

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie  
der Universität Würzburg, Lehrstuhl I  
Unter Leitung von: Prof. Dr. med. Hermann Koepsell

Die Aminosäuren W355 und A359 des rOCT1 zeigen  
substratabhängige Mutationseffekte und ändern  
nach Mutation die Affinität des Transporters zu TBuA

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Christian Aichner  
aus Bad Kissingen

Würzburg, Januar 2014



Referent: Prof. Dr. med. H. Koepsell

Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Würzburg, Lehrstuhl I

Koreferent: Prof. Dr. med. Erhard Wischmeyer

Institut für Physiologie, Schwerpunkt Neurophysiologie der Universität  
Würzburg

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg

Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.2014

Der Promovend ist Arzt

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Die organischen Kationentransporter .....	2
1.1.1 Vorkommen und Funktion .....	2
1.1.2 Die genetische Verwandtschaft der OCTs .....	3
1.1.3 Die Struktur der OCTs.....	5
1.1.4 Die Regulation der OCTs .....	7
1.1.5 Klinische Relevanz der OCTs .....	9
1.1.6 Der Transportmechanismus der OCTs.....	10
1.2 Bindungsverhalten und die Erstellung von Dockingmodellen .....	12
1.3 Zielsetzung der Arbeit .....	15
2. Material und Methodik .....	17
2.1 Verwendete Substrate und Hemmstoffe .....	17
2.2 Das Oozytenexpressionsmodell.....	19
2.2.1 Der Krallenfrosch - <i>Xenopus laevis</i> .....	19
2.2.2 Die Herstellung der Oozytenringelösung (ORI) .....	20
2.2.3 Gewinnung der Oozyten durch Laparotomie eines Krallenfrosches. ....	20
2.2.4 Auswahl der Oozyten .....	21
2.2.5 Injektion der Oozyten mit mRNA .....	22
2.3 Die „Tracer-Flux“-Messung .....	23
2.3.1 Die Hemmkinetik .....	23
2.3.2 Die Substratkinetik .....	24
2.4 Statistik und Datenauswertung .....	25

3. Ergebnisse .....	26
3.1 Mutationseffekte von W355Y und A359V auf die Affinität des TEA-Transportes.....	26
3.2 Mutationseffekte von W355Y und A359V auf die Affinität des MPP-Transportes.....	28
3.3 Mutationseffekte von W355Y und A359V auf die Affinität von TBuA .....	31
3.4 Erhöhung der Affinität der TBuA-Hemmung der MPP-Aufnahme nach einer Mutation am äußeren Rand der Substratbindungstasche.....	35
3.5 Prüfung von Änderungen der TBuA-Interaktion nach Mutationen innerhalb und am äußeren Rand der Substratbindungstasche.....	38
3.6 Vergleichende Übersicht der Mutationseffekte hinsichtlich ihrer Signifikanz .....	41
4. Diskussion .....	45
4.1 Mutationseffekte von W355Y und A359V auf die TBuA-Bindung .....	45
4.2 Mutationseffekte von F483S auf die TBuA-Bindung .....	47
4.3 Mutationseffekte auf die Transportaktivität .....	48
4.4 Substratabhängige Mutationseffekte auf rOCT1 .....	48
4.5 Effekte nach Mutationen am inneren und am äußeren Rand der Substratbindungstasche .....	49
5. Zusammenfassung.....	51
Abkürzungsverzeichnis: .....	53
Literaturverzeichnis: .....	55
Anhang:.....	65
Curriculum Vitae.....	66

## 1. Einleitung

Vielzellige Organismen sind aus Zellen aufgebaut, die im Verbund funktionierende, jedoch in sich abgeschlossene Stoffwechselsysteme, darstellen. Um ein intaktes eigenes Stoffsystem aufrechtzuerhalten müssen sich die Zellen einerseits von der Umgebung abgrenzen. Andererseits sind sie auf einen kontrollierten Austausch von Stoffen mit ihrer Umwelt angewiesen, um durch chemische Umbauprozesse Energie zu gewinnen, die unter anderem für den Erhalt der inneren Ordnung benötigt wird. Die Abgrenzung der Zellen erfolgt durch Phospholipiddoppelschichten, während der Austausch von Stoffen größtenteils durch Membranproteine erfolgt (vgl. Abb. 1).

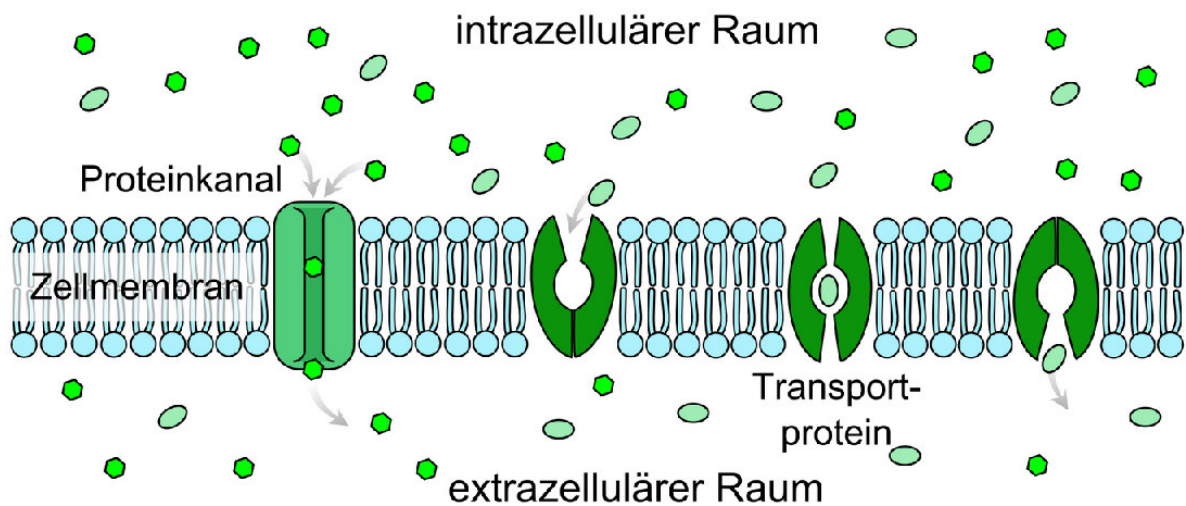


Abb. 1: Dargestellt ist eine Zellmembran aus Phospholipiddoppelschichten mit integralen Membranproteinen. Links ist ein Transportkanal dargestellt. Rechts sieht man ein Transportprotein in verschiedenen Konformationen während des Transportzyklus schematisch verdeutlicht (aus [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)).

Dabei spielen vor allem Transportproteine eine entscheidende Rolle. Einen systematischen Überblick über die Fülle an Transportproteinen der Zelle gibt die „Transporter Classification Database“ (TCDB) der International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB).

## 1.1 Die organischen Kationentransporter

### 1.1.1 Vorkommen und Funktion

Im Jahre 1994 wurde in der Arbeitsgruppe von H. Koepsell mit dem organischen Kationentransporter 1 der Ratte (rOCT1) das erste Mitglied einer großen SLC22-Familie von polyspezifischen Transportern kloniert (Gründemann et al. 1994). Wenig später gelang der Nachweis weiterer Vertreter von organischen Kationentransportern der SLC22-Familie; des rOCT2 und des rOCT3 (Okuda et al., 1996; Kekuda et al. 1998). rOCT1 wurde auf dem Chromosom 1q11-12 der Ratte lokalisiert (Koehler et al. 1996). Die humanen Vertreter von OCT1 (hOCT1) und OCT2 (hOCT2) wurden dem Chromosom 6 der Stelle q26 zugeordnet (Koehler et al. 1997). Vertreter der organischen Kationentransporter wurden in nahezu allen Gewebearten des Körpers nachgewiesen (Koepsell et al. 2004). Beim Menschen ist hOCT1 am stärksten in der Leber exprimiert wird (Koepsell et al. 2003). hOCT2 ist am stärksten in der Niere exprimiert und findet sich auch in der Plazenta, dem Thymus, der Nebenniere und in Neuronen (Koepsell H. 2004). hOCT3 wird unter anderem in der Skelettmuskulatur, der glatten Muskulatur, der Milz und in Ganglienzellen exprimiert (Koepsell H. 2004). Gemeinsam ist OCT1, OCT2 und OCT3 eine polyspezifische Substratspezifität für organische Kationen. Dabei können Kationen relativ unterschiedlichster Molekularstruktur, jedoch nur bis zu einem Durchmesser von weniger als 1 Angström, transportiert werden (Schmitt et al. 2005). Große Kationen, wie Quinin oder Cyanin 863 werden nicht transportiert. Viele Substrate der OCTs sind schwache Basen, die bei neutralem pH-Wert positiv geladen sind (z.B. Cimetidin) (Koepsell et al. 2007). Endogene Substrate, wie Cholin oder einige Monoaminneurotransmitter wie Acetylcholin oder Dopamin (Lips et al. 2005; Busch et al. 1996) werden ebenso transportiert. Auch der Transport von Katecholaminen wurde nachgewiesen (Breitert et al. 1998). Viele Medikamente wie z.B. das Antidiabetikum Metformin (Takane et al. 2008) und das Chemotherapeutikum Cisplatin (Ciaramboli et al. 2005) werden ebenfalls transportiert. Einige Substanzen binden an die organischen Kationentransporter und hemmen den Transport, werden selbst aber nicht

transportiert. Beispiele sind Corticosteron (Volk et al. 2003) oder das Modellkation Tetrabutylammonium (TBA) (Gorbunov et al. 2008).

### 1.1.2 Die genetische Verwandtschaft der OCTs

Die organischen Kationentransporter zählen zur SLC22-Transporterfamilie (Koepsell et al. 2004). Die SLC22-Familie zählt man zur Major Solute Facilitator (MSF)-Super-familie, die Uniporter, Symporter und Antiporter von Bakterien bis hin zu Pflanzen und Säugetieren beinhalten (Koepsell et al. 2003; Pao et al. 1998). Die MSF-Superfamilie ist neben der ATP-binding-cassette-(ABC)-Familie die größte Superfamilie für Transporter. Zur SLC22-Familie gehören neben den OCTs auch die Zwitter/Kation-Transporter (OCTNs) und die organischen Anionentransporter (OATs) (Koepsell et al. 2004). Die genetische Verwandtschaft der SLC22-Transporter ist in Abb. 2 schematisch dargestellt.

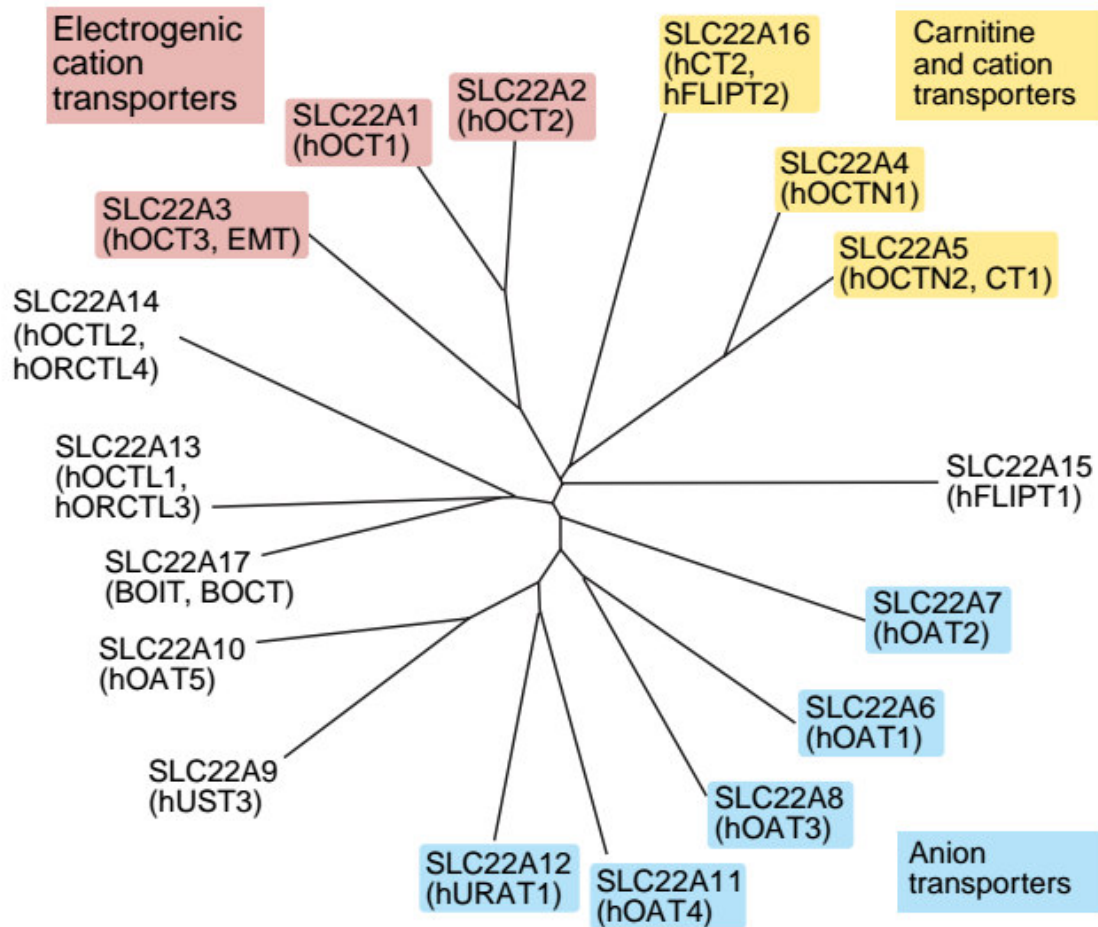


Abb. 2: Phylogenetischer Baum der humanen Transporter der SLC22 Familie. Der Abstand zwischen den Ästen stellt den Grad der genetischen Sequenzhomologien umgekehrt proportional dar. Beispielsweise sind die Sequenzhomologien zwischen hOCT1 und hOCT2 70% und zwischen hOCT1 und hOCTN1 32%. Polyspezifische Transporter sind rot, Transporter für organische Kationen und Zwitterionen gelb und Transporter für organische Anionen blau unterlegt (Koepsell et al. 2004).

Der erste Vertreter der OCTN-Gruppe, der OCTN1, wurde erstmals im Jahre 1997 kloniert (Tamai et al. 1997). Die OCTNs sind polyspezifische Transporter und transportieren die monovalenten organischen Kationen Verapamil, Quinidin und das Zwitterion Carnitin (Koepsell et al. 2004). Eine dritte Untergruppe der SLC22-Transporterfamilie sind die organischen Anionentransporter (OAT). 1997 wurde mit dem OAT1 der Ratte der erste Vertreter dieser Art kloniert (Sekine et al. 1997). Mittlerweile sind 6 weitere OATs bekannt (OAT 2-5 /URAT1/hCT2). Dazu zählt auch der URAT1-Transporter der den Harnsäurespiegel des Blutes reguliert. (Enomoto et al. 2002, Koepsell et al.



2004). OATs sind in der Lage, Anionen in beide Richtungen zu translozieren; teilweise findet ein Anionenaustausch statt (Sweet et al. 2003, Koepsell et al. 2004).

### 1.1.3 Die Struktur der OCTs

Der rOCT1 besteht aus 556 Aminosäuren. Mittels der „Kyle-Doolittle-Analyse“ zur Voraussage der Transmembrandomänen wurde 1994 die mutmaßliche Sekundärstruktur des rOCT1 abgeschätzt. Diese ist in Abb. 3 schematisch dargestellt. Das rOCT1 Protein besteht demnach aus 12 Transmembrandomänen (TMD), mit einer großen extrazellulären Schleife zwischen der TMD1 und der TMD2 und einer großen intrazellulären Schleife zwischen der TMD6 und der TMD7. Bei gegebener gerader Zahl an Transmembrandomänen, sind der N- und der C-Terminus auf der gleichen Seite. Antikörperreaktionen gegen beide Termini des Proteins ließen auf eine intrazelluläre Lokalisation der Termini schließen (Meyer-Wentrup et al. 1998).

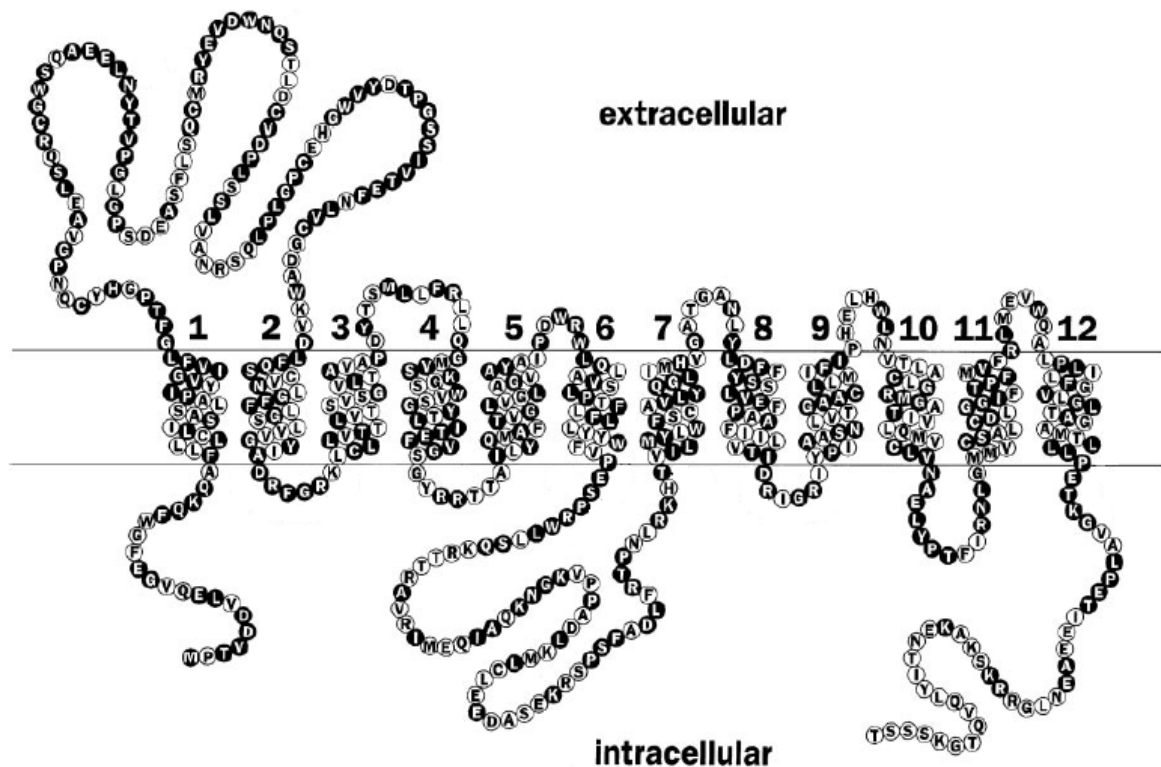


Abb. 3: Primärstruktur und mutmaßliche Topologie von rOCT1 mit 12 Transmembrandomänen. Dargestellt sind die große extrazelluläre Schleife zwischen der 1. und 2. Transmembrandomäne und die große intrazelluläre Schleife zwischen der 6. und 7. Transmembrandomäne (Koopsell et al. 1998).

Um die Tertiärstruktur von Membranproteinen aufklären zu können, bedient man sich der Röntgen-Kristallographie. Bisher ist es gelungen einige Transporter der MFS-Superfamilie von Prokaryonten in verschiedenen Konformationszuständen strukturell zu analysieren. Kürzlich wurden die dreidimensionalen Strukturen des Oxalat-Transporters aus *Oxalobacter formigenes* (Hirai et al. 2002), der Laktose-Permease LacY aus *Escherichia coli* (Abrahamson et al. 2003), der Glycerol-3-phosphat Transporter GlpT aus *E. coli* (Huang et al. 2003), des Fucose-Transporters (FucP) aus *Escherichia coli* (Dang et al., 2010) und des Oligopeptidtransporters PetTSo aus *Shewanella oneidensis* (Newstead et al., 2011) ermittelt. Diese Transporter haben gemäß ihrer Zugehörigkeit zur MFS-Superfamilie ähnliche dreidimensionale Strukturen. Die Laktose-Permease LacY wurde in einer nach innen offenen Konformation kristallisiert. Dabei umgeben die Transmembrandomänen eine zentrale Öffnung, die die Substratbindungstasche beinhaltet (Abrahamson et al. 2003). Auf Basis

der Struktur der LacY wurde 2005 erstmals ein dreidimensionales Modell der nach innen offenen Konformation von rOCT1 erstellt (Popp et al., 2005). Die Modellierung der Bindungstasche wurde an Hand von Punktmutationen verifiziert. Später wurde auch die nach außen offene Konformation von rOCT1 modelliert. In Abb. 4 sind die Modelle zusammen mit Aminosäuren, deren Austausch Affinitäten von Substraten und/oder Hemmstoffen verändert, dargestellt.

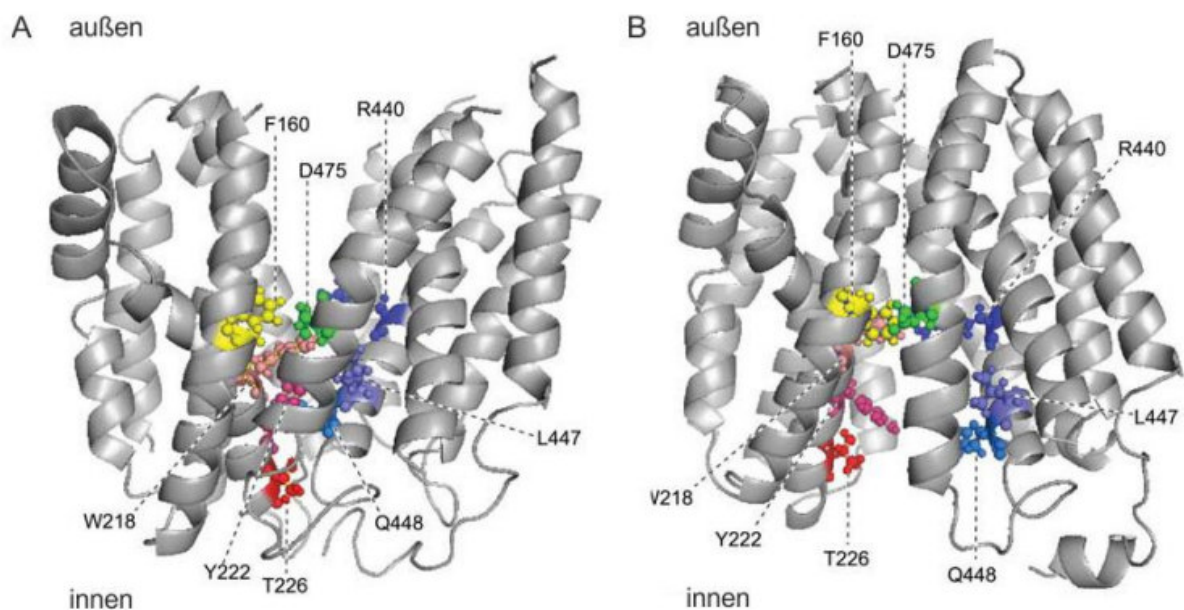


Abb. 4: Dreidimensionale Modellstruktur von rOCT1. Zu sehen sind 12 Transmembrandomänen, die eine zentrale Öffnung bilden. Mit Hilfe von Mutageneseexperimenten wurden einige Aminosäuren identifiziert, die für die Translokation von Substraten wichtig sein könnten und einen Teil der Substratbindungstasche bilden. Diese sind bunt hervorgehoben. (A) zeigt den Transporter in der nach außen gerichteten Konformation, (B) zeigt den Transporter in der nach innen gerichteten Konformation (aus Koepsell et al. 2011).

#### 1.1.4 Die Regulation der OCTs

Die Regulation der OCTs hinsichtlich Expression und Transportverhalten ist bis heute nicht vollständig verstanden. Die Regulationsmechanismen sind komplex und können auf Transkriptionsebene, Translationsebene oder posttranslational

durch Modifizierung der Transporter oder Beeinflussung ihrer intrazellulären Verteilung oder ihres Abbaus erfolgen (Koepsell et al. 2007). Die kurzfristig wirksamen, posttranslationalen Regulationsmechanismen der OCTs wurden bisher am besten untersucht. Ciarimboli et al. zeigten, dass hOCT bei Phosphorylierung durch die Proteinkinase A (PKA) inhibiert wird. Calmodulin A, die Calmodulin abhängige Kinase II sowie die Tyrosinkinase aktivieren hOCT1 (Ciarimboli et al. 2004). Bereits 2000 zeigten Mehrens et al., dass die Affinität von rOCT1 durch die Proteinkinase C abhängige Phosphorylierung erhöht wird. So scheint die Phosphorylierung an der intrazellulären Schleife des rOCT1 eine Konformationsänderung in der Bindungstasche von rOCT1 zu bewirken (Ciarimboli et al. 2005). hOCT2 beispielsweise wird von der Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) und der PKA inhibiert und vom Calmodulin-abhängigen Signalweg aktiviert (Cetinkaya et al. 2002). Auch hier wurde vermutet, dass dieser Effekt auf Konformationsänderungen der Substratbindungstasche beruht. In neuesten Arbeiten zeigte sich, dass kurzfristige Regulationseffekte von u.a. PKA, PKC und Tyrosinkinase auf einen verminderten Einbau in die Plasmamembran zurückzuführen sind, da hier keine Änderung der Substrataffinität festgestellt wurde. Nur das Eingreifen über den Calmodulin-Signalweg änderte die Substrataffinität (Guckel et al. 2012).

Die langfristige Regulation der OCTs ist unter anderem endokrin gesteuert. Es wurde gezeigt, dass Sexualhormone die Expressionsdichte von OCT2 in der Rattenniere beeinflussen. So erhöht Testosteron die Expression von rOCT2, Estradiol hingegen reduziert das Expressionslevel (Urakami et al. 2000). Dabei wird eine androgen-sensible Promoterregion auf prätranskriptionaler Ebene beeinflusst (Asaka et al. 2006). Der „hepatocyte nuclear factor-4-alpha“ (HNF-4alpha) beispielsweise aktiviert über die Promoterregion die Transkription von mRNA von hOCT1 (Saborowski et al. 2006).

### 1.1.5 Klinische Relevanz der OCTs

OCTs sind polyspezifische Transporter. Sie transportieren Moleküle unterschiedlichster Größe und Morphologie. Die meisten Medikamente werden über den Darm resorbiert und gelangen auf diesem Wege in die Hepatozyten. Die OCTs sind unter anderem an der primären biliaren Exkretion dieser Medikamente beteiligt und spielen eine entscheidende Rolle in der hepatischen Ausscheidung von Medikamenten. Mutationen und Polymorphismen von OCTs und anderen Transportern wie der „Multi drug resistance“- MDR1-Transporter könnten die Hepatotoxizität von Medikamenten erhöhen (Koepsell et al. 2007).

OCTs sind auch für die renale Exkretion von Medikamenten und Chemotherapeutika zuständig. So ist hOCT2 beispielsweise für die renale Exkretion des Antidiabetikums Metformin wichtig. Eine Kombination aus Metformin und anderen Medikamenten, die die Expression von OCTs minimieren, könnten das Risiko für Nebenwirkungen wie die Laktat-Azidose erhöhen (Wang et al. 2002, Koepsell et al. 2007).

Das nephrotoxische Chemotherapeutikum Cisplatin wird ebenso von hOCT2 der Niere transportiert. Die Kombination von Cisplatin mit anderen Substraten, die auch von hOCT2 transportiert werden, könnte so zu einer kompetitiven Hemmung führen und die Nephrotoxizität bei Chemotherapien senken (Ciarimboli et al. 2005/2010) (Koepsell et al. 2007). Neueste Studien weisen darauf hin, dass organische Kationentransporter der Schlüssel zur Nephrotoxizität von platinhaltigen Chemotherapeutika sind (Yonezawa 2012).

In Krebszellen des humanen hepatozellulären Karzinoms beeinflusst die Herunterregulation der Expression von hOCT1 die Progression des Tumors und führt zu einer Verschlechterung des Patientenüberlebens (Heise et al. 2012).

Diese Beispiele zeigen, dass organische Kationentransporter eine entscheidende Rolle bei der Ausscheidung von Medikamenten spielen und auf diese Weise die Pharmakokinetik eines Präparates, aber vor allem die Wechselwirkungen zwischen einzelnen Medikamenten, maßgeblich beeinflussen können.

### 1.1.6 Der Transportmechanismus der OCTs

Die OCTs gehören zu den Transportern, die eine erleichterte Diffusion vermitteln. Sie funktionieren nach dem „Alternating-access“-Prinzip. Das heißt, sie binden ihr Substrat in einem nach außen gerichteten Konformationszustand, machen Konformationsänderungen durch und geben das Substrat in einem nach innen gerichteten Zustand ab (siehe Abb. 5). Während des Transportvorganges gibt es noch einen Zwischenzustand, bei dem das Substrat im Transporter eingeschlossen ist („occluded-state“). Die OCTs sind in der Lage in beide Richtungen der Membran zu transportieren. Da die Substrate geladen sind, ist der über die OCTs vermittelte Transport spannungsabhängig. Die treibenden Kräfte für den durch OCTs vermittelten Transport sind der Konzentrationsgradient des jeweiligen Substrates und das Membranpotenzial.

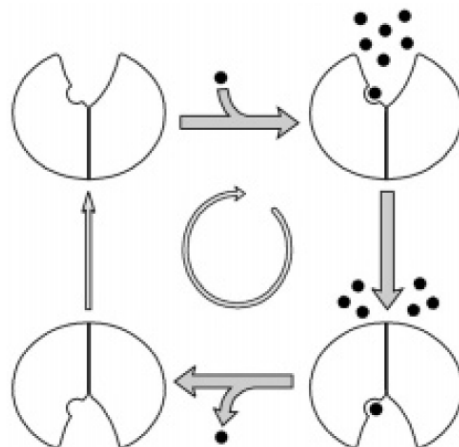


Abb. 5: Dargestellt ist ein Transporter nach dem „Alternating-access“-Modell. Links oben ist der Transporter in der nach außen offenen Konformation dargestellt. Rechts daneben sieht man den Transporter nach Substratbindung, der zu einer Konformationsänderung in die nach innen offene Konformation des Transporters führt, die rechts unten dargestellt ist. Nachdem sich das Substrat gelöst hat, kehrt der Transporter in die Ausgangskonformation zurück (Keller et al. 2005).

In der Arbeitsgruppe von H. Koepsell wurden die Eigenschaften des durch die OCTs vermittelten Kationentransportes in vielen Untersuchungen charakterisiert und der zugrundeliegende Mechanismus teilweise aufgeklärt (Koepsell et al.

2011). Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde klar gezeigt, dass es sich bei den OCTs um Transporter handelt, bei denen der Transportvorgang an eine Reihe von Konformationsänderungen des Transporters geknüpft ist und nicht um Kanäle, bei denen ein Selektionsfilter den Durchtritt von Stoffen reguliert.

Die OCTs sind polyspezifische Transporter, d.h. sie transportieren Substrate unterschiedlicher Struktur. Um die molekularen Grundlagen der Polyspezifität der OCTs für Kationen genauer zu untersuchen wurden unter anderem Punktmutationen an negativ geladenen Aminosäuren von rOCT1 durchgeführt. Die Mutation der Aminosäure Asp475, die in der Mitte der 11. Transmembrandomäne lokalisiert ist, zu Glutamat, führte zu einer Reduktion der Transportrate und interessanterweise zu einer signifikanten Erhöhung der Affinität für einige, aber nicht alle Substrate (Gorboulev et al. 1999). Aufgrund dieser Beobachtung und ähnlicher substratabhängiger Effekte von Punktmutationen an anderen Stellen der modellierten Substratbindungstasche wurde die Hypothese aufgestellt, dass rOCT1 eine große Kationenbindungstasche mit mehreren, überlappenden Interaktionsdomänen besitzt, die für das Bindungsverhalten unterschiedlicher Kationen verantwortlich ist (Gorboulev et al. 1999). 2003 wurden für die Hemmstoffe Corticosteron und TBuA unterschiedliche Affinitäten zur Substratbindungstasche gemessen, je nachdem ob der Hemmstoff von außen oder von innen an die Bindungstasche bindet (Volk et al. 2003). Auch diese Daten sprachen für die Existenz überlappender Bindungsdomänen für Liganden, die während des Transportvorgangs strukturellen Änderungen unterliegen. Die Affinität zum ungeladenen Kortikosteron änderte sich bei Erhöhung des Membranpotentials. Dies deutete spannungsabhängige Strukturänderungen des Transporters an (Volk et al. 2003). Durch gezielte Mutagenese-Versuche fand man heraus, dass wahrscheinlich sieben Aminosäuren an der Ligandenbindung beteiligt sind: Tryptophan 218, Tyrosin 222, Threonin 226, die laut Strukturmodell auf der 4. Transmembrandomäne liegen, Alanin 443, Leucin 447 und Glutamat 448, die laut Strukturmodell auf der zehnten Transmembrandomäne liegen und Aspartat 475 das auf der putativen 11. TMD lokalisiert ist (Gorboulev et al. 1999/2005, Popp et al. 2005, Koepsell et al. 2007). Die Aminosäuren Phe160, Trp218,

Arg440, Leu447 und Asp475 befinden sich im innersten Bereich der Bindungstasche und sind während des Transportmechanismus abwechselnd von der extrazellulären oder intrazellulären Seite her zugänglich (Volk et al. 2009).

Nach Markierung von Aminosäuren an der Stelle Phenylalanin 483 von rOCT1 mit einem fluoreszierenden Farbstoff konnte ein spannungs- und ein substratabhängiges Signal gemessen werden. Dies ließ vermuten, dass sich diese Aminosäure während der Translokation eines Substrates bewegt (Gorbunov et al. 2008).

## 1.2 Bindungsverhalten und die Erstellung von Dockingmodellen

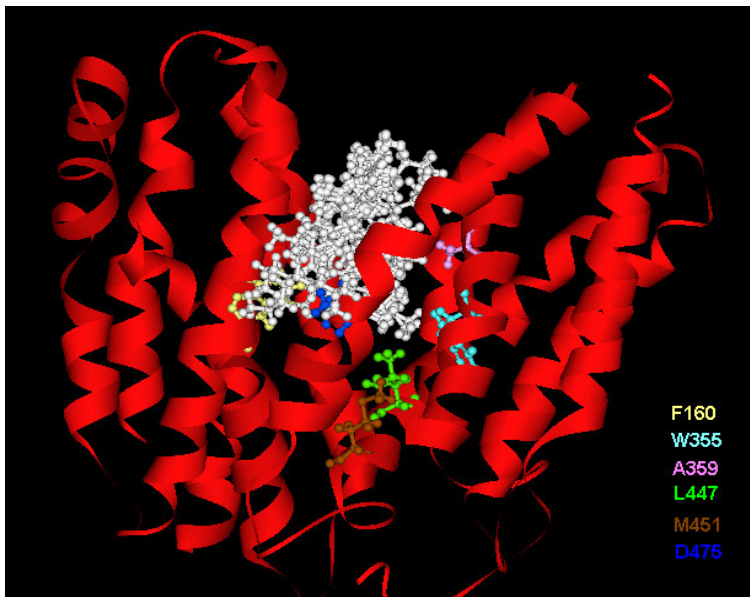
Wie in Kapitel 1.1.6 bereits in Auszügen geschildert wurde, bediente man sich bei der Erschließung des Transportmechanismus und der Erstellung des Modells von rOCT1 u.a. sog. Mutageneseversuchen. Dabei werden bestimmte Punktmutationen am Transportprotein vorgenommen, die ganz unterschiedliche Auswirkungen auf das Protein haben können. Dies ist zunächst davon abhängig, an welcher Stelle der Aminosäurekette die Mutation vorgenommen wird. Manche Aminosäuren sind so essentiell für die Entstehung oder die Funktionsweise eines Transporters, dass bei entsprechender Mutation nur noch eine eingeschränkte Funktion nachgewiesen werden kann. In anderen Fällen resultiert ein kompletter Funktionsverlust des Transportproteins. Manchmal wird es erst gar nicht in die Membran eingebaut (Sturm et al. 2007). In anderen Fällen resultiert eine substratabhängige oder hemmstoffabhängige Änderung des Bindungsverhaltens nach Mutation einer oder mehrerer Aminosäuren, die sich in der mutmaßlichen Bindungstasche des Transporters befinden (Volk et al. 2009). Das dreidimensionale Modell des rOCT1 ermöglicht durch die plastische Darstellung des Transporters eine gezielte Auswahl von Aminosäuren, die essentiell für den Transportmechanismus des Proteins sein können. Mittlerweile existiert eine detaillierte Vorstellung von der



Substratbindungsregion des Transporters, zum Beispiel in Bezug auf Kortikosteron (Volk et al. 2009).

Mithilfe der Voltage-clamp-Fluorimetrie konnten für rOCT1 neben niederaffinen Bindungsstellen für Substrate auch hochaffine Bindungsstellen nachgewiesen werden. Für TBuA wurden nach Punktmutation an der Stelle Phe483 zu Serin, neben einer niederaffinen, zwei zusätzliche hochaffine Bindungsstellen nachgewiesen (Gorbunov et al. 2008). Die Funktion dieser hochaffinen Bindungsstellen während des Transportes ist bisher nicht verstanden. Die hochaffinen Bindungsstellen könnten Substrate, die in sehr geringen Konzentrationen vorliegen, an den Transporter binden, um später für den Transport an die niederaffine Transportstelle weitergereicht und über die Membran befördert zu werden. Unter bestimmten Umständen könnte die Bindung eines Kations an eine hochaffine Bindungsstelle den Transporter blockieren. Es ist von großem Interesse die Lokalisation von hochaffinen Bindungsstellen von rOCT1 zu ergründen, weil dies helfen kann, ihre Funktion beim Transportmechanismus zu verstehen. Die Erstellung von dreidimensionalen Dockingmodellen, Hemmstoffen oder Substraten an rOCT1 hilft bei der Identifizierung möglicher Aminosäuren, die an hochaffinen Bindungsstellen beteiligt sind. Grundlage der von Dr. Thomas Müller durchgeführten „Docking“ Modelle war das Tertiärstrukturmodell von rOCT1 (Vgl. Kapitel 1.1.3). Beim „Docking“ wird mit Hilfe eines komplexen, schrittweisen Stufenalgorithmus, unter Berücksichtigung der Bindungsenergie und der sterischen Kompatibilität eines Liganden, eine mögliche Bindungsstelle im Modell verifiziert (Rarey et al. 1996). In Abbildung 6 sind Ergebnisse des „Docking“ von TBuA an die C451M Variante von rOCT1, welche eine erhöhte Aktivität nach Expression in Oozyten aufweist, gezeigt.

(A)



(B)

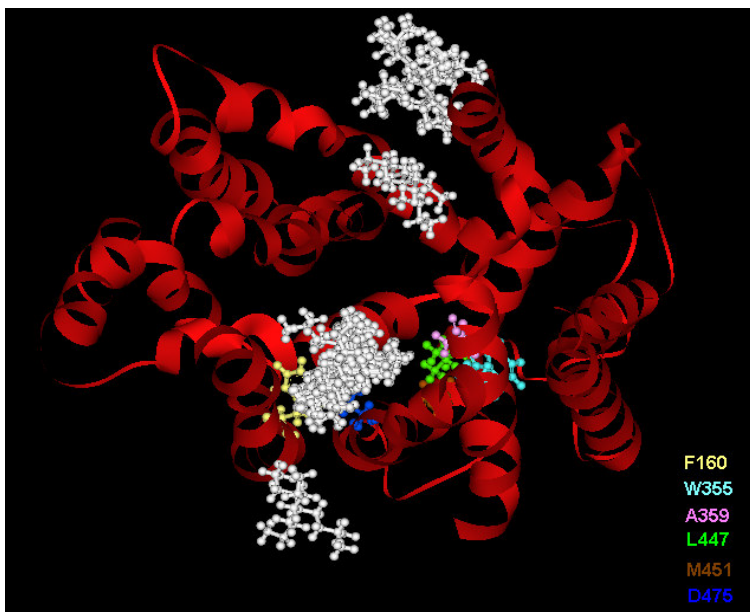


Abb. 6: Dockingmodell der dreidimensionalen Struktur von rOCT1\_C451M mit TBuA. (A) zeigt den Transporter in der nach außen offenen Konformation in Seitenansicht, (B) zeigt den Transporter in der nach außen offenen Konformation von außen. Die 12 Transmembrandomänen des Transporters sind als rote Schleifen dargestellt. Die Aminosäuren F160, L447, M451, D475, W355 und A359 sind bunt hervorgehoben. Die dreidimensionale Beziehung des Liganden TBuA (weiße Strukturmoleküle) ist als „Konformerwolke“ dargestellt und stellt alle errechneten Bindungspositionen von TBuA zu rOCT1 dar.

Mutageneseversuche von Volk et al. 2009 und Gorboulev et al. 1999 deuteten darauf hin, dass die Aminosäuren F160, L447 und D475 an der Bindung von TBuA beteiligt sind. So erhöhte sich die Affinität mit der TBuA nach Mutation der genannten Aminosäuren, die TEA-Aufnahme hemmte. Das in Abb. 6 gezeigte „Docking“-Modell unterstützt diese Interpretation. Im „Docking“-Modell von rOCT1 erscheinen zwei weitere Aminosäuren als mögliche Bindungspartner für TBuA. Es handelt sich um Alanin 359 und Tryptophan 355 in der putativen 7. Transmembrandomäne. Über die Bedeutung der Aminosäuren für den Transporter war zu Beginn meiner Arbeit noch nichts bekannt. Im „Docking“-Modell der Abb. 6 ist auch die Aminosäure in Position 451 hervorgehoben. Sie liegt in dem Modell an der Innenseite des rOCT1. Nach Austausch des Cysteins-451 durch ein Methionin wurde bei elektrophysiologischen Messungen eine mehrfach erhöhte maximale Transportrate beobachtet (Sturm et al. 2007). Diese rOCT1 Mutante eignet sich deshalb besonders gut für Transportmessungen. Die Aminosäure in Position 451 liegt nach dem Modell außerhalb der für die Bindung von Substraten und Hemmstoffen relevanten Region des Transporters.

### 1.3 Zielsetzung der Arbeit

Im „Docking“-Modell des rOCT1 wurden die Aminosäuren Alanin 359 und Tryptophan 355 in der siebten Transmembrandomäne als mögliche Bindungspartner des Hemmstoffs TBuA identifiziert. Da Untersuchungen von Gorbunov gezeigt hatten, dass rOCT1 eine niederaffine und zwei hochaffine Bindungsstellen für TBuA besitzt (Gorbunov et al. 2008), erschien es interessant zu untersuchen, ob diese Aminosäuren an der Interaktion von TBuA mit rOCT1 beteiligt sind. Um dies zu klären, wurden in der vorliegenden Arbeit Mutageneseversuche an den Aminosäuren A359 und W355 durchgeführt und es wurde untersucht, ob diese Mutationen die Hemmung des durch rOCT1 vermittelten Transportes verändern. Das unpolare Tryptophan 355 im rOCT1(C451M) wurde zum polaren Tyrosin mutiert. Alanin in Position 359 wurde zu Valin mutiert (vgl. Abbildung 20). Beide Mutationen führten zu einer

Erhöhung der Affinität, mit der TBuA den rOCT1 vermittelten Transport von MPP hemmt.

Da früher beobachtet wurde, dass die Affinität der TBuA-Hemmung des MPP-Transportes erhöht wird, wenn Phenylalanin 483 in der 11. TMD am äußeren Rande der nach außen offenen Substrattasche gegen Serin oder Cystein ausgetauscht wird (Gorbunov et al. 2008), wurde untersucht, ob die Erhöhung der Affinität von TBuA durch Mutationen in den Positionen 355 und 359 abhängig von der Mutation in Position 483 ist. In meiner Arbeit untersuchte ich somit folgende Mutanten: rOCT1(C451M) (Kontrolle), rOCT1(C451M/W355Y), rOCT1(C451M/A359V), rOCT1(C451M/F483S), rOCT1(C451M/W355Y/F483S) und rOCT1(C451M/A359V/F483S).

## 2. Material und Methodik

### 2.1 Verwendete Substrate und Hemmstoffe

Tetrabutylammonium (folglich als TBuA abgekürzt)

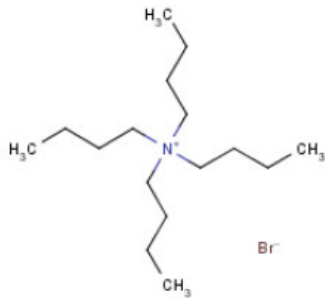


Abb. 7: Tetrabutylammonium

TBuA ist ein einfach positiv geladenes Kation und wurde als Hemmstoff bei Hemmkinetiken eingesetzt. TBuA kann die Zellmembran nicht passiv durchdringen und wird nicht von rOCT1 transportiert. Es eignet sich deshalb zur Untersuchung der Hemmung von rOCT1 von extrazellulär. TBuA wurde von Biotrend Chemikalien GmbH in Köln bezogen.

Tetraethylammonium (unten als TEA bezeichnet)

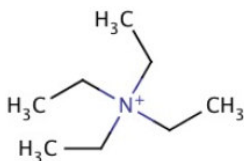


Abb. 8: Tetraethylammonium

TEA ist ein einfach positives Kation und wird von rOCT1 transportiert. Ursprünglich wurde es in der Neurophysiologie verwendet um Kaliumkanäle an Tintenfischaxons zu blockieren (Armstrong CM, 1969). TEA wurde von Biotrend Chemikalien GmbH aus Köln bezogen.

1-methyl-4-phenyl-pyridinium (unten als MPP bezeichnet)

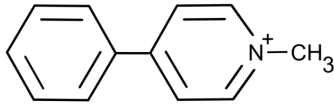


Abb. 9: 1-methyl-4-phenyl-pyridinium

MPP ist ein einfach positiv geladenes Kation und ein neurotoxisches Gift. Es ist ein Abbauprodukt des N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), das bei unsachgemäßem Gebrauch aus der Designerdroge 1-methyl-4-phenyl-4-propionoxy-piperidine (MPPP) entsteht und ähnliche Symptome verursacht wie das Krankheitsbild Parkinson (Burns RS et al. 1983) (Langston JW et al. 1983). Es ist wie TEA ein etabliertes Modellsubstrat von rOCT1 und anderen OCT Transportern. Es wurde ebenfalls von Biotrend Chemikalien GmbH aus Köln bezogen.

[<sup>14</sup>C] Tetraethylammonium (unten [<sup>14</sup>C]TEA abgekürzt)

Das mit dem Kohlenstoffisotop [<sup>14</sup>C] markierte TEA wurde bei Substratkinetiken zusammen mit nicht radiomarkiertem TEA verwendet. Es wurde von American Radiolabeled Chemicals, Inc., St. Louis, USA bezogen. Die spezifische Radioaktivität betrug 55 mCi/mmol.

Methyl-4-phenylpyridinium N-[methyl-<sup>3</sup>H] (unten [<sup>3</sup>H]MPP abgekürzt)

Das Tritium markierte [<sup>3</sup>H]MPP wurde ebenfalls von American Radiolabeled Chemicals, Inc., St. Louis, USA bezogen. Die spezifische Radioaktivität betrug 85 Ci/mmol.

## 2.2 Das Oozytenexpressionsmodell

Oozyten von *Xenopus laevis* sind mit einem Durchmesser von bis zu 1,3 mm sehr große Eizellen. Sie repräsentieren mit ihrem komplett funktionsfähigen Zellapparat und der damit verbundenen Fähigkeit aus genetischer Information, in diesem Fall in Form der mRNA des rOCT1, mittels Translation ein Membranprotein in ausreichender Zahl herzustellen und in ihrer eigenen Zellmembran zu exprimieren, ein sehr spezifisches Werkzeug für die Erforschung von Transportproteinen (Gurdon et al. 1971).

### 2.2.1 Der Krallenfrosch - *Xenopus laevis*



Abb.10: *Xenopus laevis* aus: [de.wikipedia.org](https://de.wikipedia.org)

Der Krallenfrosch, auch Apothekerfrosch genannt, gehört innerhalb der Ordnung der Froschlurche zu der Familie der Pipidiea (Zungenlosen) und wird dort der Gattung der Krallenfrösche zu geordnet. Sein natürlicher Lebensraum erstreckt sich in Afrika über das Gebiet südlich der Sahara. Er ist durch die jahrelange Nutzung als Labortier auch in Europa und in den USA in einigen Teichen und Tümpeln zu finden. Sie ernähren sich normalerweise von im Wasser lebenden Insekten oder Würmern. In unserem Institut lebten sie in Wasserbecken, die etwa die Größe einer kleinen Badewanne haben. Durch künstliches Licht wird ein Tag-Nacht-Rhythmus simuliert. Gefüttert wurden die Tiere zweimal die Woche mit Rinderherzstücken, die mit Vitaminen und Mineralien angereichert waren. Die Frösche wurden von unterschiedlichen

Lieferanten bezogen (Kähler, Hamburg; Nasco, Fort Atkinson, USA und African Xenopus Facility, Knysna, Südafrika).

### 2.2.2 Die Herstellung der Oozytenringerlösung (ORI)

Damit die *Xenopus laevis*-Oozyten *in vitro* am Leben erhalten werden, wurde eine spezielle Oozytenringerlösung (kurz: ORI) zunächst in einer 10-fachen Konzentrierung hergestellt. Mit einer Waage wurden (Jordan Sartorius AG, Göttingen) jeweils 100mM NaCl (Sigma-Aldrich, Seelze), 3mM KCl (Roth, Karlsruhe), 2mM CaCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, Seelze), 1mM MgCl<sub>2</sub> (Fluka - Sigma-Aldrich, Neu-Ulm) 5mM MOPS (Applichem, Darmstadt) abgewogen, in entmineralisiertem Wasser gelöst und mit NaOH auf einen pH von 7,4 titriert. Diese Lösung wurde in einem Autoklav (Varioklav 300 EP, H + P Labortechnik GmbH, Hackermoos) sterilisiert und bei +4°C im Kühlraum gelagert. Je nach Bedarf konnte eine ORI-Lösung mit entmineralisiertem Wasser in der gewünschten Konzentration herunterverdünnt werden. Um einem möglichen Bakterienwachstum während der Lagerung der Oozyten entgegen zu wirken, wurde der Oozytenringerlösung prophylaktisch 50mg/l Gentamicin (Applichem, Darmstadt) beigefügt.

### 2.2.3 Gewinnung der Oozyten durch Laparotomie eines Krallenfrosches

Die Krallenfrösche wurden in etwa 150 Liter großen Becken gehalten. Hiervon waren mehrere vorhanden, sodass operationsfähige Frösche getrennt von erst kürzlich operierten Fröschen gehalten werden konnten. Insgesamt konnte ein Frosch mindestens zweimal, manchmal, vorausgesetzt die Erholungszeit war ausreichend, auch viermal oder öfter operiert werden.

Der zu operierende Frosch wurde mit einem Fangnetz aus seinem Becken gefischt und in einen Behälter mit darin befindlicher dreiprozentiger Tricainlösung (Sigma-Aldrich, Seelze) gelegt. Tricain ist ein anerkanntes Narkotikum bei Tierversuchen mit Fröschen. Es wird über die Haut absorbiert



und versetzt den Frosch innerhalb kurzer Zeit in einen narkoseähnlichen Zustand. Die Narkosetiefe kann durch Testung des Schluckreflexes überprüft werden. Der betäubte Frosch wurde auf Eis gelagert und konnte bei semisterilen Bedingungen mittels eines paramedianen Unterbauchschnittes laparotomiert werden. Nach Durchtrennung der Haut, der Bauchwandfaszie und der Bauchmuskulatur zeigten sich die Ovarien, in denen bereits makroskopisch tausende Oozyten zu erkennen waren. Hiervon wurde die benötigte Menge entnommen und in eine mit ORI befüllte Petrischale (Cellstar Tissue Culture Dishes, Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen) gelegt. Die Bauchwand wurde mittels Seidenfaden (4-0, weiß, sterilisiert; Vömel, Kronberg) in Einzelknopfnahntechnik verschlossen. Zum Aufwachen legte man den Frosch in ein flaches, warmes Wasserbad. Etwa 24 Stunden später konnte der Frosch wieder in das Becken zu seinen Artgenossen gesetzt werden.

Die Oozyten waren bei der Entnahme noch in ein dichtes Geflecht aus Gefäßen und Bindegewebe eingebettet. Die entnommenen Teile des Eierstocks wurden manuell mit zwei Pinzetten zu kleineren Stücken präpariert. Danach wurde 1mg/ml Kollagenase (Sigma-Aldrich, Seelze oder ICN Biomedicals, Eschwege) zugesetzt und anschließend über Nacht bei 16°C inkubiert. Zur Entfernung des Follikel epithels wurden die Oozyten am nächsten Tag großzügig in Calcium - freiem ORI (gleiche Herstellung wie bereits beschrieben, nur unter Weglassung von CaCl<sub>2</sub>) gewaschen und waren bereit für die Nutzung im Experiment.

#### 2.2.4 Auswahl der Oozyten

Zur Auswahl lagen die Oozyten zu Hunderten in einer mit ORI gefüllten, großen Petrischale. Die Oozyten wurden durch eine Pasteurpipette unter einem Mikroskop (Wild M3; Objektiv Zeiss 16x, Wild Herbrugg AG, Heerbrugg, Schweiz) bei Bestrahlung mit einer Kaltlichtquelle (KL 1500 electronic, Schott AG, Mainz) eingesaugt und in eine extra dafür, mit ORI gefüllte, zweite Petrischale übertragen. Hierbei wurden generell nur Oozyten der Stadien 5 und 6 nach Dumont ausgewählt (Dumont JN, 1972). Vgl. Abbildung 11.



Abb. 11: Oozyten von *Xenopus laevis*. Zu erkennen sind verschiedene Exemplare im Stadium nach Dumont 5 bis 6, die sich an einem klar voneinander getrennten pigmentierten und unpigmentierten Pol erkennen lassen (aus [www.innovations-report.de](http://www.innovations-report.de)).

Sie haben einen voll ausgebildeten Translationsapparat und können fremde Transportproteine in der äußeren Membran exprimieren. Zusätzlich wurde auf Konstitution, Größe und gleichmäßige Pigmentierung geachtet. Außerdem wurden nur Oozyten ausgewählt, die gänzlich frei von Follikelepithel und vollständig aus dem Bindegewebsnetz gelöst waren. Je nach Versuch wurden auf diese Weise zwischen 100 und 400 Oozyten selektiert.

#### 2.2.5 Injektion der Oozyten mit mRNA

Die genetischen Mutationen der DNA des rOCT1 wurden von Herrn Dr. Valentin Gorboulev durchgeführt. Die Herstellung der RNA aus DNA wurde von Frau Irina Schatz übernommen. Die genaue Methodik der Mutation und Klonierung von cDNA und die Herstellung von mRNA ist unter anderem in Sturm et al. 2007 dargestellt. Die verwendete mRNA wurde zur Injektion auf eine Konzentration von  $0,2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  verdünnt. Hierzu wurde spezielles RNA-ase freies Wasser verwendet. Die Proben wurden bei  $-18^{\circ}\text{C}$  in speziellen Reaktionsgefäßen (Eppendorf AG, Hamburg) gelagert. Zunächst wurde mittels eines Mikroelektrodenausziehgerätes, eines sogenannten Pullers, (P30 Sutter Instrument Company, Novato, USA) aus einer Glaskanüle (GB 150 F-8P,

Science Products GmbH, Hofheim) mit einem Außendurchmesser von 1 mm und einem Innendurchmesser von 0,5 mm eine spitze Injektionskanüle hergestellt. Die Mikroinjektionskanüle wurde mit Öl gefüllt und in einen Mikroinjektor (Modell RP Brinkmann Instruments, Mississauga, USA) eingespannt. Die mRNA wurde mit einer Pipette (Pipettenspitze 10µl der Saarestedt AG, Nümbrecht) in ein mit Öl gefülltes kleines Gefäß pipettiert. Danach konnte die benötigte Menge RNA, meist zwischen 2 – 4 µl, mittels des Injektors unter dem Mikroskop in die Injektionskanüle aufgesogen werden. Pro Oozyte wurde 50 nl RNA injiziert, und zwar an der Grenze der hypopigmentierten Zone der Oozyte. Nach erfolgter Injektion wurden die beimpften Oozyten in 6er Vertiefungsplatten (Cellstar "X"-Well Culture Plate, Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen) pipettiert, die mit Gentamicin-haltigem ORI befüllt waren. Zusätzlich wurde eine ausreichende Zahl an nicht beimpften Oozyten in Gentamicin-haltigem ORI als Kontrolle aufbewahrt und zusammen mit den injizierten Eizellen in einen Inkubator (Peltier-Kühlbrutschrank IPP 400, Memmert GmbH & Co KG, Schwabach) gestellt und bei +16°C 2 bis 4 Tage inkubiert. Im Laufe der Inkubationszeit wurden die Oozyten täglich kontrolliert, unbrauchbare Exemplare aussortiert und die verbliebenen Oozyten in andere Behältnisse mit frischer ORI-Lösung pipettiert.

## 2.3 Die „Tracer-Flux“-Messung

### 2.3.1 Die Hemmkinetik

Ziel ist es hierbei, den Transport des Substrates bei unterschiedlichen Hemmstoffkonzentrationen zu testen, um Erkenntnisse über die Affinität des Hemmstoffes zum Transporter zu gewinnen. Die Konzentrationen des Hemmstoffes wurden so gewählt, dass sich die zu erwartende Inhibitionskonstante ( $IC_{50}$ ) etwa im Mittelfeld der Konzentrationswerte befand.

Die Oozyten wurden jeweils zu zehnt in ein Reaktionsgefäß (2 ml Eppendorf, Hamburg) zusammen mit ORI pipettiert. Die einzelnen Anteile von ORI,

Substraten und Hemmstoffen ergaben insgesamt 200  $\mu$ l. Zusätzlich wurden jeweils zwei Überstände zu je 10  $\mu$ l entnommen, um eine quantitative Kontrolle der tatsächlichen Substratkonzentration pro Ansatz zu haben. Um die Transportrate der endogenen Zellproteine der Oozyten von der Transportrate durch rOCT1 unterscheiden zu können, wurden je zwei Reaktionsgefäße mit nicht injizierten Oozyten vorbereitet. Die restlichen sieben bis acht Ansätze repräsentierten die unterschiedlichen Konzentrationen des Hemmstoffes, von einem Ansatz gänzlich ohne Hemmstoff bis hin zu einem Ansatz mit maximaler Hemmstoffkonzentration. Es wurde nach einem festen Zeitplan vorgegangen, sodass sowohl der Hemmstoff als auch das radioaktive Substrat jeweils 30 Minuten mit der Eizelle interagieren konnten. Während der Reaktionszeit wurden die Reaktionsgefäße auf ein Schüttelgerät (Köttermann GmbH & Co KG, Hänigsen) gestellt. Exakt 30 Minuten nach Verabreichung des radioaktiv markierten Substrates wurde die Reaktion in eiskaltem ORI beendet, die Oozyten vierfach gewaschen und einzeln in Szintillationsgefäße (Mini-Vial 6ml, Sarstedt AG, Nümbrecht) pipettiert. Um die Membran der Oozyten aufzulösen, wurden 100 $\mu$ l fünfprozentiger SDS-Lösung ergänzt und eine Stunde auf einen Schüttler gestellt. Danach wurden 1 ml Szintillationsflüssigkeit (Lumasafe plus, PerkinElmer, Groningen, Niederlande) eingefüllt, die Vials beschriftet und in einen Szintillationszähler (Counter) (LS 6500, Drucker Epson LX 650, Beckman Coulter, Inc., Brea, USA) gestellt.

Die ermittelte Anzahl an Counts (radioaktiven Zerfällen) pro Oozyte wurde ermittelt und entsprach somit der aufgenommenen Menge des Substrates in einer bestimmten Zeit. Aus diesen Messgrößen wurde der sogenannte IC<sub>50</sub>-Wert ermittelt. Dieser ist die Konzentration eines Inhibitors, bei der die halbmaximale Hemmung des Transporters beobachtet wird.

### 2.3.2 Die Substratkinetik

In Ansatz und Durchführung ähnelt dieses Experiment dem einer Hemmkinetik, die oben bereits ausführlich beschrieben wurde, nur mit dem Unterschied, dass

statt eines Hemmstoffes ebenso ein Substrat verwendet wird, und zwar das kalte Pendant des radioaktiv markierten Substrates. In diesem Zusammenhang ist die Ermittlung der Substrataffinität zum Transporter möglich und wird mithilfe der Michaelis-Menten-Konstante bestimmt. Sie ist diejenige Substratkonzentration, bei der der Transporter halbmaximal mit Substrat gesättigt ist.

#### 2.4 Statistik und Datenauswertung

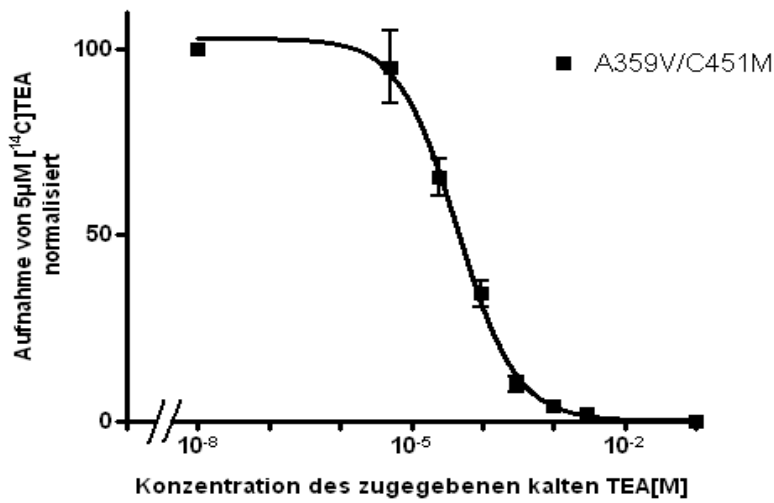
Oozyten von verschiedenen Fröschen unterliegen hinsichtlich Transporteigenschaft aufgrund von individuellen Qualitäts- und Expressionsunterschieden einer natürlichen Streuung. Daher wurde die absolute Aufnahmerate mittels Microsoft Excel (Microsoft Corporation, One Microsoft Way Redmond, WA 98052-6399, USA) zunächst normalisiert. Die Mittelwerte der mit Wasser injizierten Oozyten wurden folglich zunächst von allen übrigen Einzelwerten abgezogen, um die Statistik durch die Transportrate der endogenen Transporter der Oozyte nicht zu verfälschen. Der Mittelwert derjenigen Oozyten, denen kein Inhibitor beigefügt wurde, wurde als 100 Prozent Transportrate definiert und die Transportraten der Oozyten mit Hemmstoff daran, anteilig in Prozent angegeben. Mit Hilfe der Software Prism 4.0 (GraphPad Software, La Jolla, USA) erfolgte die statistische und graphische Auswertung der Daten. Substratkinetiken wurden mittels Michaelis-Menten-Gleichung, Hemmkinetiken mittels der Hill-Gleichung gefittet. Die ermittelten Konstanten wurden als Mittelwerte  $\pm$  SEM (Standardfehler) angegeben und auf eine Dezimalstelle gerundet. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Anova-Test und einem post hoc-Test nach Tukey ermittelt. Als signifikant wurde ein p-Wert von  $< 0,05$  angesehen. Wenn nur zwei Werte miteinander verglichen wurden oder wenn der Anova-Test wegen zu großer Unterschiede der Werte in einer analysierten Gruppe in seiner Aussagekraft bezüglich des Vergleiches der Differenz zweier Werte nicht sinnvoll limitiert erschien, wurde die Signifikanz der Mittelwerte zweier Mutanten mithilfe des Student t-Testes bestimmt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Mutationseffekte von W355Y und A359V auf die Affinität des TEA-Transportes

Bei den rOCT1 Mutanten W355Y/C451M, A359V/C451M überprüfte ich, ob Punktmutationen eine Änderung der Michaelis-Menten-Konstante des Transportes des TEA bewirken. Die mRNA der Mutanten wurde in Oozyten injiziert und die Oozyten wurden 3 Tage lang inkubiert. Danach wurde die Aufnahme des radioaktiv markierten TEA in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen nicht radioaktiven TEA gemessen und unter Verwendung der Michaelis-Menten-Gleichung an die Messwerte angepasst. (vgl. Abb.12). Für die Mutante C451M/W355Y (n=3) wurde eine Michaelis-Menten-Konstante ( $K_{m(\text{TEA})}$ ) von  $43.1 \pm 9.5 \mu\text{M}$  (n=3), für die Mutante C451M/A359V ein  $K_{m(\text{TEA})}$  Wert von  $45.0 \pm 4.6 \mu\text{M}$  erhalten. Für Kontrollmutante C451M hatte Dr. Volk in früheren Untersuchungen einen  $K_{m(\text{TEA})}$  Wert von  $65 \pm 18 \mu\text{M}$  (n=5) bestimmt (Volk et al. Mol. Pharmacol 76: 275-289. 2009). Durch die Mutationen A359V und W355Y ergaben sich somit keine statistisch signifikanten Änderungen der  $K_m$  Werte für TEA. Es ist deshalb unwahrscheinlich, dass die Aminosäuren 359 und 355 während des Transportes von TEA direkt mit TEA interagieren. Offenbar entstehen durch die Mutationen auch keine messbaren allosterischen Effekte auf die an der TEA-Bindung beteiligten oder für die Transportaffinität von TEA relevanten Regionen des Transporters. Auffällig war jedoch eine stark reduzierte Transportaktivität der Oozyten für TEA nach Mutation von A359V. So betrug die durchschnittliche maximale Transportrate von rOCT1(C451M/A359V) nur  $9.36\% \pm 1.89\%$  (n=3) der von rOCT1(C451M/W355Y). Die möglichen Gründe für die Abnahme der Transportaktivität der Oozytenmembran nach Mutation von A359V werden in Kapitel 4.3 diskutiert.

a



b

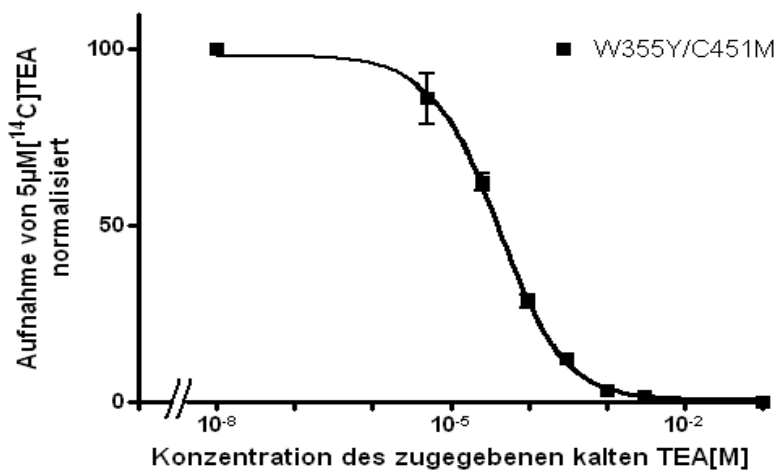


Abb. 12: Substratabhängigkeit der TEA-Aufnahme für (a) A359V/C451M und (b) W355Y/C451M. Beide Transporter wurden in Oozyten exprimiert. Die Aufnahme von 5 µM (<sup>14</sup>C)TEA wurde in Gegenwart verschiedener Konzentrationen nicht radioaktiven TEA gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte+S.E.M. aus je 3 Einzelexperimenten mit jeweils 10 Einzelmessungen. Die Kurve wurde unter Verwendung der Michaelis-Menten-Gleichung an die Messwerte angepasst.

### 3.2 Mutationseffekte von W355Y und A359V auf die Affinität des MPP-

#### Transportes

In früheren Studien wurde gezeigt, dass Punktmutationen in rOCT1 bei manchen Substraten oder Hemmstoffen zu einer Änderung der Affinitäten führen, während sie bei anderen Substraten oder Hemmstoffen keine messbaren Effekte zeigten (siehe z. B. Gorboulev et al. 1999). Diese Beobachtungen wurden mit der Hypothese, dass die organischen Kationentransporter überlappende Bindungsregionen für Substrate und/oder Hemmstoffe besitzen, erklärt. Bei meinen Untersuchungen habe ich die Effekte der beiden Mutationen auf die  $K_m$  Werte für ein weiteres Substrat untersucht. Wegen der sehr schlechten Transportaktivität der A359V-Mutante für TEA interessierte mich auch die Frage, ob diese Mutante vielleicht eine höhere Transportaktivität für MPP besitzt. MPP ist ähnlich wie TEA ein häufig benutztes Modellsubstrat für OCTs. Für die Hemmung der durch die Kontrollmutante rOCT1(C451M) vermittelten Aufnahme von 5  $\mu\text{M}$  TEA durch MPP, hatte C. Volk in früheren Untersuchungen einen  $\text{IC}_{50}$  Wert von  $9.4 \pm 1.3 \mu\text{M}$  bestimmt (siehe Tabelle 2 in Volk et al. Mol. Pharmacol 76: 275-289. 2009). Dieser Wert repräsentiert den  $K_i$  Wert für MPP, muss aber nicht mit dem  $K_m$  Wert für MPP identisch sein.

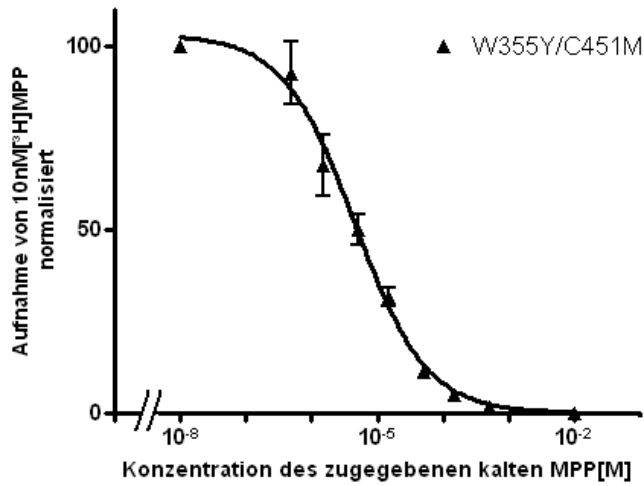
Ich habe die rOCT1 Mutanten W355Y/C451M und A359V/C451M in Oozyten exprimiert und die Aufnahme von radioaktiv markiertem MPP in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von nicht radioaktiv markiertem MPP gemessen. Unter Verwendung der Michalis-Menten-Gleichung habe ich die Kurve an die Messwerte angepasst (vgl. Abb. 13) und die apparenten  $K_m$  Werte bestimmt. Für die W355Y/C451M-Mutante bestimmte ich einen  $K_m$  Wert von  $2.6 \pm 1.5 \mu\text{M}$  ( $n=4$ ) und für die A359V/C451M-Mutante einen  $K_m$  Wert von  $3.0 \pm 1.3 \mu\text{M}$  ( $n=4$ ). Die für beide Mutanten bestimmten  $K_m$ -Werte unterscheiden sich nicht. Sie sind etwas niedriger als der ebenfalls an Oozyten gemessene  $K_m$  Wert für die durch den rOCT1 Wildtyp vermittelte MPP-Aufnahme, der  $5.1 \pm 0.5 \mu\text{M}$  ( $n=3$ ) betrug (vgl. Gorboulev et al. 1999, Mol Pharmacol). Da bisher unveröffentlichte Messungen von H. Koepsell an stabil transfizierten HEK293



Zellen zeigen, dass die C451M-Mutation den  $K_m$ -Wert von MPP nicht beeinflusst, kann geschlossen werden, dass die Mutationen W355Y und A359V keinen signifikanten Einfluss auf den  $K_m$ -Wert von MPP haben.

Nach Mutation von A359V war die Transportaktivität deutlich erniedrigt. Sie betrug  $13,3\% \pm 6,27\%$  ( $n=4$ ) im Vergleich zur W355Y-Mutante. Es zeigte sich somit auch für MPP, ähnlich wie für TEA, eine deutlich signifikante Erniedrigung der durchschnittlichen Transportrate. Allerdings war die Erniedrigung der Transportrate für den Transport von MPP weniger ausgeprägt als für den Transport von TEA (Diskussion siehe Kapitel 4.3).

a



b

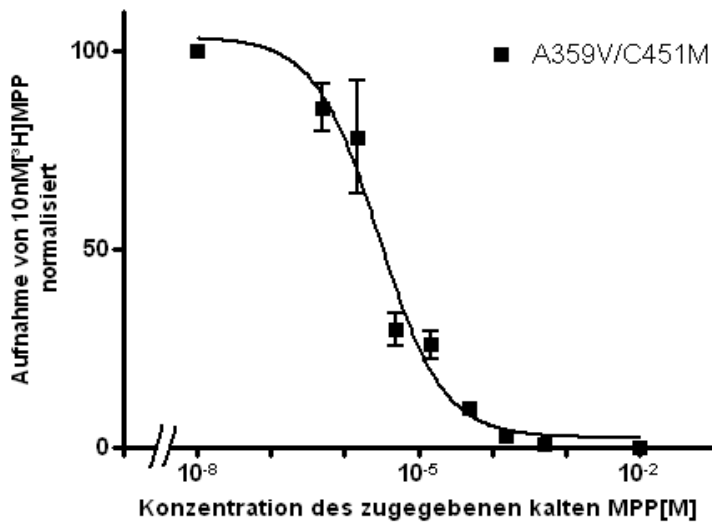


Abb. 13: Substratabhängigkeit der MPP-Aufnahme für (a) W355Y/C451M und (b) A359V/C451M. Beide Transporter wurden in Oozyten exprimiert. Die Aufnahme von 10nM [<sup>3</sup>H]MPP wurde in Gegenwart verschiedener Konzentrationen des nicht radioaktiv markierten MPP gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± S.E.M. aus je 3 Einzelexperimenten mit jeweils 10 Einzelmessungen. Die Kurve wurde mit Hilfe der Michaelis-Menten-Gleichung an die Messwerte angepasst.

### 3.3 Mutationseffekte von W355Y und A359V auf die Affinität von TBuA

Um die Bedeutung der beiden Aminosäuren 355 und 359 in der putativen 7. Transmembrandomäne, die im „Docking“-Modell (vgl. Abb. 6) als potenzielle Bindungspartner von Hemmstoff TBuA identifiziert worden waren, zu eruieren überprüfte ich, ob die Mutationen A359V und W355Y die Affinität der TBuA-Hemmung des Transportes beeinflussen. Hierzu wurden [<sup>14</sup>C]TEA-TBuA-Hemmkinetiken an den Mutanten W355Y/C451M und A359V/C451M durchgeführt. Für die TBuA-Hemmung des durch die Kontrollmutante rOCT1(C451M) vermittelten TEA induzierten Stroms bei -50 mV hatte Dr. C. Volk einen  $K_i$  Wert von  $3,5 \pm 1,1 \mu\text{M}$  ( $n=4$ ) berechnet (vgl. Tabelle 3 in Volk et al. Mol. Pharmacol 76: 275-289. 2009). Die von mir durch Aufnahmestudien mit radioaktiv markiertem TEA ebenfalls an Oozyten erhobenen  $IC_{50}$ -Werte entsprechen  $K_i$ -Werten, da die gewählte Substratkonzentration von TEA mit  $5 \mu\text{M}$  weit unter den jeweiligen  $K_m$ -Werten für TEA liegt. An den in Oozyten exprimierten Mutanten habe ich die Aufnahme von  $5 \mu\text{M}$  [<sup>14</sup>C]TEA in Gegenwart verschiedener TBuA-Konzentrationen (0, 0.5, 1, 3, 10, 30, 100, 300  $\mu\text{M}$ ) gemessen. Wie in den oben beschriebenen Versuchen zeigte die A359V-Mutante eine erheblich reduzierte Transportaktivität. In der durchgeführten Versuchsserie entsprach die Transportaktivität lediglich 5% der Transportaktivität von W355Y. Ich konnte deshalb keine aussagekräftige Auswertung der durchgeführten Versuche durchführen. Die W355Y Mutante im rOCT1(C451M) Hintergrund zeigte auch bei dieser Versuchsserie eine solide Transportaktivität für TEA. Für die halbmaximale Hemmung ( $IC_{50}$ ) berechnete ich einen Wert von  $5.0 \pm 0.4 \mu\text{M}$  ( $n=3$ ). Die Hemmkurve ist in Abbildung 14 dargestellt. Demnach zeigte die Mutante rOCT1(C451M/W355Y) eine ähnliche Affinität für die Hemmung der TEA-Aufnahme durch TBuA wie die Kontrollmutante rOCT1(C451M).

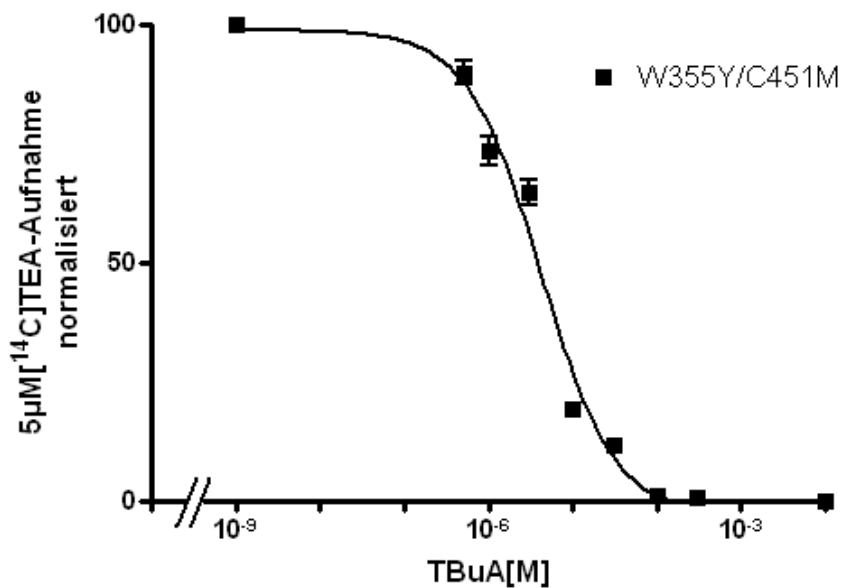
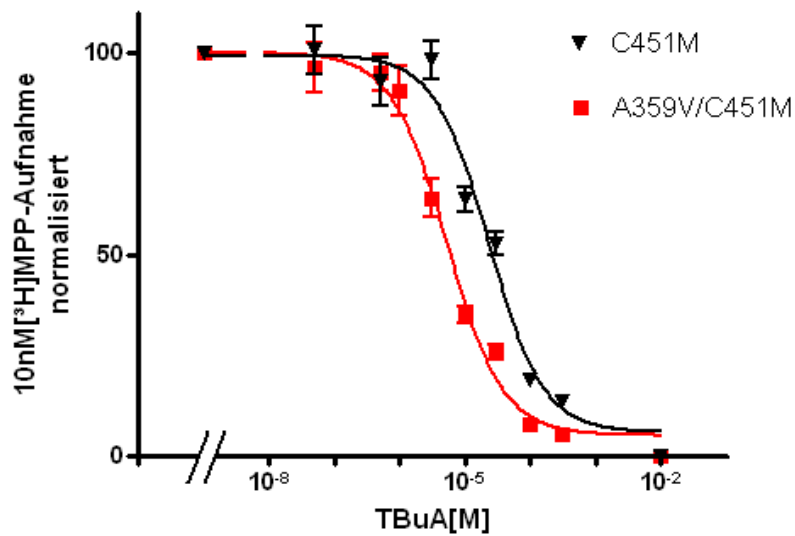


Abb. 14: TEA-TBuA-Hemmkinetik: rOCT1\_W355Y\_C451M wurde in Oozyten exprimiert. Die Aufnahme von 5 μM (<sup>14</sup>C)TEA wurde in Gegenwart verschiedener Konzentrationen TBuA (Messpunkte: ~ 0, 0.5, 1, 3, 10, 30, 100, 300 μM) gemessen. Die normalisierten Mittelwerte ± S.E.M. der [<sup>14</sup>C]TEA - Aufnahme aus 4 Einzelexperimenten mit je 10 Einzelmessungen sind gegen die TBuA-Konzentration aufgetragen. Die Kurve wurde mittels Hill-Gleichung an die Messwerte angepasst.

Da die A359V-Mutante höhere Transportraten für MPP als für TEA zeigte und ich wissen wollte, ob die Affinität der TBuA-Hemmung, des durch rOCT1 vermittelten Transportes, abhängig vom benutzten Substrat ist, untersuchte ich auch die TBuA-Hemmung der MPP-Aufnahme. Substratabhängige Effekte an OCTs wurden bereits in F. Thevenod et al. 2013 beschrieben. Für die Messungen benutzte ich eine [<sup>3</sup>H]MPP-Konzentration von 0,01 μM, die weit unter den für die MPP-Aufnahme bestimmten  $K_m$ -Werten um 5 μM lagen. Die berechneten  $IC_{50}$ -Werte entsprechen den, unter diesen Bedingungen gemessenen,  $K_i$ -Werten für TBuA. Für die Hemmung, des durch die Kontrollmutante rOCT1(C451M) vermittelten MPP-Transportes, bestimmte ich einen  $IC_{50}$ -Wert von  $26.8 \pm 4.0$  μM (n=3) (Messung siehe Abb. 15). Bemerkenswerterweise ist demnach die Affinität von TBuA für die Hemmung der MPP-Aufnahme durch die Kontrollmutante rOCT1(C451M) deutlich niedriger als für die Hemmung der TEA-Aufnahme. Die Mutationen W355Y und A359V führten

beide zu einer deutlichen Erhöhung der Affinität von TBuA, die in beiden Fällen ähnlich war. Für die TBuA-Hemmung der durch rOCT1(C451M/W355Y) vermittelten Aufnahme von 0.01  $\mu\text{M}$  MPP bestimmte ich einen  $\text{IC}_{50}$  - Wert von  $5.7 \pm 1.0 \mu\text{M}$  ( $n=4$ ) (vgl. Abb. 15b), für die durch rOCT1(C451M/A359V) vermittelte MPP-Aufnahme einen  $\text{IC}_{50}$  - Wert von  $5.4 \pm 0.9 \mu\text{M}$  ( $n=4$ ) (vgl. Abb. 15a). Die für die durch diese Mutanten vermittelten  $\text{IC}_{50}$ -Werte für die TBuA-Hemmung entsprechen dem von Markus Leistner in seiner Dissertationsarbeit berichteten Wert für die TBuA-Hemmung der MPP-Aufnahme durch den rOCT1-Wildtyp berichteten Wert von  $8.1 \pm 1.8 \mu\text{M}$  (vgl. Leistner Tabelle 3 - 4) (siehe 4. Diskussion).

a



b

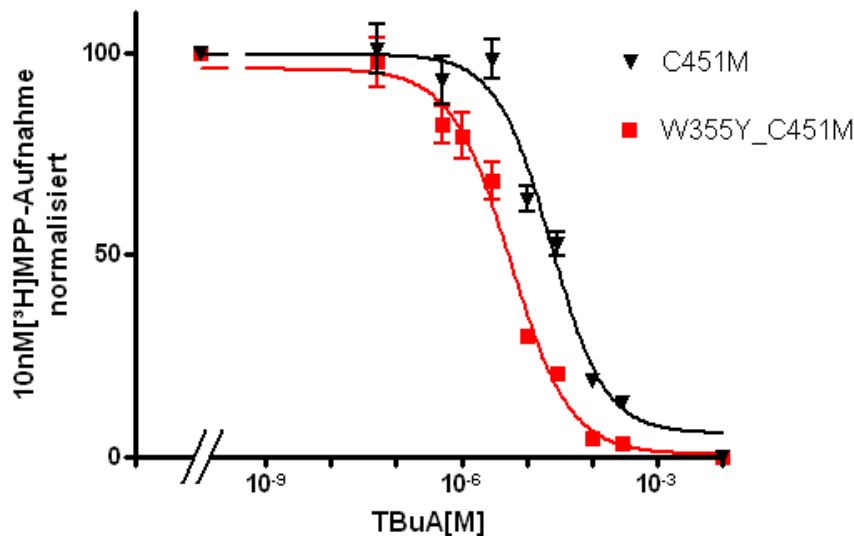


Abb. 15: MPP-TBuA-Hemmkinetiken für (a) A359V/C451M und (b) W355Y/C451M, die jeweils gegen die Kontrollmutante C451M aufgetragen sind. Die Transporter wurden in Oozyten exprimiert. Die Aufnahme von 10nM [<sup>3</sup>H]MPP wurde in Gegenwart verschiedener Konzentrationen TBuA (Messpunkte: ~ 0, 0.5, 1, 3, 10, 30, 100, 300 μM) gemessen. Die normalisierten Mittelwerte ± S.E.M. der [<sup>3</sup>H]MPP-Aufnahme aus je 4 Einzelexperimenten mit jeweils 10 Einzelmessungen sind gegen die TBuA-Konzentration aufgetragen. Die Kurve wurde mittels Hill-Gleichung den Messwerten angepasst.

### 3.4 Erhöhung der Affinität der TBuA-Hemmung der MPP-Aufnahme nach einer Mutation am äußeren Rand der Substratbindungstasche

In früheren Untersuchungen war für eine, an Cysteinresten verarmte, rOCT1 Variante beschrieben worden, dass der Austausch von Phenylalanin 483 gegen Serin zu einer Affinitätserhöhung der TBuA-Hemmung des Transportes von MPP führte (Gorbunov et al. 2008, Sturm et al. 2007, Egenberger et al. 2012). Bei der verwendeten Variante rOCT1(10ΔCys) waren alle Cysteinreste mit Ausnahme der 6 Cysteinreste in der großen extrazellulären Schleife durch Alanin, Serin oder im Falle von Cystein 451 durch Methionin ersetzt. Herr Gorbunov, ein Doktorand aus der Arbeitsgruppe von H. Koepsell, bestimmte für die TBuA-Hemmung der MPP-Aufnahme durch rOCT1(10ΔCys) einen  $IC_{50}$  Wert von  $460 \pm 60$  nM und für die TBuA-Hemmung der MPP-Aufnahme durch rOCT1(10ΔCys, F483S) einen  $IC_{50}$ -Wert von  $19 \pm 4$  nM (Gorbunov et al. 2008). Diese Werte konnten jedoch nicht von Frau Egenberger, die später in die Arbeitsgruppe von H. Koepsell kam, bestätigt werden. Frau Egenberger beobachtete zwar wie Herr Gorbunov, dass der Austausch von Phenylalanin 483 gegen Serin in der rOCT1(10ΔCys)-Variante zu einer Erhöhung der Affinität der TBuA-Hemmung der MPP-Aufnahme führte, sie bestimmte jedoch viel niedrigere  $IC_{50}$ -Werte für TBuA. Für die TBuA-Hemmung der MPP-Aufnahme durch rOCT1(10ΔCys) und rOCT1(10ΔCys/F483S) erhielt Frau Egenberger  $IC_{50}$  Werte von  $22.9 \pm 0.9$   $\mu$ M bzw.  $2.09 \pm 0.74$   $\mu$ M (vgl. Tabelle 1 in Egenberger et al. 2012). Da die Fluoreszenzuntersuchungen von Herrn Gorbunov und Frau Egenberger (Gorbunov et al. 2008, Egenberger et al. 2012) übereinstimmend zeigten, dass sich die Aminosäure in Position 483 bewegt, wenn TBuA an den Transporter bindet, diese Aminosäure jedoch am peripheren Rand der Substratbindungstasche von rOCT1 am Übergang der 11. Transmembrandomäne in der kurzen extrazellulären Schleife zwischen der 11. und 12 TMD liegt (vgl. Abb. 16.), interessierte mich die Frage, ob die durch Mutationen in den Positionen 355 und 359 innerhalb der Substratbindungstasche bedingten Veränderungen der Affinität von TBuA durch den Austausch von Phenylalanin 483 gegen Serin beeinflusst wird.

Entsprechend dem Modell der Tertiärstruktur von rOCT1 muss die Erhöhung der Affinität von TBuA durch die F483S-Mutation durch einen quasi allosterischen Effekt dieser Mutation auf die Bindung von TBuA in der Substratbindungstasche erklärt werden. Falls W355 und A359 direkt an der TBuA-Bindung beteiligt sind, sollten Mutationen in diesen Positionen auch auf dem F483S-Hintergrund nicht ohne Wirkung auf die TBuA-Affinität sein. Um zu überprüfen, ob die von Herrn Gorbunov oder Frau Egenberger publizierten  $IC_{50}$ -Werte für die TBuA-Hemmung der MPP-Aufnahme durch rOCT1(10 $\Delta$ Cys) und rOCT1(10 $\Delta$ Cys/F483S) korrekt sind, wiederholte ich diese Messungen. Dabei bestätigte ich die von Frau Egenberger publizierten Ergebnisse. Für die TBuA-Hemmung der MPP-Aufnahmen durch rOCT1(10 $\Delta$ Cys) bestimmte ich einen  $IC_{50}$ -Wert von  $26 \pm 14 \mu\text{M}$  ( $n=3$ ) während ich für die TBuA-Hemmung der MPP-Aufnahme durch rOCT1(10 $\Delta$ Cys/F483S) einen  $IC_{50}$ -Wert von  $5.6 \pm 1.9 \mu\text{M}$  ( $n=3$ ) erhielt. Als nächstes bestimmte ich den Effekt der F483S-Mutation auf dem rOCT1(C451M)-Hintergrund. Für die TBuA-Hemmung, der durch die rOCT1(C451M)-Mutante vermittelte MPP-Aufnahme, bestimmte ich einen  $IC_{50}$ -Wert von  $26.8 \pm 4.0 \mu\text{M}$  ( $n=3$ ), während ich für die TBuA-Hemmung der durch rOCT1(C451M/F483S) vermittelte MPP-Aufnahme einen  $IC_{50}$ -Wert von  $3.2 \pm 0.7 \mu\text{M}$  ( $n=5$ ) erhielt (vgl. Abb. 17). Diese Werte unterscheiden sich nicht signifikant von den für rOCT1(10 $\Delta$ Cys) und rOCT1(10 $\Delta$ Cys/F483S) bestimmten Werten. Die durch den Austausch von Phenylalanin 483 gegen Serin beobachtete quasi allosterische Erhöhung der Affinität, wird also nicht durch den Austausch der 10 Cysteine in rOCT1(10 $\Delta$ Cys) verändert.



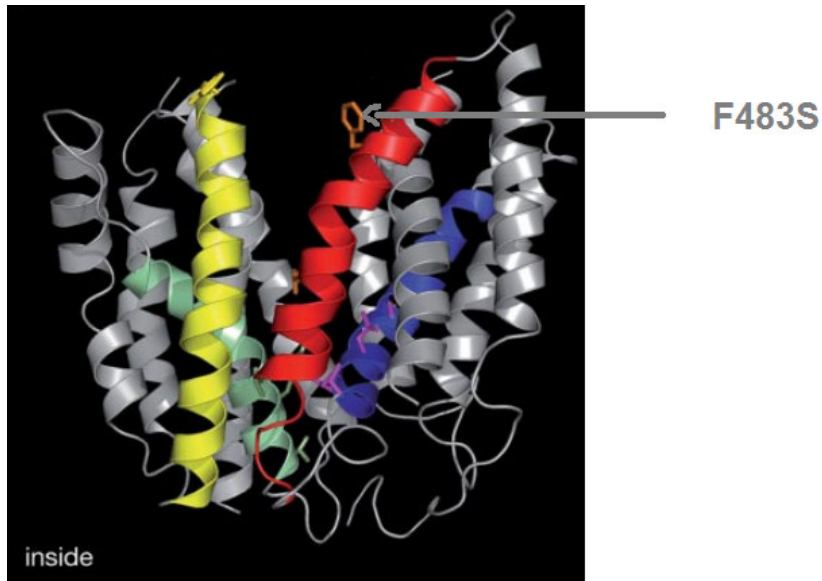


Abb. 16: Modellstruktur der nach außen offenen Konformation von rOCT1 . Die Grafik zeigt den Transporter parallel zur Membran ausgerichtet. Der Pfeil deutet auf die aromatische Aminosäure F483 der 11. Transmembrandomäne. Es wird deutlich, dass keine direkte räumliche Beziehung zur putativen Bindungstasche des Transporters besteht (vgl. Gorbunov et al. 2008).

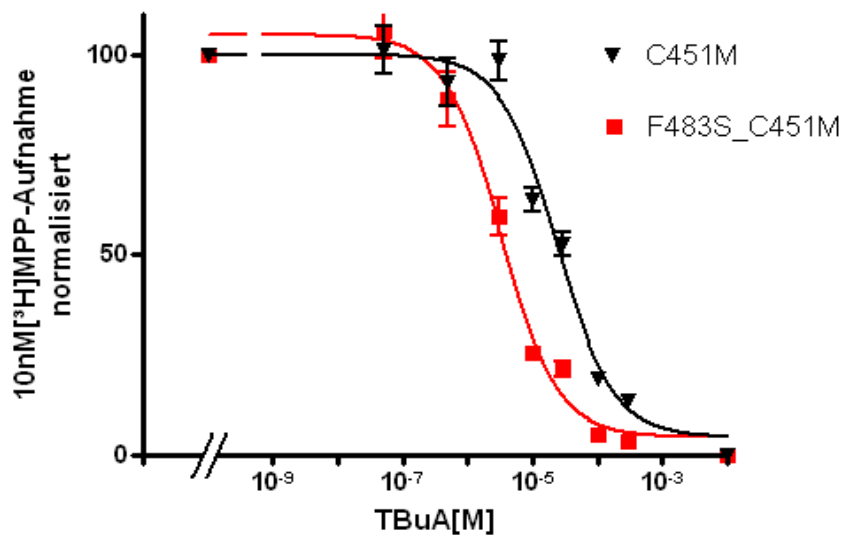
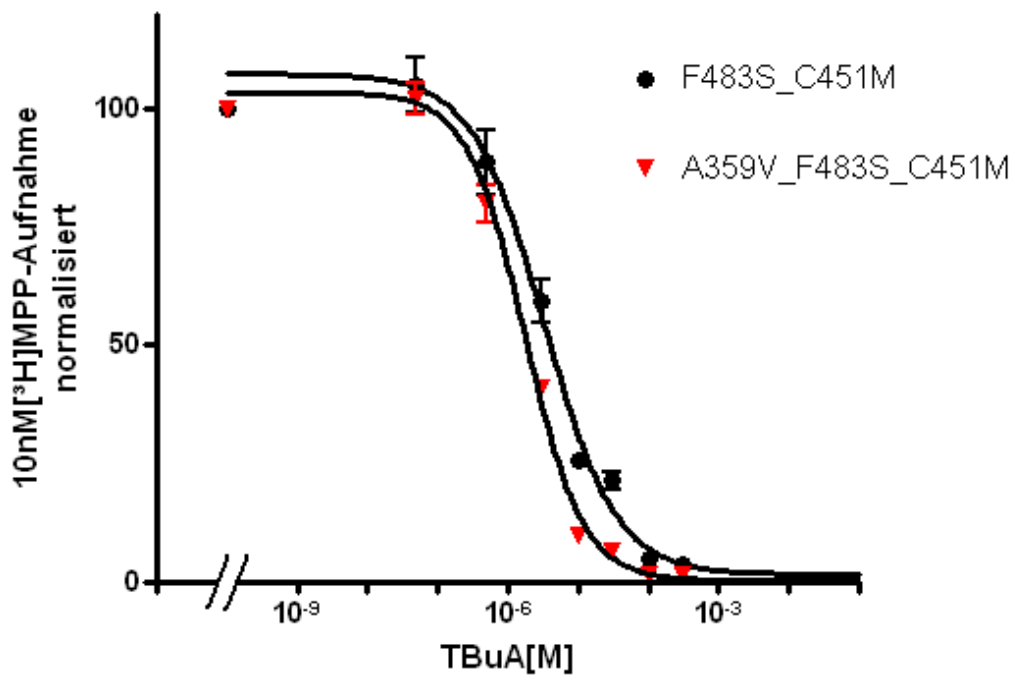
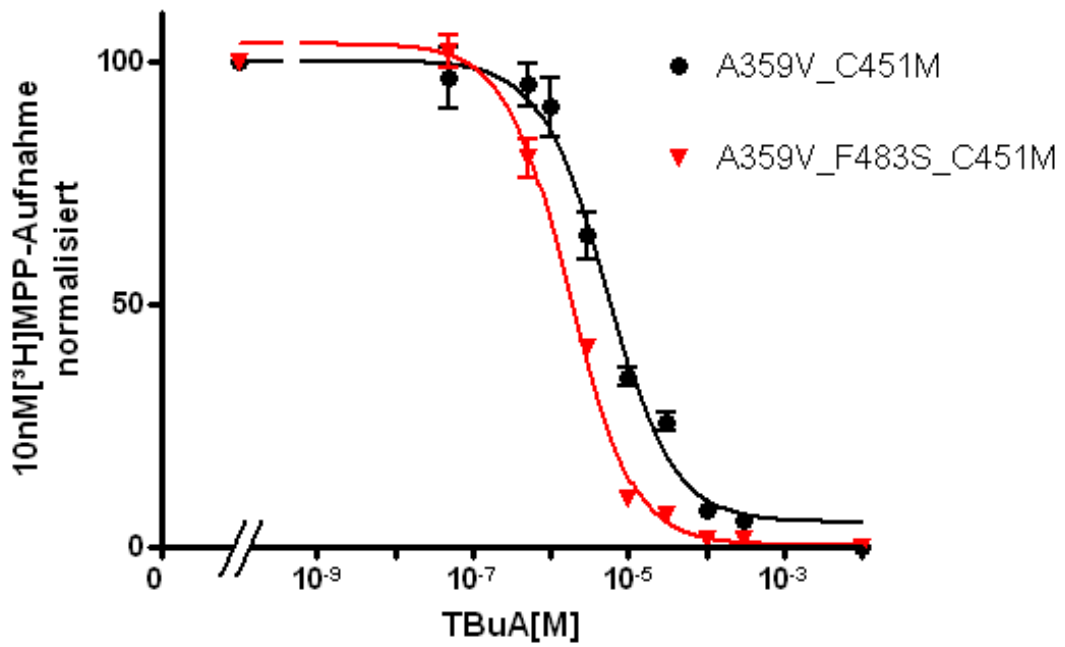


Abb. 17: MPP-TBuA-Hemmkinetik von F483S/C451M, die gegen die Kontrollmutante C451M aufgetragen ist. Beide wurden in Oozyten exprimiert. Die Aufnahme von 10nM [<sup>3</sup>H]MPP wurde in Gegenwart verschiedener Konzentrationen TBuA (Messpunkte: ~ 0, 0.5, 1, 3, 10, 30, 100, 300  $\mu$ M) gemessen. Die normalisierten Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. der [<sup>3</sup>H]MPP-Aufnahme aus je 4 Einzelexperimenten mit jeweils 10 Einzelmessungen sind gegen die TBuA-Konzentration aufgetragen. Die Kurve wurde mittels Hill-Gleichung den Messwerten angepasst.

### 3.5 Prüfung von Änderungen der TBuA-Interaktion nach Mutationen innerhalb und am äußeren Rand der Substratbindungstasche

Um zu prüfen, ob die durch die Mutationen W355Y und A359V beobachteten Affinitätserhöhungen der TBuA-Hemmung des MPP-Transportes auch zu beobachten sind, wenn sich der Transporter durch die F483S-Mutation bereits in einem erhöhten Affinitätszustand bezüglich der TBuA befindet, bestimmte ich die  $IC_{50}$ -Werte für die TBuA-Hemmung der rOCT1-Mutanten C451M/F483S/W355Y und C451M/F483S/A359V. Die Versuche wurden analog zu den oben beschriebenen Messungen der Mutanten C451M/W355Y und C451M/A359V durchgeführt und mit diesen verglichen. Für die C451M/F483S/W355Y-Mutante bestimmte ich einen  $IC_{50}$ -Wert von  $2.3 \pm 0.6 \mu\text{M}$  (n=4). Der für die C451M/F483S/A359V-Mutante bestimmte  $IC_{50}$ -Wert betrug  $1.8 \pm 0.2 \mu\text{M}$  (n=5). Abb. 18a und Tabelle 1 zeigen, dass die F483S-Mutation die TBuA-Affinität sehr signifikant ( $p < 0,001$ ) weiter erhöhen kann, wenn sie bereits durch die A359V-Mutation erhöht ist. Umgekehrt lässt sich die TBuA-Affinität durch eine zusätzliche A359V-Mutation nur sehr leicht ( $p < 0,02$ ) erhöhen, wenn sie bereits durch F483S erhöht ist. Abb. 18b und Tabelle 1 zeigen, dass die Affinität für TBuA durch die F483S-Mutation oder die W355Y-Mutationen auf einen ähnlichen Wert erhöht werden und dass beide Mutationen zusammen keinen additiven Effekt auf die TBuA-Affinität haben. Die Daten sprechen dafür, dass die F483S-Mutation die Interaktionen von W355 und A359 mit TBuA verändern.

a



b

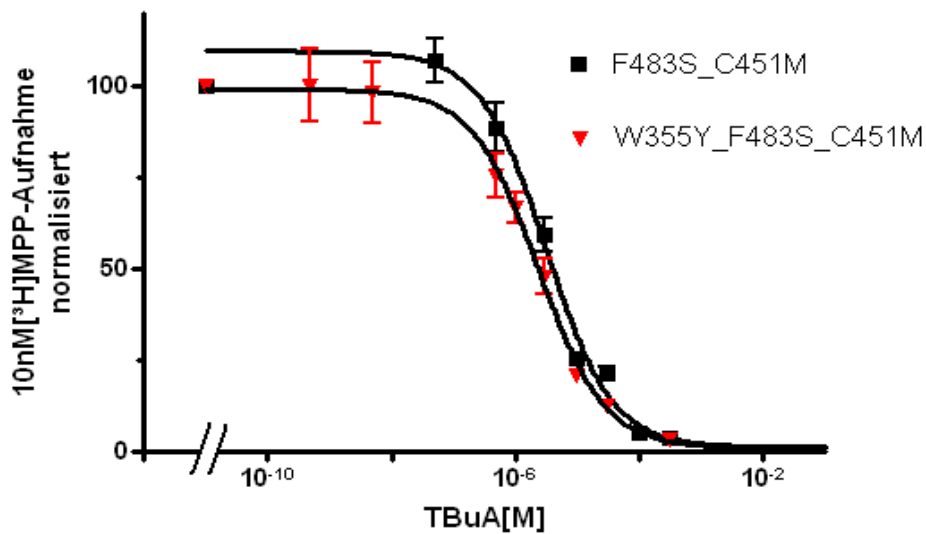
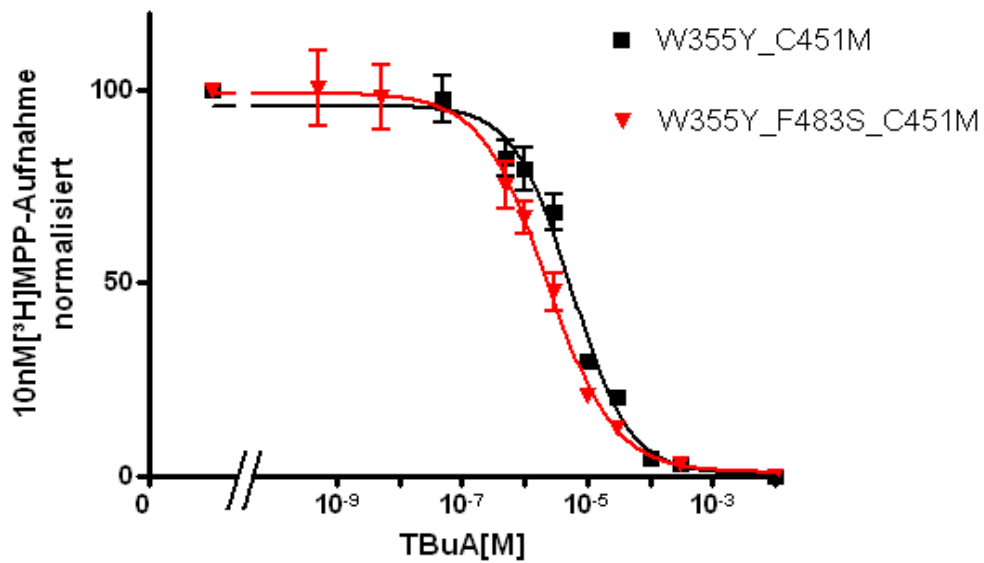
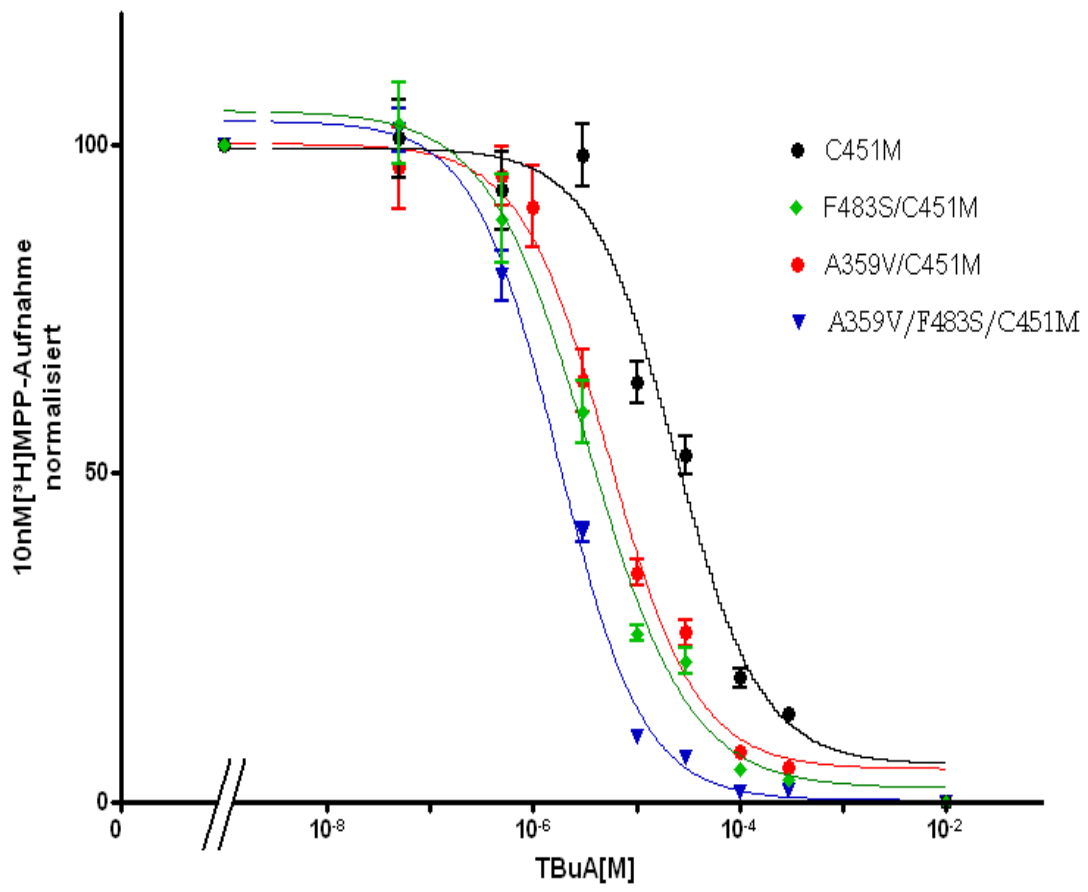


Abb. 18a/b: MPP-TBuA-Hemmkinetiken für (a) A359V/F483S/C451M und (b) W355Y/F483S/C451M, die jeweils gegen die Kontrollmutanten (a) A359V/C451M und (b) W355Y/C451M respektive F483S/C451M aufgetragen sind. Alle Mutanten wurden in Oozyten exprimiert. Die Aufnahme von 10nM [<sup>3</sup>H]MPP wurde in Gegenwart verschiedener Konzentrationen TBuA (Messpunkte: ~ 0, 0,5, 1, 3, 10, 30, 100, 300µM) gemessen. Die normalisierten Mittelwerte ± S.E.M. der [<sup>3</sup>H]MPP-Aufnahme aus je 4 Einzelexperimenten mit je 10 Einzelmessungen sind gegen die TBuA-Konzentration aufgetragen. Die Kurve wurde mittels Hill-Gleichung an die Messwerte angepasst.

### 3.6 Vergleichende Übersicht der Mutationseffekte hinsichtlich ihrer Signifikanz

In Abb. 19 sind alle in der vorliegenden Arbeit geschilderten Messungen der TBuA-Hemmung der MPP-Aufnahme in einer Abbildung dargestellt. In der Tabelle 1 wurden die gemessenen  $IC_{50}$ -Werte für die TBuA-Hemmung der MPP-Aufnahme zusammengefasst und die Signifikanz der Unterschiede miteinander verglichen. Um eine Gruppe parallel gemessener normalverteilter Stichproben miteinander zu vergleichen, führte ich den ANOVA (analysis of variance)-Test und danach den Tukey-Test zur Bestimmung der Signifikanz der Unterschiede der einzelnen Gruppen durch. Da einzelne Mutanten wegen der teilweisen Inaktivierung und ihrer Instabilität nur schwer zu messen waren, können durch diese Vorgehensweise wichtige, im Einzelvergleich signifikante Unterschiede, übersehen werden. Ich verglich deshalb auch jeweils zwei Einzelwerte und bestimmte die Signifikanz der jeweiligen Unterschiede im Student t-Test. (vgl. Tabelle 1)

a



b

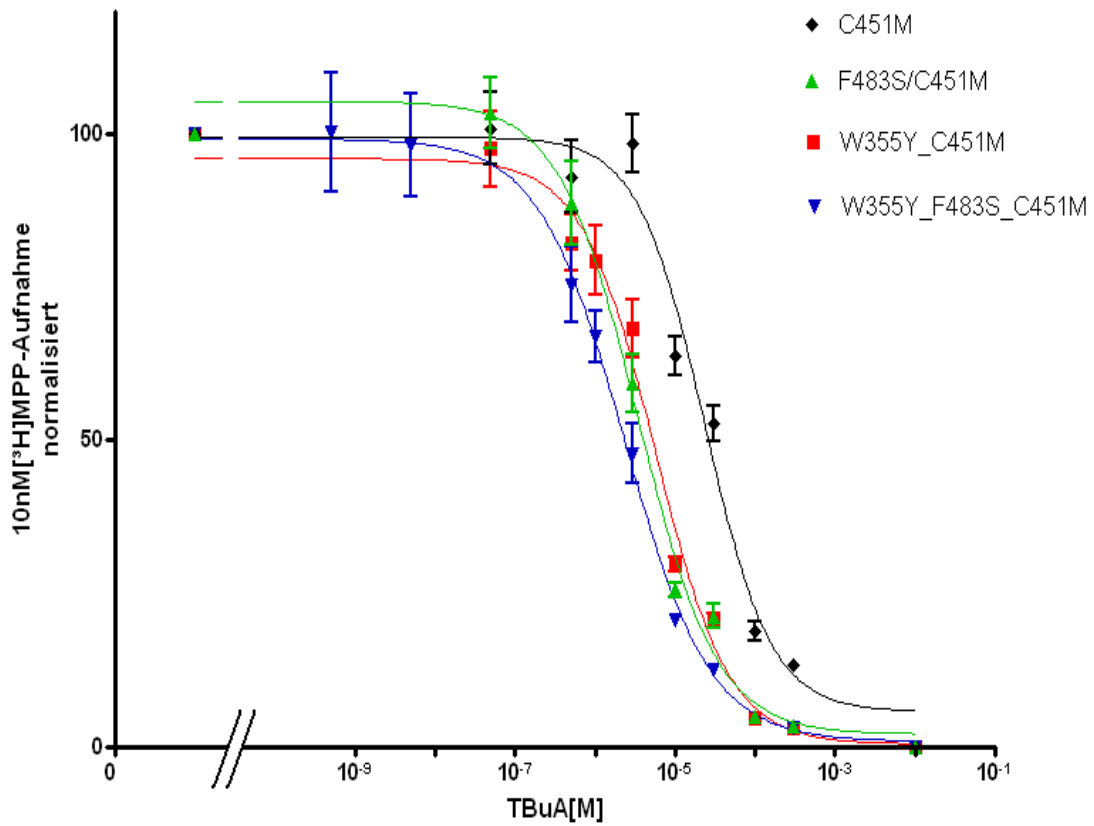


Abb. 19: MPP-TBuA-Hemmkinetiken für (a) alle Mutanten der A359V-Variante und (b) alle Mutanten der W355Y-Variante im Vergleich mit der Kontrollmutante C451M. Alle wurden in Oozyten exprimiert. Die Aufnahme von 10nM  $[^3\text{H}]\text{MPP}$  wurde in Gegenwart verschiedener Konzentrationen TBuA (Messpunkte:  $\sim 0, 0.5, 1, 3, 10, 30, 100, 300\mu\text{M}$ ) gemessen. Die normalisierten Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. der  $[^3\text{H}]\text{MPP}$ -Aufnahme aus je 4 Einzelexperimenten mit jeweils 10 Einzelmessungen sind gegen die TBuA-Konzentration aufgetragen. Die Kurven wurden mittels Hill-Gleichung an die Messwerte angepasst.

rOCT1-Typ	IC <sub>50</sub> -Werte in $\mu\text{M}$	C451M	A359V/ C451M	W355Y/ C451M	F483S/ C451M	A359V/ F483S/C451M	W355Y/ F483S/C451M
C451M	26.8 $\pm$ 4.0 (n=3)	----- ###	*** ###	*** ###	*** ###	*** ###	*** ###
A359V/C451M	5.4 $\pm$ 0.9 (n=4)	*** ###	-----	-----	-----	***	-----
W355Y/C451M	5.7 $\pm$ 1.0 (n=4)	*** ###	-----	-----	-----	-----	**
F483S/C451M	3.2 $\pm$ 0.7 (n=5)	*** ###	-----	-----	-----	*	n.s.
A359V/F483S/ C451M	1.8 $\pm$ 0.2 (n=5)	*** ###	***	-----	*	-----	-----
W355Y/F483S/ C451M	2.3 $\pm$ 0.6 (n=4)	*** ###	-----	**	n.s.	-----	-----

**Tabelle 1:** Zusammenfassung der IC<sub>50</sub> (T<sub>BuA</sub>)-Werte in  $\mu\text{M}$  für 10nM[<sup>3</sup>H]MPP-Aufnahme bei rOCT1 - C451M, A359V/C451M, W355Y/C451M, F483S/C451M, A359V/C451M; A359V/F483S/C451M, W355Y/F483S/C451M. Ergebnisse nach dem Anova-Test unter Angabe des p-value. ### p<0.001; p entspricht dem Signifikanzniveau der IC<sub>50</sub> (T<sub>BuA</sub>)-Werte der MPP-Aufnahme; Ergebnisse nach dem t-Test unter Angabe des p-value. \* p<0,02, \*\* p=0,001 \*\*\* p<0.001; p entspricht dem Signifikanzniveau der IC<sub>50</sub> (T<sub>BuA</sub>)-Werte der MPP-Aufnahme; n.s. = nicht signifikant.



## 4. Diskussion

In dieser Arbeit wird erstmals über Mutationseffekte der beiden Aminosäuren an der Position 355 und 359 des rOCT1 berichtet. Sie änderten die Interaktion des Transporters mit dem Hemmstoff TBuA und den Effekt von TBuA auf den MPP-Transport und könnten somit für den Transportmechanismus bzw. die Substratbindung des rOCT1 von entscheidender Bedeutung sein. Ebenso wurden die Effekte von Kombinationsmutation der beiden Aminosäuren 355 und 359 mit der Aminosäure an der Position 483, die nach dem dreidimensionalen Modell an der Außenseite der Bindungstasche liegt, untersucht. Nach Mutation von jeweils A359V und W355Y mit F483S im Hintergrund der rOCT1/C451M-Grundmutation zeigten sich additive Veränderungen der Affinitäten von TBuA. Die Ergebnisse meiner Arbeit bestätigten außerdem, dass Punktmutationen substratabhängige Effekte haben können (F. Thevenod et al. 2013).

### 4.1 Mutationseffekte von W355Y und A359V auf die TBuA-Bindung

Eine zentrales Ergebnis dieser Arbeit ist die Tatsache, dass durch Punktmutation der Aminosäuren W355 und A359 die Affinität des Transporters zum nicht transportablen Hemmstoff TBuA (Gorbunov et al. 2008) nahezu um den Faktor 5 erhöht werden konnte, wenngleich dies nur für den MPP transportierenden Transporter gilt.

W355 und A359 liegen im Bereich der wässrigen Phase der modellierten Bindungstasche von rOCT1 und sind für hydrophile Substrate direkt zugänglich. Diese Vorstellung stützt sich auf das dreidimensionale Modell von rOCT1, welches erstmals 2005 von Popp et al. entwickelt wurde. Durch nachfolgende Mutageneseversuche, bei denen der Transporter im Bereich einzelner Positionen gezielt mutiert wurde, konnte das Modell größtenteils bestätigt werden. (Volk et al. 2009). Wie in Abbildung 4 dargestellt, gelang damit die Identifikation wichtiger Aminosäuren, die für die Substratbindung, die Substrattranslokation, aber auch für den Translokationsmechanismus an sich,

eine entscheidende Rolle spielen können (Koepsell et al. 2011). (Siehe hierzu auch Kapitel 1.2). Bei derartigen Betrachtungen darf man aber nicht vergessen, dass die Auswirkungen einer Mutation auf die Substratbindung an den Transporter und/oder auf die Substratlokation sehr komplex sein können.

Der  $IC_{50(TBuA)[W355Y/C451M]}$  lag bei  $5.7 \pm 1.0 \mu\text{M}$ . Für A359V/C451M zeigte sich ein  $IC_{50(TBuA)[A359V/C451M]}$  von  $5.4 \pm 0.9 \mu\text{M}$ . Für die Kontrollmutante C451M ergab sich ein  $IC_{50(TBuA)[C451M]}$  von  $26.8 \pm 4.0 \mu\text{M}$ . Demnach beeinflussten die beiden Punktmutationen das Bindungsverhalten des Hemmstoffes TBuA zum Transporter. Dieser Effekt ist mit Hilfe zweier Erklärungsansätze interpretierbar. Im Falle der W355Y-Mutation kann die geringfügige Änderung der Struktur und/oder der Ladung der Aminosäure das Bindungsverhalten zu TBuA direkt beeinflusst haben. Dies wäre ein Hinweis auf die unmittelbare Beteiligung von W355 an der Bindung von TBuA. Gorbunov et al. veröffentlichten 2008 Daten, die auf die Existenz von drei TBuA-Bindungsdomänen hinweisen. Demnach könnte W355 Teil einer putativen Bindungsdomäne für TBuA sein. Gleiches würde für die Aminosäure A359 gelten. Es ist jedoch anzumerken, dass jegliche Art der Mutation, unabhängig von der Lokalisation der Aminosäure, durch Änderung lokaler sterischer Verhältnisse eine Änderung des Gesamtgefüges des Transporters verursachen und eine Fernwirkung auf Bindungsstellen haben kann. Beispielsweise änderte sich die Affinität von TBuA zu rOCT1 nach der C451M-Mutation. Laut zweidimensionalem Modell befindet sich C451M jedoch am Ende der 10. Transmembrandomäne (Gründemann et al. 1994) und ist folglich laut dreidimensionalem Modell an der Innenseite der Membran lokalisiert und somit nicht im Bereich der modellierten Bindungstasche gelegen (Popp et al. 2005). Eine direkte Bindung von TBuA an C451M, welches nicht transportiert werden kann, ist deshalb unwahrscheinlich. Um den Effekt der Mutation in dieser Position auf die Affinität von TBuA zu erklären, muss man sich vor Augen führen, dass die Tertiärstruktur in komplexer Weise gebildet und aufrechterhalten wird. So sind an der Bildung der Tertiärstruktur neben den oben erwähnten Disulfidbrücken, Ionenbindungen, Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen sowie Kation- $\pi$ -Interaktionen beteiligt. Das Zusammenspiel dieser Wechselwirkungen bei der Bildung der

Tertiärstruktur ist schwer modellierbar, da der zeitliche Ablauf der Interaktionen bei der Entstehung der Tertiärstruktur das Endergebnis entscheidend beeinflusst. Im Falle der C451M-Mutation wurde von Semlanski 2011 vermutet, dass genannte Mutation einen „allosterischen Effekt auf die eigentliche Substratbindungstasche“ habe.

Anzumerken ist, dass die durch die Mutationen W355Y und A359V vermittelten  $IC_{50}$ -Werte für die TBuA-Hemmung der MPP-Aufnahme in etwa der Größenordnung des für den Wildtyp berichteten Werts der TBuA-Hemmung der MPP-Aufnahme entsprechen. Der Transporter wird durch die Grundmutation C451M somit zunächst in einen niedrigeren Affinitätszustand versetzt, der durch die Mutation von W355Y oder A359V jeweils scheinbar aufgehoben scheint. Dies lässt vermuten, dass die Effekte der Mutationen W355Y und A359V am ehesten als allosterisch anzusehen sind. Ebenso gut kann dieser scheinbare Zusammenhang als rein zufällig angesehen werden. Unter Berücksichtigung des Modells der Tertiärstruktur von rOCT erscheint eine direkte Beteiligung der beiden Aminosäuren an der Bindung von TBuA wahrscheinlicher (siehe Abbildung 6).

#### 4.2 Mutationseffekte von F483S auf die TBuA-Bindung

Nach Mutation von F483S konnte eine signifikante, etwa 9-fache Affinitätssteigerung für TBuA gegenüber der Kontrollmutante C451M nachgewiesen werden. Trotz der peripheren Lage von 483 (siehe Abb. 6A) kann eine direkte Interaktion mit TBuA nicht ganz ausgeschlossen werden. Viel wahrscheinlicher ist jedoch, dass die beobachteten Effekte indirekter Natur sind. Bezüglich der Lage der Aminosäure an der Position 483 besteht zu den vorherbeschriebenen Aminosäuren 355 und 359 ein eklatanter Unterschied. So liegt 483 laut dreidimensionalem Modell im Bereich der 11. Transmembrandomäne. Bei genauer Betrachtung liegt sie im peripheren Bereich des Transporters und im Gegensatz zu den Aminosäuren der Position 355 und 359 nicht in der wässrigen Phase der modellierten Bindungstasche des

Transporters. Die Mutation F483S hat demzufolge offensichtlich einen Ferneinfluss auf die TBUA-Bindungsstellen, an denen die Aminosäuren 355 und 359 wahrscheinlich direkt beteiligt sind.

#### 4.3 Mutationseffekte auf die Transportaktivität

Nach Ersetzen von Alanin durch Valin an der Stelle 359 des rOCT1 sank die Transportaktivität des rOCT1 dramatisch. So war die durchschnittliche Substrataufnahme von TEA um etwa 91% geringer als im Vergleich zur Mutante W355Y. Ähnliche Effekte wurden für MPP festgestellt. Hier sank die durchschnittliche Transportaktivität um etwa 87% im Vergleich zur W355Y-Mutation. Offensichtlich verändert der Austausch von Alanin 359 gegen Valin die Struktur des Transporters, sodass entweder weniger Transportermoleküle in die Membran eingebaut werden, oder das am Transport beteiligte Konformationsänderungen gestört sind. Da die Substrataffinität zu TEA bei der A359V Mutante offensichtlich nicht durch diese Mutation verändert wird und für die A359V Mutante der gleiche  $K_m$ -Wert für MPP gefunden wurde wie für die W355Y Mutante, vermute ich, dass die A359V Mutation zu einem geringeren Einbau in die Plasmamembran führt.

#### 4.4 Substratabhängige Mutationseffekte auf rOCT1

Die Mutationseffekte von W355 und A359 waren substratabhängig. So hatte die Mutation W355Y keinen signifikanten Effekt auf die Affinität des TBUA (die Bestimmung der Affinität von A359V konnte aufgrund der schlechten Transportrate nicht ermittelt werden), nachdem TEA als Substrat verwendet wurde. Im Gegensatz dazu änderte sich die Affinität zu TBUA erheblich, als MPP als Substrat diente. Thevenod et al. veröffentlichten 2013 ähnliche Daten, wobei die Inhibitorselektivität von rOCT1 in hohem Maße durch die Wahl des Substrates beeinflusst wurde. Egenberger et al. lieferten außerdem Hinweise auf eine substratabhängige Konformationsänderung des Transporters.

Thevenod et al. mutmaßten 2013 deshalb, dass rOCT1 substratabhängige Sub-Stadien im Laufe des Transportzyklus eingeht und Substrat und Inhibitor gleichzeitig am Transporter binden können. Bezogen auf die von mir untersuchten Bindungsregionen des Transporters hieße dies konkret: Die Bindung eines Substrates, wie beispielsweise MPP, könnte geringgradige Konformationsänderungen innerhalb des Transporters bewirken, welche die Bindungsdomäne zusammen mit der Punktmutation eines putativen Hemmstoffes entscheidend verändert und so zu einer Änderung der Bindungsaffinität für TBuA führt. Die Bindung von TEA hätte demnach, aufgrund der veränderten Lokalisation der Bindungsregion, keinen Einfluss auf die Bindung des TBuA bzw. verdeckt die durch die Mutation zu erwartenden Effekte. Diese Daten bestätigen die Hypothese, dass ein Hemmstoff wie TBuA am Transporter binden kann, nachdem bereits ein Substrat im Bereich der Bindungsdomäne gebunden hat. (Thevenod et al. 2013). Der Translokationsvorgang könnte somit auch nach erfolgter Bindung des Substrates noch unterbunden werden.

#### 4.5 Effekte nach Mutationen am inneren und am äußeren Rand der Substratbindungstasche

Alle untersuchten Mutanten (W355Y, A359V, F483S) zeigten eine signifikante Affinitätserhöhungen für TBuA (gemessen mit dem Substrat MPP). Es schien deshalb interessant zu untersuchen, wie sich die Affinität nach Mutation gegenüber TBuA verändert, wenn sich diese bereits in einem erhöhten Affinitätszustand befindet. Falls W355 und A359 direkt an der TBuA-Bindung beteiligt sind, sollten Mutationen in diesen Positionen auch auf dem F483S-Hintergrund nicht ohne Wirkung auf die TBuA-Affinität sein. Die räumliche Beziehung von TBuA zu rOCT1 und speziell zu den mutierten Aminosäuren ist im Dockingmodell in Abbildung 6 dargestellt. In Abbildung 16 ist die Lage der Aminosäure 483 dargestellt. Sie liegt demnach am Rande des Transporters und mutmaßlich nicht im direkten Einflussbereich der Bindungstasche. 355 und 359

liegen hingegen im zentralen Bereich der Bindungstasche des Transporters (vgl. Abbildung 6).

Durch die zusätzliche Mutation von F483S kam es sowohl in Kombination mit der W355Y-Mutation als auch mit der A359V-Mutation zu einer signifikant additiven Affinitätserhöhung (Faktor 2). Wie ist dies zu erklären?

Durch die Kombinationsmutation könnte eine zusätzliche TBuA-Bindungsstelle zugänglich geworden sein, welche die Wahrscheinlichkeit einer TBuA-Bindung erhöht und somit die Gesamtaffinität des Hemmstoffes zum Transporter erhöht. Die Existenz von mindestens zwei TBuA-Bindungstaschen wurde bereits von Gorbunov et al. 2008 postuliert. In Anbetracht der Polyspezifität des Transporters scheint es unwahrscheinlich, dass für eine Substanz nur eine feste Bindungsregion existiert. Viel wahrscheinlicher ist die Existenz von mindestens zwei Bindungsregionen für TBuA. Die Daten lassen außerdem die Hypothese zu, dass zwei Moleküle TBuA gleichzeitig an rOCT1 binden können.

Die Ergebnisse der Mutageneseversuche dieser Arbeit sprechen für die Existenz einer „bindungsfreundlichen“ Region innerhalb des Transporters, in der Substrate und Hemmstoffe unterschiedlichster Größe und Morphologie an mehreren Stellen binden können. Diese Region kann nicht nur durch teilhabende Aminosäuren verändert werden, sondern ändert sich auch durch allosterische Effekte, z. B. bei Mutation einer peripheren Aminosäure (483) oder kurzfristig bei Bindung eines Substrates (Egenberger et. al. 2012). Außerdem scheint es wahrscheinlich, dass bei morphologisch gegebenen Voraussetzungen, zumindest zwei Liganden gleichzeitig binden können.

## 5. Zusammenfassung

Die organischen Kationentransporter gehören zur Transporter-Familie SLC22, die polyspezifische Transporter enthält. Sie ermöglichen den Transport verschiedenster Kationen und sind an der Aufnahme, Ausscheidung und Verteilung von Medikamenten beteiligt. Damit beeinflussen sie die Pharmakokinetik hydrophiler Pharmaka, die die Membran nicht passiv permeieren können. 2005 wurde in der Arbeitsgruppe von H. Koepsell ein dreidimensionales Modell des organischen Kationentransporters 1 der Ratte (rOCT1) erstellt und teilweise durch Mutageneseversuche verifiziert. Später wurde gezeigt, dass rOCT1 für den nicht transportierten Hemmstoff Tetrabutylammonium (TbUA) mehrere Bindungsstellen besitzt, die zum Teil hochaffin sind. Durch Simulation der Interaktion von TbUA mit rOCT1 wurde gezeigt, dass neben drei Aminosäuren, deren Mutation zu Veränderungen der Hemmung des rOCT1 vermittelten Transportes durch TbUA führt, auch die Aminosäuren Tryptophan 355 und Alanin 359 möglicherweise an der Bindung von TbUA beteiligt sind. Mithilfe von Messungen der TbUA Hemmung des Transportes von rOCT1-Mutanten wurde die Bedeutung der beiden Aminosäuren für die Interaktion von TbUA mit rOCT1 untersucht. Nach Mutation von W355 oder A359 änderte sich die Affinität der Hemmung des von rOCT1 vermittelten Transporters durch TbUA. Die Beteiligung dieser beiden Aminosäuren an der TbUA-Bindung des Transporters erscheint deshalb wahrscheinlich. Interessanterweise waren die Mutationseffekte auf die Affinität der TbUA-Hemmung abhängig von dem, bei den Transportmessungen verwendeten Substraten. So änderte sich die TbUA-Affinität für die Hemmung des Transportes von 1-methyl-4-Phenylpyridinium (MPP) während die TbUA Affinität für die Hemmung von Tetraäthylammonium (TEA) nicht verändert wurde. Dies unterstreicht die in früheren Arbeiten formulierte Hypothese, dass es innerhalb der Substratbindungstasche überlappende Bindungsregionen für Substrate und Hemmstoffe gibt, von denen aus der Transport ausgelöst werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde außerdem die Wirkung der Mutation der Aminosäure Phenylalanin 483, die sich am äußersten Rand der nach außen

offenen Substratbindungstasche befindet, untersucht. Nach Austausch von Phenylalanin 483 gegen Serin erhöhte sich die Affinität der TBuA-Hemmung des MPP Transportes. Eine Doppelmutation in den Positionen 483 plus 355 ergab eine additive Erhöhung der Affinität. Durch die vorliegenden Versuche wurde gezeigt, dass die Aminosäuren Phenylalanin 355 und Alanin 359 direkt an der Bindung von TBuA beteiligt sind oder diese indirekt beeinflussen. Die nach Mutation von Phenylalanin 483 beobachteten Effekte deuten darauf hin, dass Phenylalanin 483 die Bindung von TBuA indirekt beeinflusst.



## Abkürzungsverzeichnis:

A	Alanin
Anova	Analysis of variance
C	Cystein
Ca	Kalzium
Cl	Chlorid
cm	Zentimeter
[ <sup>14</sup> C]TEA	<sup>14</sup> C - Tetraethylammonium
°C	Grad Celsius
F	Phenylalanin
GentORI	Oozytenringerlösung mit Gentamycin
K	Kalium
Km	Michaelis- Konstante
Ki	Inhibitionskonstante eines Hemmstoffs
IC50	Mittlere inhibitorische Konzentration
LacY	Laktosepermease von Escherichia coli
M	Methionin
ml	Milliliter
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
MPP	1-Methyl-4-phenylpyridin
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid

NaOH	Natriumhydroxid
nl	Nanoliter
OAT	Organischer Anionentransporter
OCT	Organischer Kationentransporter
ORI	Oozytenringerlösung
rOCT	Organischer Kationentransporter der Ratte
hOCT	Organischer Kationentransporter des Menschen
SDS	Natriumdodecylsulfat
S.E.M.	Standard error of the mean
SLC	Solute carrier family
TEA	Tetraethylammonium
TBuA	Tetrabutylammonium
TMH	Transmembran-Helix
$\mu\text{M}$	Mikromolar
$\mu\text{l}$	Mikroliter
V	Valin
V <sub>max</sub>	Maximale Geschwindigkeit
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

## Literaturverzeichnis:

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

Armstrong CM, Inactivation of the potassium conductance and related phenomena caused by quaternary ammonium ion injection in squid axons. (1969) *J Gen Physiol.* 54(5):553-75.

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

Burns RS et al., A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983 Jul; 80(14):4546-50.

Busch AE, Quester S, Ulzheimer JC, Gorboulev V, Akhoundova A, Waldegger S, Lang F, Koepsell H. Monoamine neurotransmitter transport mediated by the polyspecific cation transporter rOCT1. *FEBS Lett.* 1996 Oct 21; 395(2-3):153-6.

Busch AE, Quester S, Ulzheimer JC, Waldegger S, Gorboulev V, Arndt P, Lang F, Koepsell H. Electrogenic properties and substrate specificity of the polyspecific rat cation transporter rOCT1. *J Biol Chem.* 1996 Dec 20; 271(51):32599-604.

Breidert T, Spitzenberger F, Gründemann D, Schömig E. Catecholamine transport by the organic cation transporter type 1 (OCT1). *Br J Pharmacol.* 1998 Sep; 125(1):218-24.

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

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

Ciarimboli G, Ludwig T, Lang D, Pavenstädt H, Koepsell H, Piechota HJ, Haier J, Jaehde U, Zisowsky J, Schlatter E. Cisplatin nephrotoxicity is critically mediated via the human organic cation transporter 2. *Am J Pathol.* 2005 Dec; 167(6):1477-84.

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

Ciarimboli G, Deuster D, Knief A, Sperling M, Holtkamp M, Edemir B, Pavenstädt H, Lanvers-Kaminsky C, Zehnhoff-Dinnesen A, Schinkel AH, Koepsell H, Jürgens H, Schlatter E. Organic cation transporter 2 mediates cisplatin-induced oto- and nephrotoxicity and is a target for protective interventions. *Am J Pathol.* 2010 Mar; 176(3):1169-80. Epub 2010 Jan 28.

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.

Dresser MJ, Leabman MK, Giacomini KM. Transporters involved in the elimination of drugs in the kidney: organic anion transporters and organic cation transporters. *J Pharm Sci.* 2001 Apr; 90(4):397-421.

Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science.* 1998 Apr 3; 280(5360):69-77.

Dumont JN (1972) Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol* 136(2): 153-179.

Egenberger B, Gorboulev V, Keller T, Gorbunov D, Gottlieb N, Geiger D, Mueller TD, Koepsell H. A substrate binding hinge domain is critical for transport-related structural changes of organic cation transporter 1. *J Biol Chem*. 2012 Sep 7; 287(37):31561-73. doi: 10.1074/jbc.M112.388793. Epub 2012 Jul 18.

Enomoto A, Kimura H, Chairoungdua A, Shigeta Y, Jutabha P, Cha SH, Hosoyamada M, Takeda M, Sekine T, Igarashi T, Matsuo H, Kikuchi Y, Oda T, Ichida K, Hosoya T, Shimokata K, Niwa T, Kanai Y, Endou H (2002) Molecular identification of a renal-urate anion exchanger that regulates blood urate levels. *Nature* 417:447–452

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

Gorboulev V, Shatskaya N, Volk C, Koepsell H. Subtype-specific affinity for corticosterone of rat organic cation transporters rOCT1 and rOCT2 depends on three amino acids within the substrate binding region. *Mol Pharmacol*. 2005 May; 67(5):1612-9. Epub 2005 Jan 20.

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

Gründemann D, Gorboulev V, Gambaryan S, Veyhl M, Koepsell H. Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. *Nature*. 1994 Dec 8; 372(6506):549-52.

Guckel D, Ciarimboli G, Pavenstädt H, Schlatter E. Regulation of organic cation transport in isolated mouse proximal tubules involves complex changes in protein trafficking and substrate affinity. *Cell Physiol Biochem*. 2012;30(1):269-81. doi: 10.1159/000339063. Epub 2012 Jun 19.

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

Hirai, T., J.A. Heymann, D. Shi, R. Sarker, P.C. Maloney, and S. Subramaniam. 2002. Threedimensional structure of a bacterial oxalate transporter. *Nature structural biology*.9:597-600.

Hong M, Xu W, Yoshida T, Tanaka K, Wolff DJ, Zhou F, Inouye M, You G. Human organic anion transporter hOAT1 forms homooligomers. *J Biol Chem* 280: 32285–32290, 2005.

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.

Langston JW, Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*. 1983 Feb 25; 219(4587):979-80.

Lips KS, Volk C, Schmitt BM, Pfeil U, Arndt P, Miska D, Ermert L, Kummer W, Koepsell H. Polyspecific cation transporters mediate luminal release of acetylcholine from bronchial epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005 Jul; 33(1):79-88. Epub 2005 Apr 7.

Heise M, Lautem A, Knapstein J, Schattenberg JM, Hoppe-Lotichius M, Foltys D, Weiler N, Zimmermann A, Schad A, Gründemann D, Otto G, Galle PR, Schuchmann M, Zimmermann T. Downregulation of organic cation transporters OCT1 (SLC22A1) and OCT3 (SLC22A3) in human hepatocellular carcinoma and their prognostic significance. *BMC Cancer*. 2012 Mar 22; 12:109.

Keller T, Elfeber M, Gorboulev V, Reiländer H, Koepsell H. Purification and functional reconstitution of the rat organic cation transporter OCT1. *Biochemistry*. 2005 Sep 13; 44(36):12253-63.

Keller T, Schwarz, D, Bernhard, F, Dötsch, V., Hunte, C, Gorboulev, V, and Koepsell, H. (2008) *Biochemistry* 47, 4552–4564

Keller T, Egenberger B, Gorboulev V, Bernhard F, Uzelac Z, Gorbunov D, Wirth C, Koppatz S, Dötsch V, Hunte C, Sitte HH, Koepsell H. *J Biol Chem.* (2011) Oct, The large extracellular loop of organic cation transporter 1 influences substrate affinity and is pivotal for oligomerization. 28; 286(43):37874-86

Kekuda R, Prasad PD, Wu X, Wang H, Fei YJ, Leibach FH, Ganapathy V. Cloning and functional characterization of a potential-sensitive, polyspecific organic cation transporter (OCT3) most abundantly expressed in placenta. *J Biol Chem.* 1998 Jun 26; 273(26):15971-9.

Koehler MR, Gorboulev V, Koepsell H, Steinlein C, Schmid M. Roct1, a rat polyspecific transporter gene for the excretion of cationic drugs, maps to chromosome 1q11-12. *Mamm Genome.* 1996 Mar; 7(3):247-8.

Koehler MR, Wissinger B, Gorboulev V, Koepsell H, Schmid M. The two human organic cation transporter genes SLC22A1 and SLC22A2 are located on chromosome 6q26. *Cytogenet Cell Genet.* 1997; 79(3-4):198-200

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

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

Koepsell H, Hitoshi Endou. The SLC22 drug transporter family. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* (2004) 447:666–676

Koepsell H. Polyspecific organic cation transporters: Their functions and interactions with drugs. *Trends Pharmacol Sci.* 2004 Jul; 25(7):375-81.

Koepsell H, Lips K, Volk C. Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm Res.* 2007 Jul; 24(7):1227-51. Epub 2007 May 1

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

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

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

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.

Okuda M, Saito H, Urakami Y, Takano M, Inui K. cDNA cloning and functional expression of a novel rat kidney organic cation transporter, OCT2. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996 Jul 16; 224(2):500-7.

Pao, S.S., I.T. Paulsen, and M.H. Saier, Jr. 1998. Major facilitator superfamily. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR.*

Pelis RM, Suhre WM, Wright SH. Functional influence of N-glycosylation in OCT2-mediated tetraethylammonium transport. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F1118–F1126, 2006.

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

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



Rose, AM., Valdes R Jr. Understanding the sodium pump and its relevance to disease. *Clin. Chem.* 40(9): 1674-85. (1994)

M. Saborowski, G. A. Kullak-Ublick, and J. J. Eloranta. The human organic cation transporter-1 gene is transactivated by hepatocyte nuclear factor-4!. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 317:778–785 (2006)

Schirmer T. General and specific porins from bacterial outer membranes. *J Struct. Biol.* 121(2):101-9. 1998.

Schmitt BM, Koepsell H. Alkali cation binding and permeation in the rat organic cation transporter rOCT2. *J Biol Chem.* 2005 Jul 1;280(26):24481-90. Epub 2005 May 6.

Schmitt BM, Gorbunov D, Schlachtbauer P, Egenberger B, Gorboulev V, Wischmeyer E, Müller T, Koepsell H. Charge-to-substrate ratio during organic cation uptake by rat OCT2 is voltage dependent and altered by exchange of glutamate 448 with glutamine. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009 Apr; 296(4):F709-22.

Sears CL, Kaper JB. Enteric bacterial toxins. *Microbiol. Rev.* 60; 167-215. 1996.

Sekine T, Watanabe N, Hosoyamada M, Kanai Y, Endou H (1997) Expression cloning and characterization of a novel multispecific organic anion transporter. *J Biol Chem* 272:18526–18529

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

Sweet DH, Chan LMS, Walden R, Yang X-P, Miller DS, Pritchard JB (2003) Organic anion transporter 3 (Slc22a8) is a dicarboxylate exchanger indirectly coupled to the Na<sup>+</sup> gradient. *Am J Physiol Renal Physiol* 284:F763–F769.

Tamai I, Yabuuchi H, Nezu J-I, Sai Y, Oku A, Shimane M, Tsuji A (1997) Cloning and characterization of a novel human pH-dependent organic cation transporter, OCTN1. *FEBS Lett* 419:107–111

Takane H, Shikata E, Otsubo K, Higuchi S, Ieiri I. Polymorphism in human organic cation transporters and metformin action. *Pharmacogenomics*. 2008 Apr; 9(4):415-22.

Thévenod F, , Wolff NA, Lee WK, Schatz I, Keller T, Al-Monajjed R, Gorboulev V, Koepsell H. Substrate- and cell contact-dependent inhibitor affinity of human organic cation transporter 2: studies with two classical organic cation substrates and the novel substrate Cd<sup>2+</sup>. *Mol Pharm*. 2013 Aug 5; 10(8):3045-56.

Thomas J, Wang L, Clark RE, Pirmohamed M. Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance. *Blood* 2004; 104:3739-3745.

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

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

Volk, C., Gorboulev, V., Kotzsch, A., Müller, T. D., Koepsell, H. (2009): Five amino acids in the innermost cavity of the substrate binding cleft of organic cation transporter 1 interact with extracellular and intracellular corticosterone. *Mol Pharmacol* 76: 275-289

Wang D.-S., J. W. Jonker, Y. Kato, H. Kusuhara, A. H. Schinkel, and Y. Sugiyama. Involvement of organic cation transporter 1 in hepatic and intestinal distribution of metformin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302:510–515 (2002).

White DL, Saunders VA, Dang P, Engler J, Venables A, Zrim S, Zannettino A, Lynch K, Manley PW, Hughes T. Most CML patients who have a suboptimal response to imatinib have low OCT1 activity: higher doses of imatinib may

overcome the negative impact of low OCT-1 activity. *Blood*. 2007 Dec 1; 110(12):4064-72. Epub 2007 Aug 30.

Yabuuchi H, Tamai I, Nezu J-I, Sakamoto K, Oku A, Shimane M, Sai Y, Tsuji A (1999) Novel membrane transporter OCTN1 mediates multispecific, bidirectional, and pH-dependent transport of organic cations. *J Pharmacol Exp Ther* 289:768–773

Yonezawa A. Platinum Agent-induced Nephrotoxicity via Organic Cation Transport System. *Yakugaku Zasshi*. 2012;132(11):1281-5.

### Danksagung:

An dieser Stelle möchte ich mich zuerst bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. Hermann Koepsell, für die Bereitstellung des Themas und die exzellente fachliche und menschliche Betreuung bedanken. Besonders danke ich für die freundliche Betreuung in der Phase der Erstellung dieser Arbeit und für die zahlreichen konstruktiven Gespräche.

Ich danke Dr. Valentin Gorboulev und Irina Schatz für die Herstellung der rOCT1-Mutanten. Dr. Gorboulev danke ich außerdem für die Bereitstellung von Docking-Modellen.

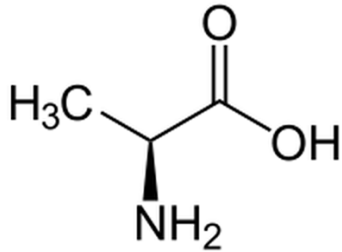
Des Weiteren bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Anatomie und Zellbiologie für die freundliche und kollegiale Arbeitsatmosphäre und die geduldige Betreuung in der Einarbeitungsphase der Experimente. Besonders danke ich: PD Dr. Christopher Volk, Dr. Maïke Veyhl-Wichmann, Ursula Roth sowie Dr. Brigitte Egenberger.

Ich bedanke mich auch bei meinen Mitdoktoranden für das kollegiale Miteinander, das den Laboralltag entscheidend auflockerte.

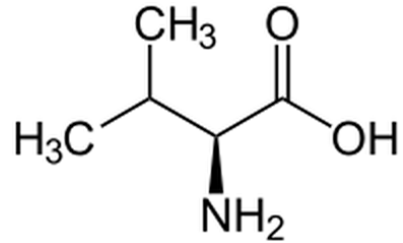
Ich bedanke mich außerdem bei meinen Eltern, die stets an mich glaubten und danke insbesondere meiner Mutter für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Schließlich danke ich meiner Frau, die mir trotz Prüfungsstress während des Studiums und später im Familienalltag und während der Arbeitszeit, immer genug Zeit für die Doktorarbeit zur Verfügung stellte und meine gelegentliche Missstimmung, vor allem während der Fertigstellung der Arbeit, geduldig ertragen hat.

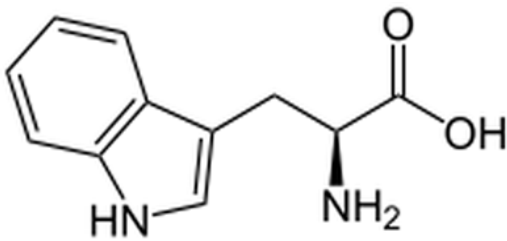
Anhang:



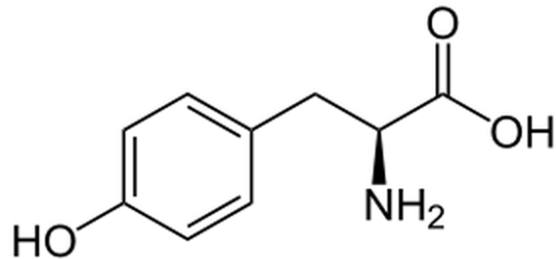
Alanin



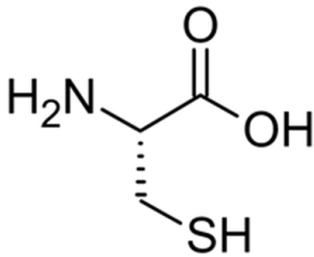
Valin



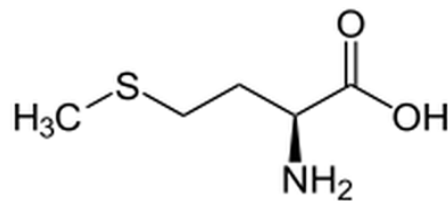
Tryptophan



Tyrosin



Cystein



Methionin

Abb. 20: Dargestellt sind die Strukturformeln der 6 relevanten Aminosäuren dieser Dissertation. Mutiert wurde an je 3 Stellen des Transporters: 359 Alanin zu Valin, 355 Tryptophan zu Tyrosin und 451 Cystein zu Methionin. Die korrespondierenden Paare sind jeweils nebeneinander dargestellt.

## Curriculum Vitae

### **PERSÖNLICHE DATEN:**

Name: Christian Heinz Aichner

Geburtsdatum: 26.11.1980

Geburtsort: Würzburg

Familienstand: verheiratet

### **BILDUNGSWEG:**

2001 Abitur am „Jack Steinberger“ Gymnasium Bad Kissingen

2001/2002 Grundwehrdienst

2002/2003 Studium der Biologie an der Universität Salzburg

2004-2011 Studium der Humanmedizin an der Julius- Maximilians-Universität Würzburg und an der Universität Wien

11/2011 Abschluss des Studiums der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Note 1,5

12/2011 Approbation als Arzt

### **BESCHÄFTIGUNGSVERHÄLTNISSE:**

2003/2004 Arbeitsaufenthalt in London/England

2007/2011 Studentischer Assistent in Anatomie und Histologie

2009/2011 Studentische Hilfskraft an der Main-Klinik Ochsenfurt

seit 02/2012 Assistenzarzt der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie des Universitätsklinikums Würzburg

Würzburg, Januar 2014

Christian Aichner