemessenen Substraten um einwertige Kationen handelt, ist $Q_i = Q_e$ und es ergeben sich für die getesteten Substrate folgende Ionen-Transportraten: für MPP 522 pmol/h , für NMN 1493 pmol/h und für TEA 1567 pmol/h . Dies sind 3,3- bis 5-fach höhere Werte als maßgeblich der Tracermessung tatsächlich transportiert wird. Somit besteht rechnerisch eine erhebliche Diskrepanz zwischen kationeninduziertem Strom und

Transport via rOCT1. Ursache hierfür kann zum einen ein paralleler Ladungstransport zusätzlich zur Translokation der organischen Kationen sein. Zum anderen sind zusätzliche Potentialänderungen und sekundär induzierte Ströme durch die Aufnahme von geladenen Substraten denkbar, welche durch endogene, im Versuchsparadigma nicht geblockte Transportmechanismen herbeigeführt werden. Im hier benutzten experimentellen Ansatz ist systematisch nicht auszuschließen, dass sich die Transportraten der spannungsgeklemmten Oozyten von denen der im Tracerflux eingesetzten, ungeklemmten Oozyten individuell unterscheiden. Insbesondere könnten durch den Kationentransport induzierte Membrandepolarisierungen im *voltage-clamp*-Paradigma neutralisiert werden und die Aufnahmeraten somit artifiziell erhöht werden. Der nächste weiterführende Schritt zur Klärung dieser Hypothese wären Traceraufnahmemessungen an spannungsgeklemmten Oozyten. Hinsichtlich der Transportstöchiometrie von OCT wären jedoch weitergehende biophysikalische Untersuchungen unter kontrollierten Versuchsbedingungen an störfaktorfreen Membranvesikeln oder Membranpatches erforderlich um beispielsweise zu klären, ob kleine anorganische Ionen eventuelle Lücken zwischen gebundenem Substrat und Bindungstasche des Transportproteins auffüllen und somit cotransportiert werden. Ähnliches wurde kürzlich für PepT1 beschrieben [KOTTRA G. *et al.*, 2002]. Alternativ könnte OCT parallel zum beschriebenen Transportermodus auch Kanaleigenschaften besitzen, wie es für die natriumgekoppelten Neurotransmittertransporter gezeigt wurde [SONDERS M.S. & AMARA S.G., 1996].

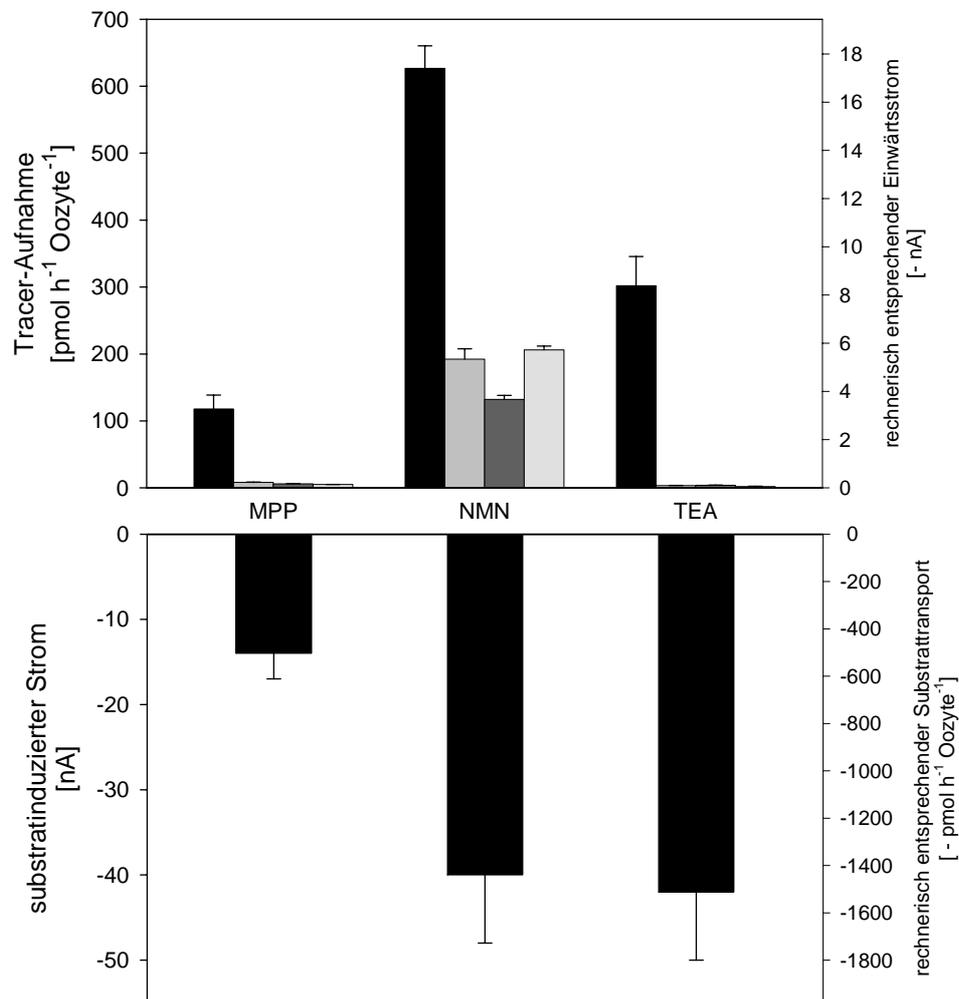


Abb. 20: Kationentransport und kationeninduzierter Strom via rOCT1. Durch Zugabe von MPP (160 μ M), NMN (6 mM) und TEA (1,5 mM) in die Badlösung von rOCT1-exprimierenden Oozyten induzierter Tracer-Transport über 60 min (oberes Diagramm, [³H]-MPP, [³H]-NMN, [¹⁴C]-TEA in pmol/h als Mediane \pm S.E.M. bei n = 7) bzw. Einwärtsstrom (unteres Diagramm, in nA als arithmetisches Mittel \pm S.E.M. bei n = 5). Das Klemmpotential bei den elektrophysiologisch untersuchten Oozyten lag zwischen -16 und -40 mV. Kontrolloozyten zeigten keinen signifikanten kationeninduzierten Strom.

3.4 Symmetrieverhalten im Bindungs- und Transportmechanismus von rOCT1

3.4.1 *cis*- und *trans*-Verhalten von Transportsubstraten

Durch die Entwicklung der Effluxmethodik im Rahmen dieser Arbeit bestand erstmals die Möglichkeit, rOCT1 als Prototyp der polyspezifischen Kationentransporter im Expressionssystem *Xenopus*-Oozyte auf seine Transportersymmetrie zu untersuchen. Wie bereits im Kapitel 3.1.3 ausgeführt, transportiert rOCT1 im Influxparadigma das Transportsubstrat von der extrazellulären zur zytosolischen Membranseite, was seiner physiologischen Rolle in der basolateralen Membran des proximalen Tubulus und der sinusoidalen Hepatozytenmembran am nächsten kommt. Es ist leicht vorstellbar, dass diese Transportrichtung seitens der Transporterkinetik energetisch bevorzugt ist. Als Uniporter ist rOCT1 jedoch auch in der Lage, Substrate in der entgegengesetzten Richtung zu transportieren, was für die *trans*-Stimulation schließlich Voraussetzung ist. Insofern müsste der Transporter „im Rückwärtsgang“, also bei Substrattransport von intrazellulär nach extrazellulär ungünstigere kinetische Charakteristika zeigen. Mithilfe des Effluxparadigmas war dieser Fragestellung einfach nachzugehen.

Zunächst ist naheliegend, dass sich rOCT1 in der maximalen Transportgeschwindigkeit (V_{\max}) zwischen den beiden Transportrichtungen unterscheiden könnte. Hierzu wären z.B. die V_{\max} -Werte des MPP-Influges mit denen des MPP-Effluxes zu vergleichen. Hierbei sind jedoch mehrere Punkte zu beachten. Zum einen ändert sich V_{\max} in Abhängigkeit von der Anwesenheit eines Substrates auf der *trans*-Seite (*trans*-Stimulation) und es ist davon auszugehen, dass rOCT1 im Influxparadigma durch endogene Substrate des Oozytendotters, z.B. Cholin (welches aus Gründen der Konstanthaltung der intrazellulären Konzentration

auch durch Zugabe in den Kultur-ORi substituiert wurde), maximal *trans*-stimuliert läuft. Somit wäre der direkte Vergleichspunkt zum Influx der *trans*-stimulierte Efflux. Zum anderen liegt beim MPP-Efflux die *cis*-Substratkonzentration deutlich unter dem entsprechenden K_M (zytosolisch 240 nM im Gegensatz zu $K_M = 9,6 \mu\text{M}$). Weiterhin verläuft der Influx von MPP über 60 min linear, was beim Efflux nicht der Fall ist. Hieraus ergibt sich, dass zur Untersuchung der Transporterdirektionalität die initialen Transportraten im Influx und Efflux von MPP bei *trans*-Stimulation und einer *cis*-Konzentration von 240 nM verglichen werden müssen. Die Substitution aller Oozyten mit Cholin in der Kulturphase gewährleistet im Influxparadigma eine stabile *trans*-Stimulation während eine eventuelle *cis*-Hemmwirkung des intrazellulären Cholins im Effluxparadigma angesichts des Überschusses der übrigen im Zytosol vorhandenen potentiellen organischen Kationen vernachlässigbar ist. Darüberhinaus gewährleistet die Tracerinjektion im Effluxparadigma im Gegensatz zur Tracervorbeladung durch Vorinkubation eine gleichbleibende zytosolische Tracerkonzentration und ist nicht mit sekundären Störeffekten behaftet wie z.B. durch unterschiedliche Transporterexpression oder Induktion sekundärer Transporter oder Kanäle bedingte, unkontrollierbare Kompensationsmechanismen, welche Membranpotential und Substratkonzentrationen verändern können. Somit sind die Versuchsbedingungen im Influx- und Effluxparadigma direkt vergleichbar.

Die initiale Transportrate für MPP im Influx bei 240 nM lässt sich leicht mithilfe der MICHAELIS-MENTEN-Gleichung aus den Ergebnissen der in Abbildung 7a dargestellten Zeitkinetik der MPP-Aufnahme in rOCT1-exprimierende Oozyten bei sättigender MPP-Konzentration (160 μM) errechnen. Hierbei lag die (differenzielle, rOCT1-spezifische) initiale Transportrate ($V_{\text{max.}}$) bei 1,67 pmol/min. Für eine Substratkonzentration von 240 nM errechnet sich demnach für die Transportrate v :

$$v = \frac{V_{\text{max.}} \cdot S}{K_m + S}$$

$$v_{240 \text{ nM}} = \frac{1670 \text{ fmol min}^{-1} \cdot 240 \text{ fmol } \mu\text{l}^{-1}}{9600 \text{ fmol } \mu\text{l}^{-1} + 240 \text{ fmol } \mu\text{l}^{-1}}$$

$$v_{240 \text{ nM}} = 40,7 \text{ fmol min}^{-1}$$

Demgegenüber beträgt die differenzielle initiale Transportrate für MPP im Efflux bei 240 nM unter *trans*-Stimulation 8,6 fmol/min., was um den Faktor 5 weniger ist. Somit besitzt rOCT1 eine direktionale Asymmetrie zugunsten des Einwärtstransports. In welchem Ausmaß jedoch diese Direktionalität durch das Oozytenmembranpotential verursacht oder modifiziert wird, lässt sich am verwendeten Paradigma nicht klären. Es wären hierzu Effluxversuche unter *voltage clamp*-Bedingungen erforderlich. Hierzu wird auf andere mittlerweile erschienenene Publikationen (z.B. ARNDT P. *et al.*, 2001) verwiesen. Es ist jedoch im Vergleich zu diesen zu betonen, dass diese auf unterschiedlichen Versuchsbedingungen beruhen, insbesondere auf die störfaktorbehaftete und in den Ausgangsbedingungen unkontrollierbare Tracervorinkubation im Effluxparadigma. Die Werte aus solchen Studien sind deshalb mit den hier präsentierten Ergebnissen nur indirekt vergleichbar. Beide stellen jedoch Annäherungen an die Fragestellung dar.

Weiterhin ist interessant zu untersuchen, ob sich die Affinität des Transporters bezüglich der Substratbindungsstelle unterscheidet, je nachdem in welchem Orientierungszustand oder Abschnitt des Translokationszyklus sich das Transportprotein befindet. Ähnliches wurde bereits für den Peptidtransporter PepT1 beschrieben [KOTTRA G. & DANIEL H., 2001]. Ebenso sind durch Ligandenbindung induzierte Konformationsänderungen von Transportproteinen bereits für mehrere Transporter beschrieben worden [JUNG H., 2001; PIRCH T. *et al.*, 2002]. Dementsprechend induziert beim Influx die Substratbindung an den nach extrazellulär orientierten Transporter die Konformationsänderung zur zytosolischen Orientierung. Bei der *trans*-Stimulation des MPP-Effluxes dagegen bindet das von außen in Sättigung zugegebene Substrat (z.B. MPP oder TEA) an den Transporter in einem Zustand des Orientierungswechsels von intra- nach extrazellulär. Es ist

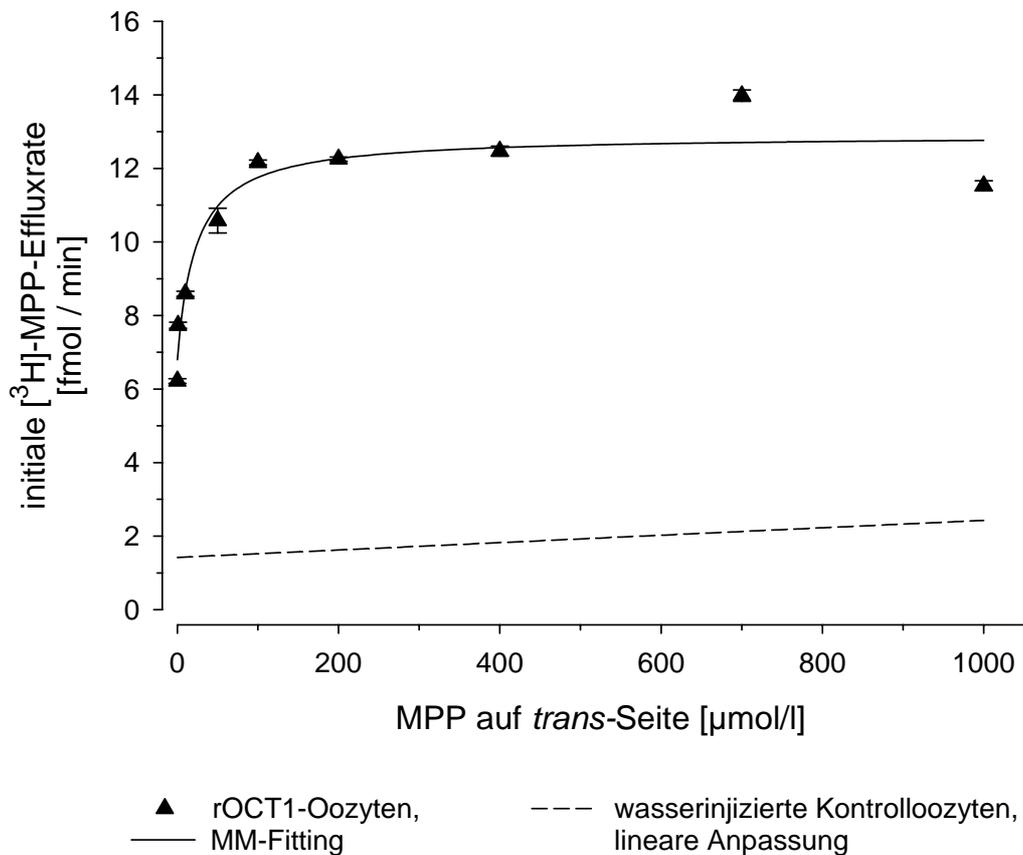


Abb. 21: Konzentrationsabhängigkeit der *trans*-Stimulation des MPP-Effluxes via rOCT1 durch MPP. Mittelwerte \pm S.E.M. der initialen Raten des kumulativen [^3H]-MPP-Effluxes aus mit 120 fmol [^3H]-MPP vorinjizierten und cholinsubstituierten Oozyten (jeweils $n = 4 - 5$). Der Efflux aus wasserinjizierten Kontrolloozyten (*trans*-MPP, $n = 4$) ist linear und ist als gestrichelte Linie orientierend dargestellt. Bei nichtlinearer Anpassung der rOCT1-Kurve an das MICHAELIS-MENTEN-Modell errechnet sich nach Abzug des unspezifischen Effluxes (Kontrolle) ein K_S für MPP von $12,4 \pm 7,2 \mu\text{M}$. Die maximale *trans*-Stimulation der initialen Effluxrate beträgt somit $223 \pm 10\%$.

denkbar, dass sich die Affinität des (im Efflux) von innen nach außen in beladenem Zustand laufenden Transporters gegenüber dem (stimulierenden) Transportsubstrat anders verhält als in umgekehrter Richtung beim Influx.

Zur Klärung dieser Fragestellung war die Beobachtung von Nutzen, dass die *trans*-Stimulation des MPP-Effluxes konzentrationsabhängig zu sein schien. Daher wurden MPP-Effluxversuche an rOCT1 durchgeführt, bei denen die *trans*-stimulierende MPP-Konzentration in der Badlösung systematisch variiert wurde. Der [³H]-MPP-Efflux (*cis*-Konzentration 240 nM intrazellulär, 370 Bq/ Oozyte) aus rOCT1-exprimierenden und wasserinjizierten Kontrolloozyten wurde über 5 min. für jede Oozyte einzeln (pro Versuchsbedingung 4 bis 5 Oozyten) gemessen und die jeweilige Kennlinie monoexponentiell gefittet. Aus den hieraus berechneten initialen Effluxraten wurde das arithmetische Gruppenmittel \pm S.E.M. gebildet, gegen den unspezifischen Efflux der Kontrollen differenziell bereinigt und gegen die *trans*-Substratkonzentration aufgetragen. Es zeigte sich, dass die maximale *trans*-Stimulation bereits bei 160 μ M MPP erreicht wird und eine weitere Steigerung (bis 1 mM) keine weitere Stimulation des Effluxes erbringt. Die rOCT1-spezifische *trans-zero*-Effluxrate lag bei $4,80 \pm 0,07$ fmol/min., die maximale *trans*-Stimulation bei $11,9 \pm 0,2$ fmol/min. dies entspricht einem Faktor 2,5. An die Effluxraten wurde die MICHAELIS-MENTEN-Gleichung angepasst. Hieraus ergab sich für die (dem *cis*-K_M-Wert entsprechende) Stimulationskonstante K_S der *trans*-Stimulation des [³H]-MPP-Effluxes via rOCT1 durch MPP: $K_s = 12,4 \pm 7,2$ μ M. Dieser Wert liegt sehr nahe an dem für rOCT1 bestimmten *cis*-K_M für MPP ($9,6 \pm 1,5$ μ M). Insofern scheint einerseits die Transstimulation entsprechend der bisherigen Theorie über Substratbindung an der Transportbindungsstelle vermittelt zu sein. Andererseits besteht für diese Bindungsstelle bei rOCT1 eine *cis-trans*-Symmetrie.

3.4.2 *cis*- und *trans*-Verhalten kompetitiver und nicht-kompetitiver Hemmstoffe

Bei Transportproteinen wie rOCT1 lassen sich ebenso wie bei Enzymen zwei Inhibitionsmechanismen unterscheiden: Kompetitive Hemmstoffe binden (von *cis*) an die Transportbindungsstelle in Konkurrenz mit dem zu transportierenden Substrat und be- oder verhindern je nach Affinität und Bindungsverhalten weitere Transportzyklen. Diese Hemmstoffe können typischerweise durch hohe Konzentrationen des Transportsubstrates verdrängt werden. In der Regel sind kompetitive Hemmstoffe selbst transportabel und diffundieren nach Translokation auf die *trans*-Seite von ihrer Bindungsstelle ab. Nicht-kompetitive Hemmstoffe dagegen binden unabhängig von einer Transportsubstratbindung. Typischerweise ist diese Hemmung nicht durch Anheben der Substratkonzentration reversibel. Früher wurde diese Hemmung allosterisch genannt, da eine zweite, von der Transportbindungsstelle verschiedene Hemmstoffbindungsstelle postuliert wurde. Neuere Modelle [KRUPKA, R.M., 1983; DEVES R. & KRUPKA R.M., 1990] verwerfen dieses Postulat, denn ebenso ein nicht-kompetitiver Hemmstoff könnte so hochaffin an die Transportbindungsstelle selbst binden, dass er vom Transportsubstrat nicht verdrängt werden kann, z.B. wenn durch die Hemmstoffbindung eine entsprechende Konformationsänderung erfolgt, die eine Bindung des Transportsubstrates verhindert. Ebenso ist eine nicht-kompetitive Hemmung denkbar wenn der Inhibitor von *trans* an die Transportbindungsstelle bindet [KRUPKA, R.M., 1983], den Transporter in dieser Orientierung blockiert und eine Substratbindung von *cis* somit verhindert. Gemeinsames Merkmal ist jedoch, dass ein nicht-kompetitiver Hemmstoff in der Regel selbst nicht transportabel ist. Anstatt kompetitive von nicht-kompetitiven Hemmstoffen zu unterscheiden, ist es daher sinnvoller, transportable von nicht-transportablen Hemmstoffen zu unterscheiden. Diese wiederum lassen sich voneinander einfach anhand des *trans*-Verhaltens unterscheiden: Ersterer führt zu einer *trans*-Stimulation, letzterer zu einer *trans*-Hemmung. Dies ist von Nutzen bei lipophilen Hemmstoffen und Substraten mit hoher Membranbindung, deren

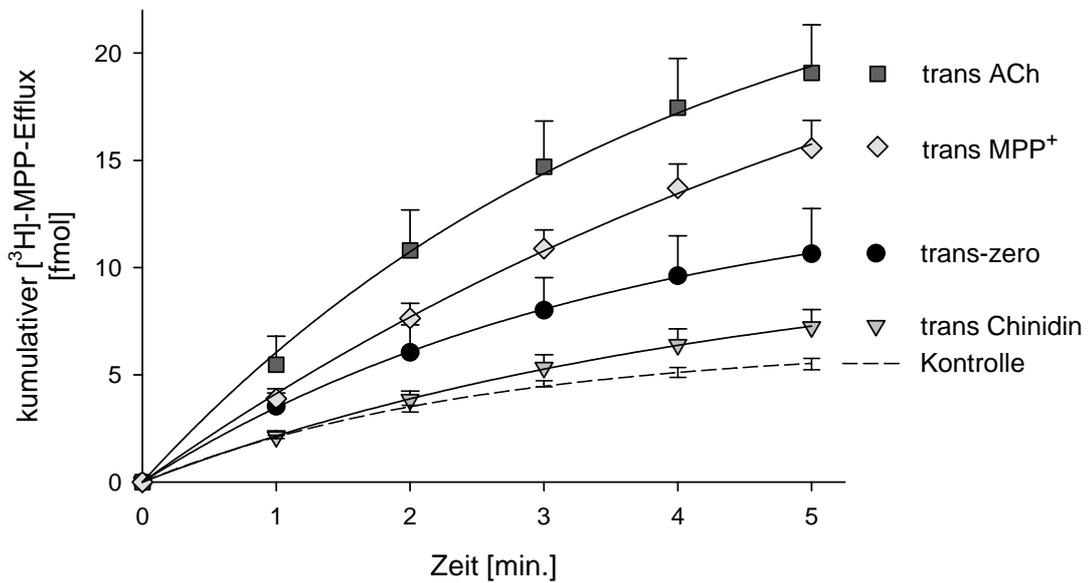


Abb. 22: *trans*-Stimulation des MPP-Effluxes via rOCT1 durch MPP (200 μ M), Acetylcholin (500 μ M) und Chinidin (40 μ M). Mittelwerte \pm S.E.M. (jeweils $n = 4$) des kumulativen [3 H]-MPP-Effluxes aus mit 120 fmol MPP vorinjizierten Oozyten. Der Efflux aus wasserinjizierten Kontrollozyten (*trans*-ACh, $n = 3$) ist als gestrichelte Linie orientierend dargestellt. Acetylcholin und MPP f"uhren zu einer *trans*-Stimulation, Chinidin zu einer *trans*-Hemmung des MPP-Transports.

Transportabilität sich im Tracerinflux nur schlecht untersuchen lässt, da der Hintergrund der unspezifischen Bindung eine transportvermittelte Aufnahme überdeckt. Dies ist zum Beispiel der Fall bei Chinidin und Acetylcholin. Im MPP-Efflux zeigt Acetylcholin (500 μM) eine *trans*-Stimulation, Chinidin (40 μM) dagegen eine *trans*-Hemmung (Abbildung 22). Somit ist Acetylcholin als transportabler („kompetitiver“), Chinidin als nicht transportabler („nicht-kompetitiver“) Hemmstoff zu klassifizieren.

Im Influx-Paradigma erfolgt die Wirkung von in die Badlösung zugegebenen Hemmstoffen gleichsinnig zur Transportrichtung (*cis*-Hemmung), während dies im Efflux-Paradigma gegensinnig der Fall ist (*trans*-Hemmung). Der Transporter wird hierbei jeweils in unterschiedlichen Phasen des Transportzyklus blockiert. Es ist vorstellbar, dass sich die Affinitäten von kompetitiven und nicht-kompetitiven Hemmstoffen unterscheiden, je nachdem von welcher Seite sie zugegeben werden, was als *cis-trans*-Asymmetrie zu bezeichnen wäre. Da Effluxversuche aus methodischen Gründen (siehe Kapitel 2.3.2) standardmäßig mit [^3H]-MPP durchgeführt wurden, mussten zur besseren Vergleichbarkeit die kinetischen Charakteristika der OCT-Hemmstoffe auf den Influx von MPP reevaluiert werden. Da im Efflux die *cis*-Konzentration von MPP deutlich unter dem K_M liegt (240 nM) und keine Vorinkubation des Hemmstoffs erfolgt, mussten vergleichbare Bedingungen auch für die *cis*-Hemmkinetiken im Influx-Paradigma geschaffen werden. Hierzu wurde die Abhängigkeit der Hemmung des Influxes von 240 nM [^3H]-MPP via rOCT1 von der Konzentration des ohne Vorinkubationszeit zugegebenen Hemmstoffs untersucht. Als nicht-kompetitive Hemmstoffe wurden Decynium22 Cyanin863, TPeA und Chinin eingesetzt. Die Relativhemmwerte wurden gegen die Inhibitorkonzentration halblogarithmisch aufgetragen und die Parameter des nicht-kompetitiven Michaelis-Menten-Inhibitionsmodells ermittelt. Die so erhaltenen *cis*- K_i -Werte sind aus Tabelle 8 ersichtlich.

Parallel dazu wurden Effluxversuche durchgeführt, bei denen der [^3H]-MPP-Auswärtstransport aus Oozyten durch Zugabe der oben genannten Hemmstoffe in unterschiedlicher Konzentration in die Badlösung (*trans*) gehemmt wurde. Die aus

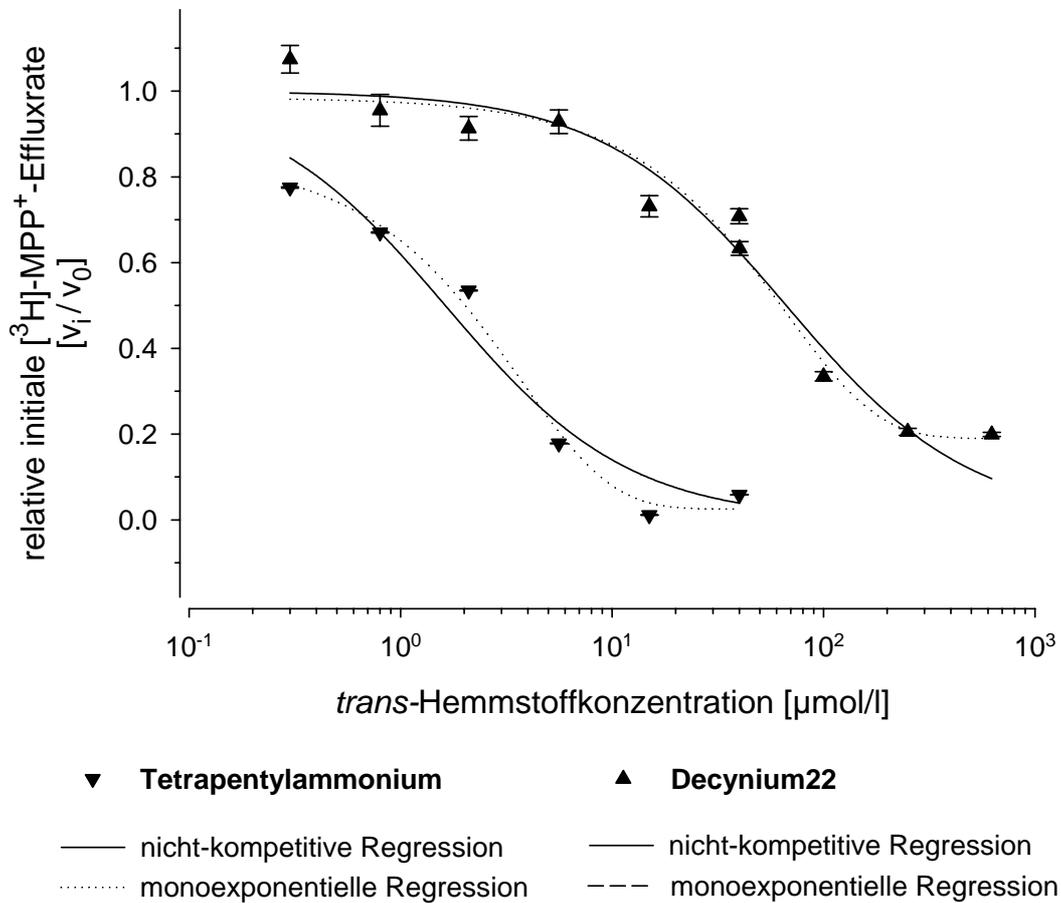


Abb. 23: Konzentrationsabhängigkeit der *trans*-Hemmung des MPP-Effluxes via rOCT1 durch Tetrabutylammonium (TPeA) und Decynium22. Die Mittelwerte \pm S.E.M. der initialen Raten des kumulativen $[^3\text{H}]\text{-MPP}$ -Effluxes aus mit 120 fmol $[^3\text{H}]\text{-MPP}$ vorinjizierten Oozyten (jeweils $n = 4$ bzw. 8) wurden um die endogene Effluxrate bereinigt und mit der *trans-zero*-Rate in Relation gesetzt. Bei Anpassung an das nicht-kompetitive Modell errechnen sich der $K_{i \text{ trans}}$ für TPeA von $1,63 \pm 0,28 \mu\text{M}$ bzw. für Decynium22 $66,6 \pm 9,2 \mu\text{M}$. Zum Vergleich betragen die aus monoexponentieller Anpassung errechneten IC_{50} $1,7 \pm 0,6 \mu\text{M}$ bzw. $67,2 \pm 12,5 \mu\text{M}$. Die mittleren rOCT1-spezifischen *trans-zero*-Raten betragen $3,27 \pm 0,14$ bzw. $2,07 \pm 0,05 \text{ fmol/min}$.

Hemmstoff	Hemmung des MPP-Transportes via rOCT1 Dissoziationskonstante [$\mu\text{mol/l} \pm \text{S.E.}$]	
	$K_i \text{ cis}$	$K_i \text{ trans}$
Decynium22	4,7 \pm 1,2	66,6 \pm 9,2
Cyanin863	5,6 \pm 0,5	21,9 \pm 6,5
TPeA	2,2 \pm 0,7	1,6 \pm 0,3
Chinin	48,5 \pm 17,8	2,1 \pm 0,4

Tab. 8: Vergleich der K_i -Werte von rOCT1 für nicht-kompetitive Inhibitoren in Abhängigkeit von der relativen Orientierung zur Transportrichtung. Ermittelt aus der nichtlinearen Anpassung der jeweiligen Hemmkinetik an das nicht-kompetitive Inhibitormodell. Gemessen wurde der Transport von [^3H]-MPP (Efflux bei *trans*, Influx bei *cis*) bei einer *cis*-Konzentration von 0,24 μM MPP ohne Vorinkubation des Hemmstoffs. Der von außen zugegebene Inhibitor hemmt in der *cis*-Bedingung den MPP-Influx gleichsinnig, in der *trans*-Bedingung den MPP-Efflux gegensinnig. Jede *cis*-Kinetik (Influx) wurde mit 8 Meßpunkten erstellt und pro Meßpunkt und Bedingung wurden jeweils 8 bis 10 Oozyten eingesetzt. Jede *trans*-Kinetik (Efflux) wurde mit 6 - 10 Meßpunkten erstellt und pro Meßpunkt und Bedingung wurden jeweils 3 bis 8 Oozyten eingesetzt. Angegeben ist der Standardfehler der nicht-kompetitiven Anpassung.

den Efflux-Kennlinien der einzelnen rOCT1-Oozyten errechneten initialen Raten wurden gegen die entsprechende Leckeffluxrate wasserinjizierter Kontrolloozyten korrigiert, mit der *trans-zero*-Rate in Relation gesetzt und die so erhaltenen Relativhemmwerte halblogarithmisch gegen die *trans*-Hemmstoffkonzentration aufgetragen. Die Kurven wurden an das nicht-kompetitive Inhibitionsmodell angepasst und *trans*-K_i-Werte errechnet. Diese sind in Tabelle 8 mit den entsprechenden *cis*-K_i-Werten direkt vergleichbar. Repräsentativ sind die *trans*-Hemmkinetiken für Decynium22 und TPeA in Abbildung 23 dargestellt.

Auffällig ist beim Vergleich der *cis*- und *trans*-Dissoziationskonstanten der nicht-kompetitiven Hemmstoffe, dass Decynium22 von der *trans*-Seite mit einer um eine Größenordnung niedrigeren Affinität hemmt, während dies bei Chinin umgekehrt ist, welches von *trans*, d.h. ohne direkte *cis*-Kompetition mit dem Transportsubstrat, mit über 20-fach höherer Affinität hemmt. Kein Unterschied in der Hemmaffinität findet sich dagegen für das aliphatische TPeA. Cyanin863 scheint am ehesten mit Decynium22 vergleichbar zu sein, wobei auch strukturelle Ähnlichkeiten bestehen (siehe Appendix). Die hieraus sich ergebenden Schlussfolgerungen für das Transportermodell von rOCT1 werden in Kapitel 4.2 diskutiert.

Dass die gezeigten Unterschiede – insbesondere im Fall von Chinin – auf unterschiedlichem Diffusionsverhalten der Hemmstoffe, sprich deren Lipophilität, beruhen, ist demgegenüber relativ unwahrscheinlich. Wäre dies der Fall, so müsste ein deutlicher Unterschied in den Hemmkonstanten von Chinin auf den MPP-Transport zu finden sein, wenn mit bzw. ohne Hemmstoffvorinkubation gemessen wird. Um dies auszuschließen wurden zwei Hemmkinetiken für Chinin auf den rOCT1-vermittelten Influx von 14 µM MPP erstellt: mit und ohne Chinin-Vorinkubation (14 min). Hierbei zeigt Chinin mit Vorinkubation eine Hemmkonstante K_i = 11,1 ± 3,0 µM, demgegenüber ist ohne Vorinkubation K_i = 11,9 ± 2,8 µM, was nicht signifikant verschieden ist. Warum diese Werte jedoch niedriger sind als bei einer MPP-Konzentration von 0,24 µM (siehe Tabelle 8) und wie der Unterschied zwischen den K_i-Werten von Chinin für *cis* und *trans* zu interpretieren ist, wird im Kapitel 4.2 ausführlich diskutiert.

4.

Diskussion

4.1 Unterschiede und Gemeinsamkeiten von hOCT2 und rOCT1

4.2 Symmetrie und Asymmetrie von rOCT1

4.1 Unterschiede und Gemeinsamkeiten von hOCT2 und rOCT1

Nach der Klonierung des Prototyps der Transporterfamilie für Organische Kationen, rOCT1 [GRÜNDEMANN D., 1994 (Diss.)], wurden mittels PCR zunächst zwei humane Homologe ermittelt und nachfolgend kloniert [GORBOULEV V. *et al.*, 1997]. Hiervon zeigte das hOCT2 genannte Konstrukt eine gute funktionelle Expression im *Xenopus*-Oozyten-System. Da eine Übertragung funktioneller Daten, die an rOCT1 aus der Ratte erhoben wurden, auf die Verhältnisse im Menschen nicht ohne weiteres zulässig ist, war eine eingehende funktionelle Charakterisierung von hOCT2 notwendig und von grundlegendem Interesse. Hinzu kommt, dass hOCT2 sequentiell dem Rattenhomolog rOCT2 näher steht als rOCT1 selbst.

Unterschiede in der Gewebeexpression und Organverteilung von rOCT1 und hOCT2 wurden in grundlegenden Arbeiten unserer Arbeitsgruppe veröffentlicht [GRÜNDEMANN D. *et al.*, 1994; GORBOULEV V. *et al.*, 1997; MEYER-WENTRUP F. *et al.*, 1998; BUSCH A.E. *et al.*, 1998; KARBACH U. *et al.*, 2000;]. Demnach ist rOCT1 in der sinusoidalen Membran von perivenösen Rattenhepatozyten und im proximalen Tubulus der Rattenniere exprimiert. Das direkte menschliche Homolog hOCT1 dagegen ist hauptsächlich in der Leber exprimiert während hOCT2 auf die Niere beschränkt ist und hier einerseits in der luminalen Membran von Epithelzellen des proximalen und distalen Tubulus lokalisiert ist [KOEPSELL H. *et al.*, 1998] andererseits aber auch in der basolateralen Membran des proximalen Tubulus des Cortex und des Markstreifens [MOTOHASHI H. *et al.*, 2002]. In der vorliegenden Arbeit konnten nun in funktioneller Hinsicht wesentliche Unterschiede und Gemeinsamkeiten von rOCT1 und hOCT2 ermittelt werden. Ein Vergleich der funktionellen Charakteristika des Rattenhomologs rOCT2 mit denen von rOCT1 wurde anderweitig publiziert [OKUDA M. *et al.*, 1999].

Transportspezifität

Die wesentliche Gemeinsamkeit von rOCT1 und hOCT2 ist die Polyspezifität für transportable organische Kationen. Strukturell unterschiedliche Kationen werden jedoch mit jeweils verschiedener Affinität transportiert. Hierbei ist insbesondere ein Aspartat an Stelle 475 bestimmend, wie kürzlich gezeigt werden konnte [GORBOULEV V. *et al.*, 1999]. Somit ist plausibel, dass es auch zwischen den Homologen rOCT1 und hOCT2 Unterschiede und Gemeinsamkeiten hinsichtlich der differenziellen Substrataffinität geben kann. Insofern zeigen hOCT2 und rOCT1 größenordnungsmäßig vergleichbare Affinitäten für TEA ($75,8 \pm 12,5$ bzw. 95 ± 10 μM) und NMN (298 ± 62 bzw. 403 ± 150 μM). Eine im Vergleich zu rOCT1 fast dreifach höhere Affinität zeigt hOCT2 für Cholin (210 ± 45 im Vergleich zu 620 ± 139 μM). Demgegenüber transportiert hOCT2 MPP, Histamin und vor allem Dopamin mit zum Teil wesentlich niedrigerer Affinität als rOCT1 (siehe Tabelle 4, Kapitel 3.2.1). In ähnlicher Weise finden sich Unterschiede und Gemeinsamkeiten hinsichtlich der Transportkapazität, d.h. der maximalen Transportgeschwindigkeit unter sättigenden Substratkonzentrationen. Im Vergleich zu rOCT1 zeigt hOCT2 für MPP eine gleich hohe, für TEA eine 2,2-fach, für Cholin eine 2,5-fach und für NMN sogar eine 2,7-fach höhere Transportkapazität (vgl. Tabelle 5, Kapitel 3.2.1).

Für das Substratspektrum von rOCT1 ergaben sich im Rahmen dieser Arbeit auch interessante neue Befunde. Zum ersten Mal konnte gezeigt werden dass Chinin von rOCT1 signifikant und cyaninhemmbar transportiert wird. Bislang war Chinin als nicht-kompetitiver Hemmstoff und als nicht transportabel klassifiziert. Von daher ergeben sich neue Schlussfolgerungen für den mutmaßlichen Hemmmechanismus von Chinin (siehe unten). Bemerkenswert ist weiterhin, dass rOCT1 auch das Dipeptid D-Phe-Ala transportiert, während hOCT2 dieses nicht als Substrat akzeptiert. Zum ersten Mal wurde somit in dieser Arbeit gezeigt, dass ein Transporter der OCT-Familie und generell ein nicht-gekoppelter Uniporter auch Peptide als zusätzliche Stoffklasse unter den Transportsubstraten akzeptiert. Bislang waren für den Transport von Peptiden die zu PepT1 homologen Proteine beschrieben [KOTTRA G. *et al.*, 2001], welche jedoch protonengekoppelte Austauscher sind. Das

Substratspektrum und die hier beschriebenen kinetischen Eigenschaften von hOCT2 und rOCT1 stehen in Einklang mit ihrer bislang vermuteten Funktion: Beide tragen wesentlich zur Homöostase von Metaboliten und zur Exkretion von Toxinen und Pharmaka auf hepatobiliärem und renalem Wege bei. Sie vermitteln hier den ersten Schritt der aktiven Sekretion organischer Kationen im Rahmen des transepithelialen Transports [KOEPEL H., 1998].

Zusätzlich wurde für hOCT2 auch die Expression in Neuronen gezeigt [BUSCH A.E. *et al.*, 1998], sodaß diesem auch eine Rolle in der Homöostase von Neurotransmittern im Zentralen Nervensystem zuzukommen scheint. Hierbei ist insbesondere an die Rückresorption von Neurotransmittern aus dem Interzellulärraum nach synaptischer Freisetzung zu denken. Tatsächlich vermittelt hOCT2 einen hochkapazitären, polyspezifischen und eher niederaffinen Transport von Monoamin-Neurotransmittern. Insbesondere für Histamin, Dopamin und Acetylcholin konnte ein hOCT2-spezifischer Transport gezeigt werden. Es ist zu vermuten, dass hOCT2 neben den höheraffinen und spezifischeren, natriumgekoppelten Neurotransmittercarriern in Glia und Neuronen einen globalen Reservemechanismus für die Rückresorption freigesetzter Neurotransmitter darstellt.

Der OCT-vermittelte Transport ist potentialabhängig und elektrogen [BUSCH A.E. *et al.*, 1996a]. Die nach Substratzugabe gemessenen Einwärtsströme wurden bislang immer als direktes Korrelat von Substrattransport interpretiert. Am Beispiel von rOCT1 konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass unter Sättigungsbedingungen eine auffällige Diskrepanz von gemessenen Strom und tatsächlichem Tracerflux besteht. Eine äquivalente Umrechnung von pro Zeiteinheit translozierten Ladungseinheiten in Stoffmengen ergibt einen drei- bis fünffach höheren Strom als durch den tatsächlichen Transport von organischen Kationen zu erwarten wäre. Daraus folgt, dass parallel zu der Transportaktivität von OCT eine Ionenleitfähigkeit besteht, über deren Regulation nur spekuliert werden kann. Denkbar ist dass kleine anorganische Ionen Lücken zwischen Bindungsstelle und gebundenem Transportsubstrat ausfüllen und mittransportiert werden. Hierzu passt auch, dass bei hOCT2 die Transport- bzw. Hemmfähigkeit schwacher Basen von

deren Ionisierungsgrad abhängt [BARENDT W.M. & WRIGHT S.H., 2002]. Ebenso wäre eine parallel zur Transportaktivität aktivierte Kanalfunktion des Proteins denkbar. Zunächst als Leckströme interpretierte Leitfähigkeitszustände („*conductive states*“) von Transportproteinen waren bereits bei natriumgekoppelten Neurotransmittercarriern beobachtet worden [MAGER S. *et al.*, 1994].

Hemmstoffspektrum

Nicht nur hinsichtlich der Transportsubstrate, sondern auch hinsichtlich der Hemmbarkeit durch organische Kationen besteht bei hOCT2 und rOCT1 eine differenzielle Polyspezifität. Eine Reihe typischer rOCT1-Hemmstoffe hemmen den hOCT2-vermittelten TEA-Transport mit höherer Affinität als den rOCT1-vermittelten (siehe Tabelle 6): Es sind dies Tetramethylammonium (für hOCT2 2,8-fach höhere Affinität als für rOCT1), Pancuronium (2,9-fach), NMN (3,3-fach) und MPP (4,9-fach). Demgegenüber zeigt hOCT2 gegenüber anderen Substanzen eine deutlich geringere Hemmbarkeit als rOCT1: Hierzu gehören Mepiperphenidol (3,2-fach höhere Hemmkonstante für hOCT2), Procainamid (6,9-fach), Chinin (7,2-fach), Tetrapentylammonium (8-fach) Desipramin (12-fach) und 3-O-Methyl-Isoprenalin mit 21-facher Hemmkonstante. Relativ gut vergleichbar sind dagegen die Affinitäten für die beiden Fluoreszenzfarbstoffe Decynium22 (1,9-fach höhere Affinität für hOCT2) und Cyanin863 (1,5-fach höhere Affinität bei rOCT1).

Von besonderer Bedeutung ist die Hemmbarkeit des hOCT2-vermittelten Dopamin-Transportes durch Amantadin. Da hOCT2 auch in Neuronen exprimiert wird und dort wohl an der globalen Rückresorption von Neurotransmittern mitwirkt, könnte dieser Mechanismus auch zumindest eine Teilkomponente des Wirkmechanismus von Amantadin in der Behandlung des dopaminergen Defizits bei Parkinson-Syndromen darstellen: Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß sich der Transport von Dopamin durch hOCT2 mit Amantadin recht hochaffin ($K_i = 46,4 \pm 7,2 \mu\text{M}$, wenn von nicht-kompetitiver Hemmung ausgegangen wird) hemmen lässt.

Hierdurch könnte es zu einer Erhöhung von Dopamin im Interzellulärraum und somit auch im synaptischen Spalt kommen, wodurch Therapieeffekte erklärbar wären.

Bezüglich Chinin ergibt sich aus den vorliegenden Ergebnissen die Notwendigkeit zur kritischen Reevaluation des zugrundeliegenden Inhibitionsmechanismus. Nachdem in dieser Arbeit erstmals die Transportabilität von Chinin via rOCT1 gezeigt werden konnte, erklären sich bislang schwer interpretierbare elektrophysiologische Befunde. Von Busch [BUSCH A.E. *et al.*, 1996a] und Nagel [NAGEL G. *et al.*, 1997, BUDIMAN T. *et al.*, 2000] waren rOCT1-spezifische Einwärtsströme bei Superfusion von Oozyten mit Chinin beobachtet worden. Diese waren zunächst durch eine Hemmung eines endogenen Effluxes von Kationen interpretiert worden. Angesichts der Transportabilität von Chinin ist nun davon auszugehen, dass zumindest eine Komponente des beobachteten Stroms tatsächlich transportbedingt ist. Befunde, dass Chinin nach dem nicht-kompetitiven Inhibitionsmodell hemmt [ARNDT P. *et al.*, 2001], sind hierbei nicht als widersprüchlich anzusehen. Bereits andernorts war beschrieben, dass ein kompetitiver Hemmstoff auch nicht-kompetitiv hemmen kann, und zwar durch Bindung an die Substratbindungsstelle auf der Gegenseite von der Substratzugabe (*trans*-Inhibition) [KRUPKA R.M., 1983; DEVES R. & KRUPKA R.M., 1983 und 1990]. Somit wäre naheliegend, dass Chinin nach intrazellulär transportiert wird und von innen eine nicht-kompetitiv erscheinende *trans*-Hemmung des Influxes organischer Kationen bewirkt. Da Chinin von OCT wohl hochaffin transportiert wird, ist auch plausibel, warum die Hemmkonstanten (auf den MPP-Transport) für Chinin bei Zugabe von außen mit und ohne Vorinkubation nicht wesentlich verschieden sind ($K_i = 11,0 \pm 3,0$ gegenüber $11,9 \pm 2,8 \mu\text{M}$). Zur weiteren Klärung wären vergleichende elektrophysiologische Untersuchungen an Oozytenmembranpatches in *inside-out* und *outside-out* Orientierung sinnvoll.

***trans*-Effekte**

Bislang war nur vermutet aber nicht bewiesen worden, dass rOCT1 als Uniporter funktioniert und transstimulierbar ist [GRÜNDEMANN D., 1994 (Diss.)]. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. rOCT1 vermag in *trans-zero*-Situation Substrate zu translozieren und ist nicht an ein obligates Austauschsubstrat für die Reorientierung in den Ausgangszustand gebunden. Sättigende Konzentrationen transportabler Substrate bewirken dagegen eine bis zu 2,4-fache Transstimulation des Transportes. Gleichermäßen konnte für hOCT2 Funktionalität unter *trans-zero*-Bedingung und Transstimulierbarkeit gezeigt werden. Somit sind hOCT2 und rOCT1 als Uniporter zu klassifizieren und sind keine obligat gekoppelten Austauscher. Beide Vertreter der OCT-Familie sind außerdem *trans*-hemmbar durch nicht-kompetitive Hemmstoffe wie z.B. Cyanin863. In analoger Weise wurde mittlerweile auch für das humane rOCT1-Homolog hOCT1 nach Expression in HeLa-Zellen dessen Trans-Stimulierbarkeit gezeigt [ZHANG L. *et al.*, 1998b]

4.2 Symmetrie und Asymmetrie von rOCT1

rOCT1 ist als Transportprotein für organische Kationen in seiner organspezifischen Lokalisation an gerichteten transepithelialen Substrattransportprozessen beteiligt. In der Niere vermittelt rOCT1 den ersten Schritt der Sekretion von Metaboliten oder Xenobiotika. In der Leber vermittelt rOCT1 die Aufnahme von zu metabolisierenden oder biliär zu eliminierenden Substanzen aus dem sinusoidalen Blut [KOEPSELL H., 1998]. Der Nettotransport in beiden Fällen muß streng von extrazellulär intrazellulär gerichtet sein. Von dieser Funktionalität ausgehend ist eine gewisse funktionelle (nicht notwendigerweise morphologische) Asymmetrie des Transporters zu erwarten. Mithilfe des Vergleichs funktioneller Charakteristika des rOCT1-vermittelten Transports im Influx mit dem als Methode neu eingeführten Efflux war diese Hypothese erstmals überprüfbar.

Zunächst ergibt sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit eine directionale Asymmetrie von rOCT1. Bei direkt vergleichbaren Transportbedingungen liegt die ermittelte initiale Transportrate für MPP im Influx bei 40,7 fmol/min, während die gleiche Rate im Efflux mit ca. 8,6 fmol/min fast um den Faktor 5 geringer ist. Selbst unter der Annahme, dass rOCT1 im Influxparadigma unter maximaler *trans*-Stimulation durch intrazelluläre endogene Transportsubstrate läuft, während im Efflux-Paradigma eine *trans-zero*-Situation vorliegt, ist der Unterschied zwischen Einwärts- und Auswärtstransport größer als der alleine durch *trans*-Stimulation zu erwartende Effekt, welcher maximal eine 2,23-fache Steigerung des Transports erbringt (siehe Kapitel 3.4). In ähnlicher Weise ist der Einwand denkbar, dass rOCT1 im Effluxparadigma von im Oozytendotter enthaltenen potentiellen endogenen organischen Kationen kompetitiv gehemmt wird. Aufgrund der Cholinsubstitution während der Kulturphase der in Influx und Efflux verwendeten Oozyten ist jedoch für beide Transportrichtungsparadigmen von einer gleichen intrazellulären CholinKonzentration auszugehen, welche aufgrund der Sättigungssituation die

Wirkung potentieller endogener Substrate nivelliert und ausgleicht. Somit liegt sowohl im Efflux- wie im Influxparadigma die gleiche potentielle Konkurrenz vor. Demnach ist eine eventuelle kompetitive Hemmung in beiden Transportrichtungen gleich und kann vernachlässigt werden.

Aus den Ergebnissen ist zu folgern, dass OCT selbst unter maximaler *trans*-Stimulation (in beide Richtungen) von außen nach innen mindestens doppelt so schnell transportiert als von innen nach außen, was mit seiner Aufnahmefunktion bei basolateraler Lokalisation in sezernierenden Epithelien in plausibler Weise konform ist. Im Gegensatz hierzu wäre beispielsweise für einen apikal oder luminal lokalisierten Transporter, welcher ebenfalls zur Netto-Sekretion von Substanzen beitragen soll, eine bevorzugte Transportrichtung von innen nach außen zu erwarten. Für letztere Transporter wird dies auch dadurch realisiert, dass diese meist protonengekoppelte Austauscher sind, deren direktionale Asymmetrie extern vom bestehenden H^+ -Gradienten festgelegt ist.

Bezüglich des Phänomens der *trans*-Stimulation läßt sich die Hypothese aufstellen, dass sie über die gleiche Bindungsstelle vermittelt wird wie der Substrattransport selbst. Dies ergibt sich aus der Beobachtung, dass die Stimmulationskonstante für die *trans*-Stimulation des MPP-Effluxes durch MPP ($12,4 \pm 7,2 \mu\text{M}$) sehr nahe beim K_M für den MPP-Influx ($9,6 \pm 1,5 \mu\text{M}$) liegt. Auch scheint (zumindest bei rOCT1) die *cis*-Hemmung des TEA-Transportes durch MPP die gleiche Bindungsstelle zu benutzen, da der entsprechende K_i ebenfalls dem K_M für MPP sehr nahe kommt. Dies spricht für sich alleine bereits für die kompetitive Natur der Hemmung durch MPP. Demgegenüber scheinen bei hOCT2 die Bindungsstellenverhältnisse nicht vergleichbar einfach zu sein. Hier findet sich ein K_i für die Hemmung des TEA-Transports durch MPP ($2,68 \pm 0,62 \mu\text{M}$) weit unterhalb des K_M -Wertes für den MPP-Transport ($19,4 \pm 2,5 \mu\text{M}$), während für NMN beide Werte identisch sind ($K_i = 299 \pm 34 \mu\text{M}$ bzw. $K_M = 298 \pm 62 \mu\text{M}$). Es ist zu vermuten, dass bei hOCT2 ein komplexerer Inhibitionsmechanismus für MPP vorliegt, z.B. über zwei differente Bindungsstellen oder Bindungszustände. Allgemein ist hervorzuheben, dass in der vorliegenden Arbeit mit dem Ausdruck

„Bindungsstelle“ keine topologische Aussage bezüglich der Proteinstruktur von OCT getroffen werden kann. Es ist darunter vielmehr ein funktionell umschriebener Bereich oder Zustand des Transporters zu verstehen.

Für das Bindungsverhalten gegenüber nicht-kompetitiven Hemmstoffen zeigt rOCT1 eine auffällige, erstmals im Rahmen dieser Arbeit beschriebene *cis-/trans*-Asymmetrie. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindungsstellen für den gleichen Inhibitor unterschiedliche Dissoziationskonstanten („Affinitäten“) aufweisen können, je nachdem in welchem Orientierungs- oder Beladungszustand sich der Transporter befindet. Es scheint eine Abhängigkeit der Hemmstoffbindung von der (hierzu) relativen Transportrichtung vorzuliegen. Für Decynium22 konnte beispielsweise gezeigt werden, dass es ein weitaus affinerer *cis*-Inhibitor als *trans*-Inhibitor darstellt: Von außen zugegebenes Decynium22 hemmt den MPP-Influx *cis* mit $K_i = 4,7 \pm 1,2 \mu\text{M}$, während es den MPP-Efflux von *trans* nur mit $K_i = 66,6 \pm 9,2 \mu\text{M}$ hemmt. Systemimmanent kann letztendlich nicht differenziert werden, ob direkt kompetitive oder allosterische Mechanismen hierfür verantwortlich sind. Es ist einerseits denkbar, dass die Bindungsstelle für einen Hemmstoff nur dann freigelegt und zugänglich wird, wenn eine Konformationsänderung des Transporters in die entsprechende Richtung erfolgt. Für den Fall von Decynium22 würde dies bedeuten, dass von außen zugegebenes Decynium22 nur dann an seine Bindungsstelle binden kann, wenn diese zusammen mit der Substratbindungsstelle nach außen orientiert wird. Diese Orientierung nach außen erfolgt schneller oder häufiger, wenn das Transportsubstrat außen in höherer Konzentration vorliegt. In diesem Modell würde auch die endogene *trans*-Stimulation im Influx ihren Platz finden. Durch endogene cytosolische Substrate erfolgt eine schnellere Rückorientierung (im beladenen Zustand) nach außen, sodaß der von außen zugegebene *cis*-Hemmstoff öfter Gelegenheit zur Bindung erhält. Dieses Modell impliziert, dass die Transportbindungsstelle und die Hemmstoffbindungsstelle sich gegenseitig beeinflussen, zumindest in ihrer jeweiligen Zugänglichkeit. Ein reines allosterisches Modell, wie bislang verbreitet, erscheint somit überholt.

Es ist andererseits auch vorstellbar, dass ein von *cis* angebotener Hemmstoff zunächst mit dem Transportsubstrat um eine Bindungsstelle kompetieren muß bevor er seine Hemmwirkung zu entfalten vermag, die durchaus in der Summe nicht-kompetitiv sein kann. Dies wäre z.B. der Fall wenn der Inhibitor zunächst auf die andere (*trans*) Membranseite transloziert werden müsste um von dort über eine zweite Bindungsstelle zu hemmen [KRUPKA R.M., 1983]. In diesem Fall müsste die Dissoziationskonstante für die *cis*-Hemmung höher sein als für die *trans*-Hemmung des gleichen Inhibitors. Auffälligerweise trifft genau dieser Sachverhalt für Chinin zu: Sein *cis*- K_i liegt mit $48,5 \pm 17,8 \mu\text{M}$ gut 20-fach über dem *trans*- K_i ($2,1 \pm 0,4 \mu\text{M}$, jeweils gemessen bei $0,24 \mu\text{M}$ [^3H]-MPP und ohne Chinin-Vorinkubation). Dies bedeutet, dass Chinin seine hemmende Wirkung zumindest zum wesentlichen Anteil von der intrazellulär gelegenen oder der *trans*-Seite von rOCT1 entfaltet. Hieraus ergibt sich jedoch die Frage wie Chinin dorthin gelangt, passiv *per diffusionem* oder durch Transport. Zur Klärung dieser Frage ist zum einen die Beobachtung hilfreich, dass Chinin tatsächlich transportiert wird, was bislang aufgrund der hohen unspezifischen Membranbindung des Tracersubstrats schwierig detektierbar war. Zum anderen ist der Befund wichtig, dass Chinin bei einer höheren Konzentration des Transportsubstrates (MPP) rOCT1 besser hemmt als bei einer niedrigen. In Kapitel 3.4 wurde gezeigt, dass Chinin den MPP-Transport von *cis* bei einer MPP-Konzentration von $14 \mu\text{M}$ unabhängig von einer Chinin-Vorinkubation mit $K_{i \text{ cis}} = 11,1 \pm 3,0 \mu\text{M}$ (mit Vorinkubation) bzw. $K_{i \text{ cis}} = 11,9 \pm 2,8 \mu\text{M}$ (ohne Vorinkubation) hemmt. Somit ist eine passive Diffusion des lipophilen Chinin durch die Zellmembran auf die Innenseite nicht entscheidend. Beide Hemmkonstanten liegen jedoch auffälligerweise um den Faktor 4 niedriger als bei einer *cis* MPP-Konzentration von $0,24 \mu\text{M}$. Dies ist mit einer eventuellen Kompetition zwischen Chinin und MPP nicht zu erklären (In einem solchen Falle müsste die Hemmkonstante bei einer niedrigeren Transportsubstratkonzentration niedriger sein als bei einer hohen.). Sehr wohl jedoch dadurch, dass der Transporter bei der höheren MPP-Konzentration schneller transportiert und dabei auch mehr Chinin nach intrazellulär verschiebt. So wird intrazellulär eine höhere Chinin-Konzentration erreicht und Chinin hemmt von der intrazellulären Transporterseite aus besser. Dies

bedeutet, dass die eigentliche Bindungsstelle für Chinin auf der intrazellulären Seite von rOCT1 liegt. In Übereinstimmung mit diesem Modell wäre auch die Hypothese zu verwerfen, dass der Unterschied in den *cis*- und *trans*- Hemmkonstanten von Chinin allein auf dem unterschiedlichen Transstimulationsstatus des Transporters bezüglich MPP beruht. Im Efflux transportiert OCT in *trans-zero*-Situation langsamer, die Reorientierungsfrequenz ist niedriger und somit werden dem auf der Außenseite (*trans*) vorliegenden Hemmstoff Chinin weniger häufig Bindungsstellen präsentiert als unter Transstimulation. Demnach müsste die Hemmkonstante von Chinin in der *trans*-Situation eher höher sein als in von *cis*, wenn alleine Transstimulationseffekte diesen Unterschied erzeugen sollten. Demgegenüber sind am ehesten Konkurrenzeffekte denkbar, was wiederum darauf hinweist, dass der rOCT1-vermittelte Transport für die Hemmwirkung von Chinin entscheidend ist. In der *cis*-Situation wird weniger Chinin von außen nach innen zur eigentlichen Chinin-Bindungsstelle transportiert, da Chinin für den Einwärtstransport zunächst mit MPP kompetieren muß. Deshalb ist die effektive hemmende Chinin-Konzentration intrazellulär geringer. Demgegenüber ist in der *trans*-Situation rOCT1 auf dem „Rückweg“ von außen nach innen, d.h. nach Abschluß eines halben Transportzyklus von innen nach außen) unbeladen und kann bei jedem Transportzyklus Chinin nach innen transportieren, sodaß die intrazellulär erreichte effektive Hemmkonzentration von Chinin höher ist. Innen hemmt Chinin jedoch nicht-kompetitiv und konkurriert dort somit nicht mit dem intrazellulären Chinin um eine Bindungsstelle.

Durch den neuartigen Mechanismus der transportseitenabhängigen Hemmung von Chinin wären auch einige der elektrophysiologischen Beobachtungen [NAGEL G. *et al.*, 1997] erklärt. Letztendlich ist am Oozytensystem nicht definitiv klärbar, ob diese Asymmetrie durch die Transportrichtung selbst oder durch die Membraninsertion des Transportproteins festgelegt ist. Störend wirkt sich hierbei aus, dass die zytosolische Seite der Oocyte nicht frei kontrollierbar ist. Auch hierzu wäre z.B. ein *excised-patch*-Versuchsansatz mit *inside-out* bzw. *outside-out*-Orientierung hilfreich.

5.

Zusammenfassung

rOCT1 und hOCT2 sind zwei homologe Transportproteine für organische Kationen, die in Niere und Leber den ersten Schritt der transepithelialen Sekretion von Metaboliten und Xenobiotika vermitteln. Eines ihrer wesentlichen Charakteristika ist neben der Potentialabhängigkeit die Polyspezifität hinsichtlich Transportsubstraten und Hemmstoffen. Beide Transporter können als Uniporter klassifiziert werden, d.h. sie besitzen keine obligate Kopplung an ein Austausch- oder Cosubstrat wie z.B. Natrium, Protonen oder andere organische Kationen. Darüberhinaus zeigen sie das für Transportproteine typische und von Kanälen distinkte Charakteristikum der *trans*-Stimulierbarkeit.

Mit rOCT1 konnten erstmals für einen Prototypen der Transportersuperfamilie SLC22 nähere Aufschlüsse über den Transportmechanismus erhalten werden. Zum einen wurde nachgewiesen, daß rOCT1 eine direktionale Asymmetrie besitzt, d.h. unter Sättigungsbedingungen besteht eine kinetische Bevorzugung der Transportrichtung von extra- nach intrazellulär um den Faktor zwei bis fünf. Zum anderen wurden anhand von rOCT1 neue Erkenntnisse zum Bindungs- und Interaktionsverhalten von Hemmstoffen und Transportsubstraten in Abhängigkeit von der Transportrichtung gewonnen. Hierbei erscheint das bisherige Modell von topologisch festgelegter kompetitiver und allosterischer Hemmung zu stark vereinfacht und nicht zutreffend. Die Bindung von Transportsubstraten und die dadurch induzierten Konformationsänderungen scheinen selbst die Bindungseigenschaften von Hemmstoffen in mehreren Zuständen zu beeinflussen. Auch scheinen Transport- und Ionenleitfähigkeit von OCT zu differenzieren zu sein.

Zur Klärung der Fragestellungen wurde das Expressionsmodell *Xenopus*-Oozyte durch die Etablierung der sogenannten Effluxmethodik funktionell und methodisch wesentlich erweitert.

6.

Literatur

- ARNDT P., VOLK C., GORBOULEV V., BUDIMAN T., POPP C., ULZHEIMER-TEUBER I., AKHOUNDOVA A., KOPPATZ S., BAMBERG E., NAGEL G. & KOEPESELL 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**, F454-F468
- BARENDT W.M. & WRIGHT S.H. (2002) The human organic cation transporter (hOCT2) recognizes the degree of substrate ionization. *J.Biol.Chem.* **277**, 22491-22496.
- BESSEGHIR K., CHATTON J.-Y. & ROCH-RAMEL F. (1990b) Transport of the organic cation N1-methylnicotinamide by the rabbit proximal tubule. II. Reabsorption and secretion in the isolated perfused tubule. *J Pharmacol Exp Ther* **253**, 452-460.
- BESSEGHIR K., MOSIG D. & ROCH-RAMEL F. (1990a) Transport of the organic cation N1-methylnicotinamide by the rabbit proximal tubule. I. Accumulation in the isolated nonperfused tubule. *J Pharmacol Exp Ther* **253**, 444-451.
- BORST-PAUWELS G.W. (1993) Mutual interaction of ion uptake and membrane potential. *Biochim Biophys Acta* **1145**, 15-24.
- BUDIMAN T., BAMBERG E., KOEPESELL H. & NAGEL G. (2000) Mechanism of Electrogenic Cation Transport by the Cloned Organic Cation Transporter 2 from Rat. *J.Biol.Chem.* **275**, 29413-29420.
- BURCKHARDT G. & WOLFF N.A. (2000) Structure of renal organic anion and cation transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* **278**, F853-F866
- BUSCH A.E., KARBACH U., MISKA D., GORBOULEV V., AKHOUNDOVA A., VOLK C., ARNDT P., ULZHEIMER J.C., SONNERS M.S., BAUMANN C., WALDEGGER S., LANG F. & KOEPESELL H. (1998) Human Neurons Express the Polyspecific Cation Transporter hOCT2, Which Translocates Monoamine Neurotransmitters, Amantadine, and Memantine. *Mol Pharmacol* **54**, 342-352.
- BUSCH A.E., QUESTER S., ULZHEIMER J.C., GORBOULEV V., AKHOUNDOVA A., WALDEGGER S., LANG F. & KOEPESELL H. (1996b) Monoamine neurotransmitter transport mediated by the polyspecific cation transporter rOCT1. *FEBS Letters* **395**, 153-156.

- BUSCH A.E., QUESTER S., ULZHEIMER J.C., WALDEGGER S., GORBOULEV V., ARNDT P., LANG F. & KOEPESELL H. (1996a) Electrogenic Properties and Substrate Specificity of the Polyspecific Rat Cation Transporter rOCT1. *J.Biol.Chem.* **271**, 32599-32604.
- DAVID C., RUMRICH G. & ULLRICH K.J. (1995) Luminal transport system for H⁺/organic cations in the rat proximal tubule. Kinetics, dependence on pH; specificity as compared with the contraluminal organic cation-transport system. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* **430**, 477-492.
- DEVES R. & KRUPKA R.M. (1983) Apparent noncompetitive inhibition of choline transport in erythrocytes by inhibitors bound at the substrate site. *J Membrane Biol* **74**, 183-189.
- DEVES R. & KRUPKA R.M. (1990) A simple test for the sidedness of binding of transport inhibitors. *Biochim Biophys Acta* **1030**, 24-31.
- 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.
- ESKANDARI S., WRIGHT E.M., KREMAN M., STARACE D.M. & ZAMPIGHI G.A. (1998) Structural analysis of cloned plasma membrane proteins by freeze-fracture electron microscopy. *PNAS* **95**, 11235-11240.
- FAUTH C., ROSSIER B. & ROCH-RAMEL F. (1988) Transport of tetraethylammonium by a kidney epithelial cell line (LLC-PK1). *Am J Physiol* **254**, F351-F357
- GORBOULEV V., ARNDT P., ULZHEIMER J.C. & KOEPESELL H. (1996) Identification of genes which are homologous to the organic cation transporter OCT1. *Biol Chem* **377**, S26-Meeting abstract
- GORBOULEV V., ULZHEIMER J.C., AKHOUNDOVA A., ULZHEIMER-TEUBER I., KARBACH U., QUESTER S., BAUMANN C., LANG F., BUSCH A.E. & KOEPESELL 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. & KOEPESELL H. (1999) Selectivity of the Polyspecific Cation Transporter rOCT1 Is Changed by Mutation of Aspartate 475 to Glutamate. *Mol Pharmacol* **56**, 1254-1261.
- GROOTHUIS G.M.M. & MEIJER D.K.F. (1996) Drug traffic in the hepatobiliary system. *J Hepatol* **24**, 3-28.
- GROVES C.E., EVANS K.K., DANTZLER W.H. & WRIGHT S.H. (1994) Peritubular organic cation transport in isolated rabbit proximal tubules. *Am J Physiol* **266**, F450-F458

-
- GROVES C.E. & WRIGHT S.H. (1995) Tetrapentylammonium (TPeA): slowly dissociating inhibitor of the renal peritubular organic cation transporter. *Biochim Biophys Acta* **1234**, 37-42.
- GRÜNDEMANN, DIRK (1994): Klonierung und Charakterisierung des basolateralen Transporters für organische Kationen aus der Rattenniere durch funktionelle Expression in Oozyten von *Xenopus laevis*. Fachbereich Biochemie, Pharmazie und Lebensmittelchemie der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main. (Dissertation).
- GRÜNDEMANN D., GORBOULEV V., GAMBARYAN S., VEYHL M. & KOEPSSELL H. (1994) Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. *Nature* **372**, 549-552.
- GRÜNDEMANN D. & KOEPSSELL H. (1994) Ethidium bromide staining during denaturation with glyoxal for sensitive detection of RNA in agarose gel electrophoresis. *Anal Biochem* **216**, 459-461.
- GRÜNDEMANN D., LIEBICH G., KIEFER N., KÖSTER S. & SCHÖMIG E. (1999) Selective Substrates for Non-Neuronal Monoamine Transporters. *Mol Pharmacol* **56**, 1-10.
- GRÜNDEMANN D., SCHECHINGER B., RAPPOLD G.A. & SCHÖMIG E. (1998) Molecular identification of the corticosterone-sensitive extraneuronal catecholamine transporter. *Nat Neurosci.* 1998 Sep;1(5):349-51. *Nature Neuroscience* **1**, 349-351.
- HERNÁNDEZ J.A. (1998) Simple carrier kinetics in complex membrane transporters. *J Membrane Biol* **165**, 235-242.
- INUI K.-I., MASUDA S. & SAITO H. (2000) Cellular and molecular aspects of drug transport in the kidney. *Kidney International* **58**, 944-958.
- ITO S. (1999) Drug secretion systems in renal tubular cells: functional models and molecular identity. *Pediatr Nephrol* (1999) **13**:980-988 **13**, 980-988.
- JUNG H. (2001) Towards the molecular mechanism of Na⁺/solute symport in prokaryotes. *Biochim Biophys Acta* **1505**, 131-143.
- KARBACH U., KRICKE J., MEYER-WENTRUP F., GORBOULEV V., VOLK C., LOFFING-CUENI D., KAISLING B., BACHMANN S. & KOEPSSELL H. (2000) Localization of organic cation transporters OCT1 and OCT2 in rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* **279**, F679-F687
- KEKUDA R., PRASAD P.D., WU X., WANG H., FEI Y.J., LEIBACH F.H. & GANAPATHY V. (1998) Cloning and functional characterization of a
-

- potential-sensitive, polyspecific organic cation transporter (OCT3) most abundantly expressed in placenta. *J.Biol.Chem.* **273**, 15971-15979.
- KOEHLER M.R., GORBOULEV V., KOEPESELL H., STEINLEIN C. & SCHMID M. (1996) Roct1, a rat polyspecific transporter gene for the excretion of cationic drugs, maps to chromosome 1q11-12. *Mamm Genome* **7**, 247-248.
- KOEHLER M.R., WISSINGER B., GORBOULEV V., KOEPESELL H. & SCHMID M. (1997) The two human organic cation transporter genes SLC22A1 and SLC22A2 are located on chromosome 6q26. *Cytogenet Cell Genet* **79**, 198-200.
- KOEPESELL H. (1998) Organic Cation Transporters in Intestine, Kidney, Liver, and Brain. *Annu.Rev.Physiol.* **60**, 243-266.
- KOEPESELL H., GORBOULEV V., ARNDT P., ULZHEIMER J.C. & KARBACH U. (1996) Cloning of organic cation transporters from kidney and liver. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* **431**, R24
- KOEPESELL H., BUSCH A.E., GORBOULEV V. & ARNDT P. (1998) Structure and Function of Renal Organic Cation Transporters. *News in Physiological Sciences* **13**, 11-16.
- KOEPESELL H., GORBOULEV V. & ARNDT P. (1999) Molecular Pharmacology of Organic Cation Transporters in Kidney. *J Membrane Biol* **167**, 103-117.
- KOTTRA G. & DANIEL H. (2001) Bidirectional electrogenic transport of peptides by the proton-coupled carrier PEPT1 in *Xenopus laevis* oocytes: its asymmetry and symmetry. *J Physiol* **536**, 495-503.
- KOTTRA G., STAMFORT A. & DANIEL H. (2002) PEPT1 as a paradigm for membrane carriers that mediate electrogenic bidirectional transport of anionic, cationic and neutral substrates. *J.Biol.Chem.* **277**, 32683-32691.
- KRUPKA R.M. (1983) The kinetics of transport inhibition by noncompetitive inhibitors. *J Membrane Biol* **74**, 175-182.
- LANG F., WALDEGGER S., SÜSSBRICH H., ULZHEIMER J.C., GORBOULEV V., KOEPESELL H. & BUSCH A.E. (1996) Electrogenic transport of organic cations and bases by the renal organic cation transporter OCT1. *Biol Chem* **377**, S28-Meeting abstract
- LANGSTON J.W., FORNO L.S., REBERT C.S. & IRWIN I. (1984) 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺): Identification of a metabolite of MPTP, a toxin selective to the substantia nigra. *Neurosci.Lett.* **48**, 87-92.
- MAGER S., MIN C., HENRY D.J., CHAVKIN C., HOFFMAN B.J., DAVIDSON N. & LESTER H.A. (1994) Conducting States of a Mammalian Serotonin Transporter. *Neuron* **12**, 845-859.

-
- MEYER-WENTRUP F., KARBACH U., GORBOULEV V., ARNDT P. & KOEPESELL 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.-I. (2002) Gene expression levels and immunolocalization of organic ion transporters in the human kidney. *J Am Soc Nephrol* **13**, 866-874.
- NAGEL G., VOLK C., FRIEDRICH T., ULZHEIMER J.C., BAMBERG E. & KOEPESELL 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.-I. (1996) cDNA Cloning and Functional Expression of a Novel Rat Kidney Organic Cation Transporter, OCT2. *Biochem Biophys Res Comm* **224**, 500-507.
- OKUDA M., URAKAMI Y., SAITO H. & INUI K.-I. (1999) Molecular mechanisms of organic cation transport in OCT2-expressing *Xenopus* oocytes. *Biochim Biophys Acta* **1417**, 224-231.
- OUDE ELFERINK R.P., MEIJER D.K.F., KUIPERS F., JANSEN P.L., GROEN A.K. & GROOTHUIS G.M.M. (1995) Hepatobiliary secretion of organic compounds; molecular mechanisms of membrane transport. *Biochim Biophys Acta* **1241**, 215-268.
- PAO S.S., PAULSEN I.T. & SAIER M.H., Jr. (1998) Major Facilitator Superfamily. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **62**, 1-34.
- PAVLOVA A., SAKURAI H., LECLERCQ B., BEIER D.R., YU A.S.L. & NIGAM S.K. (2000) Developmentally regulated expression of organic ion transporters NKT (OAT1), OCT1, NLT (OAT2), and Roct. *Am J Physiol Renal Physiol* **278**, F635-F643
- PIRCH T., QUICK M., NIETSCHKE M., LANGKAMP M. & JUNG H. (2002) Sites Important for Na⁺ and Substrate Binding in the Na⁺/Proline Transporter of *Escherichia coli*, a Member of the Na⁺/Solute Symporter Family. *J.Biol.Chem.* **277**, 8790-8796.
- PLAGEMANN P.G., WOHLHUETER R.M. & ERBE J. (1982) Nucleoside transport in human erythrocytes. A simple carrier with directional symmetry and differential mobility of loaded and empty carrier. *J.Biol.Chem.* **257**, 12069-12074.
- PRITCHARD J.B. & MILLER D.S. (1993) Mechanisms Mediating Renal Secretion of Organic Anions and Cations. *Physiol Rev* **73**, 765-796.
-

- PRITCHARD J.B. & MILLER D.S. (1997) Renal Secretion of Organic Cations: a Multistep Process. *Adv Drug Deliv Rev* **25**, 231-242.
- RUSS H., ENGEL W. & SCHÖMIG E. (1993b) Isocyanines and pseudoisocyanines as a novel class of potent noradrenaline transport inhibitors: synthesis, detection, and biological activity. *J Med Chem* **36**, 4208-4213.
- RUSS H., GLIESE M., SONNA J. & SCHÖMIG E. (1992) The extraneuronal transport mechanism for noradrenaline (uptake₂) avidly transports 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺). *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* **346**, 158-165.
- RUSS H., SONNA J., KEPPLER K., BAUNACH S. & SCHÖMIG E. (1993a) Cyanine-related compounds: a novel class of potent inhibitors of extraneuronal noradrenaline transport. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **348**, 458-465.
- SACHS L. (1992) *Angewandte Statistik*. 7. Aufl., Berlin, Springer Verlag
- SAIER M.H., Jr. (2000) A Functional-Phylogenetic Classification System for Transmembrane Solute Transporters. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **64**, 354-411.
- SAIER M.H., Jr. & PAULSEN I.T. (2001) Phylogeny of multidrug transporters. *Semin Cell Dev Biol* **12**, 205-213.
- SCHÖMIG E., BABIN-EBELL J. & RUSS H. (1993) 1,1'-diethyl-2,2'-cyanine (decynium₂₂) potently inhibits the renal transport of organic cations. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **347**, 379-383.
- SIGEL E. (1990) Use of *Xenopus* oocytes for the functional expression of plasma membrane proteins. *J Membrane Biol* **117**, 201-221.
- SOKOL P.P., HOLOHAN P.D. & ROSS C.R. (1987) The neurotoxins 1-methyl-4-phenylpyridinium and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine are substrates for the organic cation transporter in renal brush border membrane vesicles. *J Pharmacol Exp Ther* **242**, 152-157.
- SOMOGYI A.A., RUMRICH G., FRITZSCH G. & ULLRICH K.J. (1996) Stereospecificity in contraluminal and luminal transporters of organic cations in the rat renal proximal tubule. *J Pharmacol Exp Ther* **278**, 31-36.
- SONDERS M.S. & AMARA S.G. (1996) Channels in transporters. *Current Opinion in Neurobiology* **6**, 294-302.
- STEEN H., MEREMA M. & MEIJER D.K.F. (1992) A multispecific uptake system for taurocholate, cardiac glycosides and cationic drugs in the liver. *Biochem Pharmacol* **44**, 2323-2331.

-
- STEIN W.D. (1990) *Channels, Carriers, and Pumps; An Introduction to Membrane Transport*. San Diego, Academic Press.
- SUGAWARA-YOKOO M., URAKAMI Y., KOYAMA H., FUJIKURA K., MASUDA S., SAITO H., NARUSE T., INUI K.-I. & 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**, 175-180.
- TAKANO M., KATSURA T., TOMITA Y., YASUHARA M. & HORI R. (1993) Transport mechanism of choline in rat renal brush-border membrane. *Biol.Pharm.Bull.* **16**, 889-894.
- TAMAI I., OHASHI R., NEZU J.i., SAI Y., KOBAYASHI D., OKU A., SHIMANE M. & TSUJI A. (2000) Molecular and Functional Characterization of Organic Cation/Carnitine Transporter Family in Mice. *J.Biol.Chem.* **275**, 40064-40072.
- TEUBER, ISABEL (2002): Untersuchung zur Charakterisierung des organischen Kationentransporters OCT1 von Mensch und Ratte. Medizinische Fakultät der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg. (Dissertation).
- ULLRICH K.J., PAPAVALASSIOU F., DAVID C., RUMRICH G. & FRITZSCH G. (1991) Contraluminal transport of organic cations in the proximal tubule of the rat kidney. I. Kinetics of N1-methylnicotinamide and tetraethylammonium, influence of K⁺, HCO₃⁻, pH; inhibition by aliphatic primary, secondary and tertiary amines and mono- and bisquaternary compounds. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* **419**, 84-92.
- ULLRICH K.J. & RUMRICH G. (1992) Renal contraluminal transport systems for organic anions (paraaminohippurate, PAH) and organic cations (N1-methylnicotinamide, NMeN) do not see the degree of substrate ionization. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* **421**, 286-288.
- ULLRICH K.J., RUMRICH G., NEITELER K. & FRITZSCH G. (1992) Contraluminal transport of organic cations in the proximal tubule of the rat kidney. II. Specificity: anilines, phenylalkylamines (catecholamines), heterocyclic compounds (pyridines, quinolines, acridines). *Pflügers Arch - Eur J Physiol* **420**, 29-38.
- VAN MONTFOORT J.E., MULLER M., GROOTHUIS G.M.M., MEIJER D.K.F., KOEPEL H. & MEIER P.J. (2001) Comparison of "Type I" and "Type II" Organic Cation Transport by Organic Cation Transporters and Organic Anion-Transporting Polypeptides. *J Pharmacol Exp Ther* **298**, 110-115.
- VERHAAGH S., SCHWEIFER N., BARLOW D.P. & ZWART R. (1999) Cloning of the mouse and human solute carrier 22a3 (Slc22a3/SLC22A3) identifies a
-

conserved cluster of three organic cation transporters on mouse chromosome 17 and human 6q26-q27. *Genomics* **55**, 209-218.

WRIGHT E.M., LOO D.D.F., TURK E. & HIRAYAMA B.A. (1996) Sodium cotransporters. *Current Opinion in Cell Biology* **8**, 468-473.

WRIGHT S.H. & WUNZ T.M. (1987) Transport of tetraethylammonium by rabbit renal brush-border and basolateral membrane vesicles. *Am J Physiol* **253**, F1040-F1050

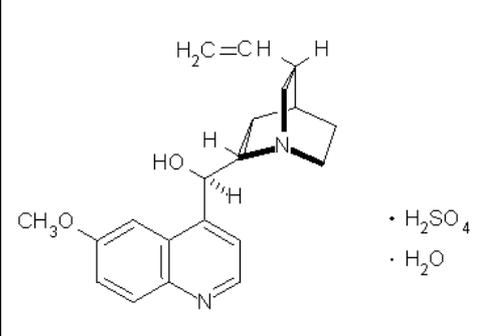
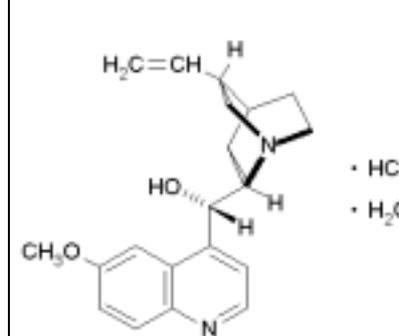
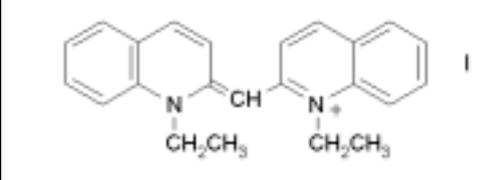
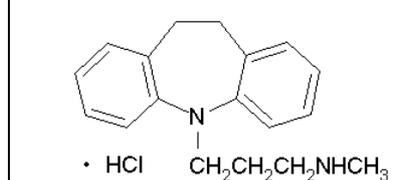
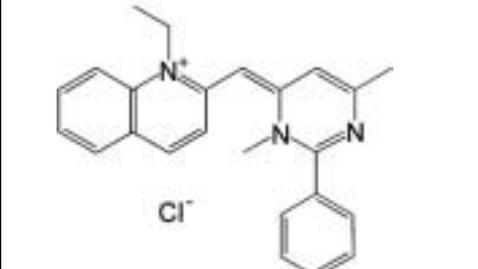
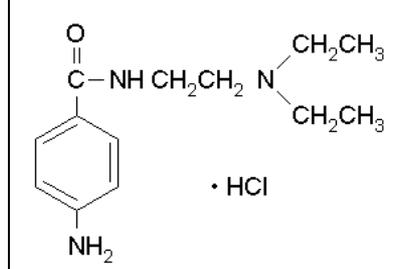
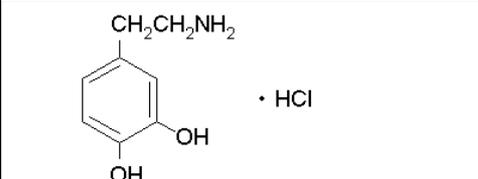
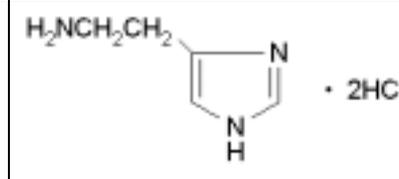
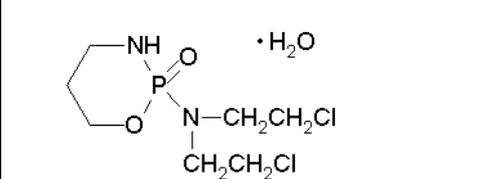
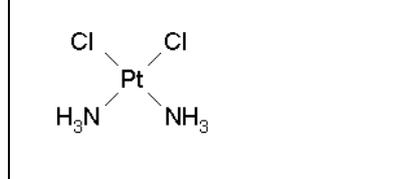
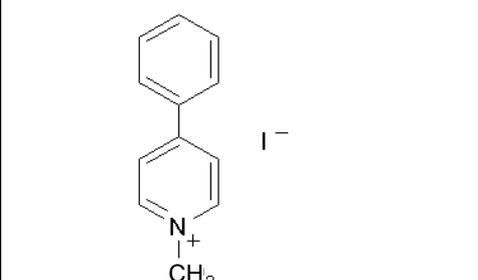
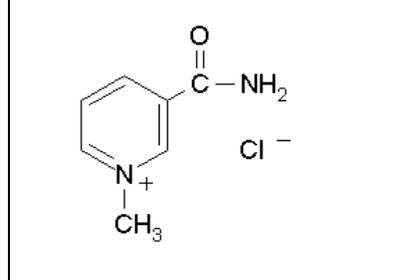
WU X., HUANG W., GANAPATHY M.E., WANG H., KEKUDA R., CONWAY S.J., LEIBACH F.H. & GANAPATHY V. (2000) Structure, function, and regional distribution of the organic cation transporter OCT3 in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* **279**, F449-F458

WU X., KEKUDA R., HUANG W., FEI Y.J., LEIBACH F.H., CHEN J., CONWAY S.J. & GANAPATHY V. (1998) Identity of the Organic Cation Transporter OCT3 as the Extraneuronal Monoamine Transporter (uptake2) and Evidence for the Expression of the Transporter in the Brain. *J.Biol.Chem.* **273**, 32776-32786.

ZHANG L., BRETT C.M. & GIACOMINI K.M. (1998a) Role of Organic Cation Transporters in Drug Absorption and Elimination. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **38**, 431-460.

ZHANG L., SCHANER M.E. & GIACOMINI K.M. (1998b) Functional Characterization of an Organic Cation Transporter (hOCT1) in a Transiently Transfected Human Cell Line (HeLa). *J Pharmacol Exp Ther* **286**, 354-361.

7. Appendix

Chinin		Chinidin	
Decynium22		Desipramin	
Cyanin863		Procainamid	
Dopamin		Histamin	
Cyclophosphamid		Cisplatin	
MPP		NMN	

Cortico-steron		Cholin	
Taurocholat		Acetyl- cholin	
TPeA		TMA	
Pancuro- nium		TEA	
d-Tubo- curarin		Spermin	
Isoprenalin		Amantadin	

Danksagung

Für die Betreuung, Einlernung in die Methodik und hilfreiche Unterstützung bei der experimentellen Arbeit danke ich Frau Dr. Maike Veyhl, für die Bereitstellung der OCT-Klone und Hilfestellung bei den molekularbiologischen Arbeiten danke ich Herrn Dr. V. Gorboulev und Frau Dr. A. Akhoundova. Für technische Unterstützung danke ich Frau I. Schatz, und für die Tierpflege Frau Engel, alle Anatomisches Institut I, Würzburg.

Für die fruchtbare Kooperation auf elektrophysiologischem Gebiet danke ich den Herren PD Dr. Andreas Busch und Dr. Stefan Bröer, damals Physiologisches Institut der Universität Tübingen.

Herrn Prof. Dr. H. Koepsell danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, die verständnisvolle und geduldige Betreuung und Diskussion der Arbeit.

Nicht zuletzt danke ich auch meinen Eltern und meiner Partnerin María del Carmen Roldán Pareja für das geduldige Verständnis und Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit.

Lebenslauf

Am 31. März 1972 wurde ich als Sohn von Günter Ulzheimer, Maschinenbaumeister, und Roswitha Ulzheimer, Bankkauffrau, in Erlenbach am Main geboren. 1978 - 82 besuchte ich die Grundschule in Großheubach, 1982 – 1991 das Johannes-Butzbach-Gymnasium Miltenberg, wo ich im Juli 1991 die Allgemeine Hochschulreife erwarb. 1991 bis 1992 leistete ich den Zivildienst bei der Caritas-Sozialstation Miltenberg.

Vom Wintersemester 1992/93 bis zum Sommersemester 1999 studierte ich Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, wo ich 1994 die Ärztliche Vorprüfung und im Juni 1999 den dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ablegte. Von Wintersemester 1999/2000 bis Sommersemester 2002 Immatrikulation zur Promotion im Fach Humanmedizin. Am 18. Juli 1996 Heirat mit Isabel Teuber, Trennung im September 1999 und Scheidung am 24. Juli 2001. Von Juli 1999 bis Dezember 2000 Arzt im Praktikum an der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg, am 1.1.2001 Approbation als Arzt, seit Januar bin ich Arzt in Weiterbildung an der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg.

Würzburg, den 5.11.2002

Jochen C. Ulzheimer