

**Identifizierung einer Aminosäure im Transportweg
des organischen Kationentransporters 1, deren Mutation
Strukturänderungen beim Transport beeinflusst**

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

vorgelegt von
Brigitte Egenberger
aus Ludwigshafen

Würzburg 2012

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Erstgutachter : Prof. Dr. Hermann Koepsell

Zweitgutachter: Prof. Dr. Rainer Hedrich

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

INHALTSVERZEICHNIS

1. ZUSAMMENFASSUNG.....	1
1.1. Zusammenfassung.....	1
1.2. Summary.....	3
2. EINLEITUNG.....	5
2.1. Die organischen Kationentransporter	5
2.1.1. Struktur der organischen Kationentransporter	8
2.1.2. Substratbindung und Translokation organischer Kationentransporter.....	9
2.1.3. rOCT1(10ΔCys), eine Cystein-Substitutionsmutante	15
2.2. Zielsetzung.....	17
3. MATERIAL & METHODEN.....	18
3.1. Materialien	18
3.1.1. Chemikalien	18
3.1.2. Radioaktive Chemikalien	18
3.1.3. Enzyme, kommerzielle Puffer und Marker	18
3.1.4. Reagenziensets (Kits).....	19
3.1.5. Lösungen, Puffer und Medien	19
3.1.6. Biologische Materialien.....	21
3.1.6.1. Bakterienstämme.....	21
3.1.6.2. Zellen.....	22
3.1.6.3. Südafrikanische Krallenfrösche (<i>Xenopus laevis</i>).....	22
3.1.7. Software	22
3.2. Methoden	22
3.2.1. Molekularbiologische Methoden	22
3.2.1.1. Herstellung der rOCT1-Konstrukte	22
3.2.1.2. Präparation und Linearisierung der cDNA	23

3.2.1.3.	RNA-Synthese durch <i>in vitro</i> Transkription.....	24
3.2.2.	Expression und Analyse von rOCT1-Mutanten in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	25
3.2.2.1.	Präparation und Injektion der <i>X. laevis</i> Oozyten	25
3.2.2.2.	Messungen der Substrataufnahme der <i>X. laevis</i> Oozyten.....	26
3.2.3.	Proteinbiochemische Methoden.....	27
3.2.3.1.	Präparation der Membranfraktion von <i>X. laevis</i> Oozyten.....	27
3.2.3.2.	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	27
3.2.3.3.	Western-Blot-Analyse	28
3.2.4.	Elektrophysiologische Messungen	29
3.2.4.1.	Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC)	29
3.2.4.2.	Bestimmung der Membrankapazitäten.....	30
3.2.4.3.	Cystein-spezifische Markierung der rOCT1-Mutanten	30
3.2.4.4.	Zwei-Elektroden-Spannungsklemme-Fluorometrie	31
3.2.5.	Expression und Analyse von rOCT1-Mutanten in Human Embryonic Kidney-293 (HEK293)-Zellen.....	33
3.2.5.1.	Zellkultur	33
3.2.5.2.	Messungen der Substrataufnahme der HEK293-Zellen.....	33
3.2.5.3.	Bindungsmessungen in HEK293-Zellen.....	34
3.2.6.	Berechnungen und Statistiken	35
4.	ERGEBNISSE	36
4.1.	Identifizierung von Positionen in rOCT1, die spannungsabhängige Fluoreszenzänderungen zeigen	36
4.1.1.	Charakterisierung der spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen in TMH 5, 8 und 11.....	39
4.1.2.	Funktionelle Charakterisierung der Cysteinmutanten rOCT1(10ΔCys-P260C), rOCT1(10ΔCys-F380C) und rOCT1(10ΔCys-F483C)	42

4.1.3.	Einfluss des Fluoreszenzfarbstoffs TMR6M auf die funktionellen Eigenschaften der Cysteinmutanten rOCT1(10ΔCys-P260C), rOCT1(10ΔCys-F380C) und rOCT1(10ΔCys-F483C).....	45
4.2.	Blockierung des Transportwegs von rOCT1(10ΔCys)	48
4.2.1.	rOCT1 und rOCT1(10ΔCys) transportieren MTSET	48
4.2.2.	Identifizierung einer Cysteinmutante, durch die der Transport von rOCT1(10ΔCys) irreversibel blockiert werden kann.....	49
4.2.3.	Durch die Mutation in Position 478 wird die Transportgeschwindigkeit von rOCT1 erniedrigt.....	52
4.2.4.	Einfluss des Cysteins 478 auf die K_m - und IC_{50} -Werte verschiedener organischer Kationen	53
4.2.5.	TMA und Cholin hemmen die kovalente Modifizierung des Cystein 478 durch MTSET.....	55
4.2.6.	Die Zugänglichkeit des Cysteins 478 ist spannungsabhängig	57
4.2.7.	Das Cystein 478 ist von außen zugänglich	58
4.2.8.	Durch die Modifizierung mit MTSET wird die Mutante rOCT1(10ΔCys-G478C) vollständig inhibiert.....	59
4.2.9.	Durch die Modifikation von rOCT1(10ΔCys-G478C) wird die Bindung von MPP blockiert.....	62
4.3.	Spannungsabhängige Fluoreszenzänderungen von rOCT1 werden durch die Position 478 beeinflusst	64
4.3.1.	Der Austausch des Glycins 478 durch ein Cystein verändert die Bewegungen in den Positionen 260 und 483	64
4.3.2.	Funktionelle Charakterisierung der Cysteindoppelmutanten rOCT1(10ΔCys-P260C-G478C), rOCT1(10ΔCys-F380C-G478C) und rOCT1(10ΔCys-F483C-G478C)	65
4.3.3.	Die Aktivität der Mutante rOCT1(10ΔCys-G478C) wird durch den Fluoreszenzfarbstoff TMR6M nicht beeinflusst.....	68

4.3.4.	Verifizierung des Einflusses der Aminosäure in der Position 478 auf die spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen von rOCT1.....	69
4.3.5.	Die Mutationen in der Position 478 beeinflussen die Geschwindigkeit der spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen.....	71
4.3.6.	Die Blockierung des Transportwegs von rOCT1 durch MTSET verändert die spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen in Position 380.....	73
4.3.7.	Die Blockierung des Transportwegs von rOCT1 durch MTSET verändert die kationenabhängigen Fluoreszenzänderungen in Position 380 und 483.....	74
4.3.8.	Keine Beeinflussung der Geschwindigkeit der kationenabhängigen Fluoreszenzänderungen durch die Mutationen in der Position 478.....	79
4.3.9.	MTSET hat keinen Einfluss auf die spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen der Einzelmutanten.....	81
5.	DISKUSSION.....	86
5.1.	Identifizierung von spannungsabhängigen Konformationsänderungen.....	87
5.2.	Spannungsabhängige Konformationsänderungen in Anwesenheit von organischen Kationen.....	89
5.3.	Blockierung des Transportwegs von rOCT1.....	91
5.4.	Beeinflussung der spannungsabhängigen Konformationsänderungen nach Mutation des Glycins in Position 478.....	97
5.5.	Beeinflussung der spannungsabhängigen Konformationsänderungen nach Mutation des Glycins 478 in Anwesenheit von organischen Kationen.....	99
5.6.	Beeinflussung der spannungsabhängigen Konformationsänderungen nach Blockierung des Transportwegs von rOCT1.....	100
6.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	105
7.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	108
8.	REFERENZEN.....	111
9.	DANKSAGUNG.....	121
	Eidesstattliche Erklärung.....	122

1. ZUSAMMENFASSUNG

1.1. Zusammenfassung

Die organischen Kationentransporter der SLC22-Familie spielen eine Schlüsselrolle bei der Aufnahme, Ausscheidung und Verteilung vieler kationischer Medikamente und endogener Substanzen. Der erste klonierte organische Kationentransporter rOCT1 (OCT1 aus der Ratte) wurde bisher eingehend funktionell charakterisiert. rOCT1 ist elektrogen, transportiert organische Kationen unterschiedlicher Struktur wie z.B. Cholin, Tetraethylammonium (TEA) oder das Neurotoxin 1-Methyl-4-Phenylpyridinium (MPP) und wird durch verschiedene Substanzen wie beispielsweise Tetrabutylammonium (TbUA) inhibiert. Für die Entwicklung und Optimierung von Medikamenten ist ein besseres Verständnis der strukturellen Grundlage der polyspezifischen Substraterkennung und des Transportprozesses von entscheidender Bedeutung. Durch modellgestützte Mutagenese konnte für rOCT1 ein großer Spalt identifiziert werden, der von acht Transmembranhelices (TMHs) geformt wird und die putative Substratbindungstasche mit überlappenden Bindungsdomänen beinhaltet.

Mittels der „Voltage-Clamp-Fluorometrie“ können Konformationsänderungen von rOCT1 während des Transportzyklus sichtbar gemacht werden. Unter Verwendung dieser Methode wurden spannungsabhängige Fluoreszenzänderungen in den Positionen 260, 380 und 483 der TMHs 5, 8 und 11 nachgewiesen. Interaktionen mit den Substraten Cholin und MPP sowie dem nicht transportierten Inhibitor TbUA von außen wirkten sich unterschiedlich auf die Bewegungen in den drei Positionen aus. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass rOCT1 spannungsabhängige Konformationen einnimmt, bei deren Änderungen sich mindestens drei Transmembrandomänen (TMH 5, TMH 8 und TMH 11) bewegen und dass in Gegenwart von organischen Kationen die Spannungsabhängigkeit der Transporterkonformation beeinflusst wird.

Des Weiteren wurde eine kritische Position innerhalb oder nahe der Substratbindungstasche von rOCT1 identifiziert, mit deren Hilfe der Transportweg irreversibel blockiert werden kann. In Position 478 wurde das Glycin durch ein Cystein ersetzt, das mittels des SH-Gruppenreagenzes [2-(Trimethylammonium)ethyl] methanethiosulfonat Bromid (MTSET) kovalent modifiziert werden konnte. Diese Modifikation bewirkte eine starke Hemmung des Transports verschiedener Substrate wie z.B. Cholin, TEA oder MPP. Anhand von

Bindungsstudien konnte gezeigt werden, dass die Bindung von MPP durch die MTSET-Modifizierung in der nach außen gerichteten Konformation verhindert wurde.

Die Einführung des Cysteins in Position 478 erhöhte die Affinität von TBuA und beeinflusste außerdem die substrat- und spannungsabhängigen Konformationsänderungen. Hierbei zeigte sich, dass in zwei der drei Positionen (260 und 483) die Fluoreszenzantwort des leeren Transporters verändert wurde. Neben den Fluoreszenzen im Gleichgewichtszustand wurden auch die Zeitkonstanten der Fluoreszenzantworten durch die Position 478 beeinflusst. Durch die Einführung eines Serins oder Threonins in diese Position konnten die Effekte des Cysteins 478 in Position 483 nachgeahmt werden. Die Blockierung des Transportwegs durch MTSET veränderte die Bewegungen des leeren Transporters in Position 260 und 483 kaum, während in Position 380 eine deutliche Reduktion der Fluoreszenzantwort gemessen wurde. Auch die substratabhängigen Fluoreszenzänderungen wurden in der Position 483 deutlich reduziert.

Insgesamt weisen diese Daten darauf hin, dass rOCT1 Konformationsänderungen durchläuft, die spannungs- und substratabhängig sind und durch die Position 478 beeinflusst werden.

1.2. Summary

Organic cation transporters of the SLC22-family play a pivotal role in the absorption, elimination and distribution of many cationic drugs and endogenous compounds. The first cloned organic cation transporter rOCT1 (rat OCT1) was extensively characterized. rOCT1 is electrogenic and transports a variety of organic cations with very different structures e.g. choline, tetraethylammonium (TEA) and the neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP). In addition rOCT1 is inhibited by various compounds such as tetrabutylammonium (TBA). For the development and optimization of drugs it is fundamental to understand the structural basics of polyspecific substrate binding and of the transport process. By using model-based mutagenesis, a large cleft of rOCT1 was identified, which is formed by eight transmembrane helices (TMH) and contains the putative substrate binding pocket with overlapping binding domains.

Conformational changes of rOCT1 during the transport cycle can be identified by using the “voltage-clamp-fluorometry” technique. Employing this method, potential-dependent fluorescence changes were identified in the positions 260, 380 and 483 in the TMHs 5, 8 and 11. Interactions of the substrates choline and MPP as well as the non-transported inhibitor TBA acting from the outside, had an individual influence on the movements at these three positions. The results demonstrate that rOCT1 adopts different potential-dependent conformations and that at least three different transmembrane domains (TMH 5, TMH 8 and TMH 11) move during the conformational changes. Additionally, the results suggest that the potential-dependence of the transporter’s conformations is influenced by the presence of organic cations.

Furthermore, a critical position was identified within or close to the substrate binding pocket of rOCT1. By modification of this position the transport pathway could be blocked. The replacement of glycine 478 with cysteine allows a covalent modification of this cysteine with an SH-group reagent [2-(Trimethylammonium)ethyl] methanethiosulfonate bromide (MTSET). This modification inhibited the transport of several substrates such as choline, TEA or MPP. With the help of binding studies, we could show that the binding of MPP in the outward facing conformation was prevented by the modification with MTSET.

The introduction of cysteine in position 478 increased the affinity of TBA and also influenced the substrate- and potential-dependent conformational changes. Specifically, it

was found that the fluorescence response of the empty transporter changed in two of three positions (260 and 483). Apart from the fluorescence in the state of equilibrium, the time constants of the fluorescence responses were also influenced by the position 478. The effects of cysteine 478 could be mimicked in position 483 by the introduction of a serine or threonine in position 478. The blockage of the transport pathway by MTSET hardly changed the movement of the empty transporter in positions 260 and 483, whereas a clear reduction of the fluorescence response was measured in position 380. Additionally, the substrate-dependent fluorescence changes were reduced clearly in position 483.

In conclusion, the data indicate that rOCT1 undergoes conformational changes, which are substrate- and potential-dependent and are influenced by the position 478.

2. EINLEITUNG

2.1. Die organischen Kationentransporter

Hydrophile Moleküle benötigen aufgrund ihrer geringen Membranpermeabilität ein Transportsystem, welches den Übertritt durch die Zytoplasmamembran ermöglicht. Erst durch die Entwicklung molekularbiologischer Techniken konnten die seit langem postulierten Transportsysteme für organische Ionen in Hepatozyten und proximalen Tubulozyten identifiziert werden (Ullrich, 1976; Giacomini et al., 1988; Boyer et al., 1992). Im Jahr 1994 wurde in unserer Arbeitsgruppe der erste organische Kationentransporter aus der Rattenniere (rOCT1) durch Expressionsklonierung entdeckt und beschrieben (Gründemann et al., 1994). Dies war der erste Vertreter einer bis zu diesem Zeitpunkt noch unbekannteren Transporterfamilie. Wenig später wurden zwei weitere homologe Transporter OCT2 und OCT3 kloniert und beschrieben (Okuda et al., 1996; Kekuda et al., 1998). Alle drei Subtypen konnten in der Ratte (Gründemann et al., 1994; Okuda et al., 1996; Kekuda et al., 1998), in der Maus (Schweifer und Barlow, 1996; Mooslehner und Allen, 1999), im Menschen (Gorboulev et al., 1997; Zhang et al., 1997b; Gründemann et al., 1998a) sowie OCT1 im Kaninchen (Terashita et al., 1998) und OCT2 im Kaninchen und Schwein (Gründemann et al., 1997; Zhang et al., 2002) kloniert werden. Zusätzlich wurde eine funktionell aktive Isoform von rOCT1 (rOCT1A) und von humanen OCT2 (hOCT2B) nachgewiesen (Zhang et al., 1997a; Urakami et al., 2002).

Im Menschen sind die Gene von OCT1-OCT3 auf dem Chromosom 6q26-27 lokalisiert (Koehler et al., 1997; Gründemann et al., 1998a); in der Ratte findet man diese Gene auf dem Chromosom 1q11-12 (Koehler et al., 1996). Die prozentuale Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen der jeweiligen OCTs innerhalb einer Spezies beträgt für OCT1/OCT2 67-70 %, OCT1/OCT3 47-57 % und OCT2/OCT3 49-51 % (Koepsell et al., 2003).

Die OCT-Subtypen sind in einer großen Zahl unterschiedlicher Gewebe exprimiert und weisen eine überlappende Gewebeverteilung auf, die in den letzten Jahren detailliert analysiert und dokumentiert wurde (Koepsell et al., 2007; Okabe et al., 2008). Zusammenfassend zeigte sich, dass im Menschen OCT1 am stärksten in der Leber exprimiert wird (Gorboulev et al., 1997; Nishimura und Naito, 2005; Nies et al., 2009), während in der Ratte die stärkste Expression von OCT1 in Leber, Niere und Dünndarm zu finden ist (Gründemann et al., 1994). In Ratte und Mensch konnte das OCT1-Protein in der

basolateralen Membran von Hepatozyten nachgewiesen werden (Meyer-Wentrup et al., 1998; Nies et al., 2008) und vermittelt unter anderem den ersten Schritt hepatischer Exkretion kationischer Arzneistoffe und Xenobiotika (Koepsell, 2004). OCT2 ist hauptsächlich in der Niere aber auch in verschiedenen anderen Organen wie im Dünndarm, in der Lunge oder im Gehirn exprimiert (Gorboulev et al., 1997; Busch et al., 1998; Lips et al., 2005). In der Ratte und im Menschen konnte das OCT2-Protein in der basolateralen Membran der proximalen Tubulozyten lokalisiert werden (Karbach et al., 2000; Sugawara-Yokoo et al., 2000; Motohashi et al., 2002) und vermittelt u. a. den ersten Schritt der renalen Exkretion kationischer Medikamente (Koepsell 2004). Das breiteste Expressionsmuster ist bei OCT3 zu finden. Im Menschen tritt die stärkste Expression von OCT3 in der Skelettmuskulatur, in der Leber, in der Plazenta, im Herzen und im Gehirn auf (Gründemann et al., 1998b; Hayer-Zillgen et al., 2002; Müller et al., 2005; Sata et al., 2005; Nies et al., 2009). Außerdem ist OCT3 im Gegensatz zu OCT1 und OCT2 neben der Expression in Epithelzellen und Neuronen auch in Muskelzellen und in Gliazellen anzutreffen (Kristufek et al., 2002; Inazu et al., 2003; Shang et al., 2003; Haag et al., 2004; Cui et al., 2009).

Aufgrund von deutlichen Sequenzhomologien werden die organischen Kationentransporter heute mit zwei weiteren Transportergruppen in der „solute carrier“²²-Familie (SLC22) zusammengefasst (Koepsell et al., 2003; Koepsell und Endou, 2004). Die beiden weiteren Gruppen bestehen aus den Mitgliedern der Carnitin-Kationentransporter (OCTN1-3), die am Transport des Zwitterions Carnitin und auch am Transport organischer Kationen beteiligt sind (Tamai et al., 1997; Tamai et al., 1998), sowie aus den Mitgliedern der organischen Anionentransporter (OAT1-7), die unter anderem eine wichtige Rolle bei der tubulären Sekretion organischer Anionen spielen (Rizwan und Burckhardt, 2007; Klaassen und Aleksunes, 2010). Die SLC22-Familie stellt ihrerseits eine Untergruppe der „major facilitator“-Superfamilie (MFS) dar. Sie besteht aus Uniportern, Symportern und Antiportern von Prokaryoten, einfachen Eukaryoten, Pflanzen und Säugern und macht neben der „ATP-binding cassette“ (ABC)-Superfamilie die größte Gruppe von Transportern aus (Pao et al., 1998; Koepsell et al., 2003).

Unabhängig von dem Subtyp oder der Spezies ist den organischen Kationentransportern gemeinsam, dass sie eine Fülle von verschiedenen organischen Kationen unterschiedlicher Struktur transportieren, deren Molekulargewicht nicht größer als 500 Da und deren Durchmesser nicht größer als 4 Å ist (Schmitt und Koepsell, 2005). Zu den Substraten der

OCTs gehören typischerweise organische Kationen mit einer positiven Ladung; transportierte endogene Substrate sind z.B. Cholin sowie einige Monoaminneurotransmitter (Koepsell et al., 2003; Nies et al., 2011). Auch Substanzen mit zwei positiven Ladungen wie z.B. Paraquat, Furamidin oder Pentamidin werden als Substrat akzeptiert (Chen et al., 2007; Ming et al., 2009). Neben permanent geladenen Kationen können auch schwache Basen wie z.B. Cimetidin, die bei physiologischem pH-Wert positiv geladen sind, transportiert werden (Barendt und Wright, 2002). Ob organische Anionen wie Prostaglandine ebenso Substrate der OCTs darstellen, muss noch endgültig geklärt werden (Kimura et al., 2002; Harlfinger et al., 2005). Als nicht-transportierte Inhibitoren können eine Vielzahl von geladenen und nicht-geladenen Molekülen fungieren, die in der Substratbindungstasche oder auch in peripheren Regionen der OCTs binden können (Koepsell et al., 2003).

OCTs arbeiten als erleichtertes Diffusionssystem entlang des elektrochemischen Gradienten; neben Kationinflux konnte auch Kationenefflux für rOCT1, rOCT2, hOCT2 sowie rOCT3 und hOCT3 nachgewiesen werden (Busch et al., 1996; Nagel et al., 1997; Busch et al., 1998; Kekuda et al., 1998; Budiman et al., 2000; Arndt et al., 2001; Keller et al., 2005; Lips et al., 2005).

Die organischen Kationentransporter sind elektrogen, vom Membranpotential abhängig (Busch et al., 1996; Gorboulev et al., 1997; Nagel et al., 1997; Budiman et al., 2000; Dresser et al., 2000; Arndt et al., 2001; Keller et al., 2005) und arbeiten unabhängig von Na^+ , Cl^- und wahrscheinlich auch von H^+ -Ionengradienten (Busch et al., 1996; Budiman et al., 2000; Keller et al., 2005; Schmitt und Koepsell, 2005). Für rOCT2 wurde gezeigt, dass unter depolarisierenden Bedingungen die Stöchiometrie größer als eins ist, was auf einen nicht-selektiven Kotransport von anorganischen Kationen zurückzuführen ist (Schmitt et al., 2009).

Da etwa 40 % der peroral applizierten Medikamente Kationen oder schwache Basen bei physiologischem pH sind (Neuhoff et al., 2003), haben die organischen Kationentransporter pharmakologisch eine besondere Bedeutung, die anhand einiger Beispiele verdeutlicht werden soll. Die Wirkstoffe Amantadin und Memantin, die in der Therapie von Morbus Parkinson eingesetzt werden, sind Substrate von hOCT2 (Busch et al., 1998). Die Antidepressiva Citalopram, Desipramin, Doxepin sowie Imipramin interagieren mit humanen OCTs (Gorboulev et al., 1997; Zhang et al., 1998; Wu et al., 2000; Ahlin et al., 2008; Zolk et al., 2009). Das Anti-Diabetikum Metformin wird von hOCT1 und hOCT2 transportiert

(Dresser et al., 2002; Wang et al., 2002) und kann seine Wirkung in Patienten mit bestimmten Polymorphismen von hOCT1 nicht entfalten (Reitman und Schadt, 2007). Die Zytostatika Cisplatin und Oxaliplatin werden von hOCTs transportiert (Ciarimboli et al., 2005; Yonezawa et al., 2006; Zhang et al., 2006) und es wurde auch gezeigt, dass die Nephrotoxizität des Zytostatikums Cisplatin durch die Blockierung des in der Niere exprimierten Transporters hOCT2 erniedrigt werden kann (Filipski et al., 2009; Ciarimboli et al., 2010). Des Weiteren fasste ein internationales Konsortium, welches die „Food and Drug Administration“ (FDA) berät, den Beschluss alle Medikamente während ihrer Entwicklung bezüglich ihrer Interaktion mit 12 klinisch relevanten Transportern zu testen, welche vier Transporter der SLC22-Familie (OCT1, OCT2, OAT1 und OAT3) beinhalten (Giacomini et al., 2010).

2.1.1. Struktur der organischen Kationentransporter

Der grundsätzliche Aufbau der organischen Kationentransporter kann aus der Primärstruktur abgeleitet werden und ist bei den Vertretern der SLC22-Familie konserviert. In der Abbildung 2.1 ist das Topologiemodell von rOCT1 zu erkennen (nach Koepsell 1998). Der Transporter besteht aus 556 Aminosäuren und besitzt zwölf transmembranäre α -Helices (TMHs), wobei der Amino- und Carboxyterminus intrazellulär liegen. Es wurde eine große extrazelluläre Schleife zwischen der ersten und zweiten Transmembrandomäne mit putativen Glykosylierungsstellen nachgewiesen. Ferner wurde eine große intrazelluläre Schleife zwischen der sechsten und siebten Transmembrandomäne mit mehreren Phosphorylierungsstellen, die an der kurzfristigen Regulierung der Aktivität von rOCT1 beteiligt sind, beschrieben (Gründemann et al., 1994; Cetinkaya et al., 2003; Ciarimboli et al., 2004; Ciarimboli und Schlatter, 2005; Pelis et al., 2006; Keller et al., 2008).

Eine dreidimensionale Anordnung der Aminosäuren der OCTs lässt sich jedoch nicht einfach vorhersagen. Hierfür wären Röntgenbeugungsanalysen an Proteinkristallen notwendig. Bis heute ist jedoch keine Kristallisation eukaryotischer Transporter der MFS-Transporterfamilie geglückt. Allerdings konnten in unserem Labor rOCT1 und rOCT2 im zellfreien System exprimiert und in größeren Mengen aufgereinigt werden, was ein großer Schritt in Richtung Kristallisierung dieser eukaryotischen Transporter ist (Keller et al., 2008). Glücklicherweise sind bereits mehrere prokaryotische Mitglieder der MFS-Transporterfamilie kristallisiert

worden, was als Grundlage für Homologiemodelle eukaryotischer Transporter genutzt werden kann (vergleiche Kapitel 2.1.2).

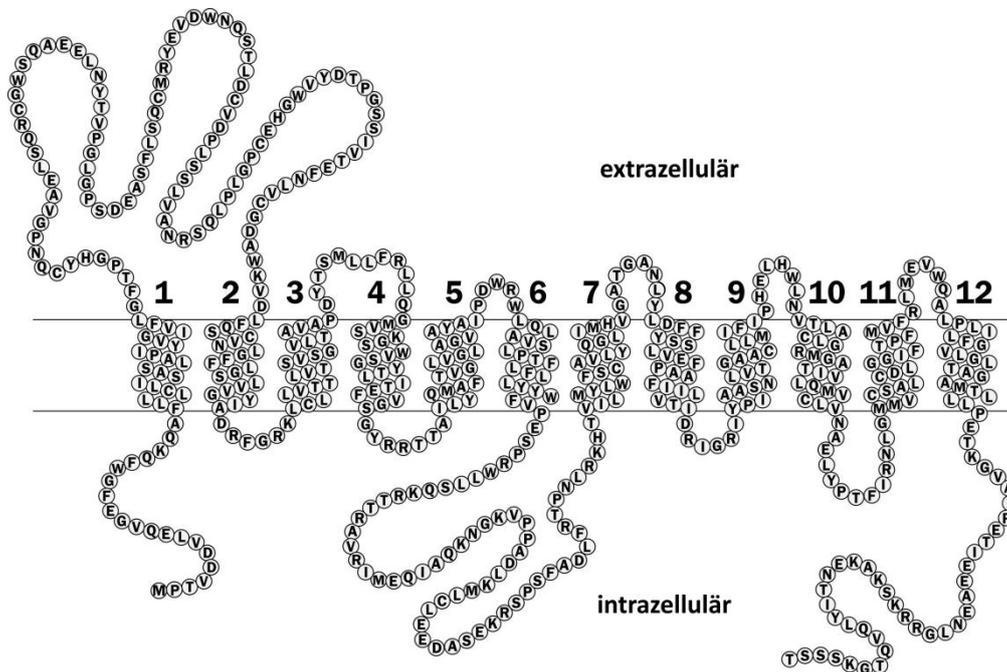


Abbildung 2.1 Membrantopologie des organischen Kationentransporters 1 aus der Ratte (rOCT1).

Zu erkennen sind 12 Transmembranhelices (TMHs), eine große extrazelluläre Schleife zwischen TMH 1 und 2 sowie eine intrazelluläre Schleife zwischen TMH 6 und 7. Der C- und N-Terminus ist intrazellulär lokalisiert.

2008 wurde gezeigt, dass rOCT1 im solubilisierten Zustand und in der Plasmamembran Homooligomere bilden kann (Keller et al., 2008). Diese Oligomerisierung wird durch die lange extrazelluläre Schleife zwischen TMH 1 und TMH 2, die mit Hilfe der Disulfidbrücken in ihrer Raumstruktur stabilisiert wird, vermittelt (Keller et al., 2011). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Eigenschaften des durch die Monomere vermittelten Transports infolge dieser Oligomerisierung nicht verändert wurden. Außerdem ist die funktionelle Unabhängigkeit der Monomere für die Interpretation der Effekte von Punktmutationen in rOCT1 von Bedeutung (Keller et al., 2011).

2.1.2. Substratbindung und Translokation organischer Kationentransporter

Um die Funktionsweise polyspezifischer Transporter zu verstehen, muss die strukturelle Grundlage polyspezifischer Bindung beleuchtet werden. Ferner ist es nötig zu erkennen wie Substratbindung zu deren Translokation führt. Fragen, die geklärt werden sollten, sind beispielsweise wie organische Kationentransporter mit verschiedenen Substraten unterschiedlicher Molekularstruktur interagieren und diese transportieren. Außerdem ist es

von großem Interesse die Fähigkeit zu verstehen strukturell sehr ähnliche Moleküle zu diskriminieren, um zu erkennen aus welchem Grund z.B. Tributylmethylammonium als Substrat (van Montfoort et al., 2001) und Tetrabutylammonium (TBUA) als Inhibitor fungiert (Volk et al., 2003).

Heute ist die Annahme gültig, dass die organischen Kationentransporter so wie die meisten Mitglieder der MFS-Transporterfamilie nach einem wechselnden Zugangsmechanismus („alternating access“-Mechanismus) arbeiten. Hierbei wird angenommen, dass der unbeladene Transporter eine Bindungsstelle besitzt (z.B. in der nach außen gerichteten Konformation) und dass nach Bindung eines Substrats eine Konformationsänderung induziert wird, die zu einer Umorientierung dieser Bindungsstelle führt (z.B. Zugänglichkeit dieser Bindungsstelle von intrazellulär). Nach Ablösen des Substrats kann der Transporter wieder die ursprüngliche Konformation einnehmen, so dass ein neuer Transportzyklus eingeleitet werden kann (Abbildung 2.2).

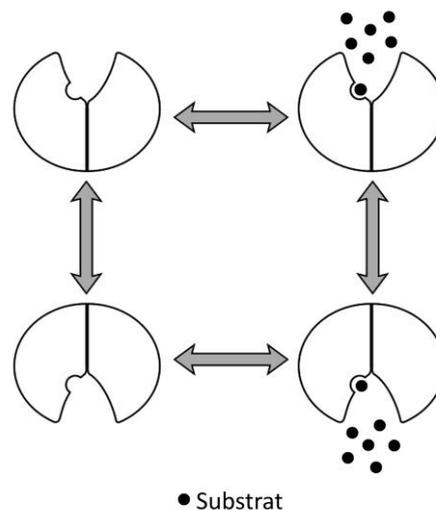


Abbildung 2.2 Schematische Darstellung des wechselnden Zugangsmechanismus („alternating access“-Mechanismus). Ein Substrat bindet an die Bindungsstelle des unbeladenen Transporters und induziert eine Konformationsänderung. Diese Konformationsänderung bewirkt eine Umorientierung der Bindungsstelle, gefolgt von einem Ablösen des Substrats von der Bindungsstelle, worauf der Transporter schließlich wieder seine ursprüngliche Konformation einnehmen kann.

Hinweise, dass OCTs nach dem „alternating access“-Modell arbeiten, gab es durch verschiedene experimentelle Befunde. Beispielsweise konnte für rOCT2 gezeigt werden, dass der ungeladene Inhibitor Corticosteron eine niedrigere Affinität zu der Substratbindungsstelle in der nach außen gerichteten Konformation im Vergleich zu der nach innen gerichteten Konformation aufweist. Der positiv geladene Inhibitor TBUA zeigt ein

umgekehrtes Verhalten: die Affinität von TBuA ist in der nach innen gerichteten Konformation zu der Substratbindungsstelle höher als in der nach außen gerichteten Konformation. Dies untermauert, dass rOCT2 eine Substratbindungsregion aufweist, die sowohl nach innen als auch nach außen gerichtet sein kann und dass die damit verbundenen Konformationsänderungen während des Transportzyklus zu veränderten Affinitäten führen können (Volk et al., 2003). Auch konnten Transstimulationsexperimente in Proteoliposomen unter Bedingungen der Spannungsklemme durchgeführt werden, die darauf hinweisen, dass rOCT1 nicht wie ein Kanal sondern nach dem „alternating access“-Modell arbeitet (Keller et al., 2005).

Wie bereits erwähnt konnten in den letzten Jahren einige Mitglieder der MFS-Transporterfamilie kristallisiert und strukturell analysiert werden. Zunächst wurden Kristallstrukturen von Transportern in der nach innen gerichteten Konformation aufgelöst. Zum einen wurde aus *Escherichia coli* die Laktose-Permease (Lac Y) (Abramson et al., 2003b) und der Glycerol-3-Phosphattransporter (GlpT) kristallisiert (Huang et al., 2003). Zum anderen konnte auch die Kristallstruktur von einem Oxalattransporter (OxIT) aus *Oxalobacter formigenes* gezeigt werden (Hirai et al., 2002).

Mit der Kristallisation des Fucose-Transporters (FucP) aus *Escherichia coli* konnte nun auch ein Protein in einer nach außen gerichteten Konformation aufgelöst werden (Dang et al., 2010). Mittels neuester Daten wurde erstmals eine Kristallstruktur eines MFS-Transporters, des Oligopeptidtransporters PetT₅₀ aus *Shewanella oneidensis*, in einer verschlossenen Konformation (im „occluded state“) geklärt (Newstead et al., 2011).

Bis heute ist jedoch kein Protein der MFS-Superfamilie in allen wichtigen Konformationszuständen kristallisiert worden. Aufgrund der teilweise geringen Sequenzhomologien der kristallisierten Transporter ist es schwierig den genauen Funktionsmechanismus der Unterfamilien zu verstehen und aufzuklären. Beispielsweise ist noch ungeklärt, welche strukturellen Unterschiede zwischen den OCTs und der Lac Y die polyspezifischen bzw. substratspezifischen Eigenschaften bedingen und z.B. bewirken, dass OCTs erleichterte Diffusionssysteme und einige OATs hingegen Anionenaustauscher sind.

2005 wurde in Anlehnung an die Kristallstruktur der Lac Y, ein H⁺/Laktose-Symporter, ein Homologiemodell der Transmembrandomänen von rOCT1 in der nach innen gerichteten Konformation erstellt (Popp et al., 2005). Für die Aminosäuren von rOCT1 und Lac Y ergibt sich eine etwa 30 %-ige Sequenzähnlichkeit der Transmembrandomänen. Dieses

Strukturmodell von rOCT1 konnte mit Hilfe von diversen Mutageneseexperimenten unterstützt werden (Gorboulev et al., 1999; Gorboulev et al., 2005; Popp et al., 2005; Gorbunov et al., 2008; Schmitt et al., 2009; Volk et al., 2009). Für weiterführende Studien wurde auch ein Modell von rOCT1 in der nach außen gerichteten Konformation benötigt, so dass basierend auf dem putativen Umlagerungsmechanismus der Laktose-Permease (Abramson et al., 2003a; Abramson et al., 2003b) eine theoretische Struktur für rOCT1 in der nach außen gerichteten Konformation berechnet wurde (Gorbunov et al., 2008).

Mit Hilfe der Mutageneseanalyse und des Strukturmodells von rOCT1 wurden bis heute acht Aminosäuren identifiziert, die die Substrataffinität und/oder die Selektivität für Substrate beeinflussen. Diese Aminosäuren umfassen das Phenylalanin 160 in der TMH 2; das Tryptophan 218, das Tyrosin 222 und das Threonin 226 der TMH 4; das Arginin 440, das Leucin 447 und das Glutamat 448 der TMH 10 sowie das Aspartat 475 der TMH 11 (Gorboulev et al., 1999; Popp et al., 2005; Volk et al., 2009) und sind in der Abbildung 2.3 hervorgehoben.

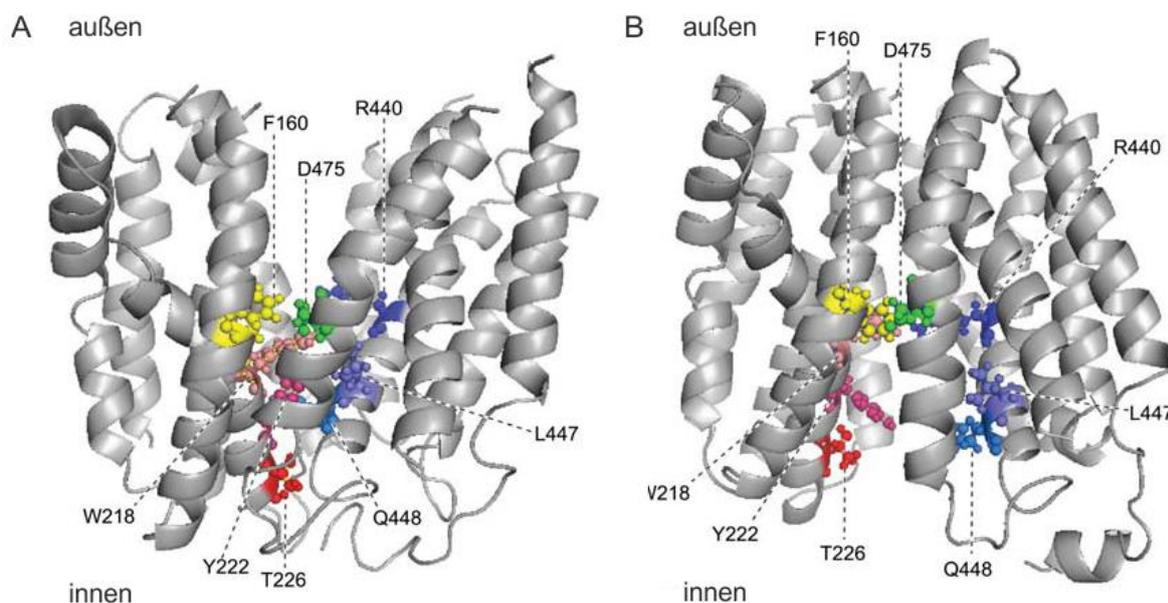


Abbildung 2.3 Modell der Tertiärstruktur von rOCT1 (aus Koepsell, 2011). Mutagenese Experimente zeigten einige Aminosäuren, die für die Affinität und/oder Selektivität der Substrate TEA und MPP wichtig sind und die bei der Interaktion von Corticosteron sowohl von intrazellulär als auch von extrazellulär von Bedeutung sind. (A) Modell der nach außen gerichteten Konformation (B) Modell der nach innen gerichteten Konformation.

Die funktionelle Charakterisierung von Mutanten in der postulierten Bindungsregion führte zunächst durch die Bestimmung von K_m - und V_{max} -Werten verschiedener Substrate und dem Vergleich von K_i -Werten zu der Identifizierung der Aminosäuren D475, W218, Y222 und T226

(Gorboulev et al., 1999; Popp et al., 2005). 1999 zeigte sich, dass die Mutation rOCT1(D475E) die Affinität für Tetraethylammonium (TEA) und Cholin sowie die Affinität eines Inhibitors Tetrapentylammonium (TPeA) erhöhte, während die Affinität für 1-Methyl-4-Phenylpyridinium (MPP) unverändert blieb. Diese Daten weisen zum einen darauf hin, dass rOCT1 eine große Bindungstasche mit teilweise überlappenden Bindungsdomänen besitzt und zum anderen, dass transportierte und nicht-transportierte organische Kationen mit der gleichen Bindungsregion interagieren (Gorboulev et al., 1999).

2005 konnte nachgewiesen werden, dass die Substrate TEA und MPP an die Aminosäuren W218 und Y222 binden und dass T226 an der Bindung von MPP beteiligt ist (Popp et al., 2005). Im gleichen Jahr konnte in einer weiteren Studie durch das Austauschen dreier Aminosäuren die Corticosteron-Affinität von rOCT2 (ca. 4 μM) auf rOCT1 (ca. 150 μM) *et vice versa* übertragen werden. Hierbei konnte demonstriert werden, dass die Aminosäuren A443, L447, Q448 nicht nur für die Erhöhung der Affinität von Corticosteron sondern auch für eine Erhöhung der MPP-Affinität verantwortlich waren (Gorboulev et al., 2005).

Die Modellvorhersage für rOCT1 zeigt einen großen Spalt, der von den TMHs 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 und 11 geformt wird und die putative Substratbindungstasche beinhaltet. Die hohe Zuverlässigkeit des Strukturmodells wird durch die Tatsache unterstützt, dass die zuvor genannten Aminosäuren, die aufgrund der Mutageneseanalysen in der Substratbindungsregion liegen sollten, im großen Spalt lokalisiert sind und Kontakt zur wässrigen Phase haben.

Da durch Messungen der Substrataufnahme (Inkubationszeiten 30-60 min) nicht unterschieden werden kann, ob ein lipophiler Inhibitor (z.B. Corticosteron) von intra- und/oder von extrazellulär wirkt, wurde ein Protokoll entwickelt, bei dem diese Unterscheidung möglich ist. Hierfür wurde entweder TEA und Corticosteron gleichzeitig appliziert (Interaktion von außen) oder Corticosteron präinkubiert (Interaktion von innen) und im Anschluss der TEA-induzierte Strom gemessen. Dabei zeigte sich, dass die Aminosäuren F160, L447 und Q448 an der intrazellulären Corticosteronbindung beteiligt sind. Für die extrazelluläre Bindung sind die Aminosäuren F160, W218, R440, L447 und D475 mitverantwortlich, nicht jedoch die Aminosäure Q448 (Volk et al., 2009). Eine Simulation der TBuA-Bindung zeigte außerdem eine mögliche Interaktion mit den Aminosäuren F160, L447

und D475 in der nach außen gerichteten Konformation, was durch Mutageneseexperimente unterstützt werden konnte (Volk et al., 2009).

Ein Vergleich der Substratbindungsregionen in der nach innen und außen gerichteten Konformation mit der Größe von Substraten weist darauf hin, dass rOCT1 mehr als ein Molekül gleichzeitig binden kann (Popp et al., 2005; Koepsell et al., 2007). Dieser Befund konnte erstmals durch eine Studie an hOCT1 unterstützt werden, wobei am solubilisierten und immobilisierten Transporter gezeigt wurde, dass eine zusätzliche hochaffine Bindungsstelle im pM-Bereich neben der bekannten niederaffinen Bindungsstelle im μM -Bereich für MPP existiert (Moaddel et al., 2005). Für rOCT1 konnten 2008 durch Nutzung der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme-Fluorometrie („Voltage-Clamp-Fluorometrie“) hochaffine Bindungsstellen neben den niederaffinen Bindungsstellen für verschiedene organische Kationen beschrieben werden (Gorbunov et al., 2008). In dieser Studie wurden für die Substrate Cholin, TEA und MPP eine zusätzliche hochaffine Bindungsstelle und für den Inhibitor TBUA zwei zusätzliche hochaffine Bindungsstellen im pM- bis nM-Bereich gezeigt. Neben den Fluoreszenzmessungen wurden auch Kapazitätsmessungen mit TBUA durchgeführt, die ebenfalls das Vorhandensein einer hochaffinen Bindungsstelle in der nach außen gerichteten Konformation unterstützen. Exakte Werte konnten aufgrund der zu geringen Sensitivität dieser Methode nicht bestimmt werden (Gorbunov et al., 2008). Die Funktion der hochaffinen Bindungsstellen während des Transportzyklus ist noch weitgehend unklar. Messungen der Substratabhängigkeiten des durch rOCT1, hOCT1 und hOCT2 vermittelten Transports von verschiedenen Substraten ergaben keine Hinweise auf Abweichungen von der Michalis-Menten-Gleichung, was darauf hindeutet, dass die Besetzung einer niederaffinen Bindungsstelle für die Translokation von Substraten essentiell ist. Erst durch Hemmstudien konnte eine Beteiligung von hochaffinen Bindungsstellen am Transport abgeleitet werden. Die Hemmung der MPP-Aufnahme durch das antivirale Medikament Lamuvidin in humanen OCTs folgte einer biphasischen Kurve. Eine partielle Hemmung der MPP-Aufnahme von etwa 40-50 % konnte bereits mit Konzentrationen im pM-Bereich erreicht werden. Eine vollständige Hemmung ergab sich mit Lamuvidin-Konzentrationen im mM-Bereich (im Bereich der K_m -Werte von Lamuvidin) (Minuesa et al., 2009). Eine hochaffine partielle Hemmung der organischen Kationentransporter könnte für Arzneimittelwechselwirkungen von Bedeutung sein.

2.1.3. rOCT1(10ΔCys), eine Cystein-Substitutionsmutante

Arbeitet rOCT1 nach dem „alternating access“-Mechanismus, ist es wahrscheinlich, dass die Transmembranhelices 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 und 11 während des Transportzyklus Konformationsänderungen durchlaufen. Durch den Nachweis von spannungs- und kationenabhängigen Bewegungen mittels der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme-Fluorometrie („Voltage-Clamp-Fluorometrie“) konnte diese Vermutung bereits für die TMH 11 bestätigt werden (Gorbunov et al., 2008).

Die Idee, auf der die Voltage-Clamp-Fluorometrie basiert, wird im Folgenden kurz erläutert. Zur Durchführung dieser Experimente wird im zu untersuchenden Protein ein reaktives Cystein benötigt, das selektiv mit einem SH-reaktiven Fluorophor kovalent markiert wird. In dieser Arbeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrhodamin-6-maleimid (TMR6M) verwendet, der als Umgebungssensor fungiert. Strukturelle Veränderungen, die während des Transportprozesses auftreten, können über eine unterschiedliche Fluoreszenzemission, verursacht durch veränderte Exponierung des Fluorophors (z.B. Bewegung von der wässrigen zur lipiden Phase *et vice versa* oder eine veränderte Lage zu „quenching“ Gruppen), sichtbar gemacht werden (Mannuzzu et al., 1996; Cha und Bezanilla, 1998; Gandhi und Olcese, 2008).

Da rOCT1 mehrere Cysteine in seiner Aminosäuresequenz aufweist, wurde eine spezielle Cystein-Substitutionsmutante rOCT1(10ΔCys) generiert, um eine unspezifische Markierung mehrerer Cysteine zu vermeiden. In dieser Cystein-Substitutionsmutante wurden 10 der 16 natürlich vorhandenen Cysteine durch Alanine, Serine oder Methionin ersetzt (Sturm et al., 2007). In der großen extrazellulären Schleife zwischen TMH 1 und TMH 2 sind weitere sechs Cysteine lokalisiert, die nicht ausgetauscht werden können, da dies sonst zu einem kompletten Verlust der Aktivität des Transporters führt (Sturm et al., 2007). Hinzuzufügen ist außerdem, dass diese Cysteine für eine Markierung durch TMR6M nicht zugänglich sind, da sie vermutlich Disulfidbrücken ausbilden (Sturm et al., 2007; Keller et al., 2011).

Eine funktionelle Charakterisierung von rOCT1(10ΔCys) wurde in den letzten Jahren bereits durchgeführt (Sturm et al. 2007; Gorbunov et al., 2008). Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Substitution der zehn Cysteine keinen Einfluss auf die Affinität von TEA und MPP in Messungen der Substrataufnahme hatten. Eine Erhöhung des I_{\max} -Wertes sowie des

$K_{0,5}$ -Wertes von Cholin im Vergleich zum rOCT1-Wildtyp ist auf den Austausch der Cysteine 322 und 451 zurückzuführen (Sturm et al., 2007). Insgesamt bleiben die meisten funktionellen Eigenschaften von rOCT1 in der Mutante rOCT1(10 Δ Cys) erhalten.

In der nach innen gerichteten Konformation des Strukturmodells von rOCT1 sind die äußeren Enden der TMH 11 (F483, F486) in unmittelbarer Nähe zu der TMH 2 (W147), während diese Aminosäuren in der nach außen gerichteten Konformation weit voneinander entfernt sind. Das Strukturmodell für rOCT1 sagt somit große Konformationsveränderungen während des Transportzyklus in den TMH 2 und TMH 11 voraus. 2008 konnten für die Cystein-Substitutionsmutante rOCT1(10 Δ Cys) mit Hilfe der Voltage-Clamp-Fluorometrie in der TMH 11 in Position 483 und im geringen Maße auch in Position 486 spannungsabhängige Konformationsänderungen nachgewiesen werden, die durch organische Kationen teilweise moduliert wurden (Gorbunov et al., 2008).

Zusätzlich wurde gezeigt, dass nach dem Austausch der Aminosäuren F483 und W147 gegen ein Cystein oder Serin in der Interaktionsdomäne die hochaffine Bindung von TBuA zur kompletten Hemmung der Transportaktivität führt, während diese Bindung keine Auswirkung auf den rOCT1-Wildtyp hat (Gorbunov et al., 2008). Dies zeigt, dass eine hochaffine Bindung von Medikamenten unter bestimmten Bedingungen wie beispielsweise spezielle Mutationen in der OCT-Sequenz zur Transporthemmung führen kann.

Da auch in anderen Transmembranhelices während des Transportvorgangs Bewegungen zu erwarten sind, standen zunächst die TMH 2 und TMH 4 im Vordergrund weiterer Untersuchungen. Nach Einführung und Markierung von Cysteinresten in TMH 2 und TMH 4 konnten jedoch keine Fluoreszenzänderungen nachgewiesen werden (Bonny Thekkumthala und Dr. Dmitry Gorbunov, nicht publizierte Daten).

2.2. Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, zunächst mit Hilfe der Voltage-Clamp-Fluorometrie nach weiteren spannungsabhängigen Konformationsänderungen von rOCT1 zu suchen. Bedingt durch die invertierten Topologiewiederholungen der SLC22-Familie (Radestock und Forrest, 2011) wurden für diese Arbeit Aminosäuren von rOCT1 ausgewählt, die auf der gegenüberliegenden Seite der TMH 2 und TMH 11 lokalisiert sind. Für die Untersuchung sollen nach außen zugängliche Aminosäuren der TMH 5 und TMH 8 durch Cysteine ersetzt werden. Des Weiteren sollte der Einfluss von verschiedenen transportierten und nicht-transportierten organischen Kationen auf mögliche spannungsabhängige Konformationsänderungen analysiert werden.

Außerdem ist es von besonderem Interesse transportgebundene Konformationsänderungen von nicht-transportgebundenen Konformationsänderungen wie z.B. Konformationsänderungen, die durch die Bindung von Kationen induziert werden, unterscheiden zu können. Um diese Differenzierung von auftretenden Fluoreszenzänderungen vornehmen zu können, wurde eine spezifische Blockierung des Transportwegs von rOCT1 benötigt.

3. MATERIAL & METHODEN

3.1. Materialien

3.1.1. Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Standardchemikalien wurden, sofern nicht abweichend aufgeführt, von den Herstellerfirmen AppliChem GmbH (Darmstadt, D), Merck KGaA (Darmstadt, D), Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, D) in Analysequalität bezogen.

Tetramethylrhodamin-6-maleimid (TMR6M) wurde von Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D) und [2-(Trimethylammonium)ethyl]methanethiosulfonat Bromid (MTSET) wurde von Toronto Research Chemicals Inc. (North York, CDN) bezogen.

3.1.2. Radioaktive Chemikalien

Folgende radioaktiv markierte Chemikalien wurden von American Radiolabeled Chemicals Inc. (St. Louis, MO, USA) bezogen: [¹⁴C]-Tetraethylammonium Bromid (TEA) mit einer spezifischen Aktivität von 55 mCi/mmol sowie [³H]-1-Methyl-4-Phenylpyridinium Iodid (MPP) mit einer spezifischen Aktivität von 85 Ci/mmol. Außerdem wurde [¹⁴C]-[2-(Trimethylammonium)ethyl]methanethiosulfonat Bromid (MTSET) mit einer spezifischen Aktivität von 106 mCi/mmol von Toronto Research Chemicals Inc. (North York, CDN) bezogen.

3.1.3. Enzyme, kommerzielle Puffer und Marker

Kollagenase Typ 2 wurde von PAA Laboratories GmbH (Pasching, A) bezogen. Die Restriktionsendonuklease Mlu1, der Restriktionspuffer R+, der DNA-Marker (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder), der RNA-Marker (RiboRuler™ High Range RNA Ladder) sowie der Protein-Marker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder) wurden von Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, D) geliefert.

3.1.4. Reagenziensets (Kits)

Das HiSpeed Plasmid Midi Kit wurde von QIAGEN (Hilden, D) bezogen. Für die cRNA-Synthese wurde das mMESSAGEMACHINE™ SP6 Kit von Ambion (Huntingdon, GB) nach Angaben des Herstellers verwendet.

3.1.5. Lösungen, Puffer und Medien

Für Lösungen und Puffer wurde doppelt entionisiertes Wasser aus der hauseigenen Anlage Seralpur Pro 90 CN (Seral, Ransbach-Baumbach, D) verwendet. Vor Gebrauch wurden diese bei 120°C für 20 min autoklaviert und zur Aufbewahrung bei 4°C gelagert.

Inkubationslösung für *Xenopus laevis* Oozyten:

- Oozytenringer-Lösung (ORI-Lösung) 5 mM 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS), pH 7,4
100 mM NaCl
3 mM KCl
2 mM CaCl₂
1 mM MgCl₂

Die *Xenopus laevis* Oozyten wurden mit kalziumfreier ORI-Lösung gewaschen und in ORI-Lösung mit 50 mg/l Gentamycin gelagert.

Nährmedium und Lösungen für HEK293-Zellen:

- „Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium“ (DMEM, 1 g/l Glukose) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D)

Für die Kultivierung der Human Embryonic Kidney-293 (HEK293)-Zellen wurde vor Gebrauch 10 % (v/v) hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum, 2 mM L-Glutamin (PAA Laboratories GmbH, Pasching, DEU) und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin zugesetzt. Bei stabil transfizierten Zelllinien wurde zusätzlich 0,6 mg/ml Geneticin hinzugefügt.

- „Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline“ (PBS) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D)

Für Transportmessungen in HEK293-Zellen wurde PBS mit 0,9 % (w/v) CaCl_2 und 0,5 % (w/v) MgCl_2 modifiziert (Transport-PBS).

Lösungen und Puffer für molekularbiologische Methoden:

- BES-Puffer (50x) 25 mM N, N-Bis-[2-hydroxyethyl]-2-aminoetansulfonsäure (BES),
2,5 mM EDTA, pH 6,7
- DEPC- H_2O H_2O mit 0,01 % (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzen,
über Nacht rühren lassen und am nächsten Tag autoklavieren
- DNA-Probenpuffer (6x) 0,25 % (w/v) Bromphenolblau
30 % (v/v) Glycerin
- Xylencyanol-Puffer (6x) 0,25 % (w/v) Xylencyanol
0,25 % (w/v) Bromphenolblau
1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) pH 8,0
50 % (v/v) Glycerin

Puffer für die Präparation der Membranfraktion von *Xenopus laevis* Oozyten:

- MBSS-Puffer 20 mM 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
(MES), pH 6,0
80 mM NaCl
- HbA-Puffer 20 mM Tris, pH 7,4
5 mM MgCl_2
5 mM NaH_2PO_4
1 mM EDTA
80 mM Saccharose

Lösungen und Puffer für proteinbiochemische Methoden:

- Elektrophorese Laufpuffer (4x) 60,67 g Tris
20 g Natriumdodecylsulfat (SDS)
288 g Glycin ad 5 l H_2O

-
- Elektrophorese Probenpuffer
60 mM Tris-HCl, pH 6,8
0,002 % (w/v) Bromphenolblau
100 mM Dithiothreitol
7 % (v/v) Glycerin
2 % (w/v) SDS
 - PBST
137 mM NaCl
2,7 mM KCl
10 mM Na₂HPO₄
2 mM KH₂PO₄, pH 7,4
0,1 % (v/v) Tween® 20
 - Lösung A
30 % (w/v) Acylamid
0,8 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid
 - Lösung B
4 g/l SDS
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
 - Lösung C
4 g/l SDS
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
 - SDS-PAGE-Gelfärbelösung
1,25 g Coomassie-Brillant-Blau R250
50 ml Essigsäure
250 ml Methanol
250 ml H₂O
 - SDS-PAGE-Gelentfärbelösung
100 ml Essigsäure
400 ml Methanol
500 ml H₂O
 - Western-Blot-Transferpuffer
25 mM Tris, pH 8,3
192 mM Glycin
10 % (v/v) Methanol

3.1.6. Biologische Materialien

3.1.6.1. Bakterienstämme

Für die Selektion und Amplifikation der Plasmide wurde der *E.coli DH10B* Stamm von GIBCO BRL (Eggenstein, D) verwendet.

3.1.6.2. Zellen

Human Embryonic Kidney-293 (HEK293)-Zellen wurden von der American Tissue Culture Collection LGC Standards GmbH (Wesel, D) bezogen und zur Expression von rOCT1-Konstrukten im eigenen Labor einer stabilen Transfektion unterzogen.

3.1.6.3. Südafrikanische Krallenfrösche (*Xenopus laevis*)

Weibliche *Xenopus laevis* wurden von Xenopus Express France (Haute Loire, F) bezogen und unter konstanten Bedingungen (18°C, 500 µS/cm) in 200 l Kunststoffbecken gehalten.

3.1.7. Software

Die folgende Software wurde für die statistische Auswertung, für die graphische Darstellung der Versuchsergebnisse sowie für die Textverarbeitung verwendet:

- CorelDRAW X5 (Corel Corporation, Ottawa, CDN)
- CorelPHOTO-PAINT X5 (Corel Corporation, Ottawa, CDN)
- EndNote X5 (Thomson Reuters, Carlsbad, CA, USA)
- GraphPad Prism Version 4.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)
- IgorPro Version 6.0 (Wavemetrics Inc., Lake Oswego, OR, USA)
- ImageJ 1.45e (Wayne Rasband, <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>)
- Office 2007 (Microsoft, Redmond, WA, USA).

Für die Steuerung und Aufzeichnung elektrophysiologischer Experimente wurde Patchmaster 2.32 (HEKA, Lambrecht, D) benutzt.

3.2. Methoden

3.2.1. Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1. Herstellung der rOCT1-Konstrukte

Die Plasmid-DNA aller verwendeten Konstrukte wurde von Dr. Valentin Gorboulev zur Verfügung gestellt. In der vorliegenden Arbeit wurden als heterologes Protein-Expressionssystem hauptsächlich *Xenopus laevis* Oozyten verwendet. Aus diesem Grund wurde das rOCT1-Gen zur Expression in *X. laevis* Oozyten in den Vektor pRSSP kloniert, der

das *Xenopus* β -Globin-Gen im 3' nicht kodierenden Bereich, eine Mlu1-Schnittstelle, ein Ampicillinresistenzgen sowie eine Promotorregion für die SP6-RNA-Polymerase enthält (Busch et al., 1996).

Des Weiteren wurden als heterologes Expressionssystem HEK293-Zellen verwendet. Hierfür wurde das rOCT1-Gen in den eukaryotischen pRc/CMV Expressionsvektor kloniert, der eine Enhancer-Promotor-Sequenz des humanen Cytomegalovirus (CMV), ein Polyadenylierungssignal und eine Neomycinresistenz enthält (Busch et al., 1996).

Alle hergestellten Mutanten basieren auf einer speziellen Cystein-Substitutionsmutante, rOCT1(10 Δ Cys) (Sturm et al., 2007). Hierbei wurden 10 der 16 ursprünglich vorhandenen Cysteine folgendermaßen durch Alanine, Serine oder Methionin ersetzt:

C26A, C155A, C179A, C322S, C358A, 418A, C437S, C451M, C470A und C474A.

Die restlichen sechs in der rOCT1-Sequenz vorhandenen Cysteine (C50, C62, C89, C103, C122 und C143) sind in der großen extrazellulären Schleife lokalisiert und können nicht ersetzt werden, da diese für die Funktionalität des Transporters von essentieller Bedeutung sind (Sturm et al. 2007). Alle Punktmutationen in der rOCT1-Sequenz wurden mit Hilfe der „Overlap Extension Methode“ (Ho et al., 1989) eingeführt und deren Richtigkeit über die Sequenzierung der Nukleotide überprüft.

Für den spezifischen biochemischen Nachweis der Proteine wurde die rOCT1-Sequenz am C-Terminus mit einem „FLAG-tag“ (DYKDDDDK) unter Nutzung der gleichen Methode versehen (Popp et al., 2005).

3.2.1.2. Präparation und Linearisierung der cDNA

Die Konzentration der gewonnenen Plasmid-DNA wurde photometrisch im UV-Absorptionsbereich bei 260 und 280 nm in einer Quarzküvette bestimmt. Die Reinheit der cDNA ergibt sich aus dem Quotienten der Absorptionsraten OD₂₆₀/OD₂₈₀, wobei der Wert reiner DNA zwischen 1,7 und 2,0 liegt.

Die Plasmid-DNA wurde für die *in vitro* Transkription zunächst linearisiert. Zu diesem Zweck wurde die cDNA über Nacht bei 37°C mit dem Restriktionsenzym Mlu1 geschnitten, anschließend mittels Agarosegelelektrophorese kontrolliert und über die Phenol/Chloroform Extraktion aufgereinigt.

Reaktionsansatz für die Linearisierung:

cDNA (10 µg)	x µl
Restriktionspuffer R+ (10x)	10 µl
DEPC-H ₂ O	(88-x) µl
Mlu1	2 µl
	<hr/>
	100 µl

3.2.1.3. RNA-Synthese durch *in vitro* Transkription

Die für die Expression der rOCT1-Genvarianten in *Xenopus laevis* Oozyten benötigten cRNAs wurden über die *in vitro* Transkription hergestellt, wobei das mMESSEGETM SP6 Kit nach Angaben des Herstellers verwendet wurde. Der Transkriptionsansatz enthielt 1 µg der linearisierten und gereinigten Matrizen-DNA, Transkriptionspuffer, den Ribonukleotidmix (ATP, CTP, UTP, GTP+m7G(5')ppp(5')G-cap) und SP6-RNA-Polymerase.

Reaktionsansatz *in vitro*-Transkription:

linearisierte DNA (1 µg)	x µl
Transkriptionspuffer(10x)	2 µl
Ribonukleotid-Mix (2x)	10 µl
SP6-RNA-Polymerase	1 µl
DEPC-H ₂ O	(7-x) µl
	<hr/>
	20 µl

Die *in vitro* Transkription wurde nach 2 h bei 37°C beendet und die Matrizen-DNA mittels DNase1 (15 min, 37°C) verdaut. Im Anschluss wurde die gewonnene cRNA mit LiCl (0,75 M) über Nacht präzipitiert. Das Pellet wurde mit 75 %-igem Ethanol gewaschen, im Folgenden zentrifugiert, getrocknet und in DEPC-H₂O aufgenommen. Zur Abschätzung der Qualität und Quantität der hergestellten cRNAs wurde jeweils 1 µl der cRNA-Lösung mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Hierfür wurde die jeweilige cRNA mit 3 µl einer 14:1 Mischung aus Dimethylsulfoxid-Glyoxal sowie Ethidiumbromid (1 mg/ml) versetzt und eine Stunde bei 50°C erhitzt. Danach wurden die Proben mit dem Probenpuffer Xylencyanol (1 µl pro Ansatz) auf das 1 %-ige Agarosegel geladen, etwa eine Stunde bei 100 V in

BES-Puffer gelelektrophoretisch aufgetrennt und das Ergebnis unter UV-Licht fotodokumentiert.

3.2.2. Expression und Analyse von rOCT1-Mutanten in *Xenopus laevis* Oozyten

3.2.2.1. Präparation und Injektion der *X. laevis* Oozyten

Die Haltung der Krallenfrösche sowie Präparation der Oozyten wurde entsprechend gängiger Protokolle durchgeführt (Weber, 1999; Wagner et al., 2000). Die weiblichen Frösche wurden 15-20 min in einer Lösung aus Ethyl-3-aminobenzoat-methansulfonat (Tricain) und NaHCO₃ (je 1 g/l) narkotisiert. Mit einem 10-15 mm langen Unterbauchsnchnitt (Laparotomie) wurde die Bauchhaut und Bauchdecke geöffnet und mehrere kleinere Ovarloben entfernt. Nachdem ausreichend Oozyten entnommen wurden, wurden die Haut und die Muskulatur mit jeweils drei Stichen unter Verwendung von steriler Seide (Vomel, Kronberg, D) vernäht. Der operierte Krallenfrosch wurde zur Regeneration einige Stunden isoliert in einem Wasserbehälter aufbewahrt, bevor dieser wieder in ein Gemeinschaftsbecken zurückgesetzt wurde.

Die entnommen Ovarloben wurden in kleine Stücke geschnitten, mit ORI-Lösung gewaschen und anschließend in einer Kollagenase-Lösung (1 mg/ml) über Nacht bei 16°C inkubiert, um eine Vereinzelung und Defollikulierung der Oozyten zu erreichen. Am nächsten Morgen wurden die Oozyten mit kalziumfreier ORI-Lösung mehrmals gewaschen und dann zur Lagerung in ORI-Lösung mit 50 mg/l Gentamycin bei 16°C aufbewahrt.

Für einen schnellen Verdau wurden die Oozyten alternativ auf dem Schüttler für drei bis vier Stunden in einer Kollagenase-Lösung (2 mg/ml) bei Raumtemperatur inkubiert.

Für die Mikroinjektion der cRNA wurden Oozyten nach ihrem Reifegrad sortiert und die Stadien V-VI verwendet (Dumont, 1972). Unter stereomikroskopischer Kontrolle wurde die jeweilige cRNA mit Hilfe der Mikroinjektionspumpe Nanoliter Injection Pump (WPI, Berlin, D) appliziert. Das Injektionsvolumen der cRNA betrug 50 nl (0,2 µg/µl) pro Oozyte.

Zuvor wurden die dabei verwendeten Borosilikatkapillaren GB100-8P (Science Products GmbH, Hofheim, D) mit dem vertikalen Mikroelektroden-Ziehgerät P-30 (Shutter instruments Co, Novato, CA, USA) automatisch in einem Schritt gezogen. Die Glaskapillaren wurden luftblasenfrei mit Mineralöl gefüllt und die Spitze leicht abgebrochen. Anschließend

wurden sie in die Injektionspumpe eingespannt und die cRNA luftblasenfrei in die Kapillare aufgesaugt.

Die Oozyten wurden in ORI-Lösung mit 50 mg/l Gentamycin bei 16°C gelagert; die Expressionsdauer betrug je nach Art des Experimentes zwischen 2-5 Tagen.

3.2.2.2. Messungen der Substrataufnahme der *X. laevis* Oozyten

Für die Messung der Substrataufnahme über die Oozytenmembran wurden 7-10 Oozyten pro Ansatz ausgewählt. Diese Oozyten wurden in 2 ml Reaktionsgefäße überführt, die 180 µl oder 190 µl ORI-Lösung enthielten, so dass das Gesamtvolumen der Lösung nach Zugabe aller Substanzen 200 µl betrug. Der Transport fand bei Raumtemperatur statt und begann nach Zugabe des radioaktiv markierten Substrats (0,14 µCi von [¹⁴C]-TEA oder [³H]-MPP pro Ansatz). Als Kontrolle dienten nicht injizierte Oozyten, denen ebenfalls das radioaktiv markierte Substrat zugesetzt wurde. Falls zusätzlich Inhibitoren eingesetzt wurden, wurden die Oozyten mit dem entsprechenden Hemmstoff 10 min präinkubiert. Die exakt eingesetzten Konzentrationen sind dem Graph und der Textbeschreibung des jeweiligen Experimentes zu entnehmen.

Die Zeit für die Aufnahme des radioaktiv markierten Substrats betrug, wenn nicht anders vermerkt, 30 min. Nach Verstreichen dieser Zeit wurde der Transportvorgang mit einer eiskalten ORI-Stopplösung beendet. Jede Oozyte wurde mindestens viermal gewaschen und in spezielle Zählröhrchen separiert. Pro Röhrchen wurden 100 µl einer 5 %-igen Natriumdodecylsulfatlösung (SDS-Lösung) zugesetzt. Nach vollständiger Lyse der Oozytenmembran, wurde jedem Zählröhrchen 1 ml der Szintillationsflüssigkeit LumaSafe Plus (PerkinElmer Inc., Rodgau, D) hinzugegeben. Alle Proben wurden mittels des Szintillationszählers LS 6500 (Beckman Coulter, Inc. Brea, CA, USA) analysiert. Als Leerwerte dienten zwei Zählröhrchen mit 100 µl SDS-Lösung und 1 ml Szintillationsflüssigkeit, die gemittelt und von den restlichen Proben subtrahiert wurden.

Die Menge des aufgenommenen Substrates wurde aus den im Szintillationszähler ermittelten „counts per minute“ (cpm) bzw. „disintegrations per minute“ (dpm) berechnet. Die unspezifische Aufnahme der nicht injizierten Oozyten wurde von der Aufnahme der OCT1 exprimierenden Oozyten abgezogen.

3.2.3. Proteinbiochemische Methoden

3.2.3.1. Präparation der Membranfraktion von *X. laevis* Oozyten

Das folgende Protokoll wurde an die Proteinisolierungsmethode aus Kamsteeg und Deen (2001) angelehnt. Nach einer Expressionszeit von 48 Stunden wurden pro Ansatz zehn injizierten Oozyten selektiert und mit ORI-Lösung gewaschen. Im Anschluss wurden die Oozyten mit 1 %-igem kolloidalem Siliziumdioxid (Ludox[®]Cl colloidal silica) in MBSS-Puffer versetzt und gemischt (30 min, 4°C). Nach Verstreichen der Zeit wurden die Oozyten zweimal mit MBSS-Puffer gewaschen, mit Polyacrylsäure (0,1 % (v/v)) versetzt und für 30 min erneut gemischt. Nach erneuten Waschschrritten mit ORI-Lösung wurden die Oozyten im HbA-Puffer (20 µl pro Oozyte) unter Zugabe von Proteaseinhibitoren homogenisiert und im Folgenden mehrfach für eine Minute bei 4°C zentrifugiert (1x 10 g, 1x 20 g, 1x 40 g), wobei der Überstand weiterverwendet wurde. Um die Membranfraktion der Oozyten zu isolieren, wurde die letzte Zentrifugation bei 100 000 g für 30 min bei 4°C durchgeführt. Das Pellet wurde mit dem SDS-Probenpuffer versetzt (1,5 µl pro Oozyte).

3.2.3.2. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die in dieser Arbeit beschriebenen proteinbiochemischen Versuche wurden von Dr. Thorsten Keller durchgeführt. Die Proteine aus der Oozytenmembran wurden in Abhängigkeit ihres Molekulargewichts durch die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt (nach Laemmli, 1970). Für die SDS-PAGE wurden zwei übereinander liegende Gelschichten verwendet. Zunächst wurde das flüssige Trenngel hergestellt und in die Gelkammern des Gießstands *Mini-PROTEAN*[®]3 der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D) gefüllt. Die Polymerisation der Trenngelmischung (3,2 ml Lösung A; 2,5 ml Wasser und 1,9 ml Lösung B) wurde durch Zugabe von 75 µl einer 10 %-igen (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS)-Lösung und 5 µl N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) ausgelöst. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das flüssige Sammelgel hinzugefügt (830 µl Lösung A; 2,9 ml Wasser und 1,25 ml Lösung C). Hier erfolgte der Polymerisationsstart durch Zugabe von 40 µl einer 10 %-igen (w/v) APS-Lösung und 6 µl TEMED. Nachdem je 45 µl der Proteinproben mit je 15 µl SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min auf 95°C erhitzt wurden, konnten die Proben auf das Gel aufgetragen werden. Nach Einfüllen des Laufpuffers wurde die Gelelektrophorese bei einer maximalen Spannung von

200 mV 60 min durchgeführt. Zur Abschätzung der aufgetragenen Proteinmengen wurden die Proteinbanden eines Gels mit der SDS-PAGE-Gelfärbelösung angefärbt und anschließend der Hintergrund mit der SDS-PAGE-Gelentfärbelösung entfärbt, so dass die Proteinbanden sichtbar wurden.

3.2.3.3. Western-Blot-Analyse

Um die gewünschten Konstrukte immunologisch nachweisen zu können, wurden die während der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine durch einen Elektrotransfer auf einen Membranfilter überführt. Für diese Übertragung der Proteine auf eine Polyvinylidendifluoridmembran (PVDF-Membran, Millipore, *Billerica, MA, USA*) wurde das „Semi-dry“-Blot-System verwendet (Gershoni und Palade, 1983). Hierfür wurde eine horizontale Apparatur mit zwei Graphitplatten-Elektroden (A. Hartenstein, Würzburg, D) eingesetzt. Die Trägermembran sowie die Whatman-Papiere wurden vor Beginn des Blots mit dem Transferpuffer äquilibriert, wobei die Trägermembran zuvor mit Methanol aktiviert wurde. Für die Anordnung der einzelnen Western-Blot-Komponenten wurde folgende Reihenfolge gewählt: die Kathode, 3x Whatman-Papiere, das SDS-PAGE-Trenngel, die PVDF-Membran, 3x Whatman-Papiere und die Anode. Der Transfer der Proteine erfolgte für zwei Stunden bei einer Stromstärke von $1,3 \text{ mA/cm}^2$. Vor der immunologischen Reaktion wurden alle restlichen Bindungsstellen der Trägermembran bei Raumtemperatur mit 2 % (w/v) Rinderserumalbumin in PBST über Nacht abgesättigt.

Zum Nachweis der „FLAG-tag“ Proteine wurde ein monoklonaler Maus anti-FLAG-Antikörper der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, D, F1804) für zwei Stunden (1:20 000) eingesetzt. Nach einem Waschschrift wurde ein Protein G-Peroxidase-Konjugat (1:5000) (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D) ebenfalls für zwei Stunden inkubiert. Das gebundene Protein G-Peroxidase-Konjugat wurde mit Hilfe der „Enhanced Chemiluminescence“-Reaktion (ECLTM, Amersham, Freiburg, D) detektiert. Die relative Färbung der erhaltenen Banden konnten mit Hilfe des Programms Image J abgeschätzt werden.

3.2.4. Elektrophysiologische Messungen

3.2.4.1. Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC)

Alle elektrophysiologischen Experimente wurden mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme-Technik („Two-Electrode-Voltage-Clamp-technique“, TEVC) durchgeführt. Der gesamte TEVC-Messplatz war auf einem schwingungsgedämpften Tisch aufgebaut, um den sich ein Faraday-Käfig befand. Es wurde ein Verstärker der Serie TURBO tec-05X (NPI Electronic GmbH, Tamm, D) verwendet. Dieser Verstärker war über den Analog-Digital-Wandler ITC-16 (Instrutech Corporation, NY, USA) an einen Personal Computer angeschlossen. Zur Steuerung des Verstärkers wurde die Software Patchmaster 2.32 benutzt. Gemessene Ströme wurden unter Verwendung einer konstanten Sollspannung mit einem vierpoliger Besselfilter bei 20 Hz aufgenommen.

Bei allen Experimenten wurde die jeweilige *X. laevis* Oozyte in eine selbstgebaute Plexiglaskammer platziert. Die Messkammer wurde während des gesamten Experiments konstant mit der entsprechenden Badlösung umspült, was über das angeschlossene Perfusionssystem gesteuert wurde. Zur spezifischen Markierung von Cysteinen wurde zum Teil Lösung direkt in die Messkammer appliziert.

Die Glaselektroden wurden mittels des Pipettenziehgerätes PIP5 (HEKA Elektronik, Lambrecht, D) in zwei Schritten aus Glasrohlingen (Borosilikatglaskapillaren GB150F-8P, Science Products GmbH, Hofheim, D) gezogen. Die fertigen Glaselektroden wurden mit 3 M KCl-Lösung luftblasenfrei gefüllt und auf der Pipettenhalterung angebracht. Über Mikromanipulatoren (NARISHIGE SCIENTIFIC INSTRUMENT LAB, J) konnte eine Bewegung in alle drei Raumrichtungen gewährleistet werden.

Die Silberelektrodenröhre wurden in regelmäßigen Abständen mit Hilfe einer automatischen Apparatur ACI-01 (NPI Electronic, Tamm, D) unter Verwendung von einer 2 M KCl-Lösung chloriert.

Vor jeder Messung wurden die Widerstände der Glaselektroden überprüft und ein Strom- sowie Spannungsabgleich vorgenommen. Die Potentialelektrode hatte einen Widerstand von 0,6-2,5 M Ω , die Stromelektrode von 0,5-2,0 M Ω .

3.2.4.2. Bestimmung der Membrankapazitäten

Unter TEVC-Bedingungen wurde in *X. laevis* Oozyten der Strom gemessen und simultan die Membrankapazität bestimmt. Dieses Verfahren wurde in unserem Labor entwickelt und ausführlich beschrieben (Schmitt und Koepsell, 2002; Schmitt und Koepsell, 2005). Hierfür wurde der Strom als Antwort auf einen symmetrischen Spannungstimulus, der aus einer depolarisierenden und einer hyperpolarisierenden Rampe besteht, aufgenommen. Die Dauer einer Rampe betrug 20 ms und die Amplitude 20 mV. Mit Hilfe dieses Protokolls kann die kapazitive Komponente des Stroms durch Eliminierung der resistiven Komponente erhalten werden, so dass die absolute Membrankapazität errechnet werden kann (Schmitt und Koepsell, 2005). Das gepaarte Rampenprotokoll wurde bei einer Filterung von 20 kHz mit einem vierpoligen Besselfilter durchgeführt.

3.2.4.3. Cystein-spezifische Markierung der rOCT1-Mutanten

In dieser Arbeit wurden Cysteinreste, die in die rOCT1-Proteinsequenz eingeführt wurden, mit unterschiedlichen Substanzen spezifisch modifiziert. Zum einen wurden Cysteine mit einem Fluoreszenzfarbstoff kovalent markiert, zum anderen wurden Cysteine mittels eines Methanthiosulfonatderivat kovalent modifiziert (Gleichung 3.1).

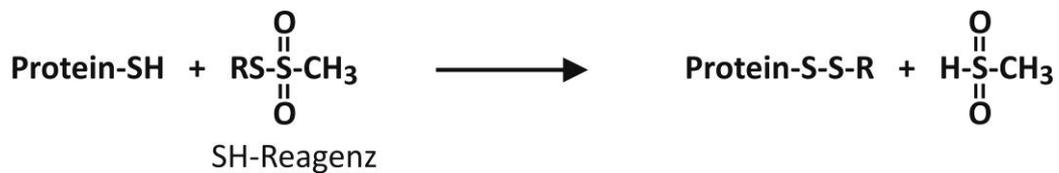
A: Tetramethylrhodamin-6-maleimid (TMR6M)

Der Rhodamin-Fluoreszenzfarbstoff TMR6M besitzt ein Absorptionsmaximum bei $\lambda_{\text{ex}} = 555 \text{ nm}$ und ein Emissionsmaximum bei $\lambda_{\text{em}} = 580 \text{ nm}$. Oozyten, die die mutierten rOCT1(10 Δ Cys)-Varianten exprimierten, wurden für die Voltage-Clamp-Fluorometrie (vergleiche Kapitel 3.2.4.4) bei Raumtemperatur 5 min mit einer 10 μM TMR6M enthaltenden ORI-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die markierten Oozyten mehrmals mit farbstofffreier ORI-Lösung gewaschen, um nicht kovalent gebundenen Farbstoff zu entfernen.

B: [2-(Trimethylammonium)ethyl] methanethiosulfonate Bromid (MTSET)

MTSET gehört zu den Methanthiosulfonatderivaten und ermöglicht ebenso eine kovalente Modifikation von SH-Gruppen. MTSET ist positiv geladen und membranimpermeabel. Da MTSET-Lösungen bei Raumtemperatur nicht stabil sind, wurden die wässrigen Messlösungen

unmittelbar vor Beginn jedes Experiments frisch angesetzt. Für die Voltage-Clamp-Fluorometrie (vergleiche Kapitel 3.2.4.4) wurden Oozyten, die die 10 Δ Cys-Mutanten exprimierten, 30-45 s mit einer 1 mM MTSET haltigen ORI-Lösung umspült. Bei Messungen der Substrataufnahme wurden die Oozyten mit einer 100 μ M MTSET haltigen ORI-Lösung 10 min präinkubiert und im Anschluss mit ORI-Lösung mehrfach gewaschen.



Gleichung 3.1 Reaktionsgleichung für Cystein-reaktive Substanzen (TMR6M, MTSET) mit SH-Gruppen von Proteinen.

3.2.4.4. Zwei-Elektroden-Spannungsklemme-Fluorometrie

Der Aufbau des Setups für die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme-Fluorometrie („Voltage-Clamp-Fluorometrie“) wurde nach dem Schema von Isacoff und Bezanilla (Mannuzzu et al., 1996; Cha und Bezanilla, 1997; Cha et al., 1998) umgesetzt.

Die Grundausstattung des Messplatzes stimmt mit der Beschreibung des TEVC-Messstandes in Kapitel 3.2.4.1 überein. Zusätzlich wurde für die Fluoreszenzmessung das Setup mit den folgenden Hardwarekomponenten weiter ausgebaut. Die Messkammer war auf dem Tisch des Epifluoreszenzmikroskops Leica DM LFS (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, D) angebracht, das über ein 40 x Wasserimmersionsobjektiv (HCX APO L 40 x/0,8) verfügte (Geibel et al., 2003). Die Lichtquelle Leica EL6000 (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, D) besaß einen langlebigen Quecksilber-Metall-Halid-Brenner sowie einen schnellen, vollständig integrierten Shutter, der zwischen die Lichtquelle und das Mikroskop geschaltet war, um das Ausmaß von Fotobleicheffekten zwischen den einzelnen Messschritten zu minimieren. Ebenso konnte die Intensität des Anregungslichtes optimal durch einen integrierter Abschwächer eingestellt werden (www.leica-microsystems.com).

Exzitations- und die Emissionswellenlängen betragen 555 nm bzw. 580 nm. Das Filtersystem Y3 L beinhaltet einen Exzitationsfilter 535/50, einen dichroitischen Spiegel 565 nm und einen Emissionsfilter 610/75.

Das Fluoreszenzsignal wurde von der Fotodiode PIN:20A (AMS Technologies AG, München, D) detektiert und von dem Low-Noise Current Preamplifier Model SR570 (Stanford Research Systems, Sunnyvale, CA, USA) verstärkt.

Der animale Pol der *X. laevis* Oozyten wurde in Richtung des Objektivs ausgerichtet, da der Hintergrund so am geringsten und das Fluoreszenzsignal am stabilsten war (Meinild et al., 2002). Zur simultanen Messung von Fluoreszenz und Strom konnte ebenfalls die Software Patchmaster 2.32 verwendet werden. Für diese Messungen wurde ein Spannungssprungprotokoll verwendet und die Filterung bei 1 kHz mit einem vierpoligen Besselfilter durchgeführt.

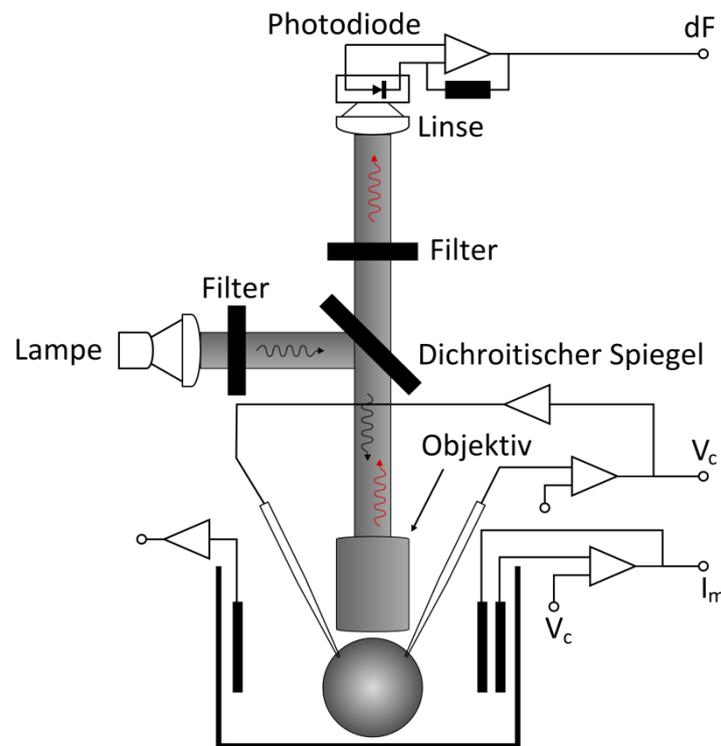


Abbildung 2.1 Schematische Darstellung der Voltage-Clamp-Fluorometrie Messanordnung nach Cha et al., 1998. Das Anregungslicht wird von einem Quecksilber-Metall-Halid-Brenner erzeugt, anschließend gefiltert, von einem dichroitischen Spiegel reflektiert und auf die Oberfläche einer *X.laevis* Oozyte fokussiert. Das emittierte Licht passiert den dichroitischen Spiegel und wird von einer Fotodiode erfasst. Während der Fluoreszenzmessung befindet sich die Oozyte unter Spannungsklemmbedingungen.

Die Fluoreszenz der TMR6M-markierten Oozyten wurde in Abhängigkeit von Spannungsänderungen und unter dem Einfluss von verschiedenen Substanzen aufgenommen. Dabei wurde die Sollspannung von +60 mV bis -160 mV in 20 mV-Schritten variiert; zwischen den Spannungssprüngen wurde die Sollspannung bei -50 mV für 1 s

gehalten, so dass eine vollständige Relaxation des Fluoreszenzsignals erreicht wurde. Die Dauer der einzelnen Sprünge betrug 1,5 s.

Jede Aufnahme des Fluoreszenzsignals wurde zwischen drei- und fünfmal überlagert, um das Hintergrundrauschen zu minimieren. Die Fluoreszenzänderungen (ΔF) wurden nach der Gleichung $\Delta F = [F_V - F_{(-160\text{mV})}] / F_{(-160\text{mV})}$ normalisiert und in Abhängigkeit von den Sollspannungen dargestellt.

Für die Bestimmung der Zeitkonstanten τ_{fast} und τ_{slow} der spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen wurde die folgende biexponentielle Funktion verwendet:

$$F(t) = \text{const}_0 + A_1 \exp(-(x-x_0)/\tau_{\text{fast}}) + A_2 \exp(-(x-x_0)/\tau_{\text{slow}})$$

wobei A_1 und A_2 die Amplituden darstellen und τ_{fast} sowie τ_{slow} die jeweiligen Zeitkonstanten der Fluoreszenzänderungen repräsentieren. Diese Gleichung wurde für „ON“-Pulse (Spannungssprung von -50 mV auf eine spezifische Spannung) als auch „OFF“-Pulse (Spannungssprung von der spezifischen Spannung zurück auf -50 mV) verwendet.

3.2.5. Expression und Analyse von rOCT1-Mutanten in Human Embryonic Kidney-293 (HEK293)-Zellen

3.2.5.1. Zellkultur

Die Kultivierung der HEK293-Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂-haltiger und Wasserdampf gesättigter Atmosphäre in entsprechenden Kulturgefäßen. Alle HEK293-Zellen wurden in DMEM gehalten; ein Medienwechsel erfolgte jeden zweiten Tag. Für das Passagieren der HEK293-Zellen wurden diese mechanisch von den Zellkulturgefäßen gelöst, bei 1000 g 10 min zentrifugiert und in neuem Kulturmedium resuspendiert, wobei etwa 10 % der Ausgangszellen weiterverwendet wurden. Für die Messungen in Kapitel 3.2.5.2 und 3.2.5.3 wurden HEK293-Zellen der Passage 10-50 verwendet.

Speziell für diese Arbeit benötigte stabil transfizierte Zelllinien wurden von Brigitte Dürner generiert.

3.2.5.2. Messungen der Substrataufnahme der HEK293-Zellen

Die Messungen der Substrataufnahme der HEK293-Zellen wurden von Irina Schatz und Alla Ganscher durchgeführt. Wie bereits in Kapitel 3.2.2.2 für Oozyten erläutert wurde auch hier

die Aufnahme eines radioaktiv markierten Substrates ($[^3\text{H}]$ -MPP) über die Zellmembran gemessen.

Die Messung der Substrataufnahme wurde gestartet, wenn eine konfluente Zellschicht im jeweiligen Zellkulturgefäß vorhanden war. Zu Beginn wurden die HEK293-Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mechanisch von der Oberfläche des Zellkulturgefäßes gelöst. Nach einer Zentrifugation von 10 min bei 1000 g wurden die Zellen in Transport-PBS resuspendiert. Mit Zugabe des radioaktiv markierten Substrats (1,4 μCi pro Ansatz) startete der Transportvorgang bei 37°C, der nach einer Sekunde mittels Stopplösung, die 100 μM Quinin als Inhibitor (Nagel et al., 1997) enthielt, beendet wurde. Bei sehr geringen Aufnahmeraten wurde die Messzeit auf 10 s erhöht. Als Kontrolle wurden HEK293-Zellen mit dem radioaktiv markierten Substrat ohne weiteren Zusatz vor und nach dem Versuch versetzt und unter den gleichen Bedingungen gemessen, um einen eventuellen Abfall der Aufnahme während des Experiments mit einberechnen zu können. Die Zellen wurden nach der Messung mit 100 μl 4 M Guanidin-Thiocyanat eine Stunde lysiert und anschließend mit 1 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und in den Szintillationszähler gestellt.

3.2.5.3. Bindungsmessungen in HEK293-Zellen

Die Bindungsmessungen werden im Gegensatz zu den in Kapitel 3.2.5.2 beschriebenen Messungen der Substrataufnahme auf Eis durchgeführt. Alle in dieser Arbeit gezeigten Bindungsmessungen wurden von Neha Gottlieb ausgeführt.

Zuerst wurden die HEK293-Zellen mit PBS gewaschen, anschließend von den Gewebekulturplatten mechanisch abgelöst, 10 min bei 1000 g zentrifugiert und in Transport-PBS aufgenommen. Bevor im Anschluss das radioaktiv markierte Substrat MPP (0,14 μCi pro Ansatz) für 5 min inkubiert wurde, wurden die Zellen 10 min auf Eis gestellt. Nach Verstreichen dieser Zeit wurden die HEK293-Zellen bei 1000 g 10 min zentrifugiert, der Überstand möglichst genau entfernt und anschließend ein kurzer Waschschrift mit PBS durchgeführt, in dem mit einer Pipette die Lösung hinzugegeben und gleich wieder entfernt wurde. Wie in Kapitel 3.2.5.2. wurden die HEK293-Zellen mit Guanidin-Thiocyanat lysiert, eine Stunde auf dem Schüttler inkubiert, mit 1 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und in den Szintillationszähler gestellt.

Für die quantitative Proteinbestimmung wurde die Methode nach Lowry angewendet (Lowry et al., 1951).

3.2.6. Berechnungen und Statistiken

Jedes individuelle Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt. Sämtliche statistischen Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben.

Mit Hilfe der Michaelis-Menten-Gleichung wurden die apparenten K_m -Werte für die Aufnahme der radioaktiv markierten Substrate und $K_{0,5}$ -Werte für Kation-induzierte Ströme berechnet.

IC_{50} -Werte (apparenter K_i) wurden für die Inhibition der Aufnahme der radioaktiv markierten Substrate durch nicht markierte Kationen mittels der Hill Gleichung bestimmt. Prozentuale Hemmungen wurden gegen die Hemmstoffkonzentration halblogarithmisch aufgetragen.

Zur Bestimmung der K_D -Werte wurde für die Bindungsmessungen die Hill Gleichung verwendet.

Die Signifikanz der Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurde mit Hilfe des ungepaarten Student's t-Test überprüft. Eine einfaktorielle Varianzanalyse („one-way ANOVA“) mit dem *post-hoc* Testverfahren Tukey wurde für drei oder mehrere Gruppen verwendet. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als schwach signifikant, $< 0,01$ als signifikant und $< 0,005$ als hoch signifikant betrachtet.

4. ERGEBNISSE

4.1. Identifizierung von Positionen in rOCT1, die spannungsabhängige Fluoreszenzänderungen zeigen

Mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme-Fluorometrie („Voltage-Clamp-Fluorometrie“) konnten bereits Aminosäuren (F483, F486) im äußeren Drittel der TMH 11 von rOCT1 identifiziert werden, mit denen spannungs- und kationenabhängige Bewegungen dieser Transmembrandomäne gezeigt werden konnten (Gorbunov et al., 2008). Um weitere beim Transport auftretende Molekülbewegungen von rOCT1 zu erfassen, wurden anhand des Strukturmodells des Transporters für diese Arbeit Aminosäuren ausgewählt, die in von außen zugänglichen Bereichen der TMH 5 und TMH 8 lokalisiert sind. Die TMH 5 und 8 befinden sich auf der gegenüberliegenden Seite der TMH 2 und 11 des Transporters. Bedingt durch die Symmetrie von rOCT1 sind im Bereich dieser Transmembrandomänen ebenfalls Konformationsänderungen während des Transports zu erwarten.

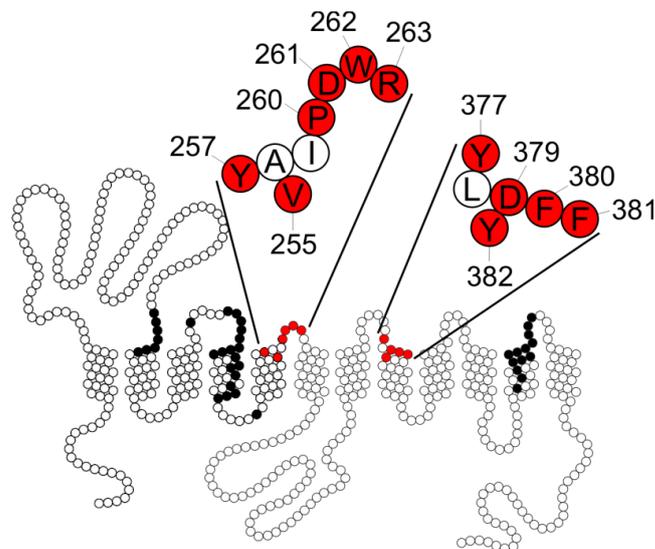


Abbildung 4.1 Lokalisierung der eingeführten Cysteine in rOCT1(10ΔCys).

Membrantopologie des rOCT1(10ΔCys) mit der Lage der mutierten Aminosäuren. Die individuell durch Cysteine ersetzten Aminosäuren in TMH 5 und TMH 8 (rot) sind im Einbuchstabencode hervorgehoben. Bereits untersuchte Positionen in TMH 2, TMH 4 und TMH 11 sind schwarz gekennzeichnet (Bonny Thekkumthala, nicht veröffentlichte Daten; Gorbunov et al., 2008).

Aus diesem Grund wurden in die Transmembranhelices 5 und 8 der Cystein-Substitutionsmutante rOCT1(10ΔCys), die als Grundlage aller weiteren Konstrukte diente, Cysteinreste eingeführt und die entstandenen Mutanten analysiert (vergleiche Kapitel 2.1.3).

Die genaue Lage der durch Cysteine ersetzten Aminosäuren wird anhand der Abbildung 4.1 verdeutlicht.

In den folgenden Experimenten wurden als heterologes Expressionssystem für die rOCT1(10ΔCys)-Mutanten *Xenopus laevis* Oozyten verwendet. Die TEVC-Messungen wurden drei bis vier Tage nach Injektion der jeweiligen cRNA durchgeführt, die Aufnahme von radioaktiv markiertem Substrat wurde zwei bis drei Tage nach Injektion der jeweiligen cRNA analysiert (vergleiche Kapitel 3.2.2.2).

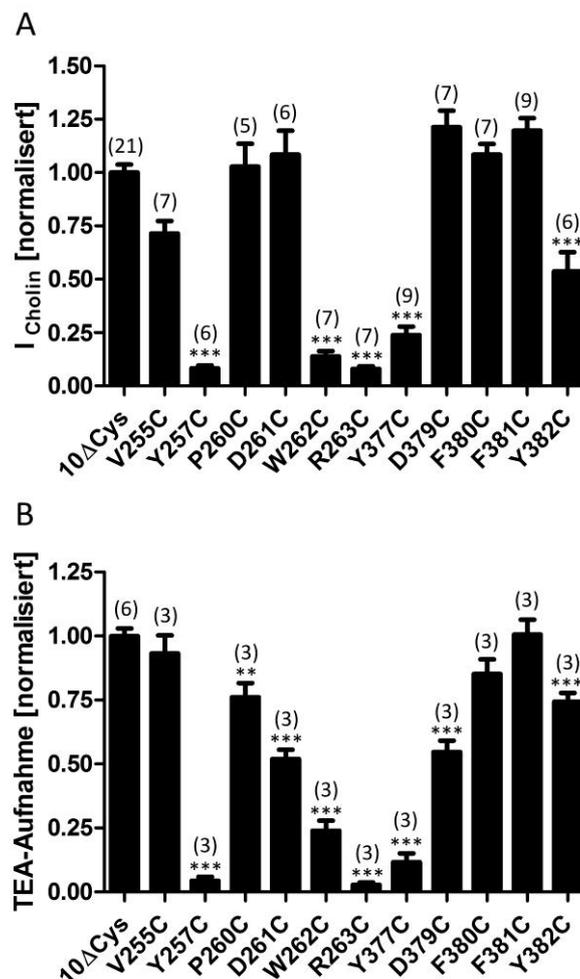


Abbildung 4.2 Aktivitätsanalyse der Cysteinmutanten von rOCT1(10ΔCys) in *Xenopus laevis* Oozyten. (A) Quantifizierung der durch 10 mM Cholin-induzierten Stromamplituden der verschiedenen rOCT1(10ΔCys)-Mutationen relativ zur Stromamplitude von rOCT1(10ΔCys). Die Fehlerbalken geben den jeweiligen Standardfehler der normalisierten Daten an. Die Anzahl der individuellen Experimente ist in Klammern angegeben. (B) Quantifizierung der [¹⁴C]-TEA-Aufnahme (9 μM) der verschiedenen Cysteinmutanten relativ zu rOCT1(10ΔCys). Alle Messwerte wurden normalisiert und gehen aus mindestens drei individuellen Experimenten hervor. Ein signifikanter Unterschied der Stromamplitude oder der Aufnahme von [¹⁴C]-TEA im Vergleich zu rOCT1(10ΔCys) ist durch „Sternchen“ gekennzeichnet (**: p < 0,01; ***: p < 0,005).

Die Funktionalität der Cysteinmutanten in der TMH 5 und TMH 8 wurde zum einen durch die Bestimmung der [¹⁴C]-TEA-Aufnahme (9 μM) und zum anderen durch die Bestimmung des Cholin (10 mM)-induzierten Einwärtsstroms analysiert. Der Abbildung 4.2 ist zu entnehmen, dass bei beiden Experimenten sieben der elf Cysteinmutanten mehr als 50 % der Aktivität von rOCT1(10ΔCys) aufwiesen. Lediglich die Cysteinmutanten in Position Y257, W262, R263 und Y377 zeigten eine stark reduzierte Aktivität, wobei in Position Y257 und R263 nur noch ungefähr 10 % der Aktivität im Vergleich zu rOCT1(10ΔCys) erreicht wurden.

Die für die [¹⁴C]-TEA-Aufnahme verwendete Konzentration von 9 μM liegt weit unterhalb des K_m -Werts von rOCT1(10ΔCys) ($K_m = 67 \pm 8 \mu\text{M}$; Gorbunov et al., 2008). Die Bestimmung des Cholin-induzierten Stroms fand bei einer Konzentration von 10 mM im gesättigten Bereich von rOCT1(10ΔCys) ($K_{0,5} = 1,41 \pm 0,24 \text{ mM}$; Gorbunov et al., 2008) statt, so dass in den TEVC-Messungen von Cholin wahrscheinlich die jeweiligen V_{max} -Werte der Mutanten erfasst wurden. Durch eine starke Verschiebung der Affinität im Vergleich zu rOCT1(10ΔCys) könnte auch ein Wert unterhalb des V_{max} -Werts für eine oder mehrere Cysteinmutanten detektiert worden sein, was aufgrund gleicher Tendenzen beider hier durchgeführten Experimente unwahrscheinlich ist. Die Ursache für die veränderten V_{max} -Werte der vier Cysteinmutanten wurde jedoch nicht weiter untersucht, da dies nicht im Fokus der Untersuchungen stand. Außerdem könnten diese Cysteinmutanten trotz reduzierter V_{max} -Werte nachweisbare spannungsabhängige Konformationsänderungen aufweisen, so dass im Folgenden alle aufgeführten Mutationen mittels der Voltage-Clamp-Fluorometrie untersucht wurden.

Die Voltage-Clamp-Fluorometrie-Messungen wurden drei bis fünf Tage nach Injektion der jeweiligen cRNA in *X. laevis* Oozyten durchgeführt (vergleiche Kapitel 3.2.4.4). Zunächst wurden die zuvor aufgeführten Cysteinmutanten der TMH 5 und TMH 8 durch 10 μM Tetramethylrhodamin-6-maleimid (TMR6M) markiert und getestet, ob spannungsabhängige Fluoreszenzänderungen (ΔF) auftraten. Dabei wurde das in Abbildung 4.3 A gezeigte Protokoll verwendet, das ausgehend von -50 mV Spannungssprünge von +60 mV bis -160 mV in 12 Schritten vollführt. Spannungsabhängige Fluoreszenzänderungen konnten in beiden Transmembranhelices in je einer Position nachgewiesen werden. In TMH 5 zeigte dies die Mutante rOCT1(10ΔCys-P260C) und in TMH 8 die Mutante rOCT1(10ΔCys-F380C). Für den leeren Transporter ergab sich ausgehend von -50 mV für beide Cysteinmutanten eine Erhöhung des Fluoreszenzsignals nach Depolarisierung und eine Erniedrigung des

Fluoreszenzsignals nach Hyperpolarisierung (Abbildung 4.3 B, C). Die bereits bekannte Position 483 zeigte im Vergleich zu den beiden erstgenannten Mutanten für den leeren Transporter eine invertierte Antwort des Fluoreszenzsignals (Abbildung 4.3 D).

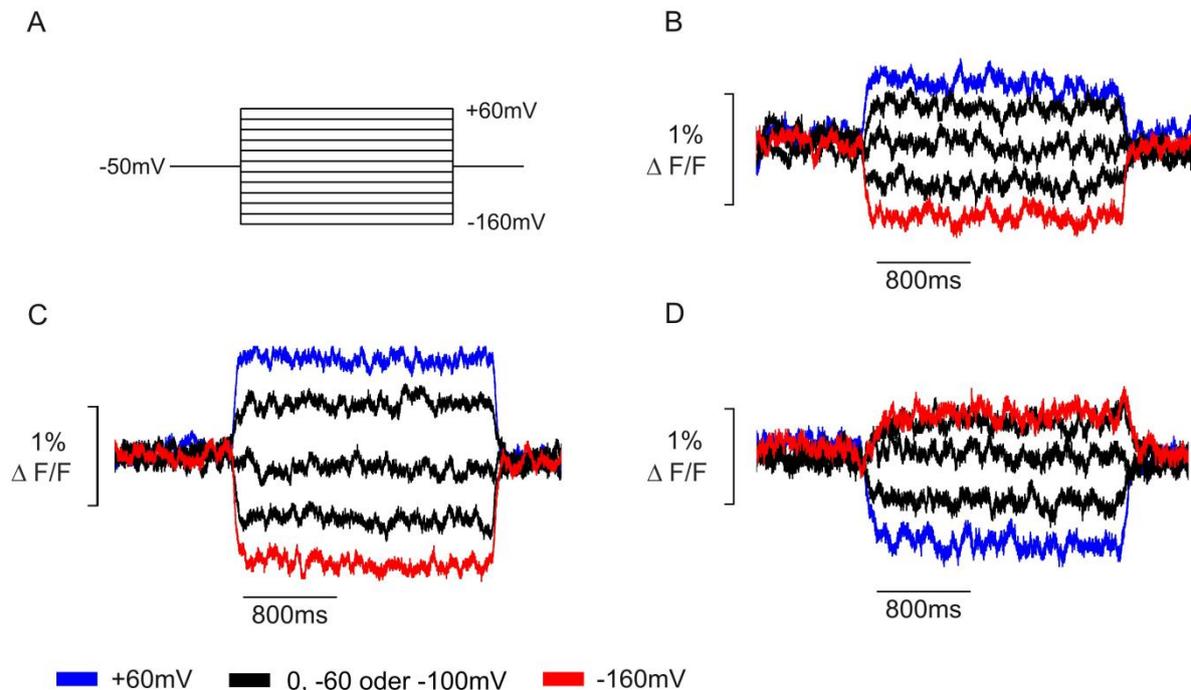


Abbildung 4.3 Spannungabhängige Fluoreszenzänderungen der Cysteinmutanten.

(A) Protokoll der Spannungssprünge für die Voltage-Clamp-Fluorometrie-Messungen. Ausgehend von -50 mV wurden die *X. laevis* Oozyten nacheinander auf 12 verschiedene Spannungsstufen geklemmt. In (B-D) wurden fünf der 12 Spannungsstufen repräsentativ dargestellt. (B) Fluoreszenzaufzeichnung der TMR6M-markierten rOCT1(10ΔCys-P260C)-Mutante (C) Fluoreszenzaufzeichnung der TMR6M-markierten rOCT1(10ΔCys-F380C)-Mutante (D) Fluoreszenzaufzeichnung der TMR6M-markierten rOCT1(10ΔCys-F483C)-Mutante.

4.1.1. Charakterisierung der spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen in TMH 5, 8 und 11

Um den Einfluss verschiedener Substrate auf die Fluoreszenz der Cysteinmutanten analysieren zu können, wurde zunächst das Fluoreszenzsignal in Abwesenheit von organischen Kationen bestimmt. Für diesen Zweck wurden die Oozyten, die mit der jeweiligen cRNA injiziert wurden, mit ORI-Lösung umspült und das Spannungssprungprotokoll ausgeführt. Im Anschluss wurde die Oozyte mit einem Substrat umspült und die Fluoreszenzantwort auf das Spannungssprungprotokoll wieder aufgezeichnet. In Abbildung 4.4 A ist die Abhängigkeit der spannungsabhängigen Fluoreszenzantwort normalisiert auf -160 mV von rOCT1(10ΔCys-P260C) nach Gabe

verschiedener Substrate gesättigter Konzentrationen zu erkennen. Das Fluoreszenzsignal wurde im Vergleich zur Fluoreszenzantwort des leeren Transporters von allen getesteten organischen Kationen auf individuelle Weise modifiziert. Während in Abwesenheit organischer Kationen die Fluoreszenz nach Depolarisation erhöht wurde, ergab sich eine invertierte verkleinerte Fluoreszenzantwort nach Gabe des transportierten Substrates Cholin (10 mM). Auch für das transportierte Substrat MPP (100 μ M) konnte eine ähnliche Fluoreszenzveränderung wie für Cholin aufgezeichnet werden. Das nicht transportierte TBuA (100 μ M) konnte die spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen nahezu vollständig blockieren.

Für die zweite Cysteinmutante rOCT1(10 Δ Cys-F380C) ergab sich insgesamt ein ähnliches Bild im Vergleich zur rOCT1(10 Δ Cys-P260C)-Mutante, das jedoch nicht für alle organische Kationen identisch war (Abbildung 4.4 B). Normalisiert auf -160 mV wurde das Fluoreszenzsignal für den leeren Transporter ebenfalls nach Depolarisation erhöht und nach Bindung organischer Kationen unterschiedlich beeinflusst. Im Unterschied zu der rOCT1(10 Δ Cys-P260C)-Mutante beeinflusste MPP das Fluoreszenzsignal in Position 380 nur bei einem Membranpotential, das größer als -60 mV war, so dass keine Inversion sondern nur eine Reduktion des Signals im Vergleich zum leeren Transporter detektiert werden konnte. Für Cholin wurde wie für die Position 260 eine Erniedrigung der Fluoreszenzantwort nach Depolarisation aufgezeichnet.

Die dritte Cysteinmutante rOCT1(10 Δ Cys-F483C) zeigte für den leeren Transporter eine Reduktion der Fluoreszenzantwort nach Depolarisation. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch mit den von Dr. Dmitry Gorbunov publizierten Daten (Gorbunov et al., 2008). Nach vielfacher Überprüfung und Diskussion gehen wir davon aus, dass in der Arbeit von Dr. Gorbunov die Polaritäten vertauscht wurden.

In Gegenwart der drei getesteten organischen Kationen Cholin, MPP und TBuA ergab sich für rOCT1(10 Δ Cys-F483C) stets die gleiche invertierte Fluoreszenzantwort. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den von Dr. Gorbunov berichteten Daten.

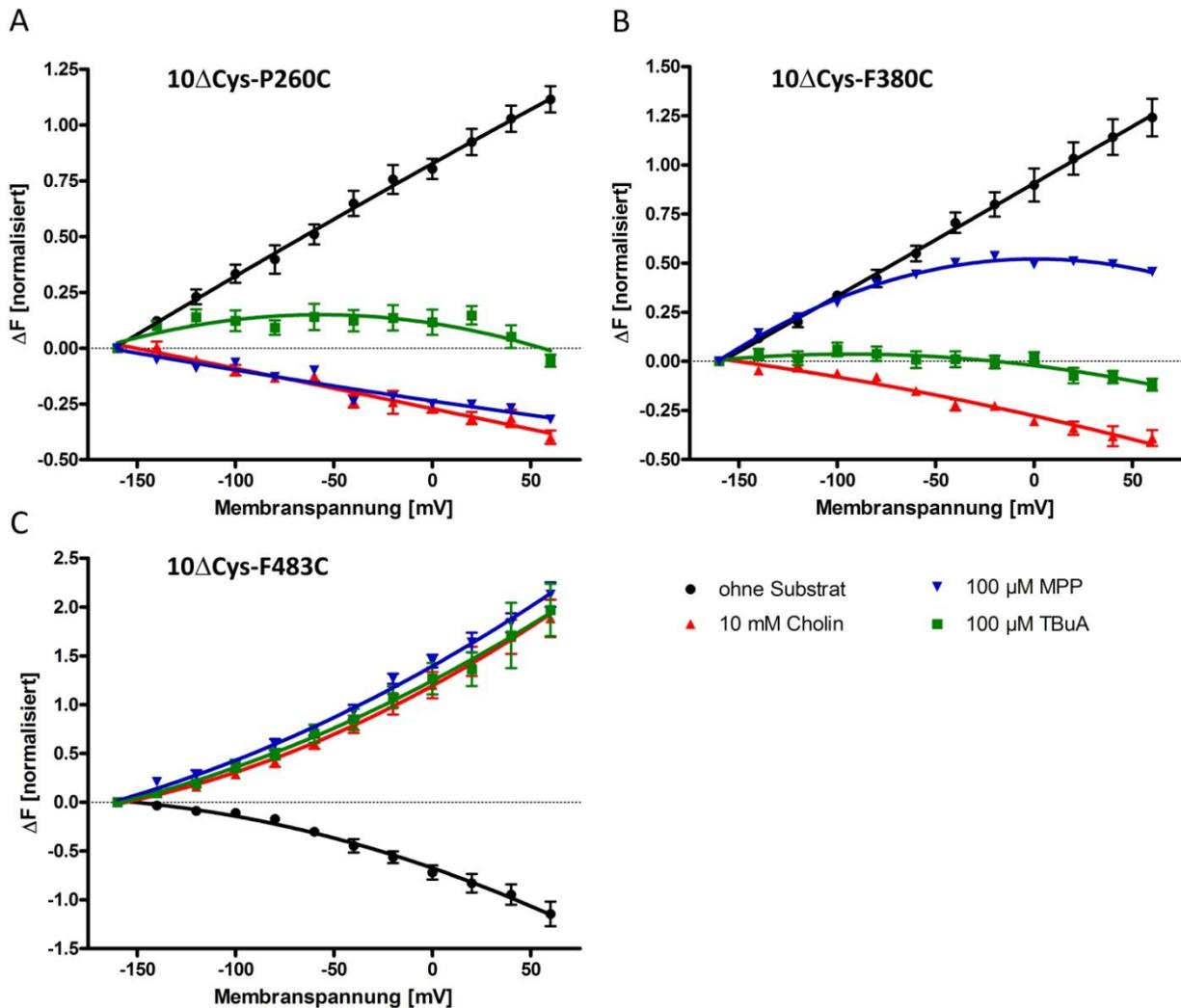


Abbildung 4.4 Spannungsabhängige Fluoreszenzänderungen unter dem Einfluss verschiedener organischer Kationen. Normalisierte Darstellung der Spannungsabhängigkeit der Fluoreszenzamplituden der jeweiligen TMR6M-markierten Cysteinmutanten in *X. laevis* Oozyten (ΔF -U Kurven, siehe Material und Methoden, Kapitel 3.2.4) für den leeren Transporter und unter dem Einfluss von verschiedenen organischen Kationen. Als transportierte Substrate dienten Cholin und MPP, als nicht transportiertes Kation diente der Hemmstoff TBuA. (A) rOCT1(10ΔCys-P260C) (B) rOCT1(10ΔCys-F380C) (C) rOCT1(10ΔCys F483C).

Die mittels der Voltage-Clamp-Fluorometrie erhaltenen Daten zeigen, dass rOCT1 spannungsabhängige Konformationen einnimmt, bei deren Änderungen sich mindestens drei Transmembrandomänen (TMH 5, TMH 8 und TMH 11) bewegen. Interessanterweise wirken sich Interaktionen von dem nicht transportierten Hemmstoff TBuA von außen und den Substraten Cholin sowie MPP unterschiedlich auf die Bewegungen in den drei verschiedenen Positionen aus. So verändert TBuA die spannungsabhängige Fluoreszenzänderung der Mutanten rOCT1(10ΔCys-P260C) und rOCT1(10ΔCys-F380C) weniger stark als die der

Mutante rOCT1(10ΔCys-F483C). In Gegenwart des Substrates MPP wurde die Fluoreszenzänderung von rOCT1(10ΔCys-F380C) weniger stark beeinflusst als bei den Mutanten rOCT1(10ΔCys-P260C) und rOCT1(10ΔCys-F483C).

4.1.2. Funktionelle Charakterisierung der Cysteinmutanten rOCT1(10ΔCys-P260C), rOCT1(10ΔCys-F380C) und rOCT1(10ΔCys-F483C)

Um direkte Interaktionen der getesteten Kationen mit den Positionen 260, 380 und 483 zu identifizieren, wurden die funktionellen Eigenschaften der Mutanten mit der Grundmutante rOCT1(10ΔCys) verglichen. Beispielsweise könnten die unterschiedlichen Effekte von MPP auf die Fluoreszenzänderung in der Position 380 im Vergleich zu den Positionen 260 und 483 darauf beruhen, dass MPP mit der Position 380 oder 260 und 483 direkt interagiert. Sie können aber auch bedeuten, dass die Bindung von MPP an der Bindungsstelle zu unterschiedlichen allosterischen Effekten in diesen drei Positionen führt. Das gleiche trifft auch auf die unterschiedlichen Effekte von TBuA auf die verschiedenen Mutanten zu. Um Veränderungen der funktionellen Eigenschaften zu erfassen, wurden die Cysteinmutanten rOCT1(10ΔCys-P260C), rOCT1(10ΔCys-F380C) und rOCT1(10ΔCys-F483C) in *X. laevis* Oozyten exprimiert und der Cholin-induzierte Strom, die Aufnahme von [³H]-MPP sowie die Hemmung der [³H]-MPP-Aufnahme (2,5 nM) durch TBuA im Vergleich zu rOCT1(10ΔCys) bestimmt.

Der Cholin-induzierte Einwärtsstrom der jeweiligen Cysteinmutante ist in Abbildung 4.5 A dargestellt. Die bei -50 mV bestimmten $K_{0,5}$ -Werte betragen für rOCT1(10ΔCys-P260C) $1,52 \pm 0,35$ mM ($n = 5$) und für rOCT1(10ΔCys-F380C) $1,54 \pm 0,04$ mM ($n = 5$). Beide Werte zeigen im Vergleich zu rOCT1(10ΔCys) ($K_{0,5} = 1,28 \pm 0,10$ mM, $n = 6$) keine signifikante Affinitätsänderung ($p > 0,05$). Ein Vergleich von den bereits publizierten Daten der Mutante rOCT1(10ΔCys-F483C) mit rOCT1(10ΔCys) ergab, dass auch der Austausch des Phenylalanins durch ein Cystein in Position 483 keine signifikante Affinitätsänderung von Cholin ($p > 0,05$) bewirkte (Daten aus Gorbunov et al., 2008).

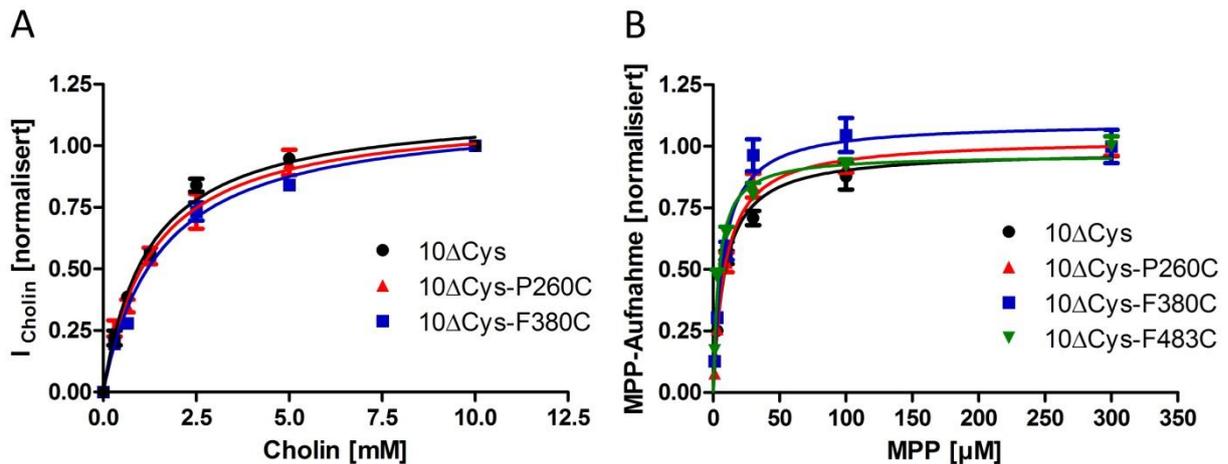


Abbildung 4.5 Konzentrationsabhängigkeiten der Cysteinmutanten.

Die Mutanten rOCT1(10ΔCys-P260C), rOCT1(10ΔCys-F380C), rOCT1(10ΔCys-F483C) und rOCT1(10ΔCys) wurden in *X. laevis* Oozyten exprimiert. (A) Konzentrationsabhängigkeit des Cholin-induzierten Einwärtsstroms. (B) Konzentrationsabhängigkeit der [³H]-MPP-Aufnahme. Alle Messwerte wurden normalisiert und gehen aus mindestens drei individuellen Experimenten hervor. Zur Anpassung der Kurve an die Messwerte wurde die Michaelis-Menten-Gleichung verwendet.

Auch für die [³H]-MPP-Aufnahme ergaben sich für die Positionen 260 und 380 keine signifikanten Veränderungen des K_m -Wertes im Vergleich zu rOCT1(10ΔCys) ($K_m = 8,77 \pm 1,04 \mu\text{M}$, $n = 5$) (Abbildung 4.5 B). Bei diesen Messungen betrug der K_m -Wert $9,53 \pm 1,62 \mu\text{M}$ für rOCT1(10ΔCys-P260C) ($n = 3$) und $8,10 \pm 1,15 \mu\text{M}$ für rOCT1(10ΔCys-F380C) ($n = 3$). Für die Mutante rOCT1(10ΔCys-F483C) ergab sich ein K_m -Wert von $4,07 \pm 0,80 \mu\text{M}$ ($n = 3$), der signifikant von rOCT1(10ΔCys) abwich ($p < 0,01$).

Bei der Hemmung der [³H]-MPP-Aufnahme durch TBuA ergab sich für die Mutante rOCT1(10ΔCys-P260C) ein IC_{50} -Wert von $20,94 \pm 3,28 \mu\text{M}$ ($n = 3$), für die rOCT1(10ΔCys-F380C)-Mutante ein IC_{50} -Wert von $12,07 \pm 0,68 \mu\text{M}$ ($n = 3$) und für die rOCT1(10ΔCys-F483C)-Mutante ein IC_{50} -Wert von $2,09 \pm 0,74 \mu\text{M}$ ($n = 3$) im Vergleich zu rOCT1(10ΔCys) mit einem IC_{50} -Wert von $22,94 \pm 0,86 \mu\text{M}$ ($n = 5$) (Abbildung 4.6). Der Austausch des Phenylalanins in Position 380 führte zu einer signifikanten Affinitätserhöhung verglichen mit rOCT1(10ΔCys) ($p < 0,5$). Auch der Austausch des Phenylalanins in Position 483 bewirkte, wie bereits publiziert (Gorbunov et al., 2008), eine signifikante Affinitätserhöhung ($p < 0,005$). Für die Mutation in Position 260 konnte keine Affinitätsänderung festgestellt werden.

In Tabelle 4.1 ist die funktionelle Charakterisierung der drei Cysteinmutanten rOCT1(10 Δ Cys-P260C), rOCT1(10 Δ Cys-F380C) und rOCT1(10 Δ Cys-F483C) zusammengefasst.¹

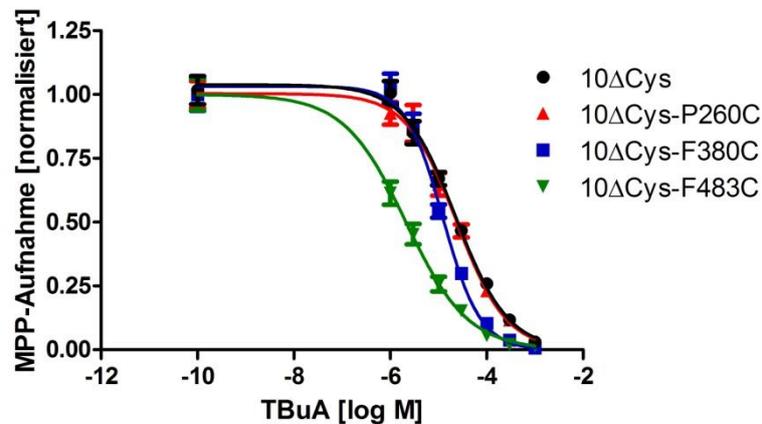


Abbildung 4.6 Hemmung der [³H]-MPP-Aufnahme durch TBuA.

Messung der [³H]-MPP-Aufnahme in Anwesenheit verschiedener TBuA-Konzentrationen. Vergleich der Mutanten rOCT1(10 Δ Cys-P260C) rOCT1(10 Δ Cys-F380C) und rOCT1(10 Δ Cys-F483C) mit rOCT1(10 Δ Cys), die in *X. laevis* Oozyten exprimiert wurden. Alle Messwerte wurden normalisiert und gehen aus mindestens drei individuellen Experimenten hervor. Zur Anpassung der Kurve an die Messwerte wurde die Hill-Gleichung verwendet.

Die Daten zeigen, dass die Substratabhängigkeit des Cholin-induzierten Stroms durch keine der drei Mutationen verändert wird. Die Positionen sind somit wahrscheinlich weder an der Bindung noch am Transport von Cholin beteiligt. Dagegen beeinflusst die Mutation in Position 483 die Substratabhängigkeit der MPP-Aufnahme sowie die Interaktion von TBuA mit dem Transport von MPP. Auch der Austausch des Phenylalanins in der Position 380 führt zu einer veränderten Interaktion von TBuA mit dem Transport von MPP. Da diese Mutationen im Strukturmodell von rOCT1 außerhalb der Substratbindungsstelle liegen, vermuten wir, dass die Mutation in der Position 483 einen allosterischen Effekt auf die Substratbindung von TBuA hat und den K_m -Wert von MPP indirekt beeinflusst.

¹ Unterschiede der Messwerte zu bereits publizierten Daten (Gorbunov et al., 2008) für die Hemmung der [³H]-MPP Aufnahme durch TBuA von rOCT1(10 Δ Cys) sowie rOCT1(10 Δ Cys-F483C) sind möglicherweise durch einen früheren Rechenfehler während der Auswertung zu erklären. Alle Messwerte unterscheiden sich jeweils ungefähr um den Faktor 100, so dass sich die IC₅₀-Werte im μ M-Bereich und nicht wie zuvor angenommen im nM-Bereich befinden.

	³ H]-MPP-Aufnahme K _m [μM]	Cholin-induzierter Strom K _{0,5} [mM]	Hemmung der ³ H]-MPP-Aufnahme durch TBuA IC ₅₀ [μM]
rOCT1(10ΔCys)	8,64 ± 1,05	1,28 ± 0,10	22,94 ± 0,86
rOCT1(10ΔCys-P260C)	9,53 ± 1,62	1,52 ± 0,35	20,94 ± 3,28
rOCT1(10ΔCys-F380C)	8,10 ± 1,15	1,54 ± 0,04	12,07 ± 0,68*
rOCT1(10ΔCys-F483C)	4,07 ± 0,80**	1,30 ± 0,16 #	2,09 ± 0,74***

Tabelle 4.1 Zusammenfassung der funktionellen Charakterisierung von rOCT1(10ΔCys-P260C), rOCT1(10ΔCys-F380C), rOCT1(10ΔCys-F483C) im Vergleich zu rOCT1(10ΔCys).

*: p < 0,05, **: p < 0,01, ***: p < 0,005 verglichen mit rOCT1(10ΔCys)

Daten aus Gorbunov et al., 2008

Die Effekte der Punktmutationen in den Positionen 380 sowie 483 auf die Affinitäten von MPP oder TBuA korrelieren nicht mit den Effekten auf die spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen. Das deutet darauf hin, dass die beobachteten kationenspezifischen Effekte auf die spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen nicht durch unterschiedliche Veränderungen der Kationeninteraktion durch die eingeführten Mutationen zu erklären sind.

4.1.3. Einfluss des Fluoreszenzfarbstoffs TMR6M auf die funktionellen Eigenschaften der Cysteinmutanten rOCT1(10ΔCys-P260C), rOCT1(10ΔCys-F380C) und rOCT1(10ΔCys-F483C)

Die Bindung des Fluoreszenzfarbstoffs TMR6M an das jeweilige Cystein in Position 260, 380 oder 483 könnte die funktionellen Eigenschaften dieser Mutanten beeinflussen. Um zu bestimmen, ob TMR6M die Substrataufnahme der Mutanten vermindert, wurde zunächst der Einfluss von TMR6M auf die Aktivität der drei Cysteinmutanten rOCT1(10ΔCys-P260C), rOCT1(10ΔCys-F380C) und rOCT1(10ΔCys-F483C) untersucht.

Hierfür wurde je ein Ansatz der Cysteinonstrukte für 5 min mit einer möglichst hohen Konzentration des Farbstoffs TMR6M (250 μM) inkubiert und anschließend mehrfach mit ORI-Lösung gewaschen. Danach wurde für 15 min die ³H]-MPP-Aufnahme (0,1 μM) in Abhängigkeit von der TMR6M-Markierung analysiert. Die ³H]-MPP-Aufnahme ohne TMR6M wurde jeweils normalisiert. Die Abbildung 4.7 zeigt den Vergleich der ³H]-MPP-Aufnahme der jeweiligen Cysteinmutanten mit und ohne TMR6M-Markierung. Für die Cysteinmutante rOCT1(10ΔCys-P260C) ergab sich keine signifikante Veränderung der Aktivität nach Bindung von TMR6M (96,97 ± 6,50 %; n = 3; p > 0,05). Auch für die Cysteinmutanten

rOCT1(10 Δ Cys-F380C) und rOCT1(10 Δ Cys-F483C) ergab sich keine signifikante Beeinflussung der Aktivität durch TMR6M ($p > 0,05$). Nach TMR6M-Bindung erreichte die Mutante rOCT1(10 Δ Cys-F380C) $87,56 \pm 6,05\%$ ($n = 3$) und die Mutante rOCT1(10 Δ Cys-F483C) $80,43 \pm 5,02\%$ ($n = 3$).

Auch wenn die [3 H]-MPP-Aufnahme in allen drei Positionen nach der TMR6M-Markierung nicht signifikant beeinflusst wurde, könnten sich die Affinitäten zu Substraten oder Inhibitoren durch die Bindung von TMR6M verändert haben. Aus diesem Grund wurde zusätzlich die konzentrationsabhängige [3 H]-MPP-Aufnahme und die Hemmung der [3 H]-MPP-Aufnahme durch TBuA nach TMR6M-Inkubation (250 μ M) untersucht.

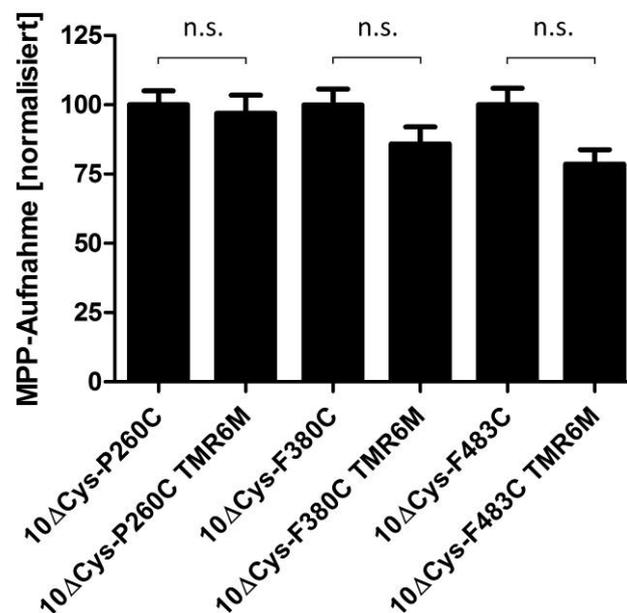


Abbildung 4.7 Quantifizierung der [3 H]-MPP-Aufnahme in Abhängigkeit der TMR6M-Markierung. Die [3 H]-MPP-Aufnahme (0,1 μ M) in *X. laevis* Oozyten, die mit cRNA von rOCT1(10 Δ Cys-P260C), rOCT1(10 Δ Cys-F380C) oder rOCT1(10 Δ Cys-F483C) injiziert wurden, wurde 15 min gemessen. Die jeweilige [3 H]-MPP-Aufnahme ohne TMR6M-Markierung wurde normalisiert und mit der [3 H]-MPP-Aufnahme nach TMR6M-Bindung verglichen.

In Abbildung 4.8 A ist die konzentrationsabhängige [3 H]-MPP-Aufnahme aller drei Cysteinmutanten zu erkennen. In dieser Messung zeigte sich, dass sich die Affinitäten der markierten Transporter nicht von den Affinitäten der unmarkierten Transporter unterscheiden ($p > 0,05$). Nach der TMR6M-Markierung ergab sich für die Mutante rOCT1(10 Δ Cys-P260C) ein K_m -Wert von $9,19 \pm 1,39 \mu$ M ($n = 3$). Auch für die Mutante rOCT1(10 Δ Cys-F380C) und für die Mutante rOCT1(10 Δ Cys-F483C) zeigten die jeweiligen

K_m -Werte von $8,82 \pm 1,29 \mu\text{M}$ ($n = 3$) und $4,33 \pm 0,61 \mu\text{M}$ ($n = 3$) keinen Unterschied zu den unmarkierten Transportern ($p > 0,05$) (vergleiche Tabelle 4.1).

Abbildung 4.8 B zeigt des Weiteren die Hemmung der $[^3\text{H}]$ -MPP-Aufnahme ($2,5\text{nM}$) durch TBuA für die drei Cysteinmutanten nach TMR6M-Bindung. Hier ergab sich ebenfalls keine Beeinflussung der TBuA-Affinitäten durch TMR6M. Der IC_{50} -Wert für die Mutante rOCT1($10\Delta\text{Cys-P260C}$) betrug $22,90 \pm 4,35 \mu\text{M}$ ($n = 3$). Für die Mutante rOCT1($10\Delta\text{Cys-F380C}$) und die Mutante rOCT1($10\Delta\text{Cys-F483C}$) ergaben sich IC_{50} -Werte von $11,54 \pm 1,01 \mu\text{M}$ ($n = 3$) sowie $4,24 \pm 1,12 \mu\text{M}$ ($n = 3$), die ebenfalls mit den IC_{50} -Werten der unmarkierten Transporter übereinstimmen ($p > 0,05$) (vergleiche Tabelle 4.1).

Die kovalente Bindung von TMR6M an das jeweilige Cystein in den drei untersuchten Positionen 260, 380 und 483 scheint den Transport von MPP oder die Interaktion von TBuA mit dem Transport von MPP nicht zu beeinflussen.

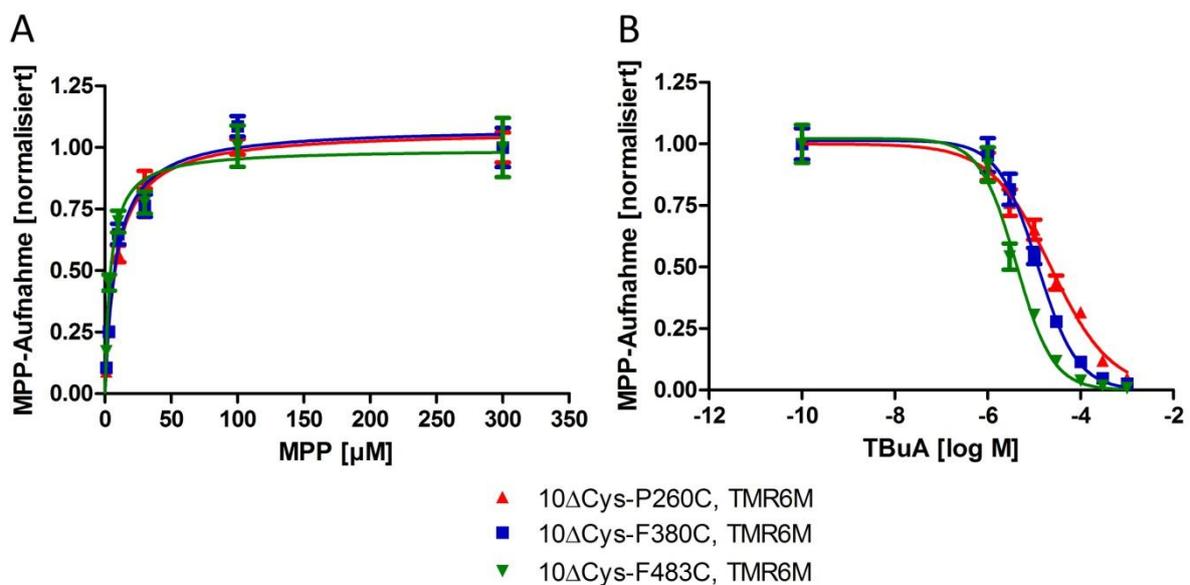


Abbildung 4.8 Konzentrationsabhängige Aufnahmen von $[^3\text{H}]$ -MPP nach TMR6M-Markierung. Die Mutanten rOCT1($10\Delta\text{Cys-P260C}$), rOCT1($10\Delta\text{Cys-F380C}$) und rOCT1($10\Delta\text{Cys-F483C}$) wurden in *X. laevis* Oozyten exprimiert. (A) konzentrationsabhängige $[^3\text{H}]$ -MPP-Aufnahme (B) Hemmung der $[^3\text{H}]$ -MPP-Aufnahme durch TBuA. Alle Messwerte wurden normalisiert und gehen aus mindestens drei individuellen Experimenten hervor. Zur Anpassung der Kurven an die Messwerte wurde in (A) die Michaelis-Menten-Gleichung sowie in (B) die Hill-Gleichung verwendet.

4.2. Blockierung des Transportwegs von rOCT1(10ΔCys)

Die unterschiedlichen Effekte von Cholin und MPP auf die spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen der Mutanten rOCT1(10ΔCys-P260C) und rOCT1(10ΔCys-F380C) können darauf beruhen, dass die Bindung von Liganden unterschiedlicher Struktur zu unterschiedlichen spannungsabhängigen Bewegungen führt. Um herauszufinden, welche Bewegungen an den Transportvorgang gekoppelt sind, suchten wir nach einer Möglichkeit den Transport schnell und irreversibel zu blockieren. Dies wurde erreicht, indem ein zusätzlicher Cysteinrest in den Transportweg eingeführt wurde und der Transport kovalent durch Modifizierung dieses Cysteinrests mittels eines substratähnlichen SH-Gruppenreagenz blockiert wurde.

Das Substratanalog [2-(Trimethylammonium)ethyl]methanethiosulfonat Bromid (MTSET, Struktur siehe Abbildung 4.9 C), ein Methanthiosulfonatderivat, war zu Beginn dieser Studie kommerziell auch in radioaktiv-markierter Form erhältlich und schien für diesen Zweck geeignet zu sein. Zunächst wurde getestet, ob MTSET von rOCT1 und rOCT1(10ΔCys) transportiert wird. Diese Versuche wurden von Dr. Gorbunov durchgeführt und werden im Folgenden beschrieben (Abbildung 4.9 und 4.11), da sie die Voraussetzung für von mir durchgeführte weiterführende Untersuchungen waren.

4.2.1. rOCT1 und rOCT1(10ΔCys) transportieren MTSET

Die Aufnahme von [¹⁴C]-MTSET wurde in *X. laevis* Oozyten analysiert, in denen rOCT1 oder rOCT1(10ΔCys) exprimiert war. Zuerst wurde die Oozyten in 100 μM [¹⁴C]-MTSET für 15 min inkubiert, mit ORI-Lösung gewaschen und die Aufnahme von [¹⁴C]-MTSET detektiert. In diesem Versuch zeigte sich eine signifikante erhöhte [¹⁴C]-MTSET-Aufnahme für rOCT1 und rOCT1(10ΔCys) im Vergleich zu den nicht injizierten Oozyten ($p < 0,005$) (Abbildung 4.9 A). Die Aufnahme für rOCT1 betrug $16,48 \pm 0,85$ pmol und für rOCT1(10ΔCys) $35,55 \pm 1,21$ pmol, während der unspezifische Anteil nur $4,76 \pm 0,53$ pmol ausmachte. Da MTSET ein SH-Gruppenreagenz ist, muss für rOCT1 angenommen werden, dass eine Reaktion von MTSET mit einem oder mehreren freien Cysteinen die Aufnahme beeinflussen könnte. Die Cystein-Substitutionsmutante rOCT1(10ΔCys) besitzt dagegen keine freien Cysteinreste, so dass keine kovalente Reaktion die Aufnahmerate von MTSET beeinflussen kann. Aus diesem Grund wurde nur für rOCT1(10ΔCys) die [¹⁴C]-MTSET-Aufnahme bei verschiedenen

Konzentrationen von MTSET analysiert. Der unspezifische Anteil nicht injizierter Oozyten wurde von der Aufnahme der rOCT1(10ΔCys) exprimierenden Oozyten abgezogen. Die erhaltene Sättigungskurve in Abbildung 4.9 B wurde mit der Michaelis-Menten-Gleichung angepasst. Für rOCT1(10ΔCys) ergab sich ein K_m -Wert von $0,53 \pm 0,05$ mM ($n = 3$).

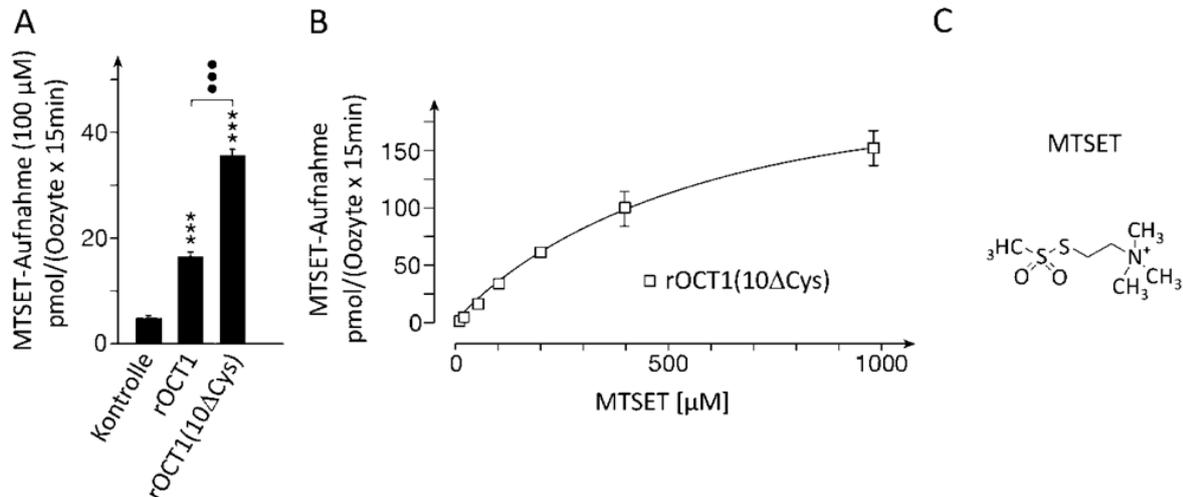


Abbildung 4.9 [¹⁴C]-MTSET-Aufnahme durch rOCT1 und rOCT1(10ΔCys).

X. laevis Oozyten wurden mit cRNA von rOCT1 oder rOCT1(10ΔCys) injiziert. (A) Die Aufnahme von [¹⁴C]-MTSET (100μM) wurde für rOCT1, rOCT1(10ΔCys) sowie nicht injizierte Oozyten (Kontrolle) für 15 min getestet. (B) Konzentrationsabhängige [¹⁴C]-MTSET-Aufnahme von rOCT1(10ΔCys). Alle Messwerte gehen aus drei individuellen Experimenten hervor. Zur Anpassung der Kurve an die Messwerte wurde die Michaelis-Menten-Gleichung verwendet (***: $p < 0,005$ im Vergleich zur Kontrolle; **: $p < 0,005$ rOCT1 im Vergleich zu rOCT1(10ΔCys)). (C) Strukturformel von MTSET.

4.2.2. Identifizierung einer Cysteinmutante, durch die der Transport von rOCT1(10ΔCys) irreversibel blockiert werden kann

Um eine geeignete Cysteinmutation für die schnelle und irreversible Blockierung des Transportwegs zu finden, wurde eine Reihe von Cysteinmutanten hergestellt und getestet. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Cysteinreste in die TMH 11 eingeführt, die sich in der Nähe der Position D475 befinden. Diese Position spielt für die Bindung von Substraten eine wichtige Rolle (Gorboulev et al., 1999).

Die Aminosäuren der Positionen S471, G478, T481, P482, F483, M484, V485, F486, R487, L488, M489 sowie E490 wurden durch Cysteinreste ersetzt und die [¹⁴C]-TEA-Aufnahme der jeweiligen Mutanten mit und ohne MTSET-Modifizierung verglichen (Daten nicht gezeigt). Dabei wurde von Dr. Gorbunov die stärkste Hemmung des Transports für die Cysteinmutante rOCT1(10ΔCys-G478C) aufgezeichnet. Um diese Ergebnisse zu bestätigen,

wiederholte ich die Messung der [¹⁴C]-TEA-Aufnahme in *X. laevis* Oozyten mit und ohne MTSET-Modifizierung der Mutante rOCT1(10ΔCys-G478C) und der Grundmutante OCT1(10ΔCys) (Abbildung 4.10).

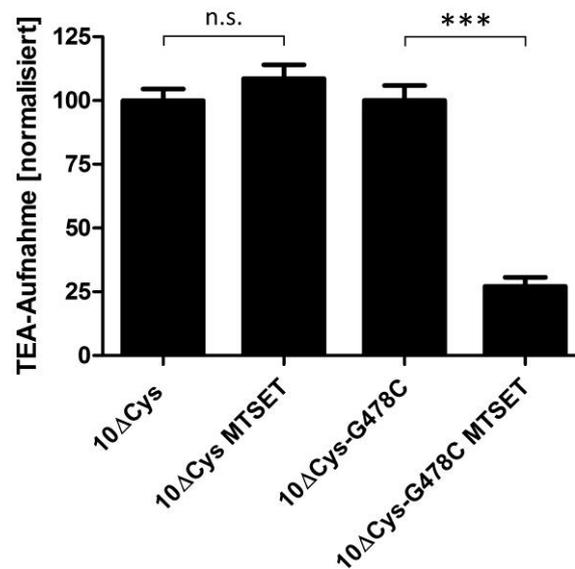


Abbildung 4.10 Quantifizierung der [¹⁴C]-TEA-Aufnahme in Abhängigkeit von MTSET.

In *X. laevis* Oozyten, die rOCT1(10ΔCys) oder rOCT1(10ΔCys-G478C) exprimieren, wurde die Aufnahme von 9 μM [¹⁴C]-TEA für 15 min gemessen. Die jeweilige [¹⁴C]-TEA-Aufnahme ohne MTSET-Modifizierung wurde normalisiert und mit der [¹⁴C]-TEA-Aufnahme nach MTSET-Bindung verglichen. Alle Messwerte gehen aus drei individuellen Experimenten hervor (***: p < 0,005).

Für beide Cysteinkonstrukte wurde die [¹⁴C]-TEA-Aufnahme 15 min durchgeführt, wobei je ein Ansatz der beiden Mutanten mit MTSET (100 μM) für 10 min inkubiert und anschließend mit ORI-Lösung mehrfach gewaschen wurde. Die [¹⁴C]-TEA-Aufnahme ohne MTSET wurde jeweils normalisiert, da die Substrat-Aufnahme durch die Mutation in der Position 478 reduziert wurde (vergleiche Kapitel 4.2.3). Für rOCT1(10ΔCys) zeigte sich keine Veränderung der Aufnahme durch die Inkubation mit MTSET (108,6 ± 5,48 %; n = 3, p > 0,05). Für die Mutante rOCT1(10ΔCys-G478C) ergab sich eine signifikant um 72,89 ± 3,59 % (n = 3) verringerte [¹⁴C]-TEA-Aufnahme (p < 0,005).

Des Weiteren hatte Dr. Gorbunov den Einfluss von MTSET auf den Cholin- sowie TEA-induzierten Einwärtsstrom der rOCT1(10ΔCys-G478C)-Mutante überprüft. Für dieses Experiment wurde der Cholin (10 mM)- oder TEA (1 mM)-induzierte Einwärtsstrom in rOCT1(10ΔCys) oder rOCT1(10ΔCys-G478C) exprimierenden Oozyten gemessen. Im Vergleich hierzu wurde der den Cholin- sowie TEA-induzierten Einwärtsstrom nach

MTSET-Inkubation (1 mM für 1 min) aufgenommen und verglichen. Während der Einwärtsstrom von rOCT1(10ΔCys) nicht durch MTSET beeinflusst wurde ($p > 0,05$), ergab sich bei rOCT1(10ΔCys-G478C) eine signifikante Reduktion um $83,9 \pm 1,8 \%$ ($p < 0,005$) für den Cholin-induzierten und um $86,6 \pm 2,1 \%$ ($p < 0,01$) für den TEA-induzierten Strom (Abbildung 4.11 A).

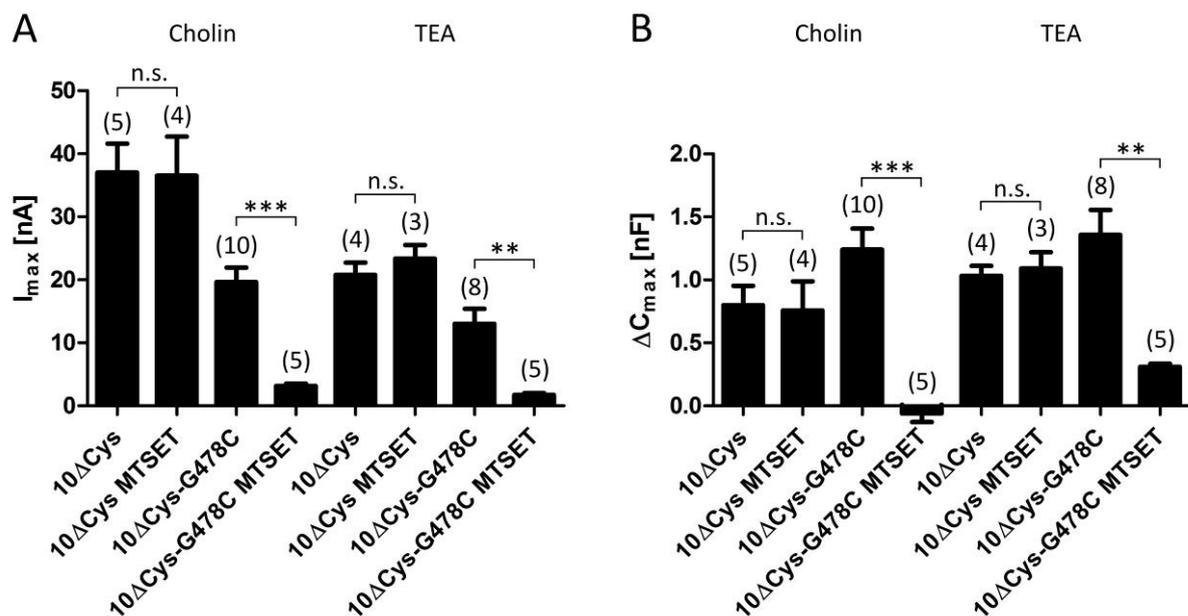


Abbildung 4.11 Blockierung des Transports der Mutante rOCT1(10ΔCys-G478C) durch MTSET.

X. laevis Oozyten wurden mit cRNA von rOCT1(10ΔCys) und rOCT1(10ΔCys-G478C) injiziert. (A) Quantifizierung des Cholin (10 mM)- und TEA (1 mM)-induzierten Einwärtsstroms von rOCT1(10ΔCys) und rOCT1(10ΔCys-G478C) mit und ohne MTSET-Modifizierung. (B) Quantifizierung der Cholin- und TEA-induzierten Kapazitätsänderung beider Konstrukte mit und ohne MTSET-Modifizierung. Angegeben sind die Mittelwerte und die jeweiligen Standardfehler. Die Anzahl der Messungen ist in Klammern aufgeführt (**: $p < 0,01$; ***: $p < 0,005$).

In Abbildung 4.11 B wurden die Cholin- oder TEA-induzierten Kapazitätsänderungen beider Konstrukte mit und ohne MTSET-Inkubation dargestellt. Bei dieser Messung ergab sich für rOCT1(10ΔCys) keine signifikante Beeinflussung durch MTSET ($p > 0,05$). Für die Cysteinmutante rOCT1(10ΔCys-G478C) konnte eine signifikante Reduktion der Kapazitätsänderung um $104,8 \pm 5,5 \%$ ($p < 0,005$) für Cholin und um $77,1 \pm 1,8 \%$ ($p < 0,01$) für TEA aufgezeichnet werden.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass der Transport verschiedener Substrate durch die kovalente Modifikation der Position 478 irreversibel blockiert werden kann.

4.2.3. Durch die Mutation in Position 478 wird die Transportgeschwindigkeit von rOCT1 erniedrigt

Der geringere Transport durch die Cysteinmutante rOCT1(10 Δ Cys-G478C) im Vergleich zu rOCT1(10 Δ Cys) könnte darauf beruhen, dass einerseits weniger Transportermoleküle in die Zytoplasmamembran der *X. laevis* Oozyten eingebaut wurden oder dass andererseits der Transporter eine niedrigere Transportrate ausweist. Um diese Frage zu klären wurde im Folgenden untersucht, ob der Austausch des Glycins durch ein Cystein in Position 478 einen Einfluss auf den Einbau des Transporters in die Zytoplasmamembran hat. Für diese Untersuchung wurde anstelle der Cystein-Substitutionsmutante die Wildtypform rOCT1 verwendet. Die Einführung des Cysteins in die Position 478 zeigte auch im Wildtyp-Hintergrund ähnliche funktionelle Eigenschaften (Daten nicht gezeigt). Der Membraneinbau sollte mittels der Western-Blot-Analyse überprüft werden, so dass zunächst rOCT1 und rOCT1(G478C) mit einem „FLAG-tag“ am C-Terminus versehen wurde (vergleiche Kapitel 3.2.1.1). Die hier beschriebenen proteinbiochemischen Versuche wurden von Dr. Thorsten Keller durchgeführt. Nach Expression beider Konstrukte in *X. laevis* Oozyten und Isolierung der Membranfraktion, wurden die Proteine mittels der SDS-PAGE aufgetrennt. Nachdem sicher gestellt wurde, dass die aufgetragene Proteinmenge von rOCT1-FLAG und rOCT1(G478C)-FLAG gleich war, wurden die rOCT1-Konstrukte mit einem anti-FLAG-Antikörper nachgewiesen (Abbildung 4.12 A) (vergleiche Kapitel 3.2.3).

Die Quantifizierung der relativen Färbung der spezifischen rOCT1-Banden ist in Abbildung 3.12 B dargestellt. rOCT1(G478C)-FLAG erreichte $92,75 \pm 2,69$ % der relativen Färbung, was nicht signifikant von rOCT1-FLAG abwich ($n = 4$; $p > 0,05$). Parallel zu der Western-Blot-Analyse wurden Oozyten aus der gleichen Präparation einer Aktivitätsanalyse unterzogen. Hierfür wurden die Oozyten für 15 min mit $0,1 \mu\text{M}$ [^3H]-MPP inkubiert und die Aufnahme der beiden Konstrukte verglichen. In dieser Messung ergab sich für rOCT1(G478C)-FLAG eine signifikant um $36,58 \pm 5,74$ % reduzierte [^3H]-MPP-Aufnahme im Vergleich zum rOCT1-FLAG-Konstrukt ($n = 3$; $p < 0,005$).

Insgesamt zeigen diese Daten, dass die signifikant reduzierte Aktivität der Mutante rOCT1(G478C) nicht auf einen verschlechterten Einbau in die Zytoplasmamembran, sondern auf eine verringerte Transportrate zurückzuführen ist.

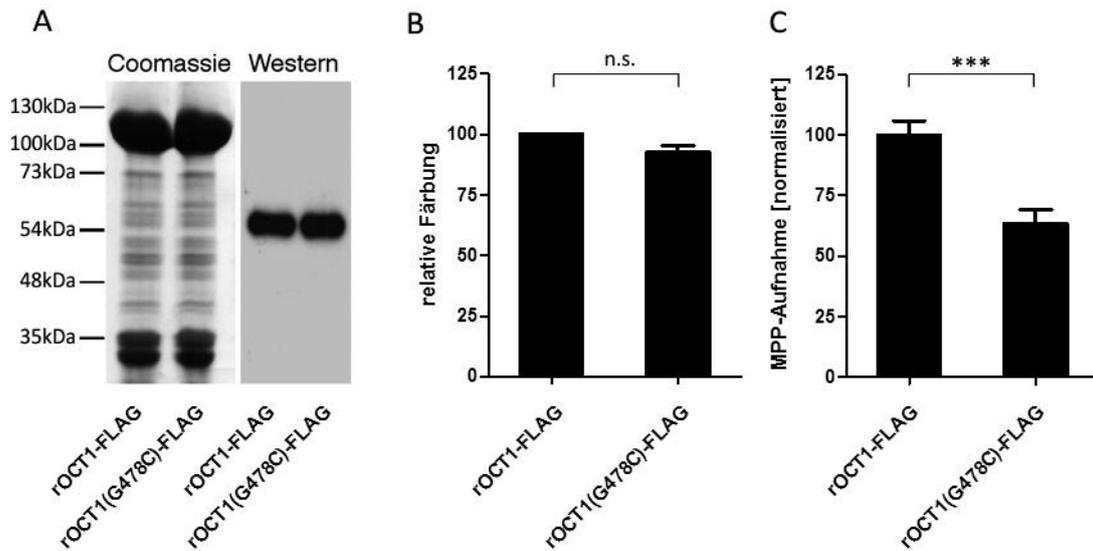


Abbildung 4.12 Nachweis der rOCT1-Konstrukte in der Zytoplasmamembran und Aktivitätsanalyse von rOCT1(G478C). *X. laevis* Oozyten wurden mit cRNA von rOCT1-FLAG und rOCT1(G478C)-FLAG injiziert. (A) SDS-PAGE (links) und Western-Blot-Analyse (rechts) der isolierten Membranfraktion aus *X. laevis* Oozyten. Nachweis von rOCT1-FLAG und rOCT1(G478C)-FLAG mit einem anti-FLAG-Antikörper. (B) Quantifizierung der spezifischen Färbung der rOCT1-Konstrukte in der Western-Blot-Analyse. (C) Quantifizierung der [³H]-MPP-Aufnahme (0,1 μM) für 15 min (***: p < 0,005).

4.2.4. Einfluss des Cysteins 478 auf die K_m - und IC_{50} -Werte verschiedener organischer Kationen

Da mit Hilfe der MTSET-Hemmung der Cysteinmutante rOCT1(10ΔCys-G478C) festgestellt werden sollte, ob die spannungs- und/oder die kationenabhängigen Bewegungen an den Transport gebunden sind, wurde zunächst untersucht, ob diese Cysteinmutante in der nicht-modifizierten Form die gleichen Transportereigenschaften wie rOCT1(10ΔCys) aufweist. Für diese funktionelle Charakterisierung von rOCT1(10ΔCys-G478C) wurde in Oozyten der Cholin-induzierte Strom, die Aufnahme von [³H]-MPP sowie die Hemmung der [³H]-MPP-Aufnahme durch Cholin oder TBuA im Vergleich zu rOCT1(10ΔCys) bestimmt. Die Abbildung 4.13 zeigt, dass der Austausch des Glycins durch ein Cystein in Position 478 keine Beeinflussung der Affinität von Cholin (A) oder MPP (B) bewirkt. Für Cholin wurde für die rOCT1(10ΔCys-G478C)-Mutante ein $K_{0,5}$ -Wert von $0,92 \pm 0,05$ mM (n = 5) im Vergleich zu rOCT1(10ΔCys) mit einem $K_{0,5}$ -Wert von $1,28 \pm 0,10$ mM (n = 6) bestimmt (p > 0,05).

Für MPP ergab sich für rOCT1(10ΔCys-G478C) ein K_m -Wert von $7,48 \pm 0,84 \mu\text{M}$ ($n = 3$), der sich nicht signifikant von dem K_m -Wert von rOCT1(10ΔCys) unterschied ($8,64 \pm 1,05 \mu\text{M}$; $n = 5$; $p > 0,05$).

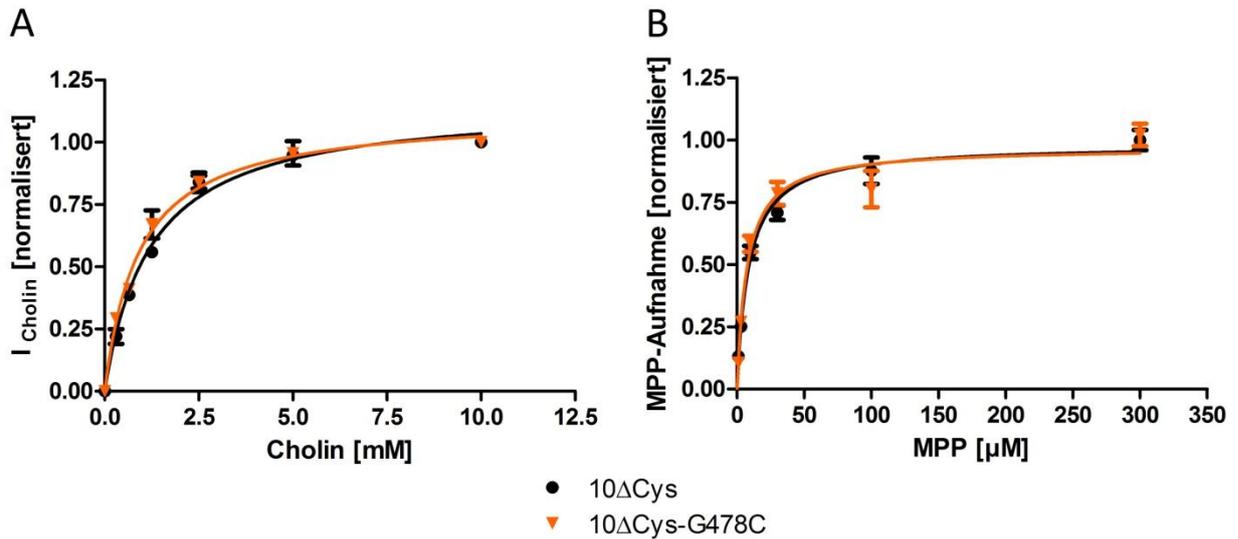


Abbildung 4.13 Konzentrationsabhängigkeiten von rOCT1(10ΔCys-G478C).

Für Oozyten, die rOCT(10ΔCys) oder die Mutante rOCT1(10ΔCys-G478C) exprimieren, wurde der Cholin-induzierte Einwärtsstrom gemessen (A) und die $[^3\text{H}]$ -MPP-Aufnahme getestet (B). Alle Messpunkte wurden normalisiert und gehen aus mindestens drei individuellen Experimenten hervor. Zur Anpassung der Kurve an die Messwerte wurde die Michaelis-Menten-Gleichung verwendet.

Auch für die Hemmung der $[^3\text{H}]$ -MPP-Aufnahme (2,5 nM) durch Cholin konnte keine Veränderung der Affinität für rOCT1(10ΔCys-G478C) ($\text{IC}_{50} = 0,79 \pm 0,11 \text{ mM}$, $n = 3$) verglichen mit der Grundmutante rOCT1(10ΔCys) ($\text{IC}_{50} = 1,11 \pm 0,17 \text{ mM}$, $n = 3$) festgestellt werden (Abbildung 4.14). Für die Hemmung der $[^3\text{H}]$ -MPP-Aufnahme (2,5 nM) durch TBuA ergab sich jedoch für rOCT1(10ΔCys-G478C) eine signifikante Affinitätserhöhung ($\text{IC}_{50} = 8,71 \pm 1,86 \mu\text{M}$, $n = 3$) im Vergleich zu rOCT1(10ΔCys) ($\text{IC}_{50} = 22,94 \pm 0,86 \mu\text{M}$, $n = 5$) ($p < 0,005$).

Aus diesen Experimenten lässt sich ableiten, dass die Position 478 nicht direkt am Transport von Cholin und MPP beteiligt ist. Eine Affinitätserhöhung im Fall von TBuA bedeutet, dass das Cystein in Position 478 entweder direkt an der Bindung von TBuA beteiligt ist oder dass das Cystein 478 die Bindungsstelle von TBuA indirekt beeinflusst.

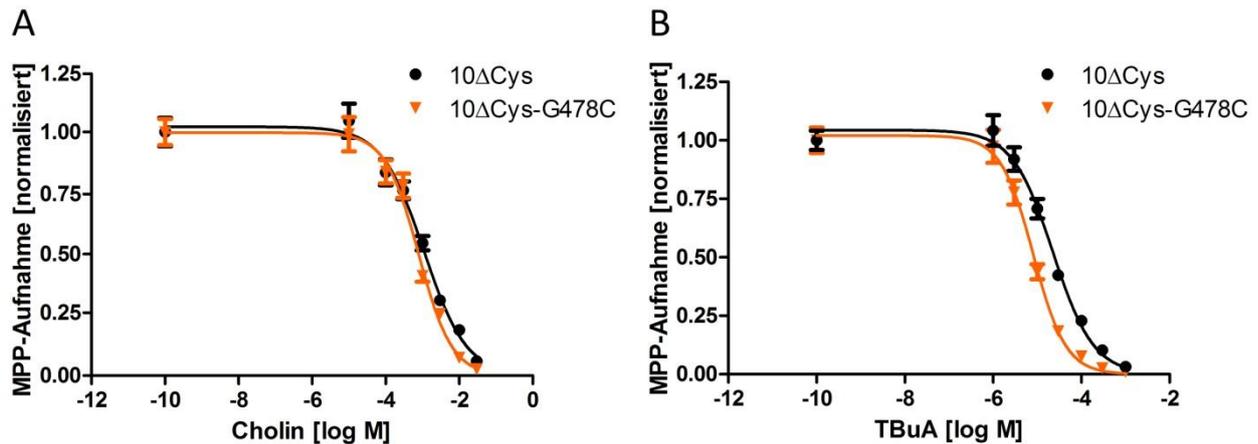


Abbildung 4.14 Hemmung der [³H]-MPP-Aufnahme durch Cholin oder TBuA.

rOCT1(10ΔCys) oder die Mutante rOCT1(10ΔCys-G478C) wurde in *X. laevis* Oozyten exprimiert. Die [³H]-MPP-Aufnahme wurde in Abhängigkeit von verschiedenen Cholin-Konzentrationen (A) oder TBuA-Konzentrationen (B) gemessen. Alle Daten gehen aus drei individuellen Experimenten hervor. Die normalisierten Messwerte wurden der Hill-Gleichung angepasst.

4.2.5. TMA und Cholin hemmen die kovalente Modifizierung des Cystein 478 durch MTSET

Das Cystein in Position 478 befindet sich eine Windung oberhalb des Aspartats 475 in der TMH 11. Diese Aminosäure ist wahrscheinlich direkt an der Bindung von TEA und MPP beteiligt. Die Bindung von organischen Kationen könnte die Position des Cysteins 478 verändern und die Modifizierung durch MTSET beeinflussen. Im Folgenden wurde deshalb untersucht, ob die Modifizierung durch MTSET durch Substrate beeinflusst wird.

Es wurden Markierungsbedingungen gewählt, bei denen bei -50 mV nur ungefähr 50 % des Transports gehemmt wurden (50 μM MTSET), so dass Unterschiede der durch MTSET verursachten Inhibition erfasst werden konnten. Hierfür wurden rOCT1(10ΔCys-G478C) exprimierende Oozyten zuerst auf -50 mV geklemmt und der maximale Substrat-induzierte Einwärtsstrom (jeweils 10 mM) gemessen. Im Anschluss wurde die MTSET-Inkubation bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen für 45 s oder 4 min durchgeführt. Zuletzt wurde der maximale Substrat-induzierte Einwärtsstrom bei -50 mV erneut gemessen.

In Abbildung 4.15 A wurde der Einfluss von Tetramethylammonium (TMA) getestet. Wurde MTSET 45 s inkubiert, ergab sich eine Hemmung des TMA-induzierten Einwärtsstroms von $64,68 \pm 2,09 \%$ ($n = 9$). In Gegenwart von 10 mM TMA betrug die Hemmung des TMA-induzierten Einwärtsstroms $43,59 \pm 3,23 \%$ ($n = 7$). Bei dieser Inkubationszeit wurde die Hemmung durch MTSET unter Einfluss von TMA signifikant reduziert ($p < 0,005$).

Wurde die MTSET-Inkubationszeit auf 4 min erhöht, ergab sich eine Hemmung des TMA-induzierten Einwärtsstroms von $73,17 \pm 2,47 \%$ ($n = 7$). Durch die simultane TMA-Gabe (10 mM) wurde auch bei dieser Inkubationszeit die Hemmung des TMA-induzierten Stroms signifikant reduziert ($p < 0,01$). Unter den gewählten Bedingungen betrug die Hemmung noch $58,60 \pm 2,21 \%$ ($n = 8$). Eine Verlängerung der MTSET-Inkubationszeit erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass MTSET kovalent an das Cystein in Position 478 binden kann, so dass der Schutzeffekt von TMA bei einer langen Inkubation verringert wurde.

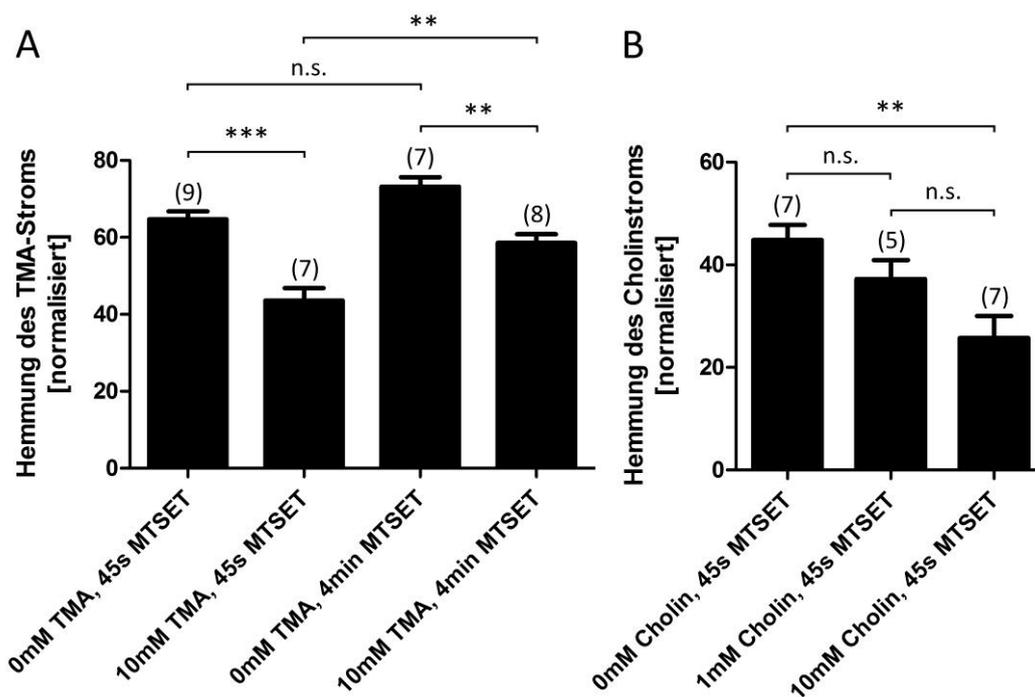


Abbildung 4.15 Quantifizierung der durch MTSET verursachten Hemmung des TMA- oder Cholin-induzierten Einwärtsstroms. Unter TEVC-Bedingungen wurde an *X. laevis* Oozyten, die mit cRNA von rOCT1(10 Δ Cys-G478C) injiziert wurden, der TMA- oder Cholin-induzierte Einwärtsstrom bei -50 mV vor und nach kovalenter Bindung von MTSET gemessen und die Inhibition normalisiert dargestellt. (A) Die MTSET-Modifizierung wurde in Gegenwart von 0 oder 10 mM TMA durchgeführt und eine MTSET-Inkubationszeit von entweder 45 s oder 4 min gewählt. (B) Die MTSET-Inkubation wurde bei unterschiedlichen Cholin-Konzentrationen durchgeführt, wobei die Inkubationszeit immer 45 s betrug. Die Anzahl der Messungen ist in Klammern aufgeführt (**: $p < 0,01$);***: $p < 0,005$).

Des Weiteren wurde getestet, ob die MTSET-Modifikation des Cysteins in Position 478 auch durch die simultane Gabe von Cholin verändert werden kann. Hierfür wurde die Klemmspannung in den Experimenten ebenso konstant bei -50 mV gehalten und die Konzentration von Cholin während der Modifizierung verändert (Abbildung 4.15 B).

Bei einer Konzentration von 1 mM Cholin lag die Hemmung des Cholin-induzierten Stroms bei $35,91 \pm 2,69 \%$ ($n = 7$), was sich jedoch nicht signifikant von der Hemmung ohne Cholin unterschied ($44,83 \pm 2,92 \%$; $n = 7$; $p > 0,05$). Wurde während der Modifikation mit MTSET zusätzlich 10 mM Cholin zugesetzt, konnte eine signifikante Veränderung der Hemmung im Vergleich zu -50 mV ohne Cholin gemessen werden ($25,74 \pm 4,26$, $n = 7$, $p < 0,005$).

In Gegenwart von TMA oder Cholin wurde die Zugänglichkeit bei -50 mV erniedrigt. Ob dies durch einen allosterischen Effekt oder direkte Kompetition bewirkt wird, kann mit diesen Daten nicht unterschieden werden. Insgesamt weisen die Daten jedoch darauf hin, dass sich das Cystein in Position 478 innerhalb der Substratbindungsregion befindet.

4.2.6. Die Zugänglichkeit des Cysteins 478 ist spannungsabhängig

Um festzustellen, ob die Zugänglichkeit des Cysteins in der Position 478 bei verschiedenen Membranpotentialen unterschiedlich ist, wurde die Spannungsabhängigkeit der Hemmung des Cholin-induzierten Einwärtsstroms durch die MTSET-Modifizierung untersucht. Damit spannungsabhängige Unterschiede der Inhibition erfasst werden konnten, wurden auch hier Markierungsbedingungen gewählt, bei denen bei -50 mV nur ungefähr 50 % des Transports gehemmt wurden ($50 \mu\text{M}$ MTSET). In diesem Experiment wurden rOCT1(10 Δ Cys-G478C) exprimierende Oozyten zunächst auf -50 mV geklemmt und der Einwärtsstrom, verursacht durch 10 mM Cholin, bestimmt. Anschließend wurde die jeweilige Oozyte mit $50 \mu\text{M}$ MTSET für 45 s bei unterschiedlichen Membranpotentialen (0 mV, -50 mV und -100 mV) ohne Cholin inkubiert und danach der durch 10mM Cholin-induzierte Einwärtsstrom bei -50 mV erneut gemessen.

In Abbildung 4.16 ist zu erkennen, dass die Hemmung des Cholin-induzierten Stroms je nach Markierungsbedingung unterschiedlich war. Wurde die Oozyte während der Modifizierung mit MTSET auf 0 mV geklemmt, lag die Inhibition bei $21,6 \pm 2,07 \%$ ($n = 7$), während die Inhibition für -50 mV $44,83 \pm 2,92 \%$ ($n = 7$) betrug. Die Hemmung des Cholin-induzierten Stroms, modifiziert bei einem Membranpotential von -100 mV, lag bei $48,18 \pm 2,62 \%$ ($n = 8$). Der Unterschied zwischen der Hemmung 0 mV/-50 mV sowie 0 mV/-100 mV war jeweils signifikant ($p < 0,005$). Für die Inhibition bei -50 mV und bei -100 mV ergab sich kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$).

Die Daten weisen darauf hin, dass die Modifikation durch MTSET spannungsabhängig ist. Es könnte zum einen sein, dass bei negativem Membranpotential (-50 mV, -100 mV) das

Cystein der Position 478 besser zugänglich ist als bei 0 mV. Eine andere Erklärung, die nicht ausgeschlossen werden kann, ist, dass die Substratkonzentration des positiv geladenen Cholins in der Substratbindungstasche bei negativem Membranpotential erhöht ist.

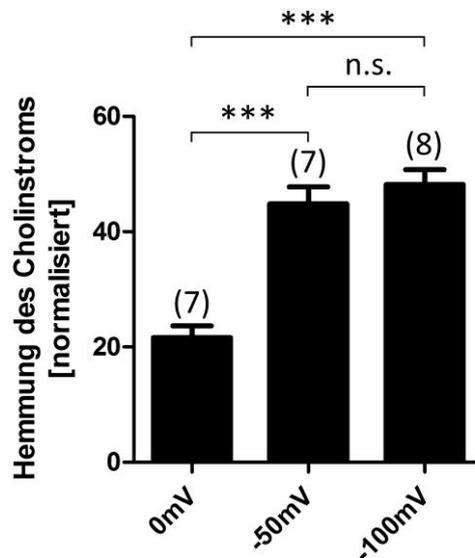


Abbildung 4.16 Spannungsabhängige Quantifizierung der durch MTSET verursachten Hemmung des Cholin-induzierten Einwärtsstroms. Unter TEVC-Bedingungen wurde an *X. laevis* Oozyten, die mit cRNA von rOCT1(10ΔCys-G478C) injiziert wurden, der Cholin induzierte Einwärtsstrom bei -50 mV vor und nach kovalenter Bindung von MTSET gemessen und die Inhibition normalisiert dargestellt. Die MTSET-Modifizierung wurde unter verschiedenen Klemmspannungen (0 mV, -50 mV, -100 mV) vorgenommen (***: $p < 0,005$).

4.2.7. Das Cystein 478 ist von außen zugänglich

Um herauszufinden, ob die Position 478 in der nach außen offenen Konformation von rOCT1 zugänglich ist, wurde diese Position auch bei 0°C analysiert. Unter diesen Bedingungen kann infolge des Einfrierens der Lipide keine große strukturelle Umlagerung des Transporters stattfinden, so dass kein Transport möglich ist. Für diese Bestimmung wurde die [³H]-MPP-Aufnahme (0,1 μM) in *X. laevis* Oozyten mit und ohne Modifikation durch MTSET bei Raumtemperatur und bei 0°C gemessen. Je ein Ansatz von rOCT1(10ΔCys) sowie rOCT1(10ΔCys-G478C) wurde für 10 min auf Eis gestellt, anschließend 10 min mit 100 μM MTSET auf Eis inkubiert, mit ORI-Lösung mehrfach gewaschen und für eine Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Verstreichen der Zeit wurde die [³H]-MPP-Aufnahme 15 min bei 20°C gemessen. Als Positivkontrolle wurde ein Ansatz von rOCT1(10ΔCys-G478C) auch bei Raumtemperatur durch MTSET modifiziert.

Wie der Abbildung 4.17 zu entnehmen ist, zeigte die rOCT1(10ΔCys)-Grundmutante auch bei 0°C keine Beeinflussung durch MTSET ($104,5 \pm 6,4 \%$, $n = 4$, $p > 0,05$). Für die Mutante rOCT1(10ΔCys-G478C) ergab sich durch den Einfluss von MTSET sowohl bei Raumtemperatur ($58,3 \pm 3,0 \%$, $n = 4$) als auch bei 0°C ($34,24 \pm 4,6 \%$, $n = 4$) eine signifikante Reduktion der [³H]-MPP-Aufnahme ($p < 0,005$). Die Hemmung der [³H]-MPP-Aufnahme bei 0°C fiel weniger stark aus als bei Raumtemperatur ($p < 0,05$).

Die geringer Hemmung bei 0°C ist wahrscheinlich auf die temperaturbedingte Erniedrigung der Reaktionsgeschwindigkeit zurückzuführen. Da auch bei 0°C eine signifikante Hemmung durch MTSET erzielt wurde, kann geschlossen werden, dass das Cystein 478 von außen zugänglich ist.

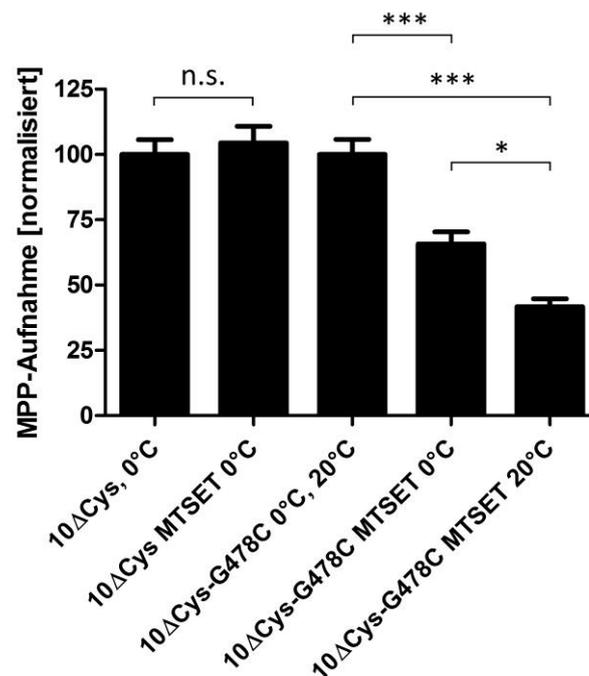


Abbildung 4.17 Quantifizierung der [³H]-MPP-Aufnahme in Abhängigkeit von der MTSET-Modifikation bei verschiedenen Temperaturen. Die [³H]-MPP-Aufnahme in *X. laevis* Oozyten, die mit crRNA von rOCT1(10ΔCys) und rOCT1(10ΔCys-G478C) injiziert wurden, wurde 15 min bei 20°C gemessen. Die jeweilige [³H]-MPP-Aufnahme ohne MTSET-Modifizierung wurde normalisiert und mit der [³H]-MPP-Aufnahme nach MTSET-Bindung verglichen (*: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$).

4.2.8. Durch die Modifizierung mit MTSET wird die Mutante rOCT1(10ΔCys-G478C) vollständig inhibiert

Nach der Modifizierung von rOCT1(10ΔCys-G478C) durch 100 μM MTSET für 10 min wurden etwa 80 % der Transportaktivität gehemmt. Die detektierte Restaktivität könnte zum einen

auf eine Restaktivität des modifizierten Transporters zurückzuführen sein oder zum anderen die Aktivität des nicht-modifizierten Transporters repräsentieren. Eine unvollständige Modifizierung der Transporter kann durch eine zu kurze Inkubationszeit oder durch eine nicht zugängliche Transporterpopulation verursacht werden. Um die Frage zu klären, wodurch die Restaktivität zustande kommt, wurde im Folgenden analysiert, ob die MTSET-Modifizierung zu einer Veränderung der Transportereigenschaften führt. Dies wäre zu erwarten, wenn der modifizierte Transporter in der Lage wäre mit verringerter Geschwindigkeit zu transportieren.

Nach der Expression von rOCT1(10ΔCys-G478C) in *X. laevis* Oozyten konnten die Eigenschaften des modifizierten Transporters wegen der geringen Empfindlichkeit des Expressionssystems nicht untersucht werden. Bei der Verwendung von stabil transfizierten HEK293-Zellen kann auch eine sehr geringe Transportaktivität charakterisiert werden, wenn die Messzeit von einer auf zehn Sekunden erhöht wird (vergleiche Kapitel 3.2.5.2).

Für den Vergleich der funktionellen Eigenschaften des modifizierten Transporters mit dem nicht-modifizierten Transporter in HEK293-Zellen wurde die Aufnahme von [³H]-MPP und die Hemmung der [³H]-MPP-Aufnahme (0,1 μM) durch TBuA jeweils mit und ohne MTSET-Modifizierung bestimmt. Für die Modifizierung der HEK293-Zellen wurden diese für eine Minute in einer 1 mM MTSET-Lösung inkubiert und anschließend mehrfach gewaschen. Auch in HEK293-Zellen konnte die Aktivität der rOCT1(10ΔCys-G478C)-Mutante durch die MTSET-Modifizierung um 89,83 ± 1,60 % gehemmt werden, während die Grundmutante rOCT1(10ΔCys) keine signifikante Beeinflussung durch MTSET zeigte (p > 0,05; Daten nicht gezeigt). Der Abbildung 4.18 A ist zu entnehmen, dass die K_m-Werte von rOCT1(10ΔCys) und rOCT1(10ΔCys-G478C) durch die MTSET-Modifizierung nicht beeinflusst wurden (p > 0,05). Für die Grundmutante rOCT1(10ΔCys) ergab sich ein K_m-Wert von 5,2 ± 0,59 μM (n = 3) ohne Modifizierung und ein K_m-Wert von 3,54 ± 0,59 μM (n = 4) nach der Modifizierung mit MTSET. Die rOCT1(10ΔCys-G478C)-Mutante zeigte einen K_m-Wert von 3,79 ± 1,14 μM (n = 3) ohne Modifizierung und einen K_m-Wert von 2,65 ± 0,65 μM (n = 4) nach MTSET-Modifizierung.

Auch bei der Hemmung der [³H]-MPP-Aufnahme durch TBuA unterschieden sich die IC₅₀-Werte in beiden Fällen nicht signifikant voneinander (Abbildung 4.18 B) (p > 0,05). Ohne MTSET-Modifizierung ergab sich für rOCT1(10ΔCys) ein IC₅₀-Wert von 1,5 ± 0,28 μM (n = 3)

und für rOCT1(10ΔCys-G478C) ein IC_{50} -Wert von $0,44 \pm 0,06 \mu\text{M}$ ($n = 3$). Im Vergleich hierzu zeigte rOCT1(10ΔCys) ein IC_{50} -Wert von $1,09 \pm 0,12 \mu\text{M}$ ($n = 3$) sowie rOCT1(10ΔCys-G478C) ein IC_{50} -Wert von $0,28 \pm 0,02 \mu\text{M}$ ($n = 3$) nach der MTSET-Modifizierung.

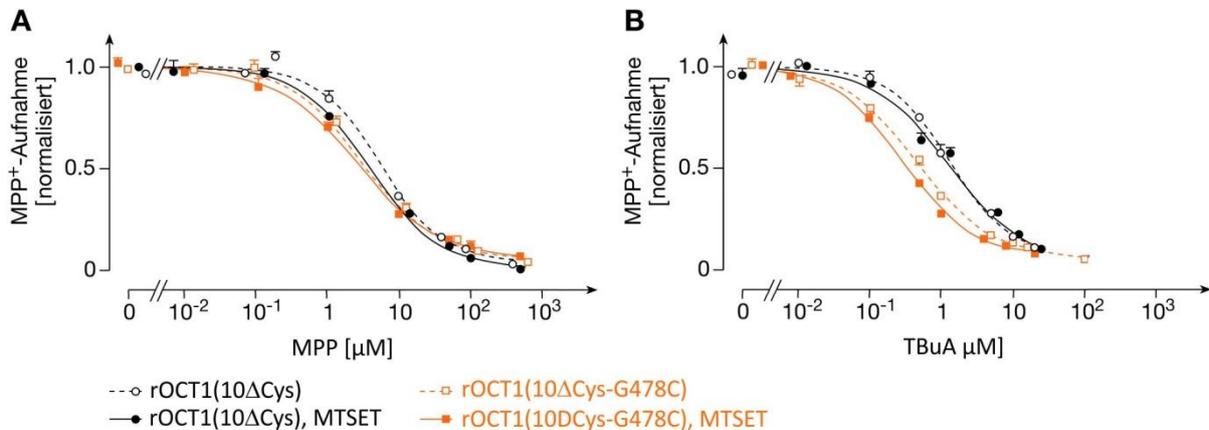


Abbildung 4.18 Konzentrationsabhängige Aufnahme von $[^3\text{H}]$ -MPP mit und ohne MTSET-Modifizierung. Die Mutanten rOCT1(10ΔCys) und rOCT1(10ΔCys-G478C) wurden in HEK293-Zellen stabil transfiziert. (A) Konzentrationsabhängigkeit der $[^3\text{H}]$ -MPP-Aufnahme mit und ohne MTSET-Modifizierung. (B) Messung der $[^3\text{H}]$ -MPP-Aufnahme in Anwesenheit verschiedener TBuA-Konzentrationen mit und ohne MTSET-Modifizierung. Alle Messwerte wurden normalisiert und gehen aus mindestens drei individuellen Experimenten hervor. Zur Anpassungen der Kurven an die Messwerte wurde die Hill-Gleichung verwendet.

Der Austausch des Glycins in Position 478 gegen ein Cystein bewirkte eine Affinitätserhöhung für TBuA der rOCT1(10ΔCys-G478C)-Mutante im Vergleich zur Grundmutante rOCT1(10ΔCys). Dieser Effekt konnte auch in Experimenten im *X. laevis* Oozyten Expressionssystem nachgewiesen werden (vergleiche Kapitel 4.2.4).

Die unter Verwendung der HEK293-Zellen gewonnen Daten zeigen, dass die getesteten Substrataffinitäten durch die MTSET-Modifizierung nicht beeinflusst wurden. Dies weist darauf hin, dass die gemessene Restaktivität nach MTSET-Modifizierung von rOCT1(10ΔCys-G478C) auf nicht-modifizierte Transporter zurückzuführen ist. Es ist unwahrscheinlich, kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass eine MTSET-Modifizierung von rOCT1(10ΔCys-G478C) die Affinitäten des Transporters nicht beeinflusst.

4.2.9. Durch die Modifikation von rOCT1(10ΔCys-G478C) wird die Bindung von MPP blockiert

Um festzustellen, ob die Bindung von MPP durch die MTSET-Modifizierung des Cysteins 478 blockiert wird, wurde die Bindung von [³H]-MPP an rOCT1(10ΔCys) und rOCT1(10ΔCys-G478C) in stabil transfizierten HEK293-Zellen verglichen. Diese Bindungsmessungen wurden von Neha Gottlieb ausgeführt und werden im Folgenden beschrieben (vergleiche Kapitel 3.2.5.3). Die Messungen wurden bei 0°C durchgeführt, um die Transportaktivität von rOCT1 auszuschalten. Für die Auswertung der Experimente wurde nur die durch nicht-radioaktiv markiertes MPP hemmbare Bindung von [³H]-MPP berücksichtigt. Nach einer Inkubation von einer Minute in einer 1 mM-MTSET-Lösung wurden die HEK293-Zellen mehrfach gewaschen und die Bindung von [³H]-MPP bestimmt.

Zunächst wurde die maximale Bindung für [³H]-MPP für beide Konstrukte rOCT1(10ΔCys) und rOCT1(10ΔCys-G478C) bestimmt (Abbildung 4.19 A). Ein Vergleich der B_{max}-Werte von rOCT1(10ΔCys) mit und ohne MTSET-Modifizierung zeigte keine signifikante Veränderung (p > 0,05). Nicht-modifiziert ergab sich für rOCT1(10ΔCys) ein B_{max}-Wert von 92,4 ± 4,6 pmol/(mg Protein), für rOCT1(10ΔCys) nach MTSET-Inkubation ergab sich 116,2 ± 13,4 pmol/(mg Protein). Für die nicht-modifizierte Cysteinmutante rOCT1(10ΔCys-G478C) wurde ein B_{max}-Wert von 39,7 ± 5,9 pmol/(mg Protein) bestimmt. Nach der MTSET-Modifizierung konnte keine [³H]-MPP-Bindung für rOCT1(10ΔCys-G478C) nachgewiesen werden. Außerdem zeigte die rOCT1(10ΔCys-G478C)-Mutante eine verringerte Bindung im Vergleich zu rOCT1(10ΔCys). Dies steht im Einklang mit der bereits erwähnten reduzierten Aktivität dieser Mutante (vergleiche Kapitel 4.2.3)

In Abbildung 4.19 B ist die konzentrationsabhängigen [³H]-MPP-Bindung für beide Cysteinmutanten dargestellt. Für die rOCT1(10ΔCys)-Mutante ergab sich für die [³H]-MPP-Bindung ein K_D-Wert von 3,67 ± 0,26 μM (n = 4), der sich auch durch eine Inkubation mit MTSET nicht signifikant veränderte (K_D = 3,93 ± 0,31 μM; n = 4) (p > 0,05). Da für die Mutante rOCT1(10ΔCys-G478C) nach der MTSET-Modifikation keine Bindung von [³H]-MPP mehr nachgewiesen werden konnte, wurde nur der K_D-Wert der nicht-modifizierten Form von rOCT1(10ΔCys-G478C) bestimmt. Hier ergab sich ein K_D-Wert von 3,29 ± 0,51 μM (n = 4).

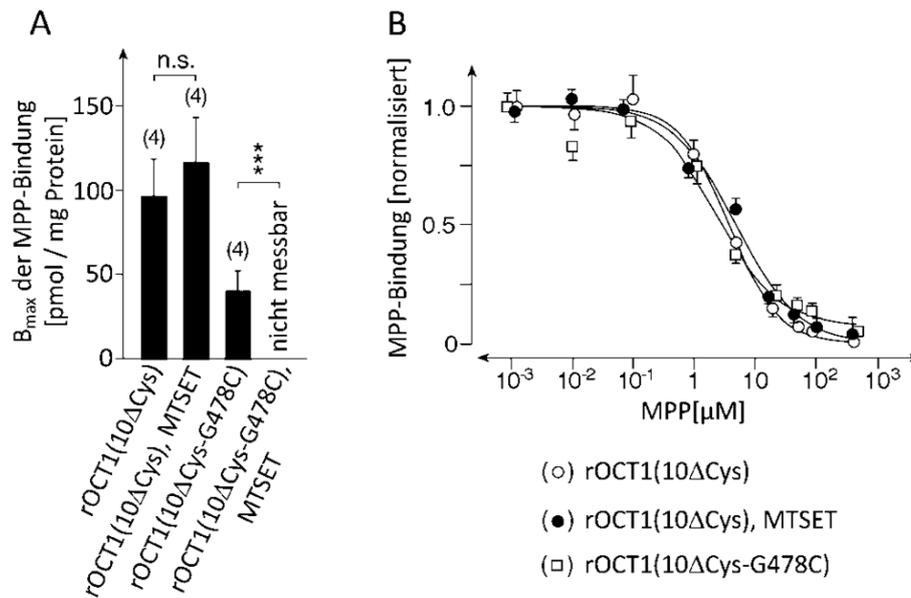


Abbildung 4.19 Bindung von [³H]-MPP mit und ohne MTSET-Modifizierung.

Die Mutanten rOCT1(10ΔCys) und rOCT1(10ΔCys-G478C) wurden in HEK293-Zellen stabil transfiziert. (A) Bestimmung der maximalen [³H]-MPP-Bindung mit und ohne MTSET-Modifizierung nach 5 min. (B) Konzentrationsabhängigkeit der [³H]-MPP-Bindung mit und ohne MTSET-Modifizierung. Alle Messwerte wurden normalisiert und gehen aus mindestens drei individuellen Experimenten hervor. Zur Anpassungen der Kurven an die Messwerte wurde in (B) die Hill-Gleichung verwendet.

Anhand dieser Daten lässt sich ableiten, dass durch die kovalente Bindung von MTSET an das Cystein in Position 478 das Andocken des Substrats MPP an die Bindungsstelle bei 0°C sterisch blockiert wird.

4.3. Spannungsabhängige Fluoreszenzänderungen von rOCT1 werden durch die Position 478 beeinflusst

Um festzustellen, ob die in den Positionen 260, 380 und 483 beschriebenen Bewegungen an den Transport von rOCT1 gekoppelt sind, wurden Cysteindoppelmutanten erstellt, die neben dem jeweiligen Cystein 260, 380 und 483 auch ein Cystein für die Blockierung durch MTSET (in Position 478) aufwiesen. Die Fluoreszenzsignale der mit TMR6M markierten Cysteindoppelmutanten wurden zunächst ohne Modifizierung durch MTSET untersucht.

4.3.1. Der Austausch des Glycins 478 durch ein Cystein verändert die Bewegungen in den Positionen 260 und 483

X. laevis Oozyten, die mit der jeweilige cRNA der Doppelmutanten injiziert wurden, wurden wie bereits in Kapitel 4.1 beschrieben 5 min mit TMR6M (10 μ M) inkubiert, anschließend die Fluoreszenzantwort des leeren Transporters auf das Spannungssprungprotokoll aufgezeichnet und mit den Fluoreszenzen der entsprechenden Cysteineinzelmutanten verglichen. In Abbildung 4.20 A ist die spannungsabhängige Fluoreszenzantwort der Position 260 dargestellt, die nach Einführung des zweiten Cysteins deutlich verringert wurde. Die spannungsabhängige Fluoreszenzantwort des markierten Cysteins in Position 380 veränderte sich durch den Austausch des Glycins nicht (Abbildung 4.20 B). Für die Position 483 ergab sich die größte Veränderung der spannungsabhängigen Fluoreszenzantwort, hier wurde die Spannungsabhängigkeit mit verringerter Amplitude invertiert (Abbildung 4.20 C).

Diese Daten zeigen, dass durch die Einführung des zweiten Cysteins in Position 478 bereits die spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen für den leeren Transporter in zwei der drei untersuchten Positionen (260 und 483) im Vergleich zu den dazugehörigen Einzelmutanten verändert wurden. Da sich die Position 478 in TMH 11 befindet, ist eine Veränderung der Fluoreszenzantwort für die Doppelmutante rOCT1(10 Δ Cys-F483C-G478C) durch eine leichte Verschiebung innerhalb der TMH 11 zu erklären. Dies kann jedoch nicht für die Mutante rOCT1(10 Δ Cys-P260C-G478C) der Fall sein. Der Austausch des Glycins durch ein Cystein führt zu einer allosterischen Änderung der spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen in der Position 260 in der TMH 5.

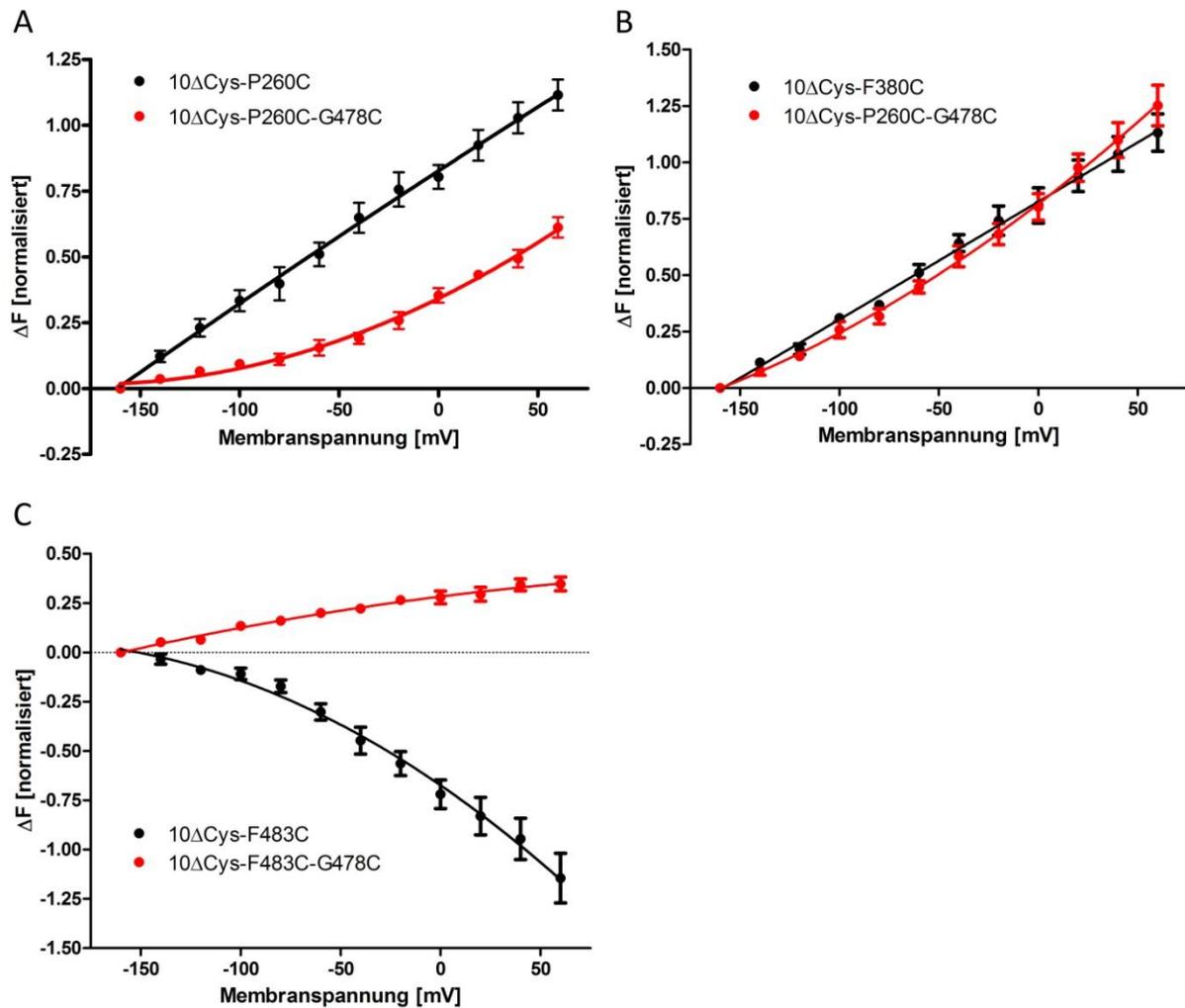


Abbildung 4.20 Effekte des Austausches von Glycin durch Cystein in Position 478 auf die spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen in den Positionen P260, F380 und F483. Normalisierte Darstellung der Spannungsabhängigkeit der Fluoreszenzamplituden der jeweiligen TMR6M-markierten Cysteinmutanten in *X. laevis* Oozyten (ΔF -U Kurven) für den leeren Transporter. (A) rOCT1(10ΔCys-P260C) und rOCT1(10ΔCys-P260C-G478C) (B) rOCT1(10ΔCys-F380C) und rOCT1(10ΔCys-F380C-G478C) (C) rOCT1(10ΔCys-F483C) und rOCT1(10ΔCys-F483C-G478C).

4.3.2. Funktionelle Charakterisierung der Cystein Doppelmutanten rOCT1(10ΔCys-P260C-G478C), rOCT1(10ΔCys-F380C-G478C) und rOCT1(10ΔCys-F483C-G478C)

Da durch die Einführung des zweiten Cysteins in Position 478 die spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen des leeren Transporters in zwei Positionen beeinflusst wurden, wurde untersucht, ob diese Mutationen zu unerwarteten Veränderungen der funktionellen Eigenschaften der Cystein Doppelmutanten führen.

Die Transporteigenschaften der drei Doppelmutanten rOCT1(10ΔCys-P260C-G478C), rOCT1(10ΔCys-F380C-G478C) sowie rOCT1(10ΔCys-F483C-G478C) wurden analog zu den

Eigenschaften der Einzelmutanten nach Expression in *X. laevis* Oozyten untersucht. Analysiert wurden der Cholin-induzierte Strom sowie die Aufnahme von [³H]-MPP. Außerdem wurde die Hemmung der [³H]-MPP-Aufnahme (2,5nM) durch TBuA bestimmt. Die Abbildung 4.21 A zeigt die Cholin-induzierten Einwärtsströme, die bei -50 mV gemessen wurden. Für die Mutante rOCT1(10ΔCys-P260C-G478C) ergab sich ein $K_{0,5}$ -Wert von $1,42 \pm 0,29$ mM ($n = 5$) und für die Mutante rOCT1(10ΔCys-F380C-G478C) ergab sich ein $K_{0,5}$ -Wert von $1,54 \pm 0,13$ mM ($n = 5$). Der $K_{0,5}$ -Wert der Mutante rOCT1(10ΔCys-F483C-G478C) betrug $1,45 \pm 0,16$ mM ($n = 4$). Diese drei $K_{0,5}$ -Werte unterscheiden sich nicht signifikant von dem $K_{0,5}$ -Wert von rOCT1(10ΔCys) ($1,28 \pm 0,10$ μM, siehe Tabelle 4.1) ($p > 0,05$).

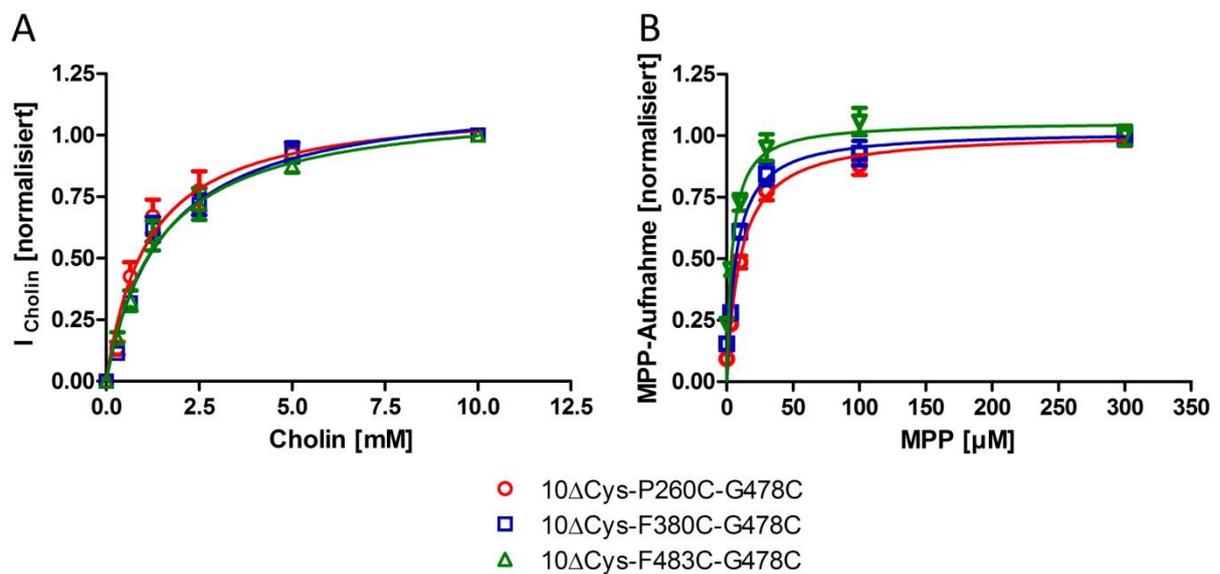


Abbildung 4.21 Konzentrationsabhängigkeiten der Cysteindoppelmutanten.

Für Oozyten, die die Mutante rOCT(10ΔCys-P260C-G478C), rOCT(10ΔCys-F380C-G478C) oder rOCT1(10ΔCys-F483C-G478C) exprimieren, wurde der Cholin-induzierte Einwärtsstrom gemessen (A) und die [³H]-MPP-Aufnahme getestet (B). Zur Anpassung der Kurve an die normalisierten Messwerte wurde die Michaelis-Menten-Gleichung verwendet.

Bezüglich der [³H]-MPP-Aufnahme verhielten sich die Doppelmutanten ebenfalls ähnlich wie die entsprechenden Cysteineinzelmutanten (Abbildung 4.21 B). Die Doppelmutante rOCT1(10ΔCys-P260C-G478C) zeigte einen K_m -Wert von $10,48 \pm 0,65$ μM ($n = 3$) und für die Doppelmutante rOCT1(10ΔCys-F380C-G478C) ergab sich ein K_m -Wert von $6,70 \pm 0,37$ μM ($n = 3$). Auch für die Doppelmutante rOCT1(10ΔCys-F483C-G478C) wurde ein ähnlicher K_m -Wert wie für die Einzelmutante rOCT1(10ΔCys-F483C) bestimmt ($K_m = 4,17 \pm 0,67$ μM,

n = 3). Die durch die Mutation in Position 483 bedingte Affinitätserhöhung für TBuA wurde nicht durch die zweite Mutation in Position 478 beeinflusst.

In der Abbildung 4.22 ist die Hemmung der [³H]-MPP-Aufnahme (2,5 nM) durch TBuA für alle Cysteindoppelmutanten dargestellt. Hierbei wichen die IC₅₀-Werte der Doppelmutanten signifikant von rOCT1(10ΔCys) ab (p < 0,005). Dies ist jedoch auf die Mutation in der Position 478 zurückzuführen, die bereits alleine eine signifikante Erhöhung der Affinität (IC₅₀ = 8,71 ± 1,86 μM) im Vergleich zu rOCT1(10ΔCys) (IC₅₀ = 22,94 ± 0,86 μM) aufwies.

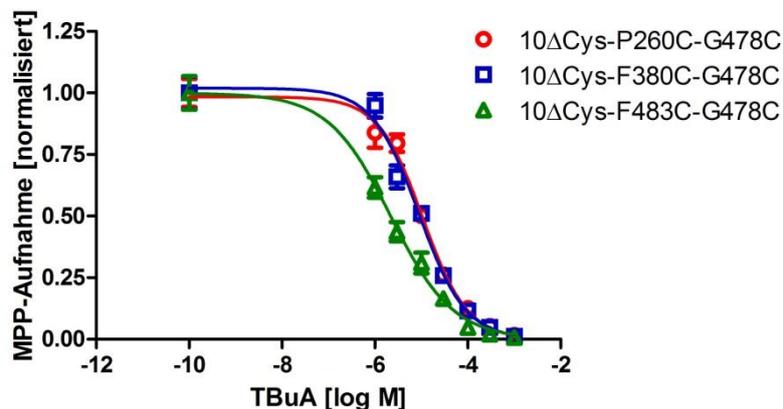


Abbildung 4.22 Hemmung der [³H]-MPP-Aufnahme durch TBuA.

rOCT(10ΔCys-P260C-G478C), rOCT(10ΔCys-F380C-G478C) und die Mutante rOCT1(10ΔCys-F483C-G478C) wurden in *X. laevis* Oozyten exprimiert und die [³H]-MPP-Aufnahme in Abhängigkeit von verschiedenen TBuA-Konzentrationen gemessen. Zur Anpassung der Kurve an die normalisierten Messwerte wurde die Hill-Gleichung verwendet.

Die Doppelmutanten rOCT1(10ΔCys-P260C-G478C) und rOCT1(10ΔCys-F380C-G478C) zeigten keine weitere Erhöhung der Affinität im Vergleich zu der rOCT1(10ΔCys-G478C)-Mutante. Die erhaltenen IC₅₀-Werte betragen für rOCT1(10ΔCys-P260C-G478C) 10,39 ± 0,35 μM (n = 3) sowie für rOCT1(10ΔCys-F380C-G478C) 8,72 ± 1,35 μM (n = 3). Für die rOCT1(10ΔCys-F483C-G478C)-Mutante ergab sich ein IC₅₀-Werte von 2,82 ± 1,00 μM (n = 3), der sich nicht signifikant von der Einzelmutante rOCT1(10ΔCys-F483C) unterschied.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass durch die Einführung des zweiten Cysteins in die Position 478 für Cholin und MPP keine Affinitätsveränderungen im Vergleich zu den Einzelmutanten aufgezeichnet wurden. Lediglich für die Hemmung der [³H]-MPP-Aufnahme durch TBuA ergab sich im Vergleich zu den Einzelmutanten eine signifikante Verschiebung der Affinität für alle drei Doppelmutanten.

In Tabelle 4.2 ist die funktionelle Charakterisierung der drei Cysteindoppelmutanten im Vergleich zu rOCT1(10ΔCys) zusammengefasst.

	³ H]-MPP- Aufnahme K _m [μM]	Cholin-induzierter Strom K _{0,5} [mM]	Hemmung der ³ H]-MPP-Aufnahme durch TBuA IC ₅₀ [μM]
rOCT1(10ΔCys-G478C)	7,48 ± 0,84	0,92 ± 0,05	8,71 ± 1,86***
rOCT1(10ΔCys-P260C-G478C)	10,48 ± 0,65	1,42 ± 0,29	10,39 ± 0,35***
rOCT1(10ΔCys-F380C-G478C)	6,70 ± 0,37	1,54 ± 0,13	8,72 ± 1,35***
rOCT1(10ΔCys-F483C-G478C)	4,17 ± 0,67**	1,45 ± 0,16	2,82 ± 1,00***

Tabelle 4.2 Zusammenfassung der funktionellen Charakterisierung von (10ΔCys-G478C), rOCT1(10ΔCys-P260C-G478C), rOCT1(10ΔCys-F380C-G478C), rOCT1(10ΔCys-F483C-G478C) im Vergleich zu rOCT1(10ΔCys).

*: p < 0,05, **: p < 0,01, ***: p < 0,005 verglichen mit rOCT1(10ΔCys) (siehe Tabelle 4.1)

4.3.3. Die Aktivität der Mutante rOCT1(10ΔCys-G478C) wird durch den Fluoreszenzfarbstoff TMR6M nicht beeinflusst

Eine Veränderung der spannungsabhängigen Fluoreszenzantworten in den Cysteindoppelmutanten im Vergleich zu den Cysteineinzelmutanten könnte darauf zurückzuführen sein, dass der Fluoreszenzfarbstoff TMR6M auch an das Cystein in Position 478 bindet und so die Gesamtfluoreszenz beeinflusst. Im Gegensatz zu den Positionen 260, 380 und 483 befindet sich die Position 478 innerhalb oder in der Nähe der Substratbindungstasche, so dass es aufgrund dessen Größe unwahrscheinlich ist, dass der Fluoreszenzfarbstoff an dieses Cystein binden kann. Da jedoch eine kovalente Bindung von TMR6M nicht ausgeschlossen werden kann, wurde im Folgenden zunächst untersucht, ob TMR6M einen Einfluss auf die Aktivität der rOCT1(10ΔCys-G478C)-Mutante hat. Hierfür wurde die [³H]-MPP-Aufnahme (0,1 μM) in Abhängigkeit von der TMR6M-Inkubation für 15 min untersucht. In Abbildung 4.23 ist der Vergleich der [³H]-MPP-Aufnahme mit und ohne TMR6M-Inkubation für rOCT1(10ΔCys) und rOCT1(10ΔCys-G478C) dargestellt. Für rOCT1(10ΔCys) ergab sich keine signifikante Änderung der Aktivität nach der Inkubation mit TMR6M (101,3 ± 5,02 %; n = 3, p > 0,05). Auch die Cysteinmutante rOCT1(10ΔCys-G478C) wurde nicht signifikant durch TMR6M beeinflusst (p > 0,05). Die Aktivität nach der TMR6M-Inkubation betrug 95,14 ± 7,14 % (n = 3).

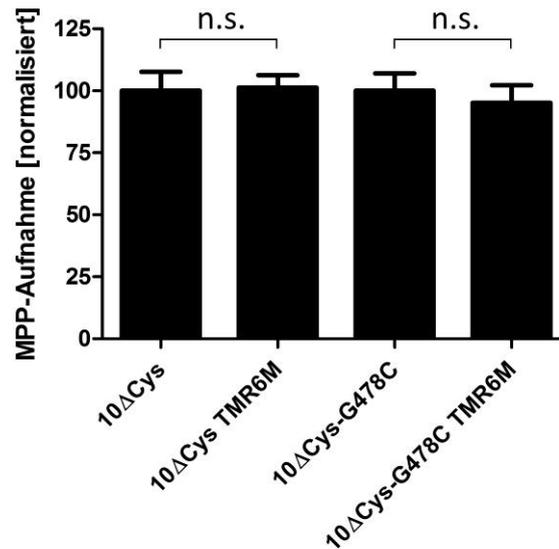


Abbildung 4.23 Quantifizierung der [³H]-MPP-Aufnahme in Abhängigkeit der TMR6M-Markierung. Die [³H]-MPP-Aufnahme in Oozyten, die mit cRNA von rOCT1(10ΔCys) und rOCT1(10ΔCys-G478C) injiziert wurden, wurde 15 min gemessen. Die jeweilige [³H]-MPP-Aufnahme ohne TMR6M-Markierung wurde normalisiert und mit der [³H]-MPP-Aufnahme nach TMR6M-Inkubation verglichen.

Diese Daten zeigen, dass TMR6M keinen Einfluss auf die Aktivität der Cysteinmutante rOCT1(10ΔCys-G478C) hat. Das Ergebnis weist darauf hin, dass TMR6M nicht an das Cystein in Position 478 binden kann.

4.3.4. Verifizierung des Einflusses der Aminosäure in der Position 478 auf die spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen von rOCT1

Die Beobachtung, dass spannungsabhängige Fluoreszenzänderungen in den Positionen 260 und 483 durch den Austausch des Glycins 478 durch ein Cystein verändert waren (vergleiche Abbildung 4.20), deutet darauf hin, dass diese Position für die beim spannungsabhängigen Transport ablaufenden Konformationsänderungen von entscheidender Bedeutung ist. Um den Einfluss der Aminosäure in Position 478 zu verifizieren, wurde das Glycin 478 durch ein Serin oder ein Threonin ersetzt. Da für die Cysteindoppelmutante rOCT1(10ΔCys-F483C-G478C) die stärkste Veränderung im Vergleich zu der Cysteineinzelmutante rOCT1(10ΔCys-F483C) aufgezeichnet werden konnte, wurde nur die Position 483 für die Generierung der Doppelmutanten verwendet.

In Abbildung 4.24 sind die spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen ohne Substrateinfluss für die Mutanten rOCT1(10ΔCys-F483C), rOCT1(10ΔCys-F483C-G478C),

rOCT1(10 Δ Cys-F483C-G478S) und rOCT1(10 Δ Cys-F483C-G478T) normalisiert auf -160 mV dargestellt. Da bei den Doppelmutanten rOCT1(10 Δ Cys-F483C-G478S) und rOCT1(10 Δ Cys-F483C-G478T) kein zusätzliches Cystein vorhanden ist, kann TMR6M nur an das Cystein in Position 483 binden.

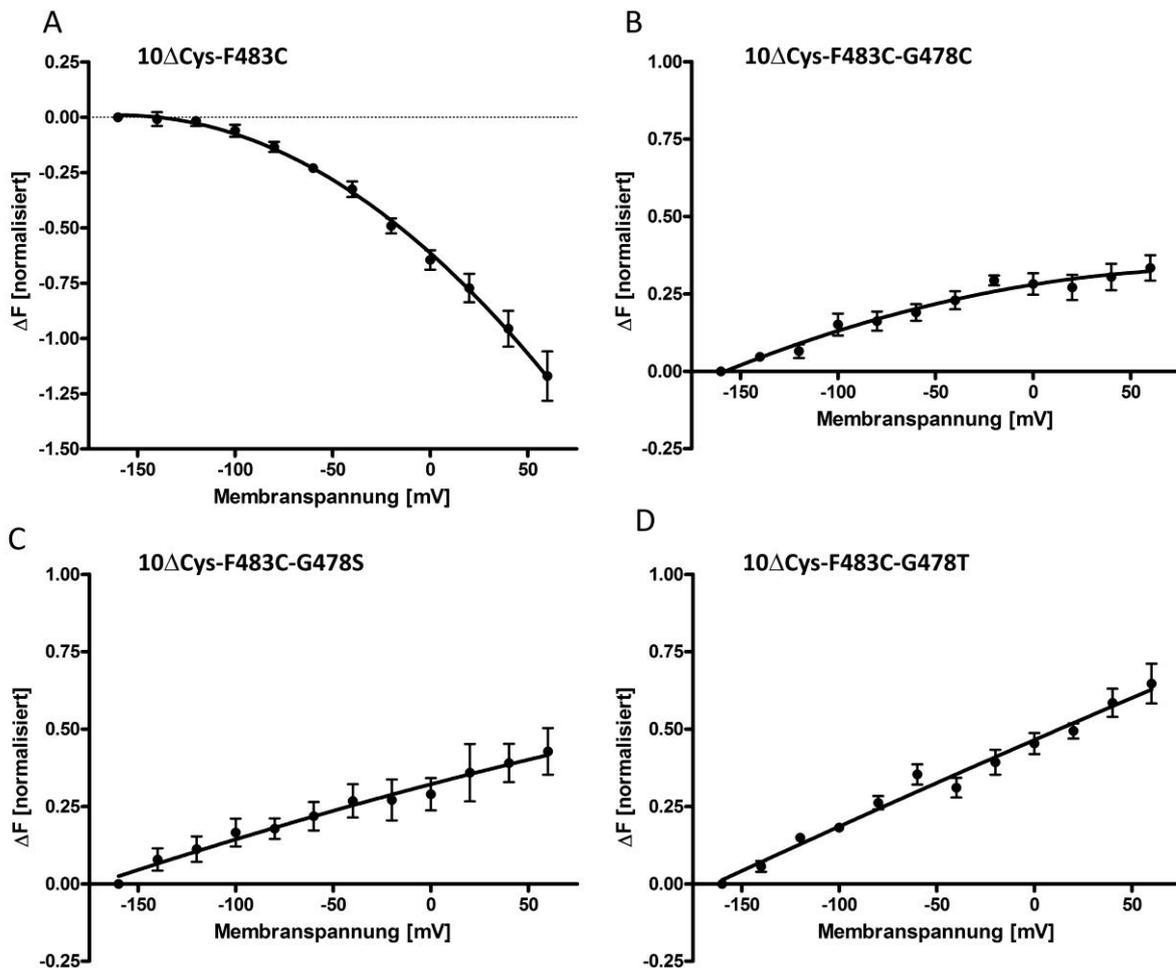


Abbildung 4.24 Effekte des Austausches von Glycin durch Cystein, Serin oder Threonin in Position 478 auf die spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen in der Positionen 483. Normalisierte Darstellung der Spannungsabhängigkeit der Fluoreszenzamplituden der jeweiligen TMR6M-markierten Cysteinmutanten in *X. laevis* Oozyten (ΔF -U Kurven) für den leeren Transporter. (A) rOCT1(10 Δ Cys-F483C) (B) rOCT1(10 Δ Cys-F483C-G478C) (C) rOCT1(10 Δ Cys-F483C-G478S) (D) rOCT1(10 Δ Cys-F483C-G478T).

Befindet sich in der Position 478 ein Serin oder Threonin, zeigte der leere Transporter ähnliche spannungsabhängige Fluoreszenzänderungen wie die Cysteinmutante rOCT1(10 Δ Cys-F483C-G478C). Die Einführung einer OH-Gruppe des Serins oder des Threonins in Position 478 führte zu einem ähnlichen Effekt wie die SH-Gruppe des Cysteins. Kleine Abweichungen in der Fluoreszenzantwort von rOCT1(10 Δ Cys-F483C-G478S) und

rOCT1(10 Δ Cys-F483C-G478T) im Vergleich zur Cysteindoppelmutante verdeutlichen die kritische Lage der Aminosäure in Position 478.

Insgesamt zeigen die mit Hilfe der Voltage-Clamp-Fluorometrie gewonnenen Daten für die Position 483, dass eine Veränderung der spannungsabhängigen Fluoreszenzantworten in den Cysteindoppelmutanten im Vergleich zu den Cysteineinzelmutanten durch die Einführung des Cysteins in Position 478 zu erklären ist.

4.3.5. Die Mutationen in der Position 478 beeinflussen die Geschwindigkeit der spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen

Die bisher aufgeführten Fluoreszenzen stellen Gleichgewichtsmessungen dar. Sie demonstrieren, dass sich bei verschiedenen Spannungen unterschiedliche Fluoreszenzen einstellen, die durch die Position 478 beeinflusst wurden. Um festzustellen, ob der Zeitverlauf dieser Fluoreszenzänderungen durch die zusätzliche Mutation in Position 478 beeinflusst wurde, wurden die Zeitkonstanten der verschiedenen Mutanten bestimmt.

Bei der Mutante rOCT1(10 Δ Cys-F483C) sind die Werte der „ON“-Pulse und „OFF“-Pulse übereinstimmend (Daten nicht gezeigt). Für den Vergleich der Mutanten wurden nur die „ON“-Pulse der spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen analysiert. Unter der Verwendung einer biexponentiellen Funktion konnten die Kurven an die Messwerte angepasst werden (vergleiche Kapitel 3.2.4.4).

In Abbildung 4.25 A sind beide Komponenten des Zeitverlaufs τ_{fast} und τ_{slow} für die Mutante rOCT1(10 Δ Cys-F483C) für große Spannungssprünge (von -50 mV auf +60 mV oder von -50 mV auf -160 mV) dargestellt. Die schnelle Komponente τ_{fast} betrug für den Spannungssprung auf +60 mV $47,42 \pm 6,46$ ms und für den Spannungssprung auf -160 mV $58,74 \pm 6,48$ ms, während die langsame Komponente τ_{slow} für den Spannungssprung auf +60 mV $134,50 \pm 10,16$ ms und für den Spannungssprung auf -160 mV $118,1 \pm 12,93$ (n = 10) betrug. Die Befunde zeigten, dass sich für den leeren Transporter keine Spannungsabhängigkeit der Zeitkonstanten ergaben (p > 0,05). Dieses Ergebnis stimmt mit den Daten von Dr. Gorbunov überein, der in seiner Dissertation ebenfalls spannungsunabhängige Zeitkonstanten für die Mutante rOCT1(10 Δ Cys-F483C) berechnete. Die Cysteindoppelmutante rOCT1(10 Δ Cys-F483C-G478C) zeigte für den leeren Transporter im Gegensatz zu rOCT1(10 Δ Cys-F483C) nur eine Komponente (Abbildung 4.25 B). Die

errechneten Zeitkonstanten τ_{fast} und τ_{slow} betragen für den Spannungssprung auf +60 mV $26,26 \pm 4,50$ ms bzw. $25,54 \pm 3,62$ ms ($n = 10$). Auch für den Spannungssprung auf -160 mV ergab sich für τ_{fast} und τ_{slow} ein ähnliches Bild ($26,4 \pm 3,38$ ms bzw. $28,98 \pm 3,28$ ms; $n = 10$). Diese Werte für die Doppelmutante waren kleiner als die für τ_{fast} berechneten Werte der Einzelmutante rOCT1(10 Δ Cys-F483C). Wie bei der Mutante rOCT1(10 Δ Cys-F483C) war die Zeitkonstante unabhängig von der Spannung ($p > 0,05$). Die Daten zeigen, dass der Austausch des Glycins durch ein Cystein in Position 478 zu einer Veränderung der Geschwindigkeit der Fluoreszenzantwort in der Position 483 führt.

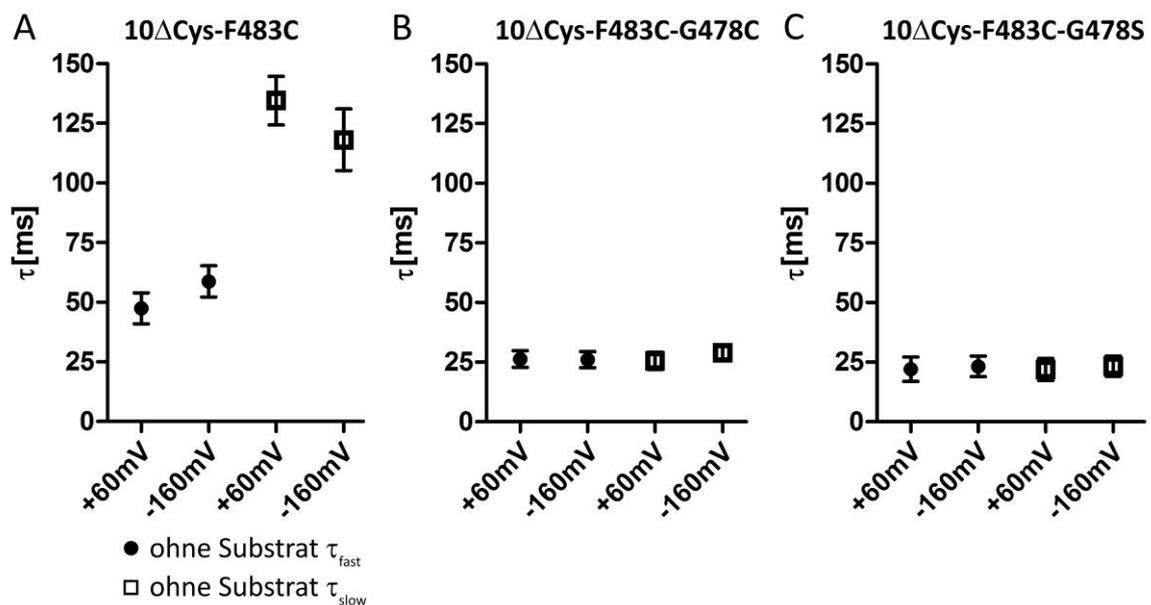


Abbildung 4.25 Zeitverlauf der spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen für verschiedenen Mutanten. Spannungsabhängigkeit der Zeitkonstanten nach Spannungssprüngen von -50 mV auf +60 mV oder auf -160 mV („ON“-Pulse) ohne Substrat. (A) rOCT1(10 Δ Cys-F483C) (B) rOCT1(10 Δ Cys-F483C-G478C) (C) rOCT1(10 Δ Cys-F483C-G478S). Darstellung des Mittelwerts und des Standardfehlers aus 5-10 Experimenten.

In Abbildung 4.25 C ist zu erkennen, dass die Doppelmutante rOCT1(10 Δ Cys-F483C-G478S) ein ähnliches Verhalten wie die Cysteinmutante rOCT1(10 Δ Cys-F483C-G478C) aufweist. Wie für die Cysteinmutante konnten auch hier keine zwei Komponenten unterschieden werden. Die errechneten Zeitkonstanten τ_{fast} und τ_{slow} betragen für den Spannungssprung auf +60 mV $22,04 \pm 5,08$ ms bzw. $21,94 \pm 4,66$ ms ($n = 5$). Für den Spannungssprung auf -160 mV betragen die errechneten Werte der Zeitkonstanten $23,21 \pm 4,34$ ms bzw. $23,36 \pm 4,24$ ms ($n = 7$).

Unter den analysierten Bedingungen zeigte sich, dass der Zeitverlauf der Fluoreszenzantwort des leeren Transporters durch die Einführung von Aminosäuren mit einer negativen Teilladung in Position 478 verändert wurde.

4.3.6. Die Blockierung des Transportwegs von rOCT1 durch MTSET verändert die spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen in Position 380

Um unterscheiden zu können, ob die detektierten Bewegungen in den drei TMHs 5, 8 und 11 durch die Blockierung des Transportwegs beeinflusst werden, wurde die Fluoreszenz der Cysteindoppelmutanten vor und nach MTSET-Modifizierung miteinander verglichen. Im Folgenden wurde zunächst die Fluoreszenzantwort der drei Cysteindoppelmutanten ohne Einfluss eines organischen Kations analysiert. Zu Beginn jedes Experiments wurden die Oozyten, die die jeweilige rOCT1(10 Δ Cys)-Mutanten exprimierten, mit TMR6M (10 μ M) für 5 min inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurde die Oozyten anschließend mit ORI-Lösung unter TEVC-Bedingungen umspült und das Spannungssprungprotokoll durchgeführt. Im Anschluss wurde die jeweilige Oozyte bei -50 mV mit 1 mM MTSET für 30-45 s inkubiert. Da MTSET ein Substrat von rOCT1(10 Δ Cys) ist, kann dieses im Gegensatz zu TMR6M auch an das Cystein in der Position 478 kovalent binden. Nach Auswaschen des SH-Gruppenreagenz wurde die Fluoreszenzänderung wieder für den leeren Transporter aufgenommen und mit der Fluoreszenzänderung vor der MTSET-Modifizierung verglichen. Die Abbildung 4.26 A zeigt, dass die MTSET-Modifizierung die spannungsabhängige Fluoreszenzänderung der Mutante rOCT1(10 Δ Cys-P260C-G478C) kaum beeinflusst. In Abbildung 4.26 B ist zu erkennen, dass die Fluoreszenzantwort der Mutante rOCT1(10 Δ Cys-F380C-G478C) nach der Modifizierung mit MTSET deutlich reduziert wurde. Für die Doppelmutante rOCT1(10 Δ Cys-F483C-G478C) ergab sich nach der MTSET-Modifizierung eine ähnliche Fluoreszenzantwort wie vor der Blockierung des Transportwegs (Abbildung 4.26 C).

Zusammenfassend zeigte sich, dass die Blockierung des Transportwegs durch MTSET die spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen nur in der Position 380 stark beeinflusst. Die im Vergleich zur jeweiligen Einzelmutante stark reduzierten Fluoreszenzamplituden in Position 260 und 483 der Doppelmutanten wurden durch die Blockierung des Transportwegs nicht verändert.

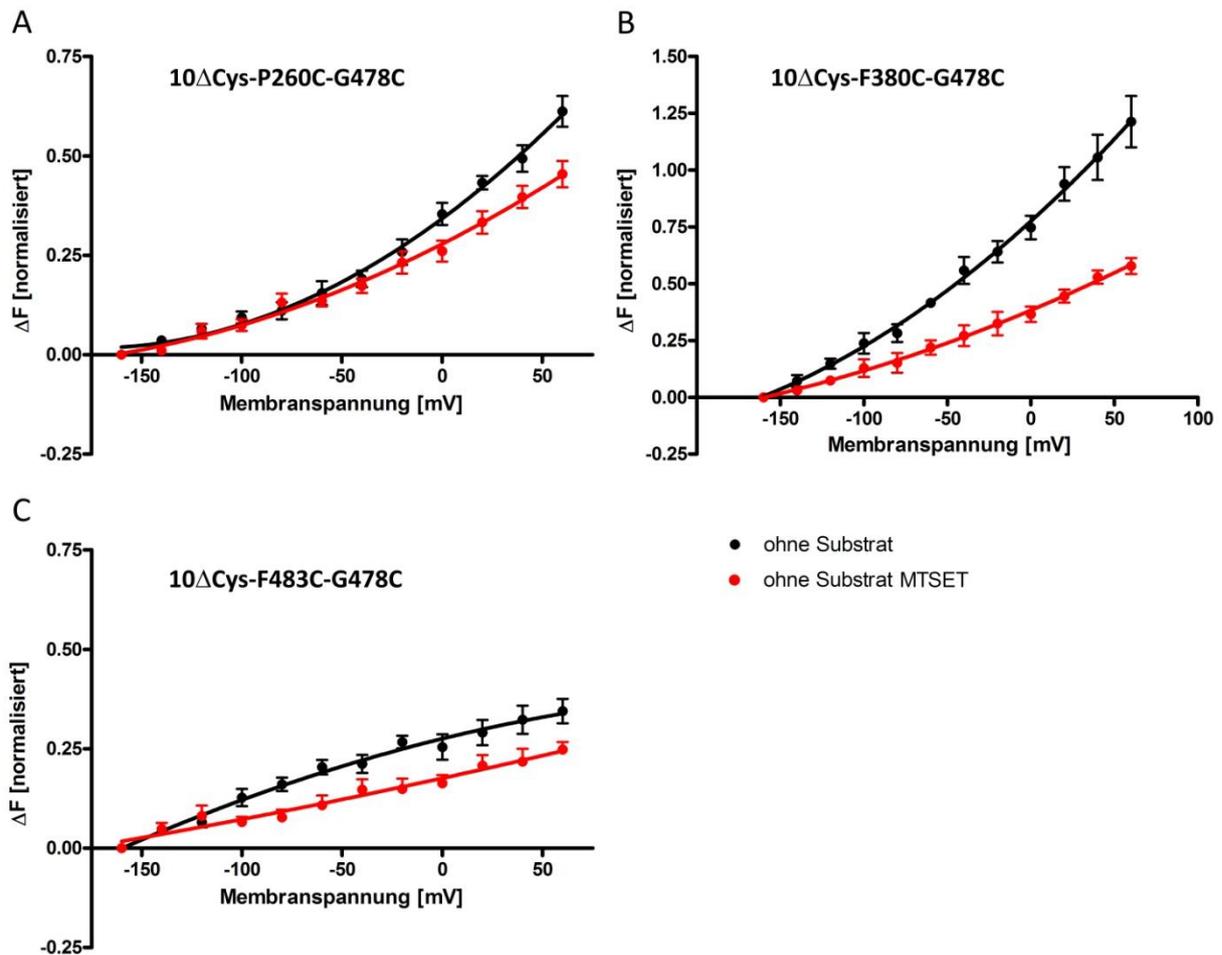


Abbildung 4.26 Spannungsabhängige Fluoreszenzänderungen der Cysteindoppelmutanten vor und nach kovalenter Bindung von MTSET. Normalisierte Darstellung der Spannungsabhängigkeit der Fluoreszenzänderungen der jeweiligen TMR6M-markierten Cysteinmutanten in *X. laevis* Oozyten (ΔF -U Kurven) für den leeren Transporter jeweils vor und nach der Modifikation durch MTSET. (A) rOCT1($10\Delta\text{Cys-P260C-G478C}$) (B) rOCT1($10\Delta\text{Cys-F380C-G478C}$) (C) rOCT1($10\Delta\text{Cys-F483C-G478C}$).

4.3.7. Die Blockierung des Transportwegs von rOCT1 durch MTSET verändert die kationenabhängigen Fluoreszenzänderungen in Position 380 und 483

Um festzustellen, ob die spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen in Gegenwart von Cholin, MPP oder TBUA durch die Blockierung des Transportwegs von rOCT1 beeinflusst werden, wurde der Einfluss der drei organischen Kationen auf die spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen der Cysteindoppelmutanten mit und ohne Modifizierung durch MTSET untersucht und verglichen. Wie in Kapitel 4.3.6 beschrieben wurden die *X. laevis* Oozyten zunächst mit TMR6M (10 μM) für 5 min inkubiert. Nach mehreren Waschsritten wurden die Oozyten anschließend mit ORI-Lösung unter TEVC-Bedingungen umspült und das Spannungssprungprotokoll durchgeführt. Dann wurden die jeweiligen Oozyten mit einer

ORI-Lösung, die die Substrate Cholin (10 mM), MPP (100 μ M) oder den Inhibitor TBuA (100 μ M) gesättigter Konzentration enthielt, konstant umspült und ebenfalls das Spannungssprungprotokoll ausgeführt. Im Anschluss wurde das entsprechende organische Kation ausgewaschen und die ursprüngliche Fluoreszenzänderung für den leeren Transporter überprüft. War diese identisch mit der Ausgangsfluoreszenz wurde die Oozyte unter TEVC-Bedingungen bei -50 mV mit 1 mM MTSET für 30-45 s inkubiert. Nach Auswaschen des SH-Gruppenreagenz wurde die Fluoreszenz wieder für den leeren Transporter sowie für den Transporter mit dem jeweiligen organischen Kation aufgezeichnet und mit der Fluoreszenzänderung vor der MTSET-Modifizierung verglichen.

Wie bereits beschrieben zeigte für die Mutante rOCT1(10 Δ Cys-P260C-G478C) eine reduzierte Amplitude der spannungsabhängigen Fluoreszenzänderung im Vergleich zu der dazugehörigen Cysteineinzelmutante rOCT1(10 Δ Cys-P260C). In Abbildung 4.27 ist zu erkennen, dass die Kationenabhängigkeit für Cholin und MPP nahezu komplett verloren ging. Nach der Modifizierung mit MTSET konnte kaum eine Veränderung der Fluoreszenzantwort sowohl für den leeren Transporter als auch in Gegenwart von Cholin oder MPP detektiert werden.

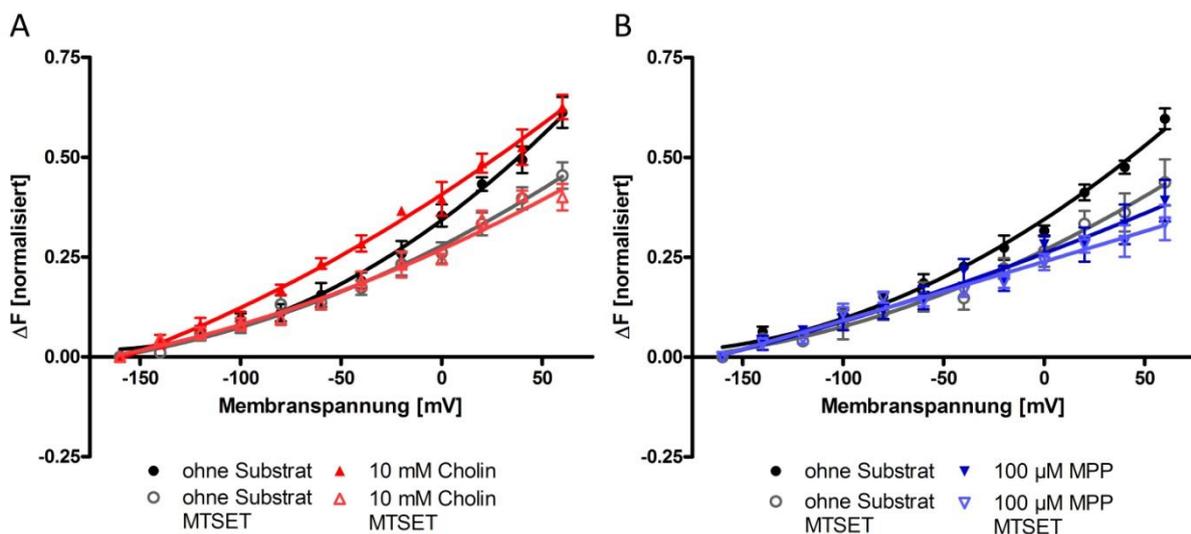


Abbildung 4.27 Spannungs- und kationenabhängige Fluoreszenzänderungen der Mutante rOCT1(10 Δ Cys-P260C-G478C) vor und nach kovalenter Bindung von MTSET. Normalisierte Darstellung der Spannungsabhängigkeit der Fluoreszenzänderungen (ΔF -U Kurven) (A) Cholin (B) MPP jeweils vor und nach der Modifikation durch MTSET.

Für den Cholin-induzierten Strom ergab sich für die Mutante rOCT1(10 Δ Cys-P260C-G478C) eine Reduktion um $84,6 \pm 2,7$ % ($n = 5$) und für den MPP-induzierten Strom eine Reduktion

um $81,8 \pm 2,5$ % ($n = 5$) nach der Modifikation durch MTSET (Daten nicht gezeigt).

Wie der Abbildung 4.28 zu entnehmen ist, konnten für die Doppelmutante rOCT1(10 Δ Cys-F380C-G478C) spannungsabhängige und kationenabhängige Fluoreszenzänderungen detektiert werden. Unter Einfluss von Cholin sowie MPP wurde eine verringerte nicht invertierte Fluoreszenzänderung aufgezeichnet. Für das nicht transportierte TBuA ergab sich eine ähnliche Fluoreszenzantwort wie für die Einzelmutante rOCT1(10 Δ Cys-F380C).

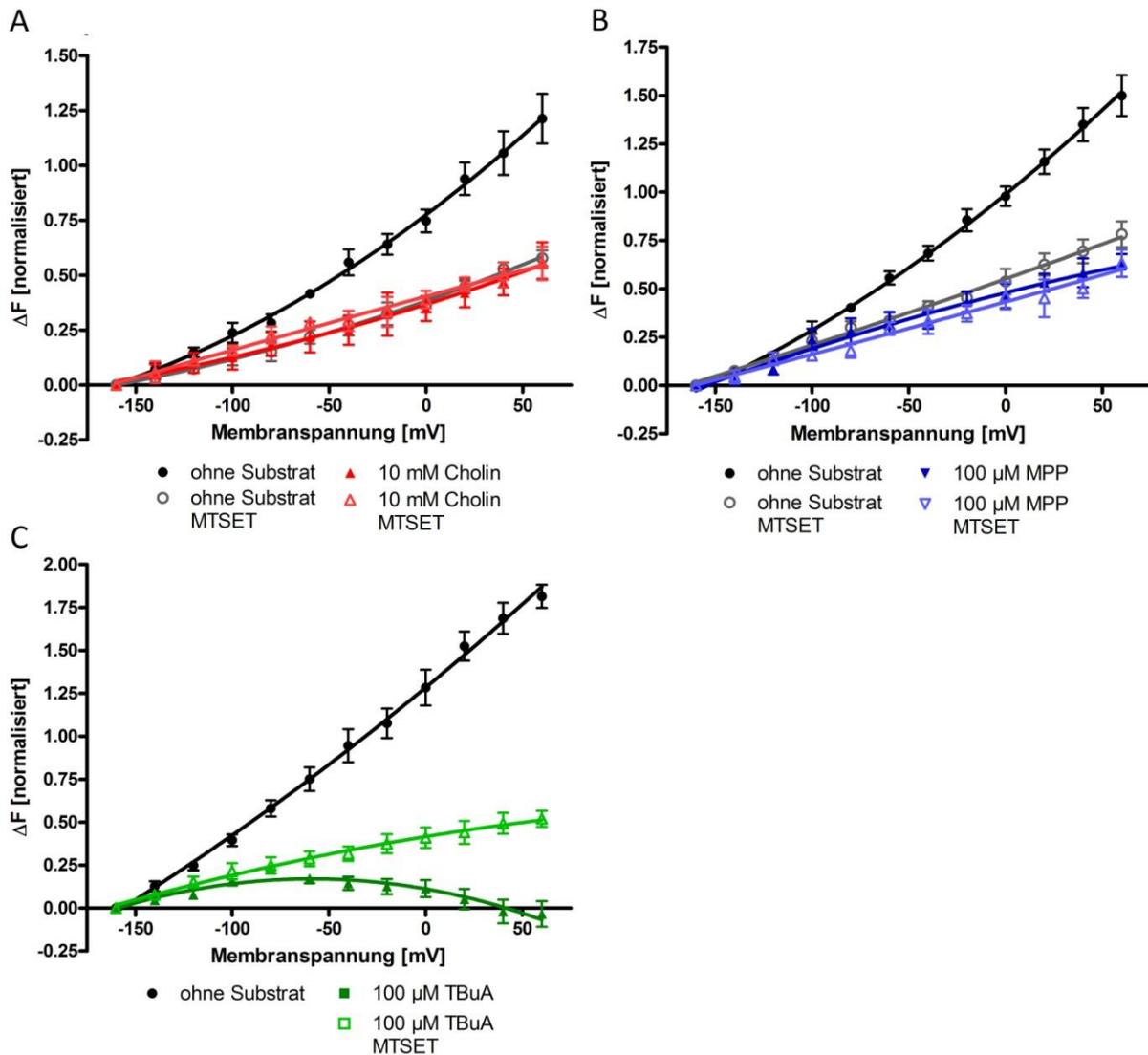


Abbildung 4.28 Spannungs- und kationenabhängige Fluoreszenzänderungen der Mutante rOCT1(10 Δ Cys-F380C-G478C) vor und nach kovalenter Bindung von MTSET. ΔF -U Kurven des leeren Transporters und in Abhängigkeit von (A) Cholin (B) MPP (C) TBuA jeweils vor und nach der Modifikation durch MTSET.

Nach der Modifikation durch MTSET wurde die Fluoreszenzantwort für Cholin und MPP kaum beeinflusst, während die Fluoreszenzänderung für den leeren Transporter stark

reduziert wurde. Der Cholin-induzierte Strom vermindert sich um $86,4 \pm 1,6 \%$ ($n = 5$), der MPP-induzierte Strom wurde um $89,2 \pm 1,8 \%$ ($n = 5$) reduziert (Daten nicht gezeigt).

Bei der Fluoreszenzaufzeichnung unter Einfluss von TBuA konnte die Ausgangsfluoreszenz auch nach 30 min waschen nicht mehr erreicht werden; die maximale Amplitude der Fluoreszenzänderung betrug $51,9 \pm 4,1 \%$ ($n = 6$). Trotz des inkompletten Waschens wurde die MTSET-Modifizierung durchgeführt und die Fluoreszenzantwort für TBuA aufgezeichnet. Hier ergab sich eine leichte Verschiebung der Fluoreszenzantwort im Vergleich zu dem nicht-modifizierten Transporter. Die Effektivität der Hemmung durch MTSET wurde für die Messung mit TBuA nicht überprüft, um eine Beeinflussung durch ein zweites Kation ausschließen zu können.

Wie bereits in Kapitel 4.3.1 beschrieben war auch für die Doppelmutante rOCT1(10 Δ Cys-F483C-G478C) die Fluoreszenz als Antwort auf das Spannungssprungprotokoll nicht identisch mit der detektierten Fluoreszenzänderung für die Einzelmutante rOCT1(10 Δ Cys-F483C). Unter dem Einfluss von Cholin und MPP ergab sich eine ähnliche Fluoreszenzantwort verglichen mit der Einzelmutante rOCT1(10 Δ Cys-F483C) (Abbildung 4.29). Nach der MTSET-Modifizierung betrug der Reststrom der rOCT1(10 Δ Cys-F483C-G478C)-Mutante für Cholin $11,6 \pm 3,9 \%$ ($n = 5$) sowie für MPP $10 \pm 0,8 \%$ ($n = 5$) (Daten nicht gezeigt). In Gegenwart des nicht transportieren TBuA zeigte die Doppelmutante eine geringfügig höhere Fluoreszenz wie für den leeren Transporter ($n = 6$) (Abbildung 4.29 C). Die spannungsabhängige Fluoreszenzänderung wurde nach Modifizierung durch MTSET für den leeren Transporter kaum beeinflusst. Die Fluoreszenzantwort von Cholin und MPP wurde dagegen stark inhibiert. Unter dem Einfluss des Hemmstoffs TBuA wurde die Fluoreszenz nach MTSET-Modifikation kaum verändert.

Insgesamt zeigen diese Daten, dass für zwei der drei Doppelmutanten (rOCT1(10 Δ Cys-F380C-G478C) und rOCT1(10 Δ Cys-F483C-G478C)) spannungs- und kationenabhängige Fluoreszenzänderungen detektiert werden konnten. Durch den Austausch von Glycin 478 gegen Cystein konnten die substratabhängigen Bewegungen von Cholin und MPP in der Position 260 nicht mehr detektiert werden. Die Konformationsänderungen in Position 380, die durch Cholin, MPP oder TBuA induziert wurden, wurden durch den Aminosäureaustausch abgeschwächt oder modifiziert. Durch die Blockierung des Transportwegs von rOCT1 wurde in der Position 380 die

Konformationsänderungen des leeren Transporters inhibiert, während in der Position 483 die Konformationsänderungen des Transporters in Gegenwart von Cholin oder MPP beeinflusst wurde. Für das nicht transportierte organische Kation TBuA zeigte die Position 380 eine leichte Verschiebung der Fluoreszenzantwort.

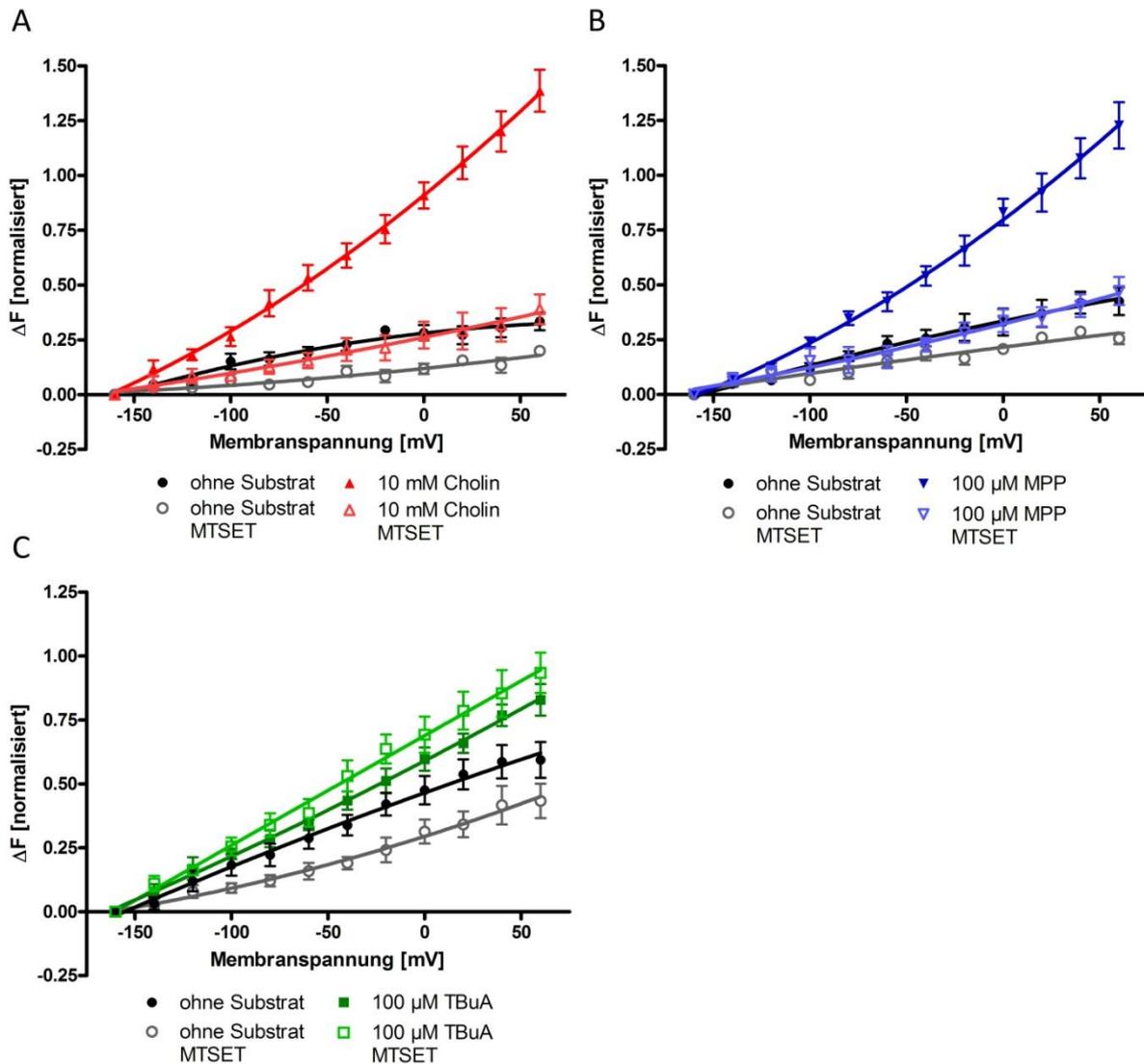


Abbildung 4.29 Spannungs- und kationenabhängige Fluoreszenzänderungen der Mutante rOCT1(10ΔCys-F483C-G478C) vor und nach kovalenter Bindung von MTSET. ΔF -U Kurven des leeren Transporters und in Abhängigkeit von (A) Cholin (B) MPP (C) TBuA jeweils vor und nach der Modifikation durch MTSET.

4.3.8. Keine Beeinflussung der Geschwindigkeit der kationenabhängigen Fluoreszenzänderungen durch die Mutationen in der Position 478

Die in Kapitel 4.3.5 aufgeführten Zeitkonstanten wurden nur für den leeren Transporter beschrieben. Um den Einfluss von Substraten auf den Zeitverlauf zu bestimmen, wurden exemplarisch auch die Zeitkonstanten unter dem Einfluss von Cholin analysiert. Hierfür wurden ebenfalls die Mutanten rOCT1(10 Δ Cys-F483C), rOCT1(10 Δ Cys-F483C-G478C) und rOCT1(10 Δ Cys-F483C-G478S) untersucht. In Abbildung 4.30 sind die Zeitkonstanten der drei Mutanten für den Transporter unter dem Einfluss von Cholin gegenübergestellt. Die errechneten Komponenten der jeweiligen Mutante ohne Substrat sind dem Kapitel 4.3.5 zu entnehmen.

In Gegenwart von Cholin ergab sich wie bereits für den leeren Transporter keine Spannungsabhängigkeit der Zeitkonstanten für alle drei Mutanten ($p > 0,05$). Außerdem verschwand die zweite Komponente des Zeitverlaufs der Cysteinmutante rOCT1(10 Δ Cys-F483C), so dass die errechneten Werte für τ_{fast} und τ_{slow} für den Spannungssprung auf +60 mV $18,59 \pm 2,61$ ms bzw. $27,40 \pm 5,30$ ms und für den Spannungssprung auf -160 mV $21,70 \pm 0,98$ ms bzw. $26,90 \pm 6,26$ ms ($n = 9$) betragen. Unter dem Einfluss von Cholin wurde somit die Geschwindigkeit der spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen im Vergleich zum leeren Transporter verändert.

Auch für die Cysteindoppelmutante rOCT1(10 Δ Cys-F483C-G478C) konnte in Gegenwart von Cholin nur eine Komponente der Zeitkonstanten aufgezeichnet werden. Für den Spannungssprung auf +60 mV ergaben sich errechnete τ_{fast}^- und τ_{slow}^- -Werte von $20,08 \pm 1,78$ ms bzw. $20,80 \pm 1,82$ ms; ($n = 5$) und für den Spannungssprung auf -160 mV errechnete τ_{fast}^- und τ_{slow}^- -Werte von $20,50 \pm 2,61$ ms bzw. $21,78 \pm 1,74$ ms; ($n = 5$). Durch die Einführung des Cysteins in Position 478 wurde der Zeitverlauf in Gegenwart von Cholin nicht beeinflusst. Dies wurde durch die Mutante rOCT1(10 Δ Cys-F483C-G478S) bestätigt. Auch hier wurde keine Veränderung der Zeitkonstanten im Vergleich zur Einzelmutante rOCT1(10 Δ Cys-F483C) gemessen. Die errechneten Werte für τ_{fast}^- und τ_{slow}^- betragen für den Spannungssprung auf +60 mV $20,25 \pm 2,75$ ms bzw. $22,08 \pm 1,59$ ms; ($n = 7$) und für den Spannungssprung auf -160 mV $17,46 \pm 1,12$ ms bzw. $17,51 \pm 1,19$ ms; ($n = 7$). Die errechneten Werte der Zeitkonstanten liegen hierbei kaum über der Auflösungsgrenze des verwendeten Messstandes.

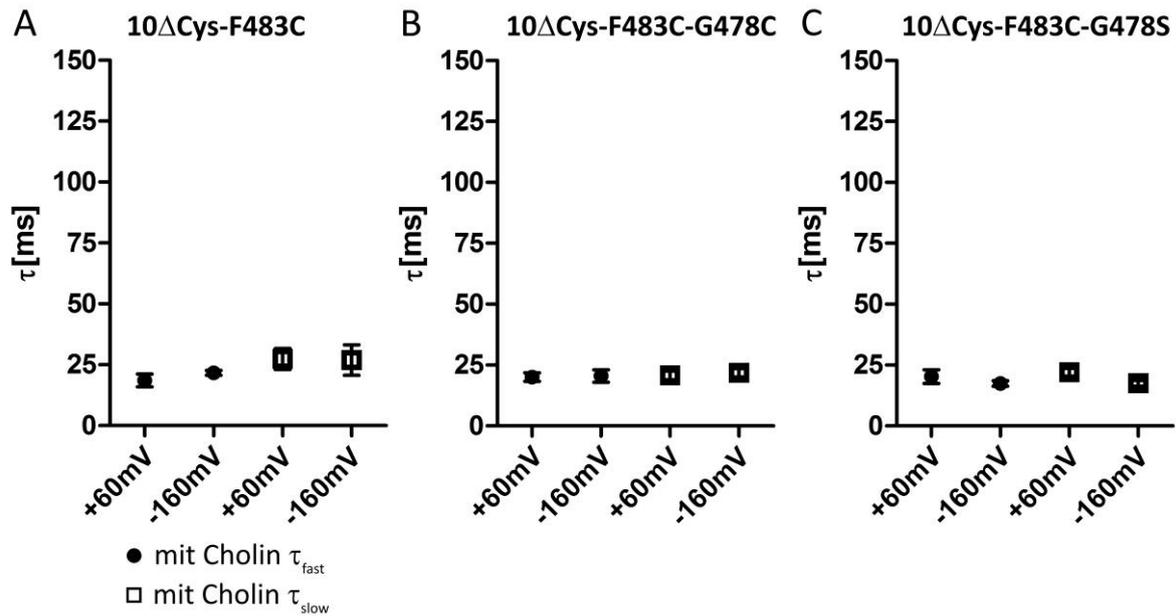


Abbildung 4.30 Zeitverlauf der spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen in Gegenwart des Substrats Cholin für verschiedenen Mutanten. Spannungsabhängigkeit der Zeitkonstanten nach Spannungssprüngen von -50 mV auf +60 mV oder auf -160 mV („ON“-Pulse) in Gegenwart von Cholin. (A) rOCT1(10 Δ Cys-F483C) (B) rOCT1(10 Δ Cys-F483C-G478C) (C) rOCT1(10 Δ Cys-F483C-G478S). Darstellung des Mittelwerts und des Standardfehlers aus 5-10 Experimenten.

In Abbildung 4.31 sind die spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen für die Cysteindoppelmutante rOCT1(10 Δ Cys-F483C-G478C) sowie für die Mutante rOCT1(10 Δ Cys-F483C-G478S) dargestellt. Kleine Abweichungen in der Fluoreszenzantwort der Mutante rOCT1(10 Δ Cys-F483C-G478S) für den leeren Transporter und in Gegenwart von Cholin im Vergleich zur Cysteindoppelmutante verdeutlichen die kritische Lage der Aminosäure in Position 478.

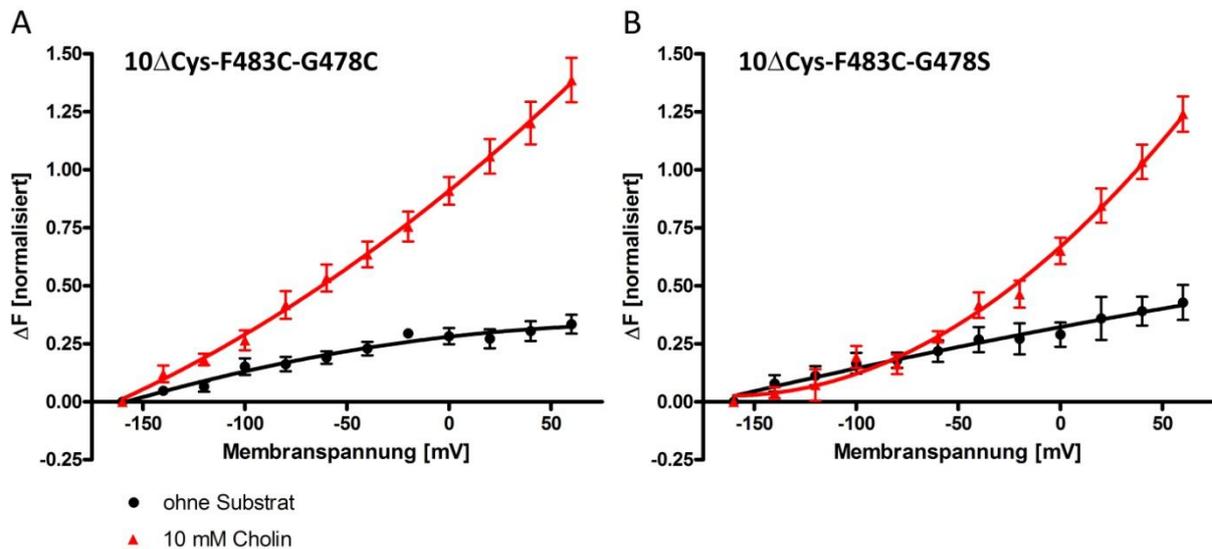


Abbildung 4.31 Effekte des Austausches von Glycin durch Cystein oder Serin in Position 478 auf die spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen in der Positionen 483. Normalisierte Darstellung der Spannungsabhängigkeit der Fluoreszenzamplituden der jeweiligen TMR6M-markierten Cysteinmutanten in *X. laevis* Oozyten (ΔF -U Kurven) für den leeren Transporter und unter dem Einfluss von Cholin. (A) rOCT1($10\Delta\text{Cys-F483C-G478C}$) (B) rOCT1($10\Delta\text{Cys-F483C-G478S}$).

4.3.9. MTSET hat keinen Einfluss auf die spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen der Einzelmutanten

Die Einzelmutanten rOCT1($10\Delta\text{Cys-P260C}$), rOCT1($10\Delta\text{Cys-F380C}$) und rOCT1($10\Delta\text{Cys-F483C}$) besitzen jeweils ein Cystein, an dem ein SH-Gruppenreagenz kovalent binden kann. Nach einer Bindung des Fluoreszenzfarbstoffs TMR6M sollten die spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen durch MTSET nicht beeinflusst werden. Um dies zu verifizieren, wurden Kontrollmessungen analog zu den Messungen in Kapitel 4.3.6 und 4.3.7 mit allen drei Cysteineinzelmutanten durchgeführt. Für die Einzelmutante rOCT1($10\Delta\text{Cys-P260C}$) konnte keine Veränderung der Fluoreszenzantworten für den leeren Transporter nach Inkubation mit MTSET festgestellt werden (Abbildung 4.32). In Gegenwart von Cholin oder MPP wurden nach MTSET-Inkubation leicht verringerte spannungsabhängige Fluoreszenzänderungen detektiert. Der Cholin-induzierte Einwärtsstrom betrug $65,8 \pm 7,1 \%$ ($n = 5$) des Stroms vor der MTSET-Inkubation. Für den MPP-induzierten Strom ergab sich eine Reduktion um $41,5 \pm 8,9 \%$ ($n = 4$).

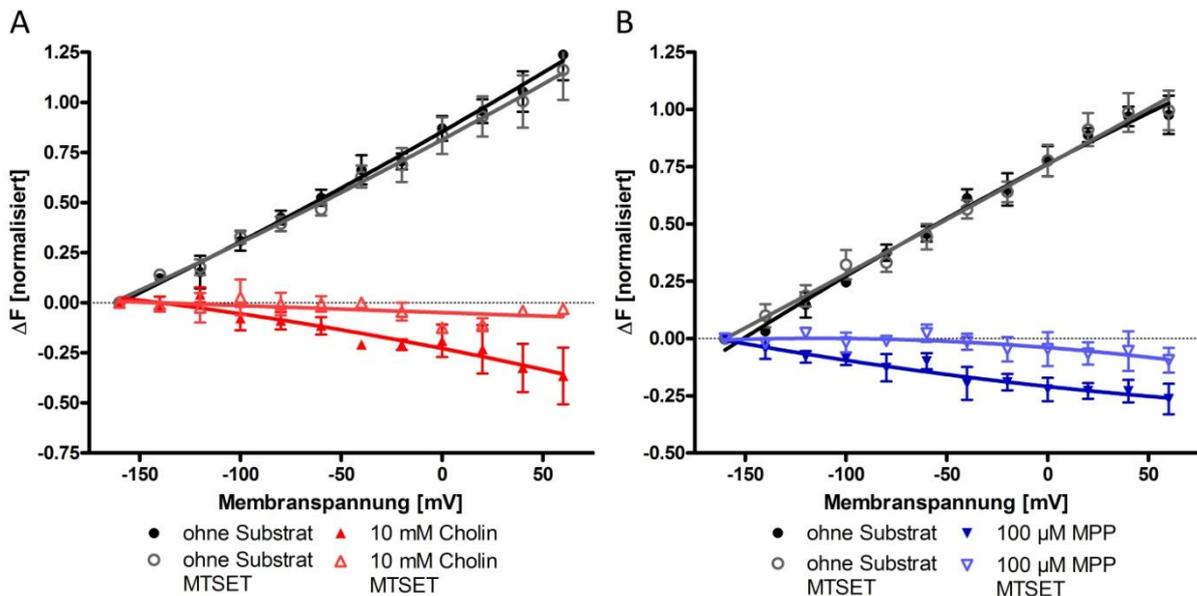


Abbildung 4.32 Spannungs- und kationenabhängige Fluoreszenzänderungen der Mutante rOCT1(10 Δ Cys-P260C) vor und nach kovalenter Bindung von MTSET. ΔF -U Kurven des leeren Transporters und in Abhängigkeit von (A) Cholin (B) MPP jeweils vor und nach der Modifikation durch MTSET.

Ein leicht reduzierter Strom nach der MTSET-Inkubation, kann dadurch erklärt werden, dass bei einer Strommessung alle rOCT1-Mutanten einer Oozyte erfasst werden, die in der Plasmamembran exprimiert sind. Da bei der Fluoreszenzmessung nur Moleküle erfasst werden, die mit TMR6M markiert sind, erfassen beide Methoden nicht zwingend die gleiche Anzahl an Transportern. Die Bindung einiger MTSET-Moleküle an Cysteine, die nicht mit TMR6M markiert sind, kann eine Inhibition der Stromantwort verursachen.

Auch für die Cysteinmutante rOCT1(10 Δ Cys-F380C) ergaben sich keine deutlichen Veränderungen der Fluoreszenzantwort nach Inkubation mit MTSET (Abbildung 4.33). Sowohl in Abwesenheit organischer Kationen als auch in Gegenwart von Cholin, MPP oder TBuA konnte eine ähnliche Fluoreszenzantwort nach MTSET-Inkubation aufgezeichnet werden. Der Kationen-induzierte Strom wurde nach MTSET-Inkubation kaum beeinflusst (Cholin $81 \pm 5,3$ %, $n = 4$; MPP $77 \pm 7,1$ %, $n = 5$). Bei der Messung mit TBuA wurde kein Kation-induzierter Strom aufgenommen, um eine Beeinflussung durch ein zweites Kation ausschließen zu können.

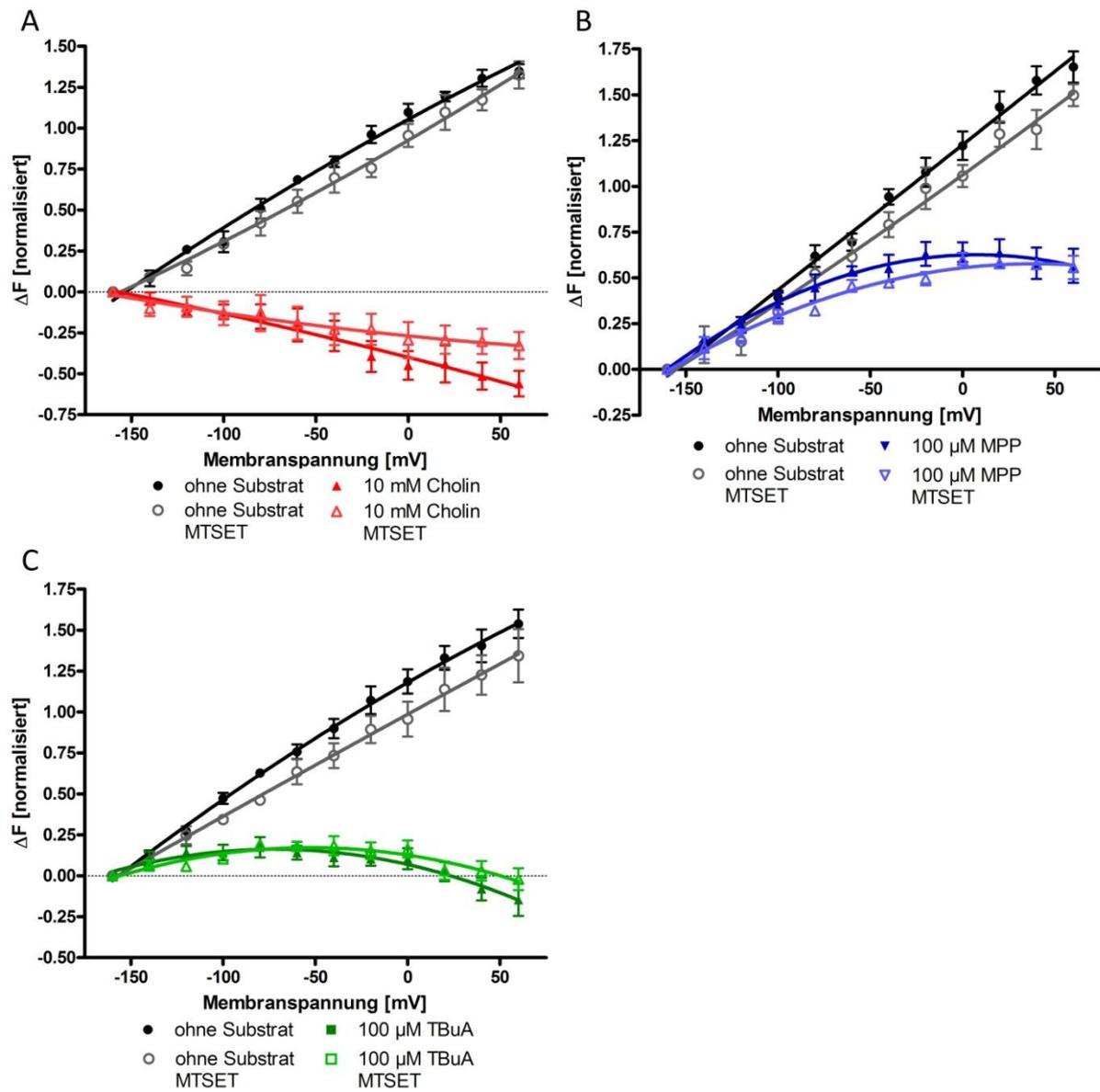


Abbildung 4.33 Spannungs- und kationenabhängige Fluoreszenzänderungen der Mutante rOCT1(10ΔCys-F380C) vor und nach kovalenter Bindung von MTSET. ΔF -U Kurven des leeren Transporters und in Abhängigkeit von (A) Cholin (B) MPP (C) TBuA jeweils vor und nach der Modifikation durch MTSET.

Die Mutante rOCT1(10ΔCys-F483C) zeigte ebenfalls kaum veränderte Fluoreszenz- und Stromantworten nach Inkubation mit MTSET; sowohl für Cholin als auch für MPP ergab sich keine Beeinflussung durch MTSET (Abbildung 4.34). Für den Cholin-induzierten Strom wurde ein Reststrom von $83,2 \pm 5,1 \%$ ($n = 6$), für den MPP-induzierten Strom ein Reststrom von $75,2 \pm 6,8 \%$ ($n = 6$) aufgezeichnet.

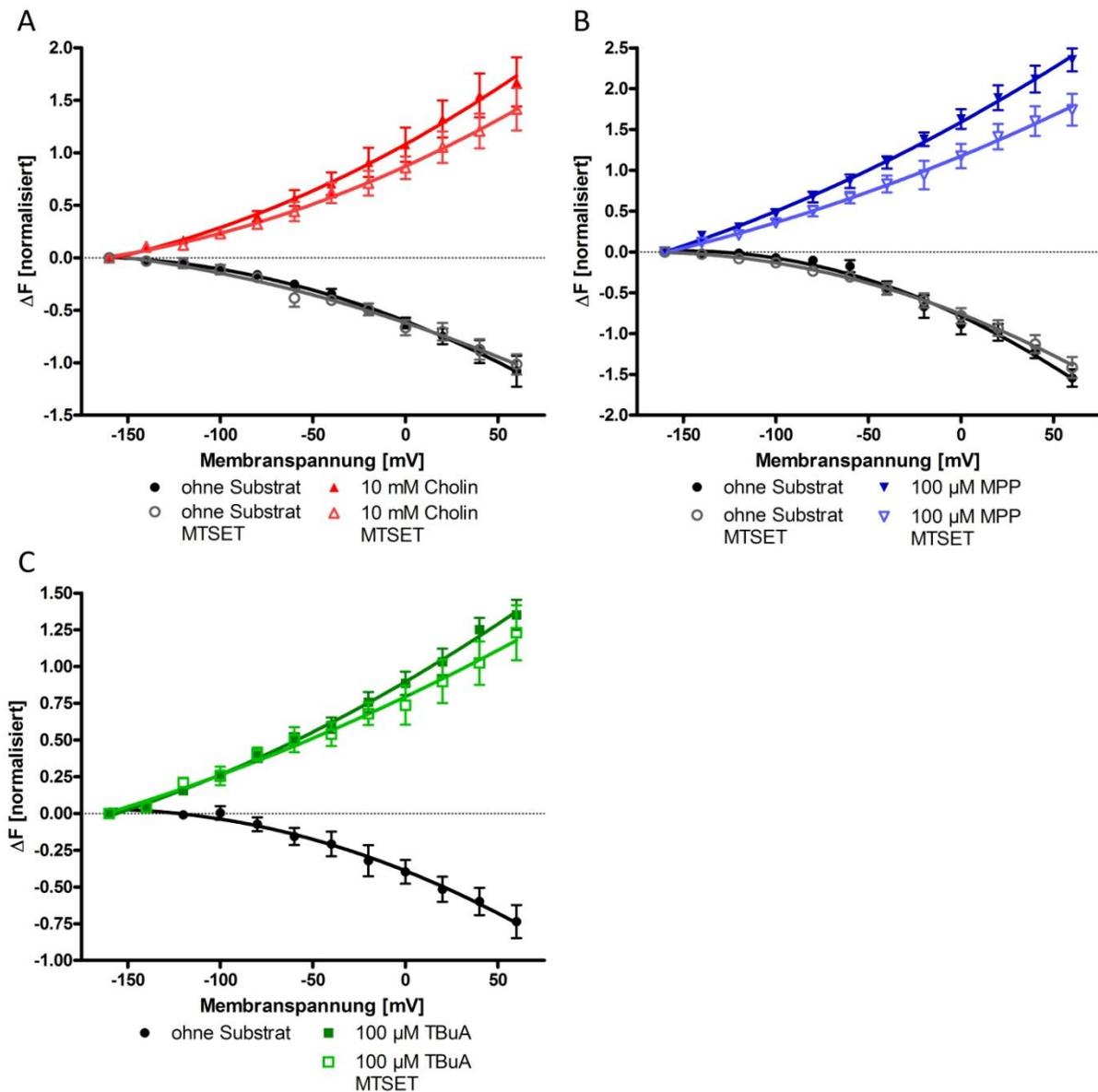


Abbildung 4.34 Spannungs- und kationenabhängige Fluoreszenzänderungen der Mutante rOCT1(10 Δ Cys-F483C) vor und nach kovalenter Bindung von MTSET. ΔF -U Kurven des leeren Transporters und in Abhängigkeit von (A) Cholin (B) MPP (C) TBuA jeweils vor und nach der Modifikation durch MTSET.

Unter Verwendung von TBuA konnte die Ausgangsfluoreszenz rOCT1(10 Δ Cys-F483C)-Mutante auch nach 30 min nicht wieder hergestellt werden; die maximale Amplitude der Fluoreszenzänderung erreichte lediglich $52,3 \pm 32,7\%$ ($n = 6$). Trotz des inkompletten Waschens wurde die Oozyte mit MTSET umspült und danach die Fluoreszenzantwort für TBuA aufgezeichnet. Die gemessene Fluoreszenz für TBuA unterschied sich nicht von der Fluoreszenzantwort vor der MTSET-Inkubation (Abbildung 4.34 C).

Zusammenfassend lässt sich zeigen, dass die spannungs- und kationenabhängigen Fluoreszenzänderungen der Cysteineinzelmutanten wie zu erwarten kaum durch MTSET beeinflusst wurden.

5. DISKUSSION

Die strukturellen Grundlagen für die polyspezifische Substraterkennung und den Transportprozess organischer Kationentransporter konnten bisher nicht völlig aufgeklärt werden. Aus diesem Grund versuchten wir den Transportmechanismus von rOCT1 auf molekularer Ebene näher zu beleuchten. Dies ist neben der Erweiterung theoretischer Kenntnisse auch für die gezielte Entwicklung von Arzneistoffen von besonderer Bedeutung. Anhand des Strukturmodells von rOCT1 basierend auf der Laktose-Permease zeigte sich, dass ein großer Spalt, der von den acht Transmembranhelices 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 und 11 geformt wird, die putative Substratbindungstasche beinhaltet. Neben der Identifizierung von Aminosäuren, die für die Substrataffinität und/oder Selektivität wichtig sind, ist es außerdem von großem Interesse den Reorientierungsvorgang während des Transportzyklus zu verstehen. Durch eine zukünftige Kristallisierung von rOCT1 könnten eine oder mehrere Momentaufnahmen möglicher Konformationen des Transporters aufgelöst werden. Welche strukturellen Umlagerungen des Proteins während des Transportprozesses stattfinden, kann zum Teil durch die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme-Fluorometrie („Voltage-Clamp-Fluorometrie“) sichtbar gemacht werden, so dass sich die Daten beider Methoden ergänzen und vervollständigen können. Aufgrund der Modellvorhersage von rOCT1 ist es wahrscheinlich, dass die oben genannten Transmembranhelices während des Transportzyklus Konformationsänderungen durchlaufen. Mittels der modellgestützten Mutagenese und der Voltage-Clamp-Fluorometrie konnten im Bereich der TMH 11 bereits spannungsabhängige Bewegungen nachgewiesen werden (Gorbunov et al., 2008).

Der Schwerpunkt meiner Dissertation lag auf der Identifizierung von weiteren spannungs- und kationenabhängigen Konformationsänderungen von rOCT1. Die hier vorliegenden Daten zeigen einerseits, dass spannungsabhängige Konformationsänderungen in den TMHs 5, 8 und 11 durchlaufen werden, die durch Substrate und durch einen Inhibitor individuell beeinflusst werden. Dies verdeutlicht, dass der Transporter eine große Konformationsänderung während des Transportzyklus vollzieht. Andererseits konnte gezeigt werden, dass die Position 478 in der Nähe der Substratbindungstasche eine kritische Rolle für die spannungsabhängigen Konformationsänderungen in den untersuchten Positionen spielt. Nach Ausschalten der Transportfunktion durch Modifizierung der Position 478 wurden die spannungsabhängigen Konformationsänderungen in einer Position deutlich reduziert.

5.1. Identifizierung von spannungsabhängigen Konformationsänderungen

Die Voltage-Clamp-Fluorometrie ist eine Kombination aus der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme-Technik und einer Echtzeit-Fluoreszenzmessung. Diese Methode wurde ursprünglich für die Untersuchung von Konformationsänderungen bei Kaliumkanälen während des „Gating“-Mechanismus entwickelt (Mannuzzu et al., 1996; Cha und Bezanilla, 1997) und wurde in den letzten fünfzehn Jahren auf verschiedene Transportproteine übertragen (Loo et al., 1998; Li et al., 2000; Li und Lester, 2002; Geibel et al., 2003; Larsson et al., 2004). Da der verwendete Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrhodamin-6-maleimid (TMR6M) umgebungssensitiv ist (vergleiche Kapitel 2.1.3), repräsentieren spannungsabhängige Veränderungen der detektierten Fluoreszenzintensität eine lokale Bewegung des Moleküls (Cha und Bezanilla, 1997; Cha und Bezanilla, 1998; Horne und Fedida, 2009).

Die in der Dissertation von Dr. Dmitry Gorbunov mittels Voltage-Clamp-Fluorometrie detektierten spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen in den Positionen 483 und 486 der TMH 11 von rOCT1 könnten eine große strukturelle Umlagerung während des Transportzyklus widerspiegeln. Da diese Bewegungen in einer Transmembrandomäne aufgezeichnet wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass sie auf eine kleine lokale Veränderung innerhalb dieser Domäne zurückzuführen sind, die nicht zwingendermaßen ein Nachweis für die große strukturelle Umlagerung darstellt. Entsprechend dem „alternating access“-Mechanismus liegt der leere rOCT1 bevorzugt in einer nach außen gerichteten Konformation vor. Nach Bindung eines Substrats ändert sich das Gleichgewicht der Konformationen, so dass der Transporter sich nun bevorzugt in einer nach innen gerichteten Konformation befindet, bei der das Substrat nach innen abgegeben werden kann. Arbeitet rOCT1 nach diesem „alternating access“-Mechanismus, sind weitere Konformationsänderungen während des Umklappens des Proteins von einer nach außen gerichteten in eine nach innen gerichteten Konformation zu erwarten. Zusätzliche Aminosäuren in verschiedenen Transmembrandomänen, die ebenfalls spannungs- und/oder kationenabhängige Fluoreszenzänderungen aufweisen, würden diese Annahme erhärten. Nachdem zunächst keine Aminosäuren in den TMH 2 und TMH 4 identifiziert werden konnten, die spannungsabhängige Fluoreszenzänderungen zeigen (Dr. Gorbunov und Bonny Thekkumthala, nicht veröffentlichte Daten), wurden im äußeren Bereich der TMH 5 und

TMH 8 weitere Aminosäuren durch Cysteine ersetzt. Nach Überprüfung der Funktionalität der elf generierten Cysteinmutanten, wurden diese mit Hilfe der Voltage-Clamp-Fluorometrie genauer analysiert. Nach der Markierung der Cysteine mit TMR6M konnte neben der rOCT1(10ΔCys-F483C)-Mutante auch in zwei zusätzlichen Cysteinmutanten spannungsabhängige Fluoreszenzänderungen gezeigt werden. In den anderen neun Positionen konnten unter Verwendung von TMR6M keine Fluoreszenzänderungen detektiert werden. Die Ursachen dafür können unterschiedlich sein. Einerseits könnten die Cysteine für den Fluoreszenzfarbstoff nicht zugänglich sein oder der Transporter könnte durch die Bindung von TMR6M inaktiviert werden. Andererseits ist es denkbar, dass die Umgebung des Fluorophors während der Messung unverändert bleibt. Dies bedingt, dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass in Bereichen, in denen keine Veränderungen aufgezeichnet werden konnten, trotzdem konformationsabhängige Bewegungen vollführt werden.

Die Cysteinmutante rOCT1(10ΔCys-P260C) in der TMH 5 und die Cysteinmutante rOCT1(10ΔCys-F380C) in der TMH 8 zeigten spannungsabhängige Fluoreszenzänderungen, wobei die Fluoreszenz nach Depolarisierung deutlich zunahm. Ein invertiertes Verhalten des Fluoreszenzsignals konnte für die seit längerem bekannte Mutante rOCT1(10ΔCys-F483C) nachgewiesen werden. Da die Polarität des Fluoreszenzsignals von der Ausgangsposition des Fluorophors abhängig ist, widerspricht diese Invertierung einer gleichmäßigen strukturellen Umlagerung des Proteins nicht. Beispielsweise konnten für den Na⁺-abhängigen Glukosetransporter SGLT1 unterschiedliche Signale für verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe aufgezeichnet werden. Das spannungsabhängige Fluoreszenzsignal der Cysteinmutante SGLT1(D454C) erscheint invertiert, wenn anstatt des Fluoreszenzfarbstoffs TMR5M das Isomer TMR6M mit dem Cystein 454 konjugiert ist (Diez-Sampedro et al., 2004).

In Abbildung 5.1 ist die Lage der drei Aminosäuren im Strukturmodell in der nach außen gerichteten Konformation zu erkennen. Hierbei wird deutlich, dass sich die beiden Positionen 380 und 483 im äußeren Drittel der jeweiligen TMHs befinden und die Position 260 am äußersten Rand der TMH 5 lokalisiert ist. Des Weiteren zeigte sich, dass durch die Einführung eines zusätzlichen Cysteins in die Position 478 die spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen in Position 260 und 483 beeinflusst wurden, was darauf hinweist, dass bereits kleine Veränderungen innerhalb des Moleküls Auswirkungen auf die

Konformationsänderungen in mehreren Transmembrandomänen haben können (vergleiche Kapitel 5.4 und 5.5).

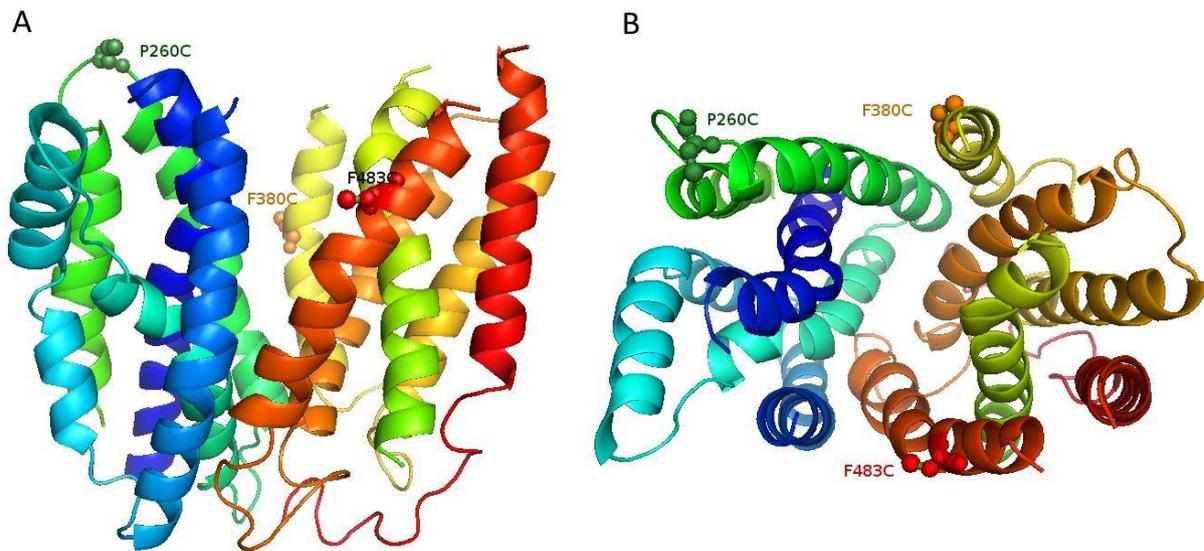


Abbildung 5.1 Strukturmodell der nach außen gerichteten Konformation von rOCT1. Die drei Positionen P260, F380 und F483, in denen spannungsabhängige Konformationsänderungen nachgewiesen werden konnten, sind hervorgehoben. (A) Tertiärstruktur von rOCT1 in der Seitenansicht (B) Tertiärstruktur von rOCT1 mit der Aufsicht von extrazellulär.

5.2. Spannungsabhängige Konformationsänderungen in Anwesenheit von organischen Kationen

Der Einfluss von unterschiedlichen organischen Kationen auf die spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen wurde in den drei Positionen 260, 380 und 483 genauer betrachtet. Als Beispiele für transportierte Substrate wurde Cholin und MPP verwendet, die sich in ihrer Struktur deutlich unterscheiden. In allen drei Positionen wurde das spannungsabhängige Fluoreszenzsignal im Vergleich zur Fluoreszenzantwort des leeren Transporters modifiziert, wobei sich in der Cysteinmutante rOCT1(10 Δ Cys-P260C) und rOCT1(10 Δ Cys-F483C) für beide Substrate dieselbe Tendenz der Veränderungen ergab. In beiden Fällen wurde das spannungsabhängige Fluoreszenzsignal im Vergleich zum leeren Transporter invertiert. In diesen Positionen scheinen dieselben Konformationsänderungen durch Cholin und MPP induziert zu werden. Auch die Mutante rOCT1(10 Δ Cys-F380C) zeigte im Vergleich zum leeren Transporter eine modulierte Fluoreszenzantwort in Anwesenheit von Cholin und MPP. Im Unterschied zu den beiden anderen Positionen 260 und 483 wurde jedoch nicht die gleiche Fluoreszenzantwort detektiert. Ähnlich dem Signal in der Position 260 wurde das

Fluoreszenzsignal in der Position 380 in Antwort auf Cholin invertiert und die Amplitude reduziert, wogegen MPP eine nur leicht reduzierte Antwort im Spannungsbereich von -40 mV bis +60 mV hervorrief. Dies zeigt, dass strukturell verschiedene Substrate unterschiedliche Konformationsänderungen in bestimmten Positionen von rOCT1 hervorrufen können.

Ob die Konformationsänderungen durch die Bindung eines Substrats und/oder durch dessen Translokation verursacht sind, lässt sich aus diesen Daten nicht ableiten. Es ist möglich, dass zum einen verschiedene Konformationsänderungen durch eine Bindung der Substrate in unterschiedlichen Regionen des Moleküls verursacht werden. Da die getesteten Substrate strukturell verschieden sind, liegt die Vermutung einer nicht komplett identischen Bindungsregion nahe, was z.B. durch den Nachweis überlappender Bindungsstellen für TEA und MPP bereits gezeigt wurde (Gorboulev et al., 1999; Popp et al., 2005). Zum anderen ist es möglich, dass die Bindung von Substraten an gleicher Stelle aufgrund unterschiedlicher Interaktion mit verschiedenen Aminosäuren Unterschiede im Gleichgewicht an Konformationen induziert, was in dieser speziellen Position sichtbar wurde. Die Beobachtung von unterschiedlichen Konformationsänderungen verschiedener Substrate könnte auch verschiedene Transportraten für verschiedene Substrate erklären.

Als Beispiel für ein nicht-transportiertes organisches Kation wurde der Einfluss von TBuA auf die spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen untersucht. Mit diesem organischen Kation wurde bei den Mutanten rOCT1(10ΔCys-P260C) und rOCT1(10ΔCys-F380C) in der TMH 5 und TMH 8 das spannungsabhängige Fluoreszenzsignal nahezu völlig inhibiert. Nach der Markierung der Position 483 in der TMH 11 wurde das Fluoreszenzsignal in Gegenwart des Hemmstoffs TBuA auf dieselbe Weise wie für transportierte Kationen modifiziert, es ergab sich im Vergleich zum leeren Transporter ein starkes invertiertes Signal.

Im Fall des Hemmstoffs TBuA könnten die Fluoreszenzantworten die Bindung von TBuA in der nach außen gerichteten Konformation und/oder den inkompletten Translokationsschritt reflektieren. Die Positionen 260 und 380 auf der einen Seite des Transporters unterstützen die Annahme, dass ein Hemmstoff die für die Translokation nötigen Konformationsänderungen inhibiert. Da in Position 483 auf der gegenüber liegenden Seite des Transporters jedoch keine Unterschiede zu den durch Substrate hervorgerufenen Fluoreszenzantworten zu beobachten sind, weist dies darauf hin, dass der Transporter unabhängig, ob Substanzen transportiert oder nicht transportiert werden, ähnliche

Konformationsänderungen einnimmt. Bei Betrachtung der gesamten Daten liegt die Annahme nahe, dass der Transporter in Gegenwart von TBuA zumindest teilweise in der Lage ist, die für die Translokation nötigen spannungsabhängigen Konformationsänderungen zu durchlaufen aber im Gegensatz zu Substraten dies nicht in allen Bereichen des Moleküls sichtbar ist.

Die mittels der Voltage-Clamp-Fluorometrie gewonnenen Daten demonstrieren, dass in Gegenwart von organischen Kationen die Spannungsabhängigkeit der Transporterkonformation beeinflusst wird. Dies gilt sowohl für transportierte als auch nicht-transportierte organische Kationen.

5.3. Blockierung des Transportwegs von rOCT1

Eine weitere zentrale Fragestellung dieser Arbeit war, ob transportgebundene Konformationsänderungen von nicht-transportgebundenen Konformationsänderungen zu unterscheiden sind. In Gegenwart des Inhibitors TBuA ist kein Transport nachweisbar; allerdings geben diese spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen keinen Hinweis, ob die Konformationsänderungen in Gegenwart von Cholin oder MPP an den Transport gekoppelt sind. Es kann außerdem nicht ausgeschlossen werden, dass ein sehr langsamer, nicht zu detektierender Transport von TBuA stattfinden kann, so dass zur Klärung dieser Frage ein anderes Verfahren verwendet werden muss.

Wird der Transportweg von rOCT1 während eines Experimentes ausgeschaltet, kann der Vergleich von Fluoreszenzänderungen vor und nach Blockierung des Transportwegs Aufschluss darüber geben, ob die jeweiligen detektierten spannungs- und kationenabhängigen Konformationsänderungen an die Transportfunktion gekoppelt sind. Zu diesem Zweck wurde eine zusätzliche Punktmutation G478C in die Sequenz der Cysteinsubstitutionsmutante rOCT1(10 Δ Cys) eingeführt. Die kovalente Modifizierung der Mutation mit Hilfe des SH-Reagens [2-(Trimethylammonium)ethyl] methanethiosulfonat (MTSET) bewirkt, dass die Transportfunktion ausgeschaltet werden kann. Im Unterschied zu einigen Voltage-Clamp-Fluorometrie-Untersuchungen an Kanälen und Transportern (z.B. Meinild et al., 2009; Passero et al., 2009), bei denen MTSET zum Einsatz kam, ist MTSET hier ein Substrat des untersuchten Transporters rOCT1 und der Cystein-Substitutionsmutante rOCT1(10 Δ Cys). Als Substrat kann MTSET im Gegensatz zu TMR6M auch Cysteine

modifizieren, die in tieferen Bereichen des Proteins liegen und nicht von außen zugänglich sind.

Die stärkste durch MTSET verursachte Hemmung aller getesteten Cysteinmutanten der TMH 11 zeigte die Mutante rOCT1(10 Δ Cys-G478C), so dass diese für die Blockierung des Transportwegs verwendet wurde. In Messungen der [¹⁴C]-TEA-Aufnahme sowie bei der Bestimmung des Cholin- oder TEA-induzierten Einwärtsstroms, trat eine etwa 80 %-ige Reduktion der Aufnahme bzw. Stroms nach der Modifizierung durch MTSET auf. Auch die Cholin- und TEA-induzierten Kapazitätsänderungen wurden durch den Einfluss von MTSET um mehr als 75 % blockiert. Die Befunde weisen darauf hin, dass durch die kovalente Modifizierung des Cysteins in Position 478 die Transportfunktion von rOCT1 irreversibel blockiert werden kann. Eine Blockierung des Transports organischer Kationen kann grundsätzlich auf verschiedene Weise stattfinden. Zum einen kann es sein, dass durch die Bindung eines Moleküls die für die Translokation nötigen Konformationsänderungen nicht mehr stattfinden können. Zum anderen kann es sein, dass ein sperriges Molekül die Bindungsstellen für Substrate abdeckt, so dass ebenfalls kein Transport stattfinden kann.

Um diese Frage zu klären, wurden Bindungsstudien bei 0°C durchgeführt. Dies war möglich, da die Position 478 auch von außen zugänglich ist, was durch die Messung der Substrataufnahme ([³H]-MPP) bei 0°C gezeigt werden konnte. Auch unter diesen Bedingungen konnte MTSET an das Cystein in der Position 478 binden. Die Untersuchungen der MPP-Bindung an rOCT1(10 Δ Cys) ergaben, dass die Dissoziationskonstante K_D nach der Inkubation mit MTSET unverändert war. Nach der Modifizierung von rOCT1(10 Δ Cys-G478C) konnte keine Bindung mehr nachgewiesen werden, so dass das MTSET-Molekül wahrscheinlich sterisch verhindert, dass MPP binden kann. Die durch MTSET verursachte Reduktion der Kapazitätsänderungen legt somit nahe, dass MTSET die Bindung von MPP sterisch blockiert, so dass die Umlagerung zu einer anderen Konformation verhindert wird (Schmitt et al., 2002; Schmitt und Koepsell, 2005).

Um die Lage und den Einfluss der Position 478 besser zu beurteilen, wurden im Folgenden „Dockingmodelle“ erstellt. Als Grundlage dieser Modelle diente das Strukturmodell für rOCT1. Da fast alle Experimente vor dem Hintergrund von rOCT1(10 Δ Cys) durchgeführt wurden, wurde das Strukturmodell modifiziert und zusätzlich die mögliche Bindung von MPP

bzw. TBuA für rOCT1(10 Δ Cys) und rOCT1(10 Δ Cys-G478C) eingearbeitet. Die in grün bzw. gelb dargestellten Konformerwolken zeigen alle möglichen Bindungspositionen der Liganden. Je näher die markierte Aminosäure in Position 478 an einem MPP- oder TBuA-Molekül liegt, desto wahrscheinlicher ist eine direkte Interaktion. In Abbildung 5.2 ist das „Dockingmodell“ für MPP dargestellt. Die Mutation in Position 478 zeigte, wie in Kapitel 4.2.4 und 4.2.8 beschrieben, keine Veränderung der MPP-Affinität, so dass MPP wahrscheinlich nicht mit der Position 478 interagiert.

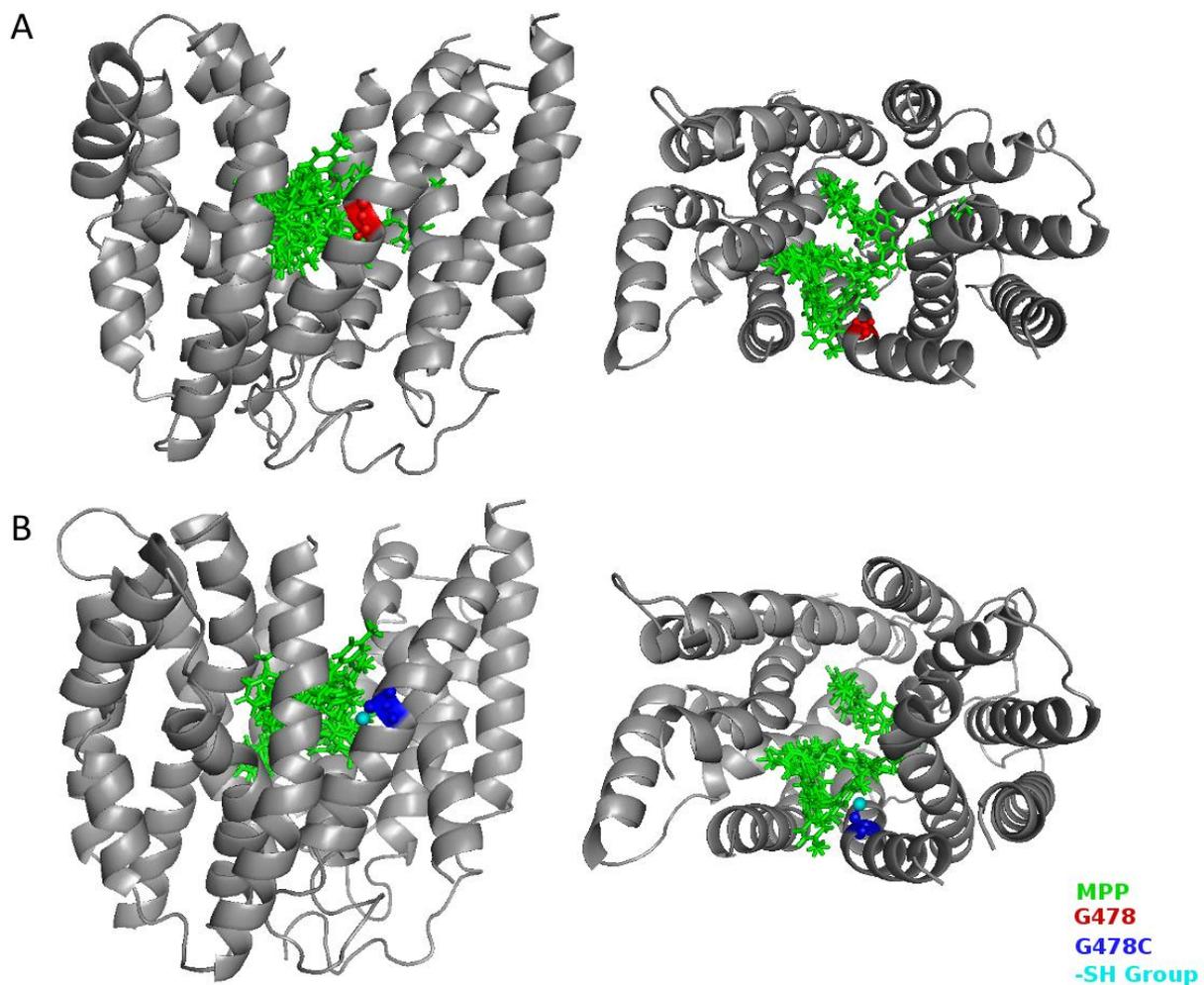


Abbildung 5.2 Strukturmodell der nach außen gerichteten Konformation von rOCT1. Die modellierte Bindung von MPP ist in grün für (A) rOCT1(10 Δ Cys) und (B) rOCT1(10 Δ Cys-G478C) dargestellt. Die Modelle sind jeweils in der Seitenansicht (links) und in der Aufsicht von extrazellulär (rechts) abgebildet.

Bei der Betrachtung des Dockingmodells für rOCT1(10 Δ Cys) und rOCT1(10 Δ Cys-G478C) zeigte sich ein sehr ähnliches Bild für die möglichen Bindungspositionen für MPP. Das Glycin 478 in rOCT1(10 Δ Cys) scheint sich nahe an einigen MPP-Molekülen zu befinden. Die

SH-Gruppe des Cysteins 478 in rOCT1(10 Δ Cys-G478C) zeigt weiter in die Bindungstasche hinein, so dass auch hier eine Interaktion mit MPP denkbar wäre. Um zu erkennen, welchen Einfluss die Mutation in Position 478 auf die Bindung von TBuA hat, wurden ebenso TBuA-Dockingmodelle für rOCT1(10 Δ Cys) und rOCT1(10 Δ Cys-G478C) erstellt. Die Mutante rOCT1(10 Δ Cys-G478C) zeigte eine Verschiebung der TBuA-Affinität im Vergleich zu rOCT1(10 Δ Cys). In *X. laevis* Oozyten sowie HEK293-Zellen ergab sich eine Affinitätserhöhung um den Faktor 2,6 beziehungsweise 3,4. Nach den Modelldarstellungen in Abbildung 5.3 zeigte sich, dass die SH-Gruppe des Cysteins 478 weiter in die Bindungstasche ragt und näher als das Glycin an einige TBuA-Moleküle heranreicht. Kleine Unterschiede haben hier anscheinend einen großen Einfluss auf die Affinität des Inhibitors TBuA.

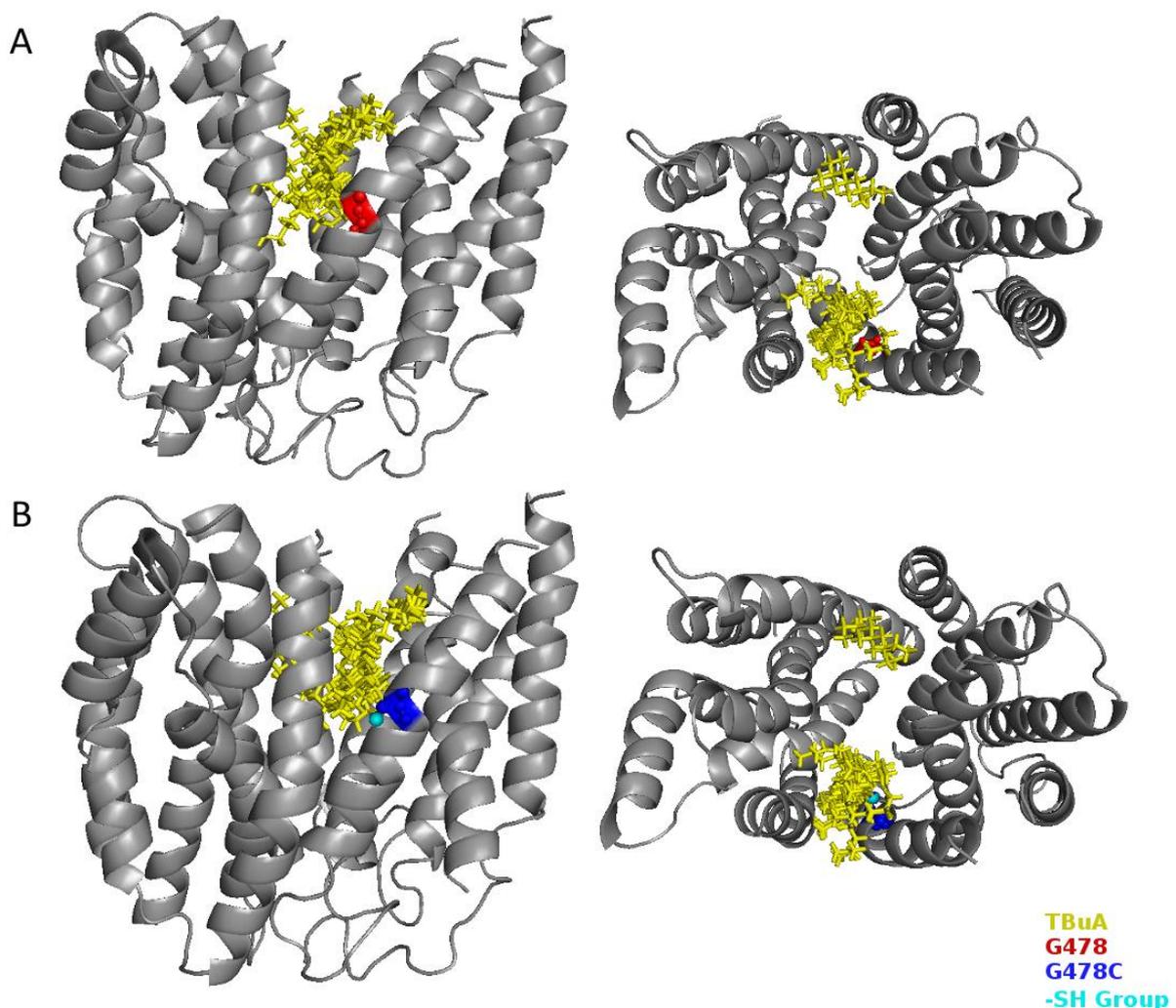


Abbildung 5.3 Strukturmodell der nach außen gerichteten Konformation von rOCT1. Die modellierte Bindung von TBuA ist in gelb für (A) rOCT1(10 Δ Cys) und (B) rOCT1(10 Δ Cys-G478C) dargestellt. Die Modelle sind jeweils in der Seitenansicht (links) und in der Aufsicht von extrazellulär (rechts) abgebildet.

In Abbildung 5.4 ist das Cystein 478 kovalent an ein MTSET-Molekül gebunden. Die experimentellen Befunde zeigen, dass nach der kovalenten Modifizierung der Transport für verschiedene Substrate irreversibel gehemmt wird und weisen darauf hin, dass MPP nicht mehr an rOCT1 binden kann. Durch das Modell werden diese Befunde unterstützt. Im Strukturmodell ist deutlich zu erkennen, dass MTSET weit ins Innere der Substratbindungstasche ragt und die Bindung von MPP wahrscheinlich sterisch blockieren kann. Ob dies auch für die Substrate Cholin und TEA sowie den Inhibitor TBuA gilt, kann aus den Daten nicht abgeleitet werden.

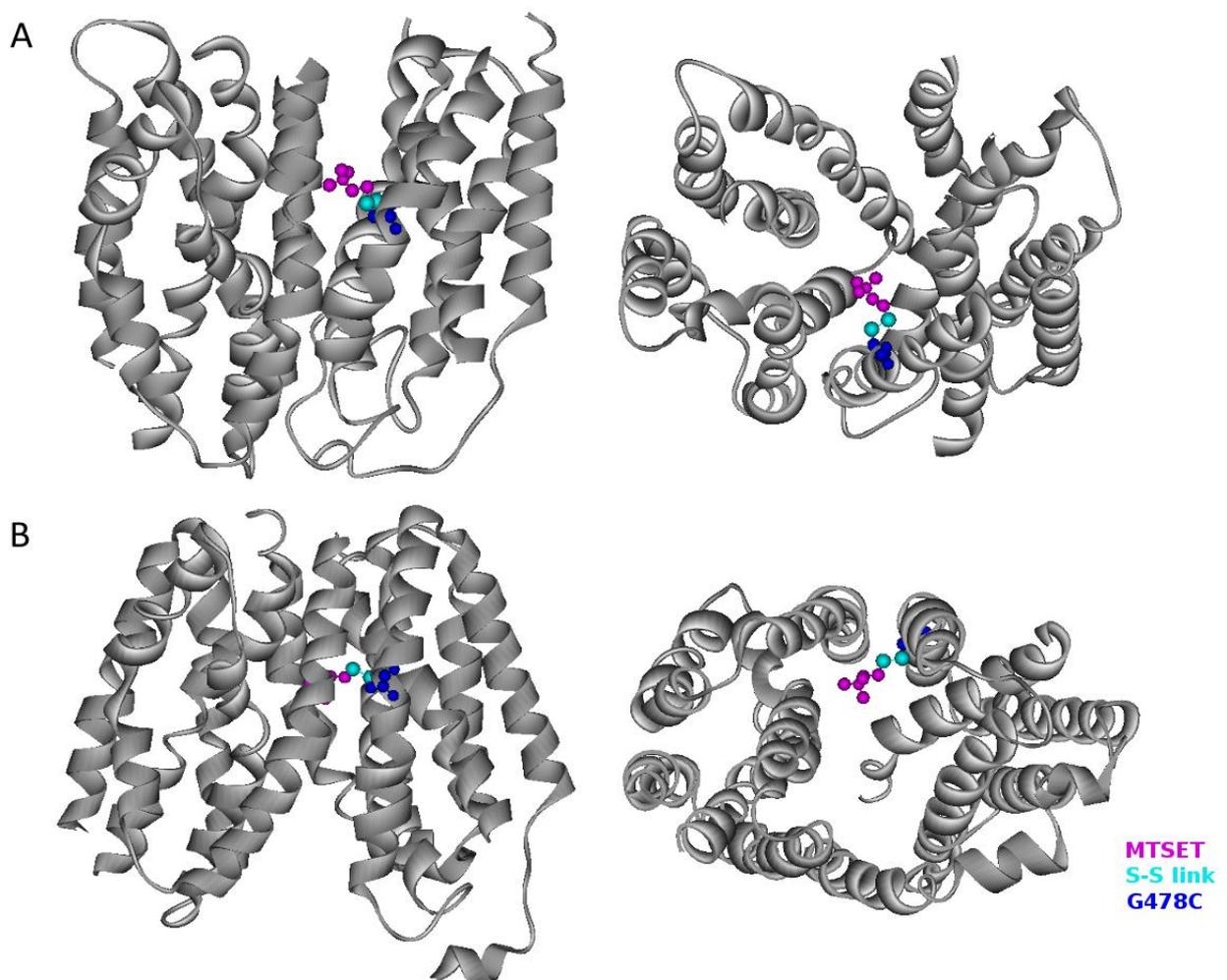


Abbildung 5.4 Strukturmodell von rOCT1. (A) Modell von rOCT1(10 Δ Cys-G478C) in der nach außen gerichteten Konformation. (B) Modell von rOCT1(10 Δ Cys-G478C) in der nach innen gerichteten Konformation. In beiden Konformationen wurde die Bindung von MTSET an das Cystein in Position 478 hervorgehoben. Die Modelle sind jeweils in der Seitenansicht (links) und in der Aufsicht von extrazellulär (rechts) abgebildet.

Die weitere Charakterisierung der Mutante rOCT1(10 Δ Cys-G478C) ergab außerdem, dass MTSET als Substratanalog von TMA mit Substraten von rOCT1 interagiert. Bei gleichzeitiger Inkubation von MTSET und TMA oder Cholin für 45 s ergab sich eine signifikante Reduzierung der Hemmung des substratinduzierten Stroms. Wurde die Inkubationszeit für MTSET und TMA verlängert, ging der Schutzeffekt von TMA signifikant zurück, da die Wahrscheinlichkeit einer kovalenten Reaktion des Cysteins mit MTSET erhöht wurde. Basierend auf diesen Daten kann keine Unterscheidung getroffen werden, ob die Reduzierung der Zugänglichkeit auf einen allosterischen Effekt oder auf eine direkte Konkurrenz beider Moleküle zurückzuführen ist.

Des Weiteren zeigte sich, dass die Modifikation des Cysteins 478 durch MTSET von der angelegten Spannung abhängig war. Durch das Verändern der vorherrschenden Spannung könnte zum einen das Gleichgewicht der Transporterkonformationen beeinflusst worden sein, so dass die Zugänglichkeit der Position 478 in der hyperpolarisierten Oozyte vergrößert wurde. Zum anderen ist es möglich, dass durch das Anlegen einer negativen Spannung die Substratkonzentration des positiv geladenen Cholins am Transporter erhöht wird.

Da nach der Modifizierung von rOCT1(10 Δ Cys-G478C) durch MTSET nur etwa 80 % der Transportaktivität blockiert wurde, stellt sich die Frage, wodurch die detektierte Restaktivität zustande kommt. Eine Bestimmung der Affinitäten von rOCT1(10 Δ Cys-G478C) nach der Modifizierung durch MTSET ergab, dass die K_m -Werte und IC_{50} -Werte im Vergleich zum nicht-modifizierten Transporter unverändert blieben. Eine unveränderte Affinität bedeutet wahrscheinlich, dass die Transportaktivität des modifizierten Transporters vollständig blockiert wurde und nach der Modifizierung durch MTSET nicht-modifizierte Transportermoleküle charakterisiert wurden. Auch wenn es nicht völlig auszuschließen ist, dass die MTSET-Modifizierung zu keiner funktionellen Veränderung führt, scheint dies unwahrscheinlich zu sein, da das durch MTSET-modifizierte Cystein sehr sperrig ist.

Insgesamt lässt sich sagen, dass durch die spezifische Modifizierung des Cysteins in Position 478 eine Möglichkeit geschaffen wurde, während eines Experimentes rOCT1 schnell und irreversibel zu inaktivieren, indem eine Bindung von Substraten verhindert wird.

5.4. Beeinflussung der spannungsabhängigen Konformationsänderungen nach Mutation des Glycins in Position 478

Wie bereits erwähnt bewirkte der Austausch des Glycin 478 in der TMH 11 durch ein Cystein eine Veränderung der mit Hilfe der Voltage-Clamp-Fluorometrie bestimmten spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen des leeren Transporters in zwei der drei untersuchten Positionen, was verdeutlicht, dass sich das Glycin 478 in einer kritischen Position befindet. Die relative Lage des Cysteins in Position 478 zu den Positionen 260, 380 und 483 wurde in Abbildung 5.5 hervorgehoben. Die Doppelmutante rOCT1(10 Δ Cys-P260C-G478C) zeigte eine reduzierte Amplitude der Fluoreszenzantwort im Vergleich zur dazugehörigen Einzelmutante rOCT1(10 Δ Cys-P260C). Auch für die Doppelmutante rOCT1(10 Δ Cys-F483C-G478C) ergab sich ein deutlich verändertes Fluoreszenzsignal, das im Vergleich zu der dazugehörigen Einzelmutante rOCT1(10 Δ Cys-F483C) verringert und invertiert erschien. Im Fall der Doppelmutante rOCT1(10 Δ Cys-F380C-G478C) wurde keine Veränderung der Fluoreszenz für den leeren Transporter aufgezeichnet. Unterschiede in der Fluoreszenzantwort sind auf eine veränderte Lage des Fluorophors zurückzuführen (Manuzzu und Isacoff, 2000; Ghandi und Isacoff, 2005; Horne et al., 2009).

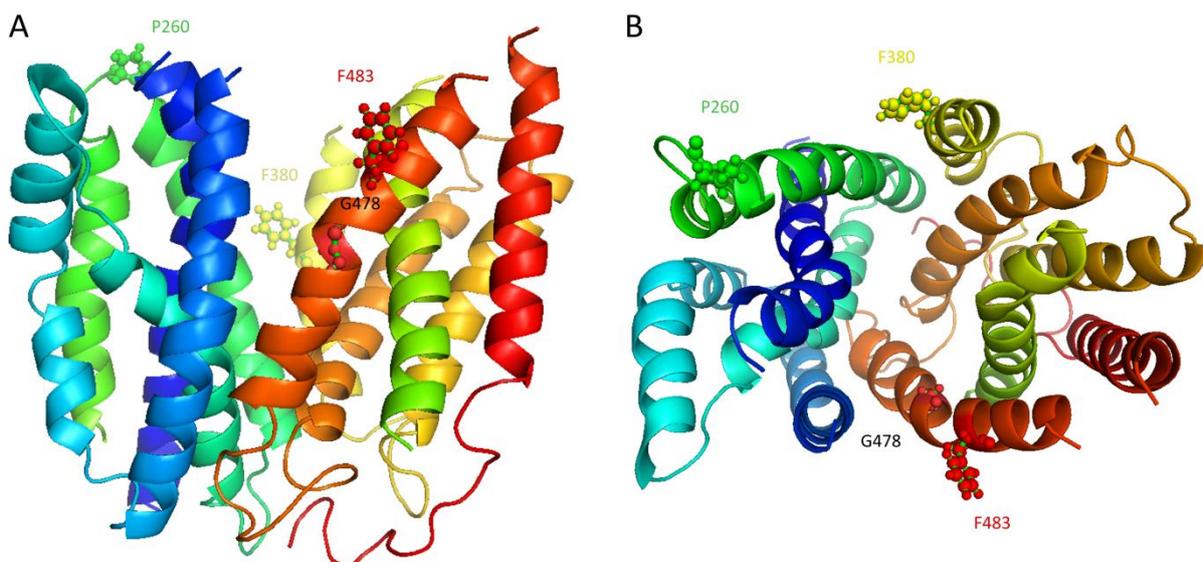


Abbildung 5.5 Strukturmodell der nach außen gerichteten Konformation von rOCT1. Strukturmodell von rOCT1, in dem die drei Positionen für die Voltage-Clamp-Fluorometrie sowie die Position 478 hervorgehoben sind. (A) Tertiärstruktur von rOCT1 in der Seitenansicht (B) Tertiärstruktur von rOCT1 mit der Aufsicht von extrazellulär.

Die Invertierung und Reduzierung der Fluoreszenz in Position 483 könnte durch eine lokale Veränderung innerhalb der TMH 11 aufgrund einer Ladungsverschiebung durch den Austausch des unpolaren Glycins durch das polare Cystein zu erklären sein. Eine Reduzierung der Fluoreszenzamplitude der Doppelmutante rOCT1(10 Δ Cys-P260C-G478C) der TMH 5 kann jedoch nicht so einfach erklärt werden. Eine Veränderung der Umgebung des Fluorophors müsste über eine weite Distanz erfolgen, wobei mehrere Transmembrandomänen miteinander interagieren müssten. Da die Position 260 im Gegensatz zur Position 380 und 483 sehr weit außen liegt, kann bereits eine kleine Veränderung bewirken, dass der Fluorophor für viele Konformationsänderungen insensitiv wird.

Um experimentell ausschließen zu können, dass die Beeinflussung der spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen auf eine Bindung des TMR6M an das Cystein 478 zurückzuführen ist, wurden weitere Doppelmutanten analysiert. Auch wenn aufgrund der Molekülgröße eine Bindung des Farbstoffs an das Cystein in Position 478 unwahrscheinlich ist, kann dies nicht völlig ausgeschlossen werden. Da die größte Veränderung der Fluoreszenz für die Mutante rOCT1(10 Δ Cys-F483C-G478C) aufgenommen wurde, wurde die Mutation F483C mit der Mutation G478S oder G478T kombiniert. Die OH-Gruppe des Serins oder des Threonins sollte hierbei den Effekt der SH-Gruppe nachahmen können, wenn die Beeinflussung der spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen ausschließlich auf diese Mutation zurückzuführen ist. Wie erwartet zeigten beide Doppelmutanten eine ähnliche spannungsabhängige Fluoreszenzänderung für den leeren Transporter wie die Mutante rOCT1(10 Δ Cys-F483C-G478C), so dass man davon ausgehen muss, dass eine Verschiebung der Fluoreszenzantwort in den Cysteindoppelmutanten rOCT1(10 Δ Cys-P260C-G478C) sowie rOCT1(10 Δ Cys-F483C-G478C) ausschließlich durch das Einführen des Cysteins in Position 478 verursacht wurde.

Diese Fluoreszenzdaten wurden durch die Bestimmung der Zeitkonstanten für die Mutanten rOCT1(10 Δ Cys-F483C), rOCT1(10 Δ Cys-F483C-G478C) sowie rOCT1(10 Δ Cys-F483C-G478S) unterstützt. Bisher aufgeführte Fluoreszenzen spiegeln den Gleichgewichtszustand der jeweiligen Mutante unter bestimmten Bedingungen wieder. Durch die Analyse der Zeitkonstanten konnte zusätzlich eine Aussage über den zeitabhängigen Verlauf der Bewegungen gemacht werden. Für die rOCT1(10 Δ Cys-F483C) wurden im Gegensatz zu der Cysteindoppelmutante rOCT1(10 Δ Cys-F483C-G478C) ohne Substrat zwei Komponenten des

Zeitverlaufs nachgewiesen. In Gegenwart des Substrats Cholin (vergleiche Kapitel 5.5) ergab sich in beiden Mutanten jeweils eine Zeitkonstante, deren Werte in beiden Mutanten vergleichbar waren. Da durch die Einführung eines weiteren Cysteins eine Komponente des Zeitverlaufs nicht mehr nachzuweisen war, könnte es sein, dass die Mutation der Position 478 eine kleine Konformationsänderung bedingt, die bewirkt, dass bereits zu Beginn des Transportvorgangs eine andere Ausgangssituation vorliegt. Durch die Mutation in Position 478 könnte so die Bindung eines Substrates imitiert werden. Die Zeitkonstanten der Mutante rOCT1(10 Δ Cys-F483C-G478S) stimmen mit den Werten der Cysteindoppelmutante überein, so dass auch hier das Serin und das Cystein einen ähnlichen Effekt auslösten.

5.5. Beeinflussung der spannungsabhängigen Konformationsänderungen nach Mutation des Glycins 478 in Anwesenheit von organischen Kationen

Die Beeinflussung der spannungsabhängigen Bewegungen durch den Austausch des Glycin 478 durch ein Cystein wurde in den Positionen 260, 380 und 483 auch in Gegenwart von organischen Kationen mittels der Voltage-Clamp-Fluorometrie untersucht. In der Position 260 wurde die Fluoreszenzantwort des leeren Transporters nach der Mutation G478C deutlich reduziert. Diese spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen der Mutante rOCT1(10 Δ Cys-P260C-G478C) blieben durch die Substrate Cholin und MPP nahezu unbeeinflusst. Unter den getesteten Bedingungen waren für diese Mutante somit eine sehr kleine Amplitude und ein Fehlen der Substratspezifität zu vermerken, was die Annahme unterstützt, dass die Position aufgrund der extremen Lage insensitiv gegenüber kleinen Strukturveränderungen ist.

In der Position 380 wurden die spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen des leeren Transporters durch die Mutation G478C nicht verändert. Interessanterweise konnten jedoch in der Doppelmutante rOCT1(10 Δ Cys-F380C-G478C) keine Unterschiede zwischen Cholin und MPP wahrgenommen werden. Im Gegensatz hierzu wurden in der Einzelmutante rOCT1(10 Δ Cys-F380C) je nach Substrat unterschiedliche Fluoreszenzsignale aufgezeichnet. Der Befund demonstriert, dass die Lage des Fluorophors auch in dieser Doppelmutante durch die Mutation in Position 478 beeinflusst wurde. Im Fall der Mutante rOCT1(10 Δ Cys-F483C-G478C) konnte für die Substrate Cholin und MPP eine ähnliche Fluoreszenzantwort im Vergleich zur Einzelmutante rOCT1(10 Δ Cys-F483C) aufgezeichnet

werden, so dass die Mutation G478C unter diesen Bedingungen keinen Einfluss auf die spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen hatte.

Der nicht-transportierte Hemmstoff TBuA wurde nur in zwei Positionen, 380 und 483, getestet. Da in der Position 260 eine sehr kleine substratinsensitive Fluoreszenzantwort mit Cholin und MPP detektiert werden konnte, wurde auf eine Messung in Gegenwart von TBuA verzichtet. Im Fall der rOCT1(10 Δ Cys-F380C-G478C)-Mutante wurde eine sehr ähnliche Fluoreszenzantwort im Vergleich zur Einzelmutante rOCT1(10 Δ Cys-F380C) aufgenommen. In der Position 483 wies die Einzelmutante rOCT1(10 Δ Cys-F483C) ein spannungsabhängiges Fluoreszenzsignal hoher Amplitude für TBuA auf, während die Doppelmutante rOCT1(10 Δ Cys-F483C-G478C) eine stark reduzierte Amplitude zeigte, die von dem Fluoreszenzsignal des leeren Transporters nicht zu unterscheiden war. In dieser Position konnte somit durch die Einführung des Cysteins in Position 478 ein Unterschied zwischen Substraten und dem Inhibitor TBuA sichtbar gemacht werden, der in der Einzelmutante rOCT1(10 Δ Cys-F483C) nicht nachweisbar war.

Die Voltage-Clamp-Fluorometrie-Daten der Cysteindoppelmutanten veranschaulichen insgesamt, dass durch die Einführung des Cysteins in der Position 478 die spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen beeinflusst wurden. Dies ist für die Position 260 und 483 bereits für den leeren Transporter erkennbar, während eine Verschiebung der Fluoreszenzen für die Position 380 erst in Gegenwart von Cholin sichtbar wurde.

5.6. Beeinflussung der spannungsabhängigen Konformationsänderungen nach Blockierung des Transportwegs von rOCT1

Durch das spezifische Ausschalten der Transportfunktion von rOCT1 kann festgestellt werden, ob die detektierten Konformationsänderungen an den Transport gekoppelt sind. Der Vergleich der spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen vor und nach der Modifizierung durch MTSET sollte genutzt werden, um Rückschlüsse auf die Bindungs- bzw. die Transportrelevanz der Bewegungen ziehen zu können. Zunächst werden die Voltage-Clamp-Fluorometrie-Daten ohne die einschränkenden Bindungsmessungen interpretiert. Für die Experimente waren zwei Markierungsschritte nötig. Zuerst wurden die Mutanten mit TMR6M markiert und dann im Anschluss mit MTSET modifiziert. Eine Inkubation mit dem Fluoreszenzfarbstoff bewirkte, dass Cysteine im äußeren Bereich des Proteins inkomplett

markiert wurden; das Cystein im tieferen Bereich war für TMR6M nicht zugänglich. Als Substrat kann MTSET an alle freien Cysteine binden, die sowohl außen als auch in der Bindungstasche liegen können. In den Kontrollmessungen der Cysteineinzelmutanten blieben die Fluoreszenzen wie erwartet weitgehend durch MTSET unbeeinflusst. In den Cysteindoppelmutanten wurde nach der Modifizierung durch MTSET der Cholin- und MPP-induzierte Einwärtsstrom in allen betrachteten Fällen um 80-90 % reduziert, was demonstriert, dass die Hemmung des Transportwegs durch MTSET auch in den Doppelmutanten effektiv war.

Die durch MTSET modifizierten Cysteine in Position 260, 380 oder 483 sind für die Fluoreszenzdaten irrelevant, da sie mit der Voltage-Clamp-Fluorometrie nicht wahrgenommen werden können. Sie können allerdings einen Einfluss auf den substratinduzierten Strom haben, der über die gesamte Oozyte abgeleitet wurde. Dies war in einigen Kontrollmessungen der Einzelmutanten der Fall, so dass z.B. in der Position 260 eine um ca. 35-40 % reduzierte Stromantwort nach der MTSET-Inkubation aufgezeichnet wurde. Auch in den Cysteindoppelmutanten könnte der substratinduzierte Strom durch eine Bindung von MTSET an die Positionen 260, 380 oder 483 beeinflusst worden sein. Da der Gesamtstrom der Oozyte abgeleitet wurde, ist es möglich, dass die Hemmung des substratinduzierten Stroms durch eine Kombination aus diesem Effekt und der Blockierung des Substratwegs an der Position 478 zustande kam.

Die Bestimmung des $K_{0,5}$ -Werts für Cholin und des K_m -Werts für MPP zeigte keinen Unterschied zu den Einzelmutanten. Lediglich bei der Messung des IC_{50} -Werts von TBuA ergab sich eine Erhöhung der Affinität, die für die Mutanten rOCT1(10 Δ Cys-P260C-G478C) und rOCT1(10 Δ Cys-F380C-G478C) mit dem Wert der Mutante rOCT1(10 Δ Cys-G478C) übereinstimmte. Die Affinität der rOCT1(10 Δ Cys-F483C-G478C)-Mutante wurde wahrscheinlich hauptsächlich durch die Mutation in der Position 483 bestimmt, da bereits die Cysteineinzelmutante rOCT1(10 Δ Cys-F483C) eine signifikante Erhöhung der Affinität um den gleichen Faktor im Vergleich zu rOCT1(10 Δ Cys) zeigte.

Nach der Blockierung des Transportwegs durch MTSET blieb die spannungsabhängige Fluoreszenzantwort der Mutante rOCT1(10 Δ Cys-P260C-G478C) für alle getesteten Bedingungen nahezu unbeeinflusst. In der Position 380 wurde nach der

MTSET-Modifizierung für den leeren Transporter eine deutliche Reduktion des Fluoreszenzsignals aufgezeichnet, wogegen Fluoreszenzsignale in Gegenwart der Substrate Cholin und MPP unverändert blieben. Eine Veränderung des Fluoreszenzsignals des leeren Transporters in der Position 380 durch MTSET bedingt, dass zumindest in dieser Mutante sich durch Bindung von MTSET eine leichte Verschiebung innerhalb des Moleküls ergab, da unter substratfreien Bedingungen eine Blockierung des Transportwegs die Fluoreszenz nicht beeinflussen dürfte, wenn man davon ausgeht, dass die MTSET-Bindung keinen Effekt auf die Transporterkonformation hat. Im Fall der Mutante rOCT1(10 Δ Cys-F483C-G478C) wurde das Fluoreszenzsignal in Gegenwart von Cholin und MPP deutlich reduziert; der leere Transporter blieb nahezu unbeeinflusst. Da in der Mutante rOCT1(10 Δ Cys-F483C-G478C) das Fluoreszenzsignal in Gegenwart von Substraten durch die MTSET-Modifizierung beeinflusst wurde, liegt es nahe anzunehmen, dass die hier detektierten Bewegungen transportabhängig sind.

Der nicht-transportierte Hemmstoff TBuA wurde nur in den Positionen 380 und 483 getestet. Nach der MTSET-Modifizierung für die Mutante rOCT1(10 Δ Cys-F483C-G478C) konnte keine Veränderung der Fluoreszenzantwort in Gegenwart von TBuA aufgezeichnet werden. Für die rOCT1(10 Δ Cys-F380C-G478C)-Doppelmutante konnte das TBuA-Signal allerdings kaum ausgewaschen werden, so dass auch nach 30 min keine komplette Wiederherstellung des Ausgangssignals wie auch bei der Kontrollmessung mit der Mutante rOCT1(10 Δ Cys-F483C) erreicht werden konnte. Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass TBuA nach Bindung nicht mehr komplett vom Transporter entfernt werden kann bzw. dass die Besetzung der hochaffinen Bindungsstelle in einigen Fällen irreversibel ist, was unter diesen beiden Bedingungen sichtbar wurde. Trotz des inkompletten Waschens änderte die Bindung von MTSET das Fluoreszenzsignal in Anwesenheit von TBuA; so dass im positiven Spannungsbereich eine höhere Fluoreszenz aufgezeichnet werden konnte.

Betrachtet man die Bindungsstudie von MPP, ergibt sich eine eingeschränkte Interpretation, der mittels der Voltage-Clamp-Fluorometrie für die Cysteindoppelmutanten erhaltenen Daten. MTSET verhindert die Bindung von MPP an rOCT1. Ob Cholin und TBuA ebenfalls nicht binden können, lässt sich mit diesen Bindungsmessungen nicht mit Sicherheit sagen. Geht man jedoch davon aus, dass keine Bindung stattfindet, ergibt sich, dass mit dieser

experimentellen Anordnung keine definitive Aussage gemacht werden kann, ob Bewegungen an den Transport gebunden sind, da bereits die Bindung der Substanzen durch das MTSET-Molekül unterdrückt wird. Veränderungen der Fluoreszenz nach der MTSET-Modifizierung in Gegenwart von organischen Kationen wären somit auf MTSET selbst bzw. auf die durch die MTSET-Bindung verursachten strukturellen Veränderungen zurückzuführen. Beispielsweise zeigte die Doppelmutante rOCT1(10 Δ Cys-F483C-G478C) nach der MTSET-Modifizierung eine stark reduzierte Fluoreszenzantwort in Anwesenheit von Cholin und MPP. Das Fluoreszenzsignal für beide Substrate konnte nicht von der Fluoreszenzantwort des leeren Transporters unterschieden werden. Nimmt man an, dass keine Substratbindung mehr stattfinden kann, wurde nach MTSET-Modifizierung nur die Fluoreszenzantwort des leeren Transporters (auch in Gegenwart von MPP und Cholin) aufgezeichnet. Da beide Substrate eine ähnliche Fluoreszenzantwort auslösten, ist es möglich, dass MTSET neben der MPP-Bindung auch die Cholinbindung verhindert. Im Fall der rOCT1(10 Δ Cys-F380C-G478C)-Mutante zeigte sich unter dem Einfluss von TBuA eine veränderte Fluoreszenzantwort nach Blockierung des Transportwegs. Auch hier konnte die Fluoreszenzantwort in Gegenwart von TBuA nicht von der Fluoreszenzantwort des leeren Transporters unterschieden werden. Ist auch für TBuA eine Bindung nach der MTSET-Modifizierung nicht mehr möglich, spiegelt diese Fluoreszenzantwort ebenfalls den leeren Transporter wieder.

Für die organischen Kationentransporter konnten mehrere Bindungsstellen nachgewiesen werden (Moaddel et al., 2005; Gorbunov et al., 2008; Minuesa et al., 2009). Hierbei ergab sich, dass die niederaffine Bindungsstelle für die Translokation von Substraten von essentieller Bedeutung ist. Es könnte auch sein, dass durch die Modifizierung durch MTSET nur die für den Transport relevante niederaffine Bindungsstelle nicht mehr zugänglich ist. Die Fluoreszenzantwort nach der MTSET-Bindung in Gegenwart von Substraten oder Inhibitoren könnte nicht nur den leeren Transporter sondern auch den Transporter mit besetzten hochaffinen Bindungsstellen reflektieren.

Zusammenfassend konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass rOCT1 Konformationsänderungen durchläuft, die wahrscheinlich die große strukturelle Umlagerung von einer nach außen gerichteten Konformation in eine nach innen gerichtete Konformation

während des Transportzyklus repräsentieren. Hierbei konnten spannungs- und kationenabhängige Fluoreszenzänderungen in drei verschiedenen Transmembranhelices aufgezeichnet werden, die sich je nach organischem Kation und Position unterschieden. Ebenso sind Unterschiede in den spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen zwischen den Substraten Cholin und MPP sowie dem Inhibitor TBUA erkennbar.

Zusätzlich wurde eine spezifische Möglichkeit gefunden den Transportweg von rOCT1 irreversibel zu blockieren, indem die Bindung von Substraten durch eine kovalente Modifikation des Cysteins in Position 478 sterisch verhindert werden konnte. Diese Position ist kritisch für die Affinität von TBUA und beeinflusst die spannungsabhängigen Konformationsänderungen in den Positionen 260 und 483 sowie die kationenabhängigen Konformationsänderungen in den Positionen 260, 380 und 483. Nach Bindung von MTSET an das Cystein in Position 478 wurden die spannungsabhängigen Konformationsänderungen in Position 380 verringert, was die Annahme, dass die Position 478 relevant für Konformationsänderungen ist, unterstützt.

6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Ampere
Å	Angström (10^{-10} m)
ABC	„ATP binding cassette“
Anova	„Analysis of variance“
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BES	N, N-Bis-[2-hydroxyethyl]-2-aminoetansulfonsäure
B _{max}	maximale Bindung
Bq	Becquerel
c	zenti (10^{-2})
°C	Grad Celsius
Ci	Curie
cDNA	komplementäre DNA
Cpm	„counts per minute“
cRNA	kodierende RNA
Da	Dalton
DEPC	Diethyldicarbonat
DMEM	„Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dpm	„disintegration per minute“
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alteres
F	Farad
ΔF	Fluoreszenzänderung
FDA	„Food and Drug Administration“
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
HEK	„human embryonic kidney“
hOCT	humaner organischer Kationentransporter
Hz	Hertz
I	elektrische Stromstärke
IC ₅₀	apparente Inhibitionskonstante
K	kilo (10^3)
K _i	Inhibitionskonstante
K _D	Dissoziationskonstante
K _m	Michaelis-Konstante
l	Liter

m	Meter
m	milli (10^{-3})
μ	mikro (10^{-6})
M	mega (10^6)
M	Molarität
min	Minute
mol	Mol
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MPP	1-Methyl-4-phenylpyridin
MSF	„major facilitator“ Superfamilie
MTSET	[2-(Trimethylammonium)ethyl]methanethiosulfonat
n	Anzahl
n	nano (10^{-9})
Ω	Ohm
OAT	organischer Anionentransporter
OCT	organischer Kationentransporter
OCTN	Carnitin-Kationentransporter
OD	Optische Dichte
ORI	Oozytenringer-Lösung
p	Wahrscheinlichkeit
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	„Phosphate Buffered Saline“
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
rOCT	organischer Kationentransporter aus der Ratte
ORI-Lösung	Oozytenringer-Lösung
p	pico (10^{-12})
®	Warenzeichen („restricted“)
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunde
S	Siemens
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLC	„solute carrier“ Familie
TBuA	Tetrabutylammonium
TEA	Tetraethylammonium
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
™	Warenzeichen („Trade Mark“)
TMA	Tetramethylammonium
TMH	Transmembranhelix
TMR6M	Tetramethylrhodamin-6-maleimid
TPeA	Tetrapentylammonium
TEVC	Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

TBuA	Tetrabutylammonium
UV	Ultraviolett
V	Volt
V_{\max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
v/v	„volume per volume“
w/v	„weight per volume“

7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 2.1 Membrantopologie des organischen Kationentransporters 1 aus der Ratte (rOCT1).....	9
Abbildung 2.2 Schematische Darstellung des wechselnden Zugangsmechanismus („alternating access“ Mechanismus).....	10
Abbildung 2.3 Modell der Tertiärstruktur von rOCT1.....	12
Abbildung 3.1 Schematische Darstellung der Voltage-Clamp-Fluorometrie Messanordnung nach Cha et al., 1998.....	32
Abbildung 4.1 Lokalisierung der eingeführten Cysteine in rOCT1(10ΔCys).....	36
Abbildung 4.2 Aktivitätsanalyse der Cysteinmutanten von rOCT1(10ΔCys) in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	37
Abbildung 4.3 Spannungsabhängige Fluoreszenzänderungen der Cysteinmutanten.....	39
Abbildung 4.4 Spannungsabhängige Fluoreszenzänderungen unter dem Einfluss verschiedener organischer Kationen.....	41
Abbildung 4.5 Konzentrationsabhängigkeiten der Cysteinmutanten.....	43
Abbildung 4.6 Hemmung der [³ H]-MPP-Aufnahme durch TBUA.....	44
Abbildung 4.7 Quantifizierung der [³ H]-MPP-Aufnahme in Abhängigkeit der TMR6M-Markierung.....	46
Abbildung 4.8 Konzentrationsabhängige Aufnahmen von [³ H]-MPP nach TMR6M-Markierung.....	47
Abbildung 4.9 [¹⁴ C]-MTSET-Aufnahme durch rOCT1 und rOCT1(10ΔCys).....	49
Abbildung 4.10 Quantifizierung der [¹⁴ C]-TEA-Aufnahme in Abhängigkeit von MTSET.....	50
Abbildung 4.11 Blockierung der Transports der Mutante rOCT1(10ΔCys-G478C) durch MTSET.....	51
Abbildung 4.12 Nachweis der rOCT1-Konstrukte in der Zytoplasmamembran und Aktivitätsanalyse von rOCT1(10ΔCys-G478C).....	53
Abbildung 4.13 Konzentrationsabhängigkeiten von rOCT1(10ΔCys-G478C).....	54
Abbildung 4.14 Hemmung der [³ H]-MPP-Aufnahme durch Cholin und TBUA.....	55

Abbildung 4.15 Quantifizierung der durch MTSET verursachten Hemmung des TMA- oder Cholin-induzierten Einwärtsstroms.....	56
Abbildung 4.16 Spannungsabhängige Quantifizierung der der MTSET verursachten Hemmung des Cholin-induzierten Einwärtsstroms.....	58
Abbildung 4.17 Quantifizierung der [³ H]-MPP-Aufnahme in Abhängigkeit von der MTSET-Modifikation bei verschiedenen Temperaturen.....	59
Abbildung 4.18 Konzentrationsabhängige Aufnahme von [³ H]-MPP mit und ohne MTSET-Modifizierung.....	61
Abbildung 4.19 Bindung von [³ H]-MPP mit und ohne MTSET-Modifizierung.....	63
Abbildung 4.20 Effekte des Austausches von Glycin durch Cystein in Position 478 auf die spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen in den Positionen P260, F380 und F483.....	65
Abbildung 4.21 Konzentrationsabhängigkeiten der Cysteindoppelmutanten.....	66
Abbildung 4.22 Hemmung der [³ H]-MPP-Aufnahme durch TBuA.....	67
Abbildung 4.23 Quantifizierung der [³ H]-MPP-Aufnahme in Abhängigkeit der TMR6M-Markierung.....	69
Abbildung 4.24 Effekte des Austausches von Glycin durch Cystein, Serin oder Threonin in Position 478 auf die spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen in der Position 483.....	70
Abbildung 4.25 Zeitverlauf der spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen für verschiedene Mutanten.....	72
Abbildung 4.26 Spannungsabhängige Fluoreszenzänderungen der Cysteindoppelmutanten vor und nach kovalenter Bindung von MTSET.....	74
Abbildung 4.27 Spannungs- und kationenabhängige Fluoreszenzänderungen der Mutante rOCT1(10ΔCys-P260C-G478C) vor und nach kovalenter Bindung von MTSET.....	75
Abbildung 4.28 Spannungs- und kationenabhängige Fluoreszenzänderungen der Mutante rOCT1(10ΔCys-F380C-G478C) vor und nach kovalenter Bindung von MTSET.....	76
Abbildung 4.29 Spannungs- und kationenabhängige Fluoreszenzänderungen der Mutante rOCT1(10ΔCys-F483C-G478C) vor und nach kovalenter Bindung von MTSET.....	78

Abbildung 4.30 Zeitverlauf der spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen in Gegenwart des Substrats Cholin für verschiedene Mutanten..... 80

Abbildung 4.31 Effekte des Austausches von Glycin durch Cystein oder Serin in Position 478 auf die spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen in der Position 483. 81

Abbildung 4.32 Spannungs- und kationenabhängige Fluoreszenzänderungen der Mutante rOCT1(10ΔCys-P260C) vor und nach kovalenter Bindung von MTSET..... 82

Abbildung 4.33 Spannungs- und kationenabhängige Fluoreszenzänderungen der Mutante rOCT1(10ΔCys-F380C) vor und nach kovalenter Bindung von MTSET..... 83

Abbildung 4.34 Spannungs- und kationenabhängige Fluoreszenzänderungen der Mutante rOCT1(10ΔCys-F483C) vor und nach kovalenter Bindung von MTSET..... 84

Abbildung 5.1 Strukturmodell der nach außen gerichteten Konformation von rOCT1..... 89

Abbildung 5.2 Strukturmodell der nach außen gerichteten Konformation von rOCT1..... 93

Abbildung 5.3 Strukturmodell der nach außen gerichteten Konformation von rOCT1..... 94

Abbildung 5.4 Strukturmodell von rOCT1..... 95

Abbildung 5.5 Strukturmodell der nach außen gerichteten Konformation von rOCT1..... 97

8. REFERENZEN

- Abramson, J., I. Smirnova, V. Kasho, G. Verner, S. Iwata, and H.R. Kaback. 2003a. The lactose permease of *Escherichia coli*: overall structure, the sugar-binding site and the alternating access model for transport. *FEBS letters*. 555:96-101.
- Abramson, J., I. Smirnova, V. Kasho, G. Verner, H.R. Kaback, and S. Iwata. 2003b. Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science*. 301:610-615.
- Ahlin, G., J. Karlsson, J.M. Pedersen, L. Gustavsson, R. Larsson, P. Matsson, U. Norinder, C.A. Bergstrom, and P. Artursson. 2008. Structural requirements for drug inhibition of the liver specific human organic cation transport protein 1. *Journal of medicinal chemistry*. 51:5932-5942.
- Arndt, P., C. Volk, V. Gorboulev, T. Budiman, C. Popp, I. Ulzheimer-Teuber, A. Akhoundova, S. Koppatz, E. Bamberg, G. Nagel, and H. Koepsell. 2001. Interaction of cations, anions, and weak base quinine with rat renal cation transporter rOCT2 compared with rOCT1. *American journal of physiology. Renal physiology*. 281:F454-468.
- Barendt, W.M., and S.H. Wright. 2002. The human organic cation transporter (hOCT2) recognizes the degree of substrate ionization. *The Journal of biological chemistry*. 277:22491-22496.
- Boyer, J.L., J. Graf, and P.J. Meier. 1992. Hepatic transport systems regulating pHi, cell volume, and bile secretion. *Annual review of physiology*. 54:415-438.
- Budiman, T., E. Bamberg, H. Koepsell, and G. Nagel. 2000. Mechanism of electrogenic cation transport by the cloned organic cation transporter 2 from rat. *The Journal of biological chemistry*. 275:29413-29420.
- Busch, A.E., U. Karbach, D. Miska, V. Gorboulev, A. Akhoundova, C. Volk, P. Arndt, J.C. Ulzheimer, M.S. Sonders, C. Baumann, S. Waldegger, F. Lang, and H. Koepsell. 1998. Human neurons express the polyspecific cation transporter hOCT2, which translocates monoamine neurotransmitters, amantadine, and memantine. *Molecular pharmacology*. 54:342-352.
- Busch, A.E., S. Quester, J.C. Ulzheimer, S. Waldegger, V. Gorboulev, P. Arndt, F. Lang, and H. Koepsell. 1996. Electrogenic properties and substrate specificity of the polyspecific rat cation transporter rOCT1. *The Journal of biological chemistry*. 271:32599-32604.
- Cetinkaya, I., G. Ciarimboli, G. Yalcinkaya, T. Mehrens, A. Velic, J.R. Hirsch, V. Gorboulev, H. Koepsell, and E. Schlatter. 2003. Regulation of human organic cation transporter hOCT2 by PKA, PI3K, and calmodulin-dependent kinases. *American journal of physiology. Renal physiology*. 284:F293-302.
- Cha, A., and F. Bezanilla. 1997. Characterizing voltage-dependent conformational changes in the Shaker K⁺ channel with fluorescence. *Neuron*. 19:1127-1140.
- Cha, A., and F. Bezanilla. 1998. Structural implications of fluorescence quenching in the Shaker K⁺ channel. *The Journal of general physiology*. 112:391-408.

- Cha, A., N. Zerangue, M. Kavanaugh, and F. Bezanilla. 1998. Fluorescence techniques for studying cloned channels and transporters expressed in *Xenopus* oocytes. *Methods in enzymology*. 296:566-578.
- Chen, Y., S. Zhang, M. Sorani, and K.M. Giacomini. 2007. Transport of paraquat by human organic cation transporters and multidrug and toxic compound extrusion family. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 322:695-700.
- Ciarimboli, G., D. Deuster, A. Knief, M. Sperling, M. Holtkamp, B. Edemir, H. Pavenstadt, C. Lanvers-Kaminsky, A. am Zehnhoff-Dinnesen, A.H. Schinkel, H. Koepsell, H. Jurgens, and E. Schlatter. 2010. Organic cation transporter 2 mediates cisplatin-induced oto- and nephrotoxicity and is a target for protective interventions. *The American journal of pathology*. 176:1169-1180.
- Ciarimboli, G., T. Ludwig, D. Lang, H. Pavenstadt, H. Koepsell, H.J. Piechota, J. Haier, U. Jaehde, J. Zisowsky, and E. Schlatter. 2005. Cisplatin nephrotoxicity is critically mediated via the human organic cation transporter 2. *The American journal of pathology*. 167:1477-1484.
- Ciarimboli, G., and E. Schlatter. 2005. Regulation of organic cation transport. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 449:423-441.
- Ciarimboli, G., K. Struwe, P. Arndt, V. Gorboulev, H. Koepsell, E. Schlatter, and J.R. Hirsch. 2004. Regulation of the human organic cation transporter hOCT1. *Journal of cellular physiology*. 201:420-428.
- Cui, M., R. Aras, W.V. Christian, P.M. Rappold, M. Hatwar, J. Panza, V. Jackson-Lewis, J.A. Javitch, N. Ballatori, S. Przedborski, and K. Tieu. 2009. The organic cation transporter-3 is a pivotal modulator of neurodegeneration in the nigrostriatal dopaminergic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106:8043-8048.
- Dang, S., L. Sun, Y. Huang, F. Lu, Y. Liu, H. Gong, J. Wang, and N. Yan. 2010. Structure of a fucose transporter in an outward-open conformation. *Nature*. 467:734-738.
- Diez-Sampedro, A., D.D. Loo, E.M. Wright, G.A. Zampighi, and B.A. Hirayama. 2004. Coupled sodium/glucose cotransport by SGLT1 requires a negative charge at position 454. *Biochemistry*. 43:13175-13184.
- Dresser, M.J., A.T. Gray, and K.M. Giacomini. 2000. Kinetic and selectivity differences between rodent, rabbit, and human organic cation transporters (OCT1). *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 292:1146-1152.
- Dresser, M.J., G. Xiao, M.K. Leabman, A.T. Gray, and K.M. Giacomini. 2002. Interactions of n-tetraalkylammonium compounds and biguanides with a human renal organic cation transporter (hOCT2). *Pharmaceutical research*. 19:1244-1247.
- Filipski, K.K., R.H. Mathijssen, T.S. Mikkelsen, A.H. Schinkel, and A. Sparreboom. 2009. Contribution of organic cation transporter 2 (OCT2) to cisplatin-induced nephrotoxicity. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 86:396-402.
- Gandhi, C.S., and R. Olcese. 2008. The voltage-clamp fluorometry technique. *Methods Mol Biol*. 491:213-231.

- Geibel, S., J.H. Kaplan, E. Bamberg, and T. Friedrich. 2003. Conformational dynamics of the Na⁺/K⁺-ATPase probed by voltage clamp fluorometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100:964-969.
- Gershoni, J.M., and G.E. Palade. 1983. Protein blotting: principles and applications. *Analytical biochemistry*. 131:1-15.
- Giacomini, K.M., P.H. Hsyu, and L.G. Gisclon. 1988. Renal transport of drugs: an overview of methodology with application to cimetidine. *Pharmaceutical research*. 5:465-471.
- Giacomini, K.M., S.M. Huang, D.J. Tweedie, L.Z. Benet, K.L. Brouwer, X. Chu, A. Dahlin, R. Evers, V. Fischer, K.M. Hillgren, K.A. Hoffmaster, T. Ishikawa, D. Keppler, R.B. Kim, C.A. Lee, M. Niemi, J.W. Polli, Y. Sugiyama, P.W. Swaan, J.A. Ware, S.H. Wright, S.W. Yee, M.J. Zamek-Gliszczynski, and L. Zhang. 2010. Membrane transporters in drug development. *Nature reviews. Drug discovery*. 9:215-236.
- Gorboulev, V., N. Shatskaya, C. Volk, and H. Koepsell. 2005. Subtype-specific affinity for corticosterone of rat organic cation transporters rOCT1 and rOCT2 depends on three amino acids within the substrate binding region. *Molecular pharmacology*. 67:1612-1619.
- Gorboulev, V., J.C. Ulzheimer, A. Akhoundova, I. Ulzheimer-Teuber, U. Karbach, S. Quester, C. Baumann, F. Lang, A.E. Busch, and H. Koepsell. 1997. Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters. *DNA and cell biology*. 16:871-881.
- Gorboulev, V., C. Volk, P. Arndt, A. Akhoundova, and H. Koepsell. 1999. Selectivity of the polyspecific cation transporter rOCT1 is changed by mutation of aspartate 475 to glutamate. *Molecular pharmacology*. 56:1254-1261.
- Gorbunov, D., V. Gorboulev, N. Shatskaya, T. Mueller, E. Bamberg, T. Friedrich, and H. Koepsell. 2008. High-affinity cation binding to organic cation transporter 1 induces movement of helix 11 and blocks transport after mutations in a modeled interaction domain between two helices. *Molecular pharmacology*. 73:50-61.
- Gründemann, D., J. Babin-Ebell, F. Martel, N. Ording, A. Schmidt, and E. Schomig. 1997. Primary structure and functional expression of the apical organic cation transporter from kidney epithelial LLC-PK1 cells. *The Journal of biological chemistry*. 272:10408-10413.
- Gründemann, D., V. Gorboulev, S. Gambaryan, M. Veyhl, and H. Koepsell. 1994. Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. *Nature*. 372:549-552.
- Gründemann, D., S. Koster, N. Kiefer, T. Breidert, M. Engelhardt, F. Spitzenberger, N. Obermuller, and E. Schomig. 1998a. Transport of monoamine transmitters by the organic cation transporter type 2, OCT2. *The Journal of biological chemistry*. 273:30915-30920.
- Gründemann, D., B. Schechinger, G.A. Rappold, and E. Schomig. 1998b. Molecular identification of the corticosterone-sensitive extraneuronal catecholamine transporter. *Nature neuroscience*. 1:349-351.

- Haag, C., R. Berkels, D. Grundemann, A. Lazar, D. Taubert, and E. Schomig. 2004. The localisation of the extraneuronal monoamine transporter (EMT) in rat brain. *Journal of neurochemistry*. 88:291-297.
- Harlfinger, S., C. Fork, A. Lazar, E. Schomig, and D. Grundemann. 2005. Are organic cation transporters capable of transporting prostaglandins? *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 372:125-130.
- Hayer-Zillgen, M., M. Bruss, and H. Bonisch. 2002. Expression and pharmacological profile of the human organic cation transporters hOCT1, hOCT2 and hOCT3. *British journal of pharmacology*. 136:829-836.
- Hirai, T., J.A. Heymann, D. Shi, R. Sarker, P.C. Maloney, and S. Subramaniam. 2002. Three-dimensional structure of a bacterial oxalate transporter. *Nature structural biology*. 9:597-600.
- Ho, S.N., H.D. Hunt, R.M. Horton, J.K. Pullen, and L.R. Pease. 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*. 77:51-59.
- Horne, A.J., and D. Fedida. 2009. Use of voltage clamp fluorimetry in understanding potassium channel gating: a review of Shaker fluorescence data. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 87:411-418.
- Huang, Y., M.J. Lemieux, J. Song, M. Auer, and D.N. Wang. 2003. Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from *Escherichia coli*. *Science*. 301:616-620.
- Inazu, M., H. Takeda, and T. Matsumiya. 2003. Expression and functional characterization of the extraneuronal monoamine transporter in normal human astrocytes. *Journal of neurochemistry*. 84:43-52.
- Kamsteeg, E.J., and P.M. Deen. 2001. Detection of aquaporin-2 in the plasma membranes of oocytes: a novel isolation method with improved yield and purity. *Biochemical and biophysical research communications*. 282:683-690.
- Karbach, U., J. Kricke, F. Meyer-Wentrup, V. Gorboulev, C. Volk, D. Loffing-Cueni, B. Kaissling, S. Bachmann, and H. Koepsell. 2000. Localization of organic cation transporters OCT1 and OCT2 in rat kidney. *American journal of physiology. Renal physiology*. 279:F679-687.
- Kekuda, R., P.D. Prasad, X. Wu, H. Wang, Y.J. Fei, F.H. Leibach, and V. Ganapathy. 1998. Cloning and functional characterization of a potential-sensitive, polyspecific organic cation transporter (OCT3) most abundantly expressed in placenta. *The Journal of biological chemistry*. 273:15971-15979.
- Keller, T., B. Egenberger, V. Gorboulev, F. Bernhard, Z. Uzelac, D. Gorbunov, C. Wirth, S. Koppatz, V. Dotsch, C. Hunte, H.H. Sitte, and H. Koepsell. 2011. The large extracellular loop of organic cation transporter 1 influences substrate affinity and is pivotal for oligomerization. *The Journal of biological chemistry*. 286:37874-37886.
- Keller, T., M. Elfeber, V. Gorboulev, H. Reilander, and H. Koepsell. 2005. Purification and functional reconstitution of the rat organic cation transporter OCT1. *Biochemistry*. 44:12253-12263.

- Keller, T., D. Schwarz, F. Bernhard, V. Dotsch, C. Hunte, V. Gorboulev, and H. Koepsell. 2008. Cell free expression and functional reconstitution of eukaryotic drug transporters. *Biochemistry*. 47:4552-4564.
- Kimura, H., M. Takeda, S. Narikawa, A. Enomoto, K. Ichida, and H. Endou. 2002. Human organic anion transporters and human organic cation transporters mediate renal transport of prostaglandins. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 301:293-298.
- Klaassen, C.D., and L.M. Aleksunes. 2010. Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation. *Pharmacological reviews*. 62:1-96.
- Koehler, M.R., V. Gorboulev, H. Koepsell, C. Steinlein, and M. Schmid. 1996. Roct1, a rat polyspecific transporter gene for the excretion of cationic drugs, maps to chromosome 1q11-12. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society*. 7:247-248.
- Koehler, M.R., B. Wissinger, V. Gorboulev, H. Koepsell, and M. Schmid. 1997. The two human organic cation transporter genes SLC22A1 and SLC22A2 are located on chromosome 6q26. *Cytogenetics and cell genetics*. 79:198-200.
- Koepsell, H. 1998. Organic cation transporters in intestine, kidney, liver, and brain. *Annual review of physiology*. 60:243-266.
- Koepsell, H. 2004. Polyspecific organic cation transporters: their functions and interactions with drugs. *Trends in pharmacological sciences*. 25:375-381.
- Koepsell, H. 2011. Substrate recognition and translocation by polyspecific organic cation transporters. *Biological chemistry*. 392:95-101.
- Koepsell, H., and H. Endou. 2004. The SLC22 drug transporter family. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 447:666-676.
- Koepsell, H., K. Lips, and C. Volk. 2007. Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharmaceutical research*. 24:1227-1251.
- Koepsell, H., B.M. Schmitt, and V. Gorboulev. 2003. Organic cation transporters. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*. 150:36-90.
- Kristufek, D., W. Rudorfer, C. Pifl, and S. Huck. 2002. Organic cation transporter mRNA and function in the rat superior cervical ganglion. *The Journal of physiology*. 543:117-134.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- Larsson, H.P., A.V. Tzingounis, H.P. Koch, and M.P. Kavanaugh. 2004. Fluorometric measurements of conformational changes in glutamate transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101:3951-3956.
- Li, M., R.A. Farley, and H.A. Lester. 2000. An intermediate state of the gamma-aminobutyric acid transporter GAT1 revealed by simultaneous voltage clamp and fluorescence. *The Journal of general physiology*. 115:491-508.
- Li, M., and H.A. Lester. 2002. Early fluorescence signals detect transitions at mammalian serotonin transporters. *Biophysical journal*. 83:206-218.

- Lips, K.S., C. Volk, B.M. Schmitt, U. Pfeil, P. Arndt, D. Miska, L. Ermert, W. Kummer, and H. Koepsell. 2005. Polyspecific cation transporters mediate luminal release of acetylcholine from bronchial epithelium. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 33:79-88.
- Loo, D.D., B.A. Hirayama, E.M. Gallardo, J.T. Lam, E. Turk, and E.M. Wright. 1998. Conformational changes couple Na⁺ and glucose transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95:7789-7794.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*. 193:265-275.
- Mannuzzu, L.M., M.M. Moronne, and E.Y. Isacoff. 1996. Direct physical measure of conformational rearrangement underlying potassium channel gating. *Science*. 271:213-216.
- Meinild, A.K., B.A. Hirayama, E.M. Wright, and D.D. Loo. 2002. Fluorescence studies of ligand-induced conformational changes of the Na(+)/glucose cotransporter. *Biochemistry*. 41:1250-1258.
- Meyer-Wentrup, F., U. Karbach, V. Gorboulev, P. Arndt, and H. Koepsell. 1998. Membrane localization of the electrogenic cation transporter rOCT1 in rat liver. *Biochemical and biophysical research communications*. 248:673-678.
- Ming, X., W. Ju, H. Wu, R.R. Tidwell, J.E. Hall, and D.R. Thakker. 2009. Transport of dicationic drugs pentamidine and furamidine by human organic cation transporters. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 37:424-430.
- Minuesa, G., C. Volk, M. Molina-Arcas, V. Gorboulev, I. Erkizia, P. Arndt, B. Clotet, M. Pastor-Anglada, H. Koepsell, and J. Martinez-Picado. 2009. Transport of lamivudine [(-)-beta-L-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine] and high-affinity interaction of nucleoside reverse transcriptase inhibitors with human organic cation transporters 1, 2, and 3. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 329:252-261.
- Moaddel, R., R. Yamaguchi, P.C. Ho, S. Patel, C.P. Hsu, V. Subrahmanyam, and I.W. Wainer. 2005. Development and characterization of an immobilized human organic cation transporter based liquid chromatographic stationary phase. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 818:263-268.
- Mooslehner, K.A., and N.D. Allen. 1999. Cloning of the mouse organic cation transporter 2 gene, Slc22a2, from an enhancer-trap transgene integration locus. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society*. 10:218-224.
- Motohashi, H., Y. Sakurai, H. Saito, S. Masuda, Y. Urakami, M. Goto, A. Fukatsu, O. Ogawa, and K. Inui. 2002. Gene expression levels and immunolocalization of organic ion transporters in the human kidney. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 13:866-874.

- Müller, J., K.S. Lips, L. Metzner, R.H. Neubert, H. Koepsell, and M. Brandsch. 2005. Drug specificity and intestinal membrane localization of human organic cation transporters (OCT). *Biochemical pharmacology*. 70:1851-1860.
- Nagel, G., C. Volk, T. Friedrich, J.C. Ulzheimer, E. Bamberg, and H. Koepsell. 1997. A reevaluation of substrate specificity of the rat cation transporter rOCT1. *The Journal of biological chemistry*. 272:31953-31956.
- Neuhoff, S., A.L. Ungell, I. Zamora, and P. Artursson. 2003. pH-dependent bidirectional transport of weakly basic drugs across Caco-2 monolayers: implications for drug-drug interactions. *Pharmaceutical research*. 20:1141-1148.
- Newstead, S., D. Drew, A.D. Cameron, V.L. Postis, X. Xia, P.W. Fowler, J.C. Ingram, E.P. Carpenter, M.S. Sansom, M.J. McPherson, S.A. Baldwin, and S. Iwata. 2011. Crystal structure of a prokaryotic homologue of the mammalian oligopeptide-proton symporters, PepT1 and PepT2. *The EMBO journal*. 30:417-426.
- Nies, A.T., E. Herrmann, M. Brom, and D. Keppler. 2008. Vectorial transport of the plant alkaloid berberine by double-transfected cells expressing the human organic cation transporter 1 (OCT1, SLC22A1) and the efflux pump MDR1 P-glycoprotein (ABCB1). *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 376:449-461.
- Nies, A.T., H. Koepsell, K. Damme, and M. Schwab. 2011. Organic cation transporters (OCTs, MATEs), in vitro and in vivo evidence for the importance in drug therapy. *Handbook of experimental pharmacology*:105-167.
- Nies, A.T., H. Koepsell, S. Winter, O. Burk, K. Klein, R. Kerb, U.M. Zanger, D. Keppler, M. Schwab, and E. Schaeffeler. 2009. Expression of organic cation transporters OCT1 (SLC22A1) and OCT3 (SLC22A3) is affected by genetic factors and cholestasis in human liver. *Hepatology*. 50:1227-1240.
- Nishimura, M., and S. Naito. 2005. Tissue-specific mRNA expression profiles of human ATP-binding cassette and solute carrier transporter superfamilies. *Drug metabolism and pharmacokinetics*. 20:452-477.
- Okabe, M., G. Szakacs, M.A. Reimers, T. Suzuki, M.D. Hall, T. Abe, J.N. Weinstein, and M.M. Gottesman. 2008. Profiling SLCO and SLC22 genes in the NCI-60 cancer cell lines to identify drug uptake transporters. *Molecular cancer therapeutics*. 7:3081-3091.
- Okuda, M., H. Saito, Y. Urakami, M. Takano, and K. Inui. 1996. cDNA cloning and functional expression of a novel rat kidney organic cation transporter, OCT2. *Biochemical and biophysical research communications*. 224:500-507.
- Pao, S.S., I.T. Paulsen, and M.H. Saier, Jr. 1998. Major facilitator superfamily. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 62:1-34.
- Pelis, R.M., X. Zhang, Y. Dangprapai, and S.H. Wright. 2006. Cysteine accessibility in the hydrophilic cleft of human organic cation transporter 2. *The Journal of biological chemistry*. 281:35272-35280.
- Popp, C., V. Gorboulev, T.D. Muller, D. Gorbunov, N. Shatskaya, and H. Koepsell. 2005. Amino acids critical for substrate affinity of rat organic cation transporter 1 line the

- substrate binding region in a model derived from the tertiary structure of lactose permease. *Molecular pharmacology*. 67:1600-1611.
- Radestock, S., and L.R. Forrest. 2011. The alternating-access mechanism of MFS transporters arises from inverted-topology repeats. *Journal of molecular biology*. 407:698-715.
- Reitman, M.L., and E.E. Schadt. 2007. Pharmacogenetics of metformin response: a step in the path toward personalized medicine. *The Journal of clinical investigation*. 117:1226-1229.
- Rizwan, A.N., and G. Burckhardt. 2007. Organic anion transporters of the SLC22 family: biopharmaceutical, physiological, and pathological roles. *Pharmaceutical research*. 24:450-470.
- Sata, R., H. Ohtani, M. Tsujimoto, H. Murakami, N. Koyabu, T. Nakamura, T. Uchiumi, M. Kuwano, H. Nagata, K. Tsukimori, H. Nakano, and Y. Sawada. 2005. Functional analysis of organic cation transporter 3 expressed in human placenta. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 315:888-895.
- Schmitt, B.M., D. Gorbunov, P. Schlachtbauer, B. Egenberger, V. Gorboulev, E. Wischmeyer, T. Muller, and H. Koepsell. 2009. Charge-to-substrate ratio during organic cation uptake by rat OCT2 is voltage dependent and altered by exchange of glutamate 448 with glutamine. *American journal of physiology. Renal physiology*. 296:F709-722.
- Schmitt, B.M., and H. Koepsell. 2002. An improved method for real-time monitoring of membrane capacitance in *Xenopus laevis* oocytes. *Biophysical journal*. 82:1345-1357.
- Schmitt, B.M., and H. Koepsell. 2005. Alkali cation binding and permeation in the rat organic cation transporter rOCT2. *The Journal of biological chemistry*. 280:24481-24490.
- Schweifer, N., and D.P. Barlow. 1996. The Lx1 gene maps to mouse chromosome 17 and codes for a protein that is homologous to glucose and polyspecific transmembrane transporters. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society*. 7:735-740.
- Shang, T., A.V. Uihlein, J. Van Asten, B. Kalyanaraman, and C.J. Hillard. 2003. 1-Methyl-4-phenylpyridinium accumulates in cerebellar granule neurons via organic cation transporter 3. *Journal of neurochemistry*. 85:358-367.
- Sturm, A., V. Gorboulev, D. Gorbunov, T. Keller, C. Volk, B.M. Schmitt, P. Schlachtbauer, G. Ciarimboli, and H. Koepsell. 2007. Identification of cysteines in rat organic cation transporters rOCT1 (C322, C451) and rOCT2 (C451) critical for transport activity and substrate affinity. *American journal of physiology. Renal physiology*. 293:F767-779.
- Sugawara-Yokoo, M., Y. Urakami, H. Koyama, K. Fujikura, S. Masuda, H. Saito, T. Naruse, K. Inui, and K. Takata. 2000. Differential localization of organic cation transporters rOCT1 and rOCT2 in the basolateral membrane of rat kidney proximal tubules. *Histochemistry and cell biology*. 114:175-180.
- Tamai, I., R. Ohashi, J. Nezu, H. Yabuuchi, A. Oku, M. Shimane, Y. Sai, and A. Tsuji. 1998. Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2. *The Journal of biological chemistry*. 273:20378-20382.

- Tamai, I., H. Yabuuchi, J. Nezu, Y. Sai, A. Oku, M. Shimane, and A. Tsuji. 1997. Cloning and characterization of a novel human pH-dependent organic cation transporter, OCTN1. *FEBS letters*. 419:107-111.
- Terashita, S., M.J. Dresser, L. Zhang, A.T. Gray, S.C. Yost, and K.M. Giacomini. 1998. Molecular cloning and functional expression of a rabbit renal organic cation transporter. *Biochimica et biophysica acta*. 1369:1-6.
- Ullrich, K.J. 1976. Renal tubular mechanisms of organic solute transport. *Kidney international*. 9:134-148.
- Urakami, Y., M. Akazawa, H. Saito, M. Okuda, and K. Inui. 2002. cDNA cloning, functional characterization, and tissue distribution of an alternatively spliced variant of organic cation transporter hOCT2 predominantly expressed in the human kidney. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 13:1703-1710.
- van Montfoort, J.E., M. Muller, G.M. Groothuis, D.K. Meijer, H. Koepsell, and P.J. Meier. 2001. Comparison of "type I" and "type II" organic cation transport by organic cation transporters and organic anion-transporting polypeptides. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 298:110-115.
- Volk, C., V. Gorboulev, T. Budiman, G. Nagel, and H. Koepsell. 2003. Different affinities of inhibitors to the outwardly and inwardly directed substrate binding site of organic cation transporter 2. *Molecular pharmacology*. 64:1037-1047.
- Volk, C., V. Gorboulev, A. Kotsch, T.D. Muller, and H. Koepsell. 2009. Five amino acids in the innermost cavity of the substrate binding cleft of organic cation transporter 1 interact with extracellular and intracellular corticosterone. *Molecular pharmacology*. 76:275-289.
- Wagner, C.A., B. Friedrich, I. Setiawan, F. Lang, and S. Broer. 2000. The use of *Xenopus laevis* oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 10:1-12.
- Wang, D.S., J.W. Jonker, Y. Kato, H. Kusuhara, A.H. Schinkel, and Y. Sugiyama. 2002. Involvement of organic cation transporter 1 in hepatic and intestinal distribution of metformin. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 302:510-515.
- Weber, W. 1999. Ion currents of *Xenopus laevis* oocytes: state of the art. *Biochimica et biophysica acta*. 1421:213-233.
- Wu, X., W. Huang, M.E. Ganapathy, H. Wang, R. Kekuda, S.J. Conway, F.H. Leibach, and V. Ganapathy. 2000. Structure, function, and regional distribution of the organic cation transporter OCT3 in the kidney. *American journal of physiology. Renal physiology*. 279:F449-458.
- Yonezawa, A., S. Masuda, S. Yokoo, T. Katsura, and K. Inui. 2006. Cisplatin and oxaliplatin, but not carboplatin and nedaplatin, are substrates for human organic cation transporters (SLC22A1-3 and multidrug and toxin extrusion family). *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 319:879-886.

- Zhang, L., M.J. Dresser, J.K. Chun, P.C. Babbitt, and K.M. Giacomini. 1997a. Cloning and functional characterization of a rat renal organic cation transporter isoform (rOCT1A). *The Journal of biological chemistry*. 272:16548-16554.
- Zhang, L., M.J. Dresser, A.T. Gray, S.C. Yost, S. Terashita, and K.M. Giacomini. 1997b. Cloning and functional expression of a human liver organic cation transporter. *Molecular pharmacology*. 51:913-921.
- Zhang, L., M.E. Schaner, and K.M. Giacomini. 1998. Functional characterization of an organic cation transporter (hOCT1) in a transiently transfected human cell line (HeLa). *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 286:354-361.
- Zhang, S., K.S. Lovejoy, J.E. Shima, L.L. Lagpacan, Y. Shu, A. Lapuk, Y. Chen, T. Komori, J.W. Gray, X. Chen, S.J. Lippard, and K.M. Giacomini. 2006. Organic cation transporters are determinants of oxaliplatin cytotoxicity. *Cancer research*. 66:8847-8857.
- Zhang, X., K.K. Evans, and S.H. Wright. 2002. Molecular cloning of rabbit organic cation transporter rbOCT2 and functional comparisons with rbOCT1. *American journal of physiology. Renal physiology*. 283:F124-133.
- Zolk, O., T.F. Solbach, J. Konig, and M.F. Fromm. 2009. Structural determinants of inhibitor interaction with the human organic cation transporter OCT2 (SLC22A2). *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 379:337-348.

9. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst bei Prof. Dr. Hermann Koepsell bedanken, der mir die einmalige Gelegenheit bot, meine Doktorarbeit in seinem Labor anfertigen zu können. Besonders danke ich ihm für die interessante Themenstellung und die hervorragende Betreuung in den vergangenen vier Jahren. Weiterhin danke ich Prof. Dr. Hermann Koepsell für die richtungsweisenden Ideen und Verbesserungsvorschläge sowohl experimentell als auch während der Verfassung meiner Dissertationsarbeit.

Des Weiteren möchte ich mich besonders bei Prof. Dr. Rainer Hedrich für die Betreuung und Hilfe während meiner Arbeit bedanken.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Anatomie und Zellbiologie für die gute Arbeitsatmosphäre und die hilfreichen Anleitungen, die mir immer eine große Hilfe waren. Dr. Valentin Gorboulev danke ich vor allem für die Herstellung der rOCT1-Mutanten und das Korrekturlesen meiner Arbeit. Bei PD Dr. Christopher Volk und Dr. Maike Veyhl-Wichmann bedanke ich mich für die Hilfe und alle guten Ratschläge, die weit über die Betreuung im Oozytenlabor hinausgingen. Dr. Thorsten Keller danke ich insbesondere für die unterstützende Arbeit im biochemischen Bereich. Ein weiteres Dankeschön geht an Ursula Roth, Alla Ganscher, Irina Schatz und Brigitte Dürner, die mich im Laboralltag und bei meinen Messungen unterstützten. Elke Varin danke ich zusätzlich für die gemeinsame Pflege der Frösche.

Außerdem geht ein besonderer Dank an Dr. Dietmar Geiger sowie an alle weiteren Mitarbeiter des Lehrstuhls für Botanik I, die mich bei der Etablierung der Voltage-Clamp-Fluorometrie unterstützten und mir bei der Auswertung der Daten eine große Hilfe waren.

Ein Dank geht auch an meine Mitdoktoranden Alex, Aruna, Chakri, Neha, Reddy und Saba, die mich motivierten und ohne die der Laboralltag bei weitem nicht derart unterhaltsam gewesen wäre.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Identifizierung einer Aminosäure im Transportweg des organischen Kationentransporters 1, deren Mutation Strukturänderungen beim Transport beeinflusst“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg,