

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Medizinische Klinik und Poliklinik D / Experimentelle Nephrologie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Karl-Heinz Rahn -

Untersuchungen zur Regulation des organischen
Kationentransporters rOCT1 durch zyklische Nukleotide und
Untersuchungen des organischen Kationentransportes
über die Mitochondrienmembran
mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae dentium

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Verena Mönnich

aus Datteln

2003

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Heribert Jürgens

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Eberhard Schlatter

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Markus Lerch

Tag der mündlichen Prüfung: 14. November 2003

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Medizinische Klinik und Poliklinik D / Experimentelle Nephrologie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Karl-Heinz Rahn -
Referent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Eberhard Schlatter

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Markus Lerch

ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchungen zur Regulation des organischen Kationentransporters rOCT1 durch zyklische Nukleotide und Untersuchungen des organischen Kationentransportes über die Mitochondrienmembran mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie

Verena Mönnich

In der vorliegenden Studie wurde der organische Kationentransporter der Ratte Typ 1 (rOCT1), stabil exprimiert in einer permanenten menschlichen Nierenzelllinie (HEK293), bezüglich seiner Regulation durch zyklische Nukleotide untersucht. Als Methode diente die ASP^+ -Fluoreszenzmessung. Dabei stellte das fluoreszierende organische Kation ASP^+ das Substrat für den rOCT1 dar. Der rOCT1 wurde durch 8-Br-cGMP und extrazelluläres cGMP gehemmt. Der Effekt war nicht PKG-vermittelt und zeigte sich bei cGMP nur nach 10-minütiger Vorinkubation der Zellen. Dies führt zu der Annahme, dass eine Erhöhung intrazellulären cGMPs in proximalen Tubuluszellen die Aufnahme organischer Kationen durch Inhibition des rOCT1 verringert. Dieser Effekt ist offensichtlich spezifisch für cGMP und wird nicht durch die nicht zyklischen Guanosinnukleotide oder cAMP ausgelöst.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde mit derselben Messmethode untersucht, ob in der inneren Mitochondrienmembran ein Transporter für organische Kationen existiert und ob dieser identisch mit einem Transporter des OCT-Typs ist. Dazu wurden die Substanzen Cimetidin, TEA^+ und Chinin als bekannte Substrate beziehungsweise als Inhibitor des organischen Kationentransportes in der Plasmamembran verwendet. Generell zeigte sich eine Aufnahme von ASP^+ über die innere Mitochondrienmembran, jedoch zeigte diese keine Charakteristika des organischen Kationentransportes über Transporter des OCT-Typs.

Tag der mündlichen Prüfung: 14. November 2003

Meiner Mutter, die ich über alles liebe und
meinem Vater, den ich sehr vermisse.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	i
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	iii
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 PROBLEMSTELLUNG.....	1
1.2 AKTUELLER STAND DER FORSCHUNG.....	1
1.2.1 <i>Wissensstand zur Untersuchung der Regulation des Kationentransporters rOCT1</i>	1
1.2.1.1 Der proximale Tubulus der Niere	2
1.2.1.2 Organische Kationen und ihr Transport im proximalen Tubulus	3
1.2.1.3 Organischer Kationentransporter der Ratte Typ 1 (rOCT1).....	6
1.2.2 <i>Wissensstand zur Untersuchung des Kationentransportes über die Mitochondrienmembran</i>	9
1.2.2.1 Die Mitochondrienmembran.....	9
1.2.2.2 Transportvorgänge in der Mitochondrienmembran	10
1.3 ZIELSETZUNG UND AUFBAU DER ARBEIT	11
2 MATERIAL UND METHODEN.....	13
2.1 ZELLEN	13
2.2 ZELLKULTUR.....	13
2.3 SUPERFUSIONSLÖSUNG.....	14
2.4 4-(4-DIMETHYLAMINOSTYRYL)-N-METHYLPYRIDINIUM (ASP ⁺).....	14
2.5 VERSUCHSAUFBAU.....	15
2.6 SUPERFUSIONSKAMMER.....	17
2.7 FLUORESCENZMESSUNG.....	18
2.7.1 <i>Messung der Regulation des organischen Kationentransporters rOCT1 durch zyklische Nukleotide mittels der ASP⁺-Fluoreszenzmessmethode</i>	18
2.7.2 <i>Messung des organischen Kationentransportes über die Mitochondrienmembran mittels der ASP⁺-Fluoreszenzmessmethode</i>	19
2.8 CHEMIKALIEN	20
2.9 STATISTIK	20

Inhaltsverzeichnis

3	ERGEBNISSE	22
3.1	REGULATION DES ORGANISCHEN KATIONENTRANSPORTERS ROCT1 DURCH ZYKLISCHE NUKLEOTIDE	22
3.2	ORGANISCHER KATIONENTRANSPORT ÜBER DIE MITOCHONDRIENMEMBRAN	30
3.2.1	<i>Kompetitive Hemmstoffe Cimetidin und TEA⁺</i>	30
3.2.2	<i>Nicht-kompetitiver Hemmstoff Chinin</i>	33
4	DISKUSSION	34
4.1	UNTERSUCHUNG DER REGULATION DES ORGANISCHEN KATIONENTRANSPORTERS ROCT1 DURCH ZYKLISCHE NUKLEOTIDE	34
4.2	ORGANISCHER KATIONENTRANSPORT ÜBER DIE MITOCHONDRIENMEMBRAN	40
5	ZUSAMMENFASSUNG	43
6	LITERATURVERZEICHNIS	44
	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	I
	ORIGINALPUBLIKATIONEN	I
	ABSTRACTS.....	I
	CURRICULUM VITAE	II
	DANKSAGUNG	III
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	IV

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ANP	atriales natriuretisches Peptid
ASP ⁺	4-(4-Dimethylaminostyryl)-N-Methylpyridinium
ATP	Adenosintriphosphat
Br-	bromo
cAMP	zyklisches 3',5'-Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches 3',5'-Guanosinmonophosphat
Cl ⁻	Chlorid
CO ₂	Kohlendioxid
GDP	Guanosindiphosphat
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
H ⁺	Proton
HCO ₃ ⁻	Bicarbonat
HEK293-Zellen	<i>human embryonic kidney cells</i>
hOCT2	<i>humaner organischer Kationentransporter Typ 2</i>
IHKE1-Zellen	<i>immortalized human kidney epithelial cells</i>
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
KT5720	spezifischer Inhibitor der Proteinkinase A
KT5823	spezifischer Inhibitor der Proteinkinase G
LLC-PK ₁ -Zellen	kultivierte Nierenepithelzellen vom Schwein
MCF	mitochondriale Carrier-Familie
MDR	<i>multidrug-resistance protein</i>
MFS	<i>major facilitator superfamily</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MPP ⁺	1-Methyl-4-Phenylpyridinium
MW ± SEM	Mittelwert ± Standardfehler des Mittels
n	Anzahl der Experimente
NaCl	Natriumchlorid
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Natrium/Kalium-Adenosintriphosphatase
NMN ⁺	N-Methylnikotinamid

Abkürzungsverzeichnis

OATP	organischer Anionentransporter
OCT	Transporter für organische Kationen
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pK _a	negativer dekadischer Logarithmus der Aciditätskonstante
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
rOCT1	<i>organischer Kationentransporter Typ 1 der Ratte</i>
rOCT1-HEK293-Zellen	stabil den rOCT1 exprimierende HEK293-Zellen
SCL 22-Familie	<i>solute carrier family 22</i>
TEA ⁺	Tetraethylammonium
TIM	<i>translocase of the inner membrane</i>
TOM	<i>translocase of the outer membrane</i>
TPA ⁺	Tetrapropylammonium
TPB ⁻	Tetraphenylboron

1 EINLEITUNG

1.1 Problemstellung

Für die Beurteilung der Wirksamkeit von Medikamenten ist die Untersuchung ihrer Sekretion und Reabsorption im Körper von großer Bedeutung. Viele dieser Arzneistoffe gehören zur chemischen Gruppe der Kationen. Wegen ihrer positiven Ladung können sie Membranen nicht ohne weiteres überwinden. Für ihren Transport sind integrale Membranproteine verantwortlich. Folglich ist die Erforschung des Aufbaus, der Funktion und Regulation dieser Transportproteine von essenzieller Bedeutung. Ein solches Transportprotein ist der rOCT1, welcher Gegenstand eines Teils der vorliegenden Arbeit ist.

In Bezug auf die Entwicklung von Medikamenten und deren Wirkung ist jedoch auch ihre Verteilung und somit ihr konkreter Wirkungsort innerhalb der Zelle bedeutend. Eine wichtige Rolle spielen dort die Mitochondrien als Zentrale des Energiestoffwechsels [O'Rourke, 2000; Szewczyk and Wojtczak, 2002]. Daher wird in einem weiteren Teil dieser Studie untersucht, ob der Kationentransport über die innere Mitochondrienmembran ebenfalls durch Transporter des OCT-Typs vermittelt wird.

Als Grundlage für die nachfolgende Arbeit soll nunmehr ein Überblick über den aktuellen Wissensstand der beiden Themengebiete gegeben werden.

1.2 Aktueller Stand der Forschung

1.2.1 Wissensstand zur Untersuchung der Regulation des Kationentransporters rOCT1

1947 wurde von Rennick und Mitarbeitern erstmals die Sekretion eines organischen Kations (TEA^+) in der Niere nachgewiesen [Rennick et al., 1947]. In den folgenden Jahren wurden eine Vielzahl von Untersuchungen zum organischen Kationentransport an verschiedenen Geweben und Spezies durchgeführt, zum Beispiel in der Niere [zur Übersicht siehe Koepsell, 1998; Ullrich, 1999], der Leber [Martel et al., 1996; Mc Kinney

and Hosford, 1992; Moseley et al., 1996; Moseley et al., 1997; Nakamura et al., 1994], im Dünndarm [Iseki et al., 1993], der Plazenta [Ganapathy et al., 1988] und im Plexus choroideus [Miller et al., 1999; Whittico et al., 1990].

Hauptort der Sekretion und Reabsorption körpereigener und –fremder Substanzen sind die Epithelzellen im proximalen Tubulus der Niere [Koepsell et al., 1999].

1.2.1.1 Der proximale Tubulus der Niere

Die kleinste funktionelle Einheit der Niere ist das Nephron, welches sich in folgende Abschnitte unterteilt: Glomerulus (Ort des Filtrationsprozesses) und Tubulussystem (Ort des tubulären Transportes). Das Tubulussystem wiederum lässt sich wie folgt einteilen: proximaler Tubulus mit Pars convoluta und Pars recta, dünne absteigende Henle-Schleife, dünne aufsteigende Henle-Schleife, dicke aufsteigende Henle-Schleife und distaler Tubulus. Acht bis zehn Nephrone münden schließlich in ein Sammelrohr [Junqueira, 2002] (Abbildung 1).

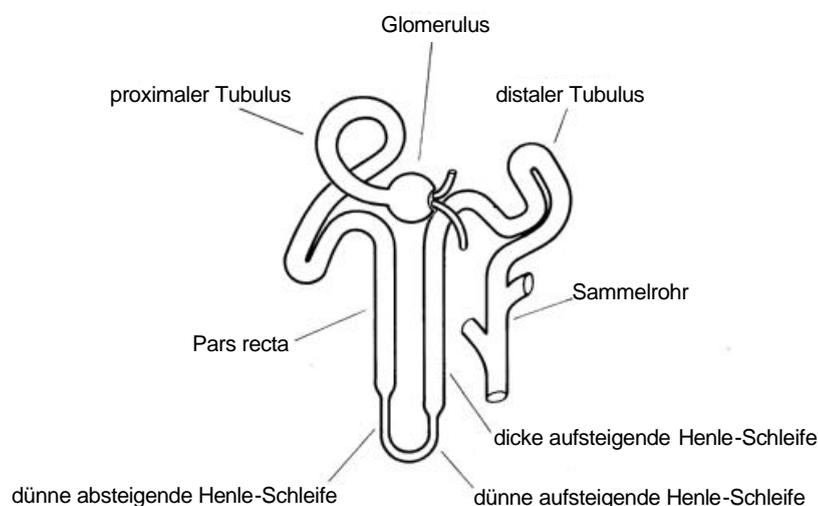


Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Nephrons der Säugerniere.

Der proximale Tubulus wird von einschichtigem Epithel ausgekleidet, deren Zellen kubisch bis hochprismatisch und relativ groß sind. Mikroskopisch auffällig sind ein hoher apikaler Bürstensaum und eine basale senkrechte Streifung, die vor allem durch die vielen länglichen senkrecht angeordneten Mitochondrien hervorgerufen wird. Zudem gibt es basolateral zahlreiche Zellfortsätze, die die Membranoberfläche um ein

Vielfaches vergrößern und in hoher Dichte Na⁺/K⁺-ATPasen enthalten. Letzteres lässt auf eine hohe Transportaktivität im proximalen Tubulus schließen [Junqueira, 2002]. In der Pars recta wird das Epithel dann niedriger und die basalen Oberflächenvergrößerungen nehmen ab. Der proximale Tubulus besitzt eine zentrale Bedeutung für die metabolische Inaktivierung und Ausscheidung zahlreicher körpereigener und –fremder Substanzen. Von besonderem pharmakologischem Interesse sind in diesem Zusammenhang unter anderem die Transportsysteme für organische Kationen.

1.2.1.2 Organische Kationen und ihr Transport im proximalen Tubulus

Organische Kationen sind durch ihre positive Ladung bei physiologischem pH gekennzeichnet. Sie werden eingeteilt in Typ1- und Typ2-Kationen [Mol et al., 1988; Oude Elferink et al., 1995]. Zur ersten Gruppe gehören kleine, stark hydrophile Kationen (z.B. TEA⁺). Zur zweiten Gruppe zählen in ihrer Molekularstruktur komplexere und hydrophobere Kationen (z.B. Chinin). Organische Kationen umfassen Substanzen, die vom Körper endogen synthetisiert oder ihm exogen, zum Beispiel als Medikament, zugeführt werden. Zu den endogenen Vertretern der organischen Kationen zählen die biogenen Amine, wie beispielsweise Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin. Zu den exogenen Vertretern gehören permanente Kationen wie TEA⁺ und MPP⁺, sowie ein großer Teil der klinisch eingesetzten Arzneistoffe [Dresser et al., 2000]. Zur chemisch heterogenen Gruppe der kationischen Pharmaka gehören unter anderem Antihistaminika, Antidepressiva, Antibiotika, Lokalanästhetika, Analgetika, Zytostatika, β -Blocker und Kalziumblocker [Pritchard and Miller, 1997; Ullrich, 1999; Ullrich and Rumrich, 1993].

Da organische Kationen aufgrund ihrer polaren Eigenschaft Zellmembranen kaum penetrieren können, es sei denn, sie sind hydrophob, spielen integrale Membranproteine für ihren Transport eine wichtige Rolle. Diese sogenannten Carrier-Proteine erledigen den Transport geladener Teilchen über die Zellmembran. Dafür sind im Organismus zum einen substratspezifische, Na⁺-abhängige Transporter zuständig, wie sie für das Nervensystem und auch für die Niere dargestellt wurden [Koepsell, 1998; Burckhardt and Wolff, 2000; Rudnick and Clark, 1993; Schloss et al., 1992]. Zum anderen findet der Transport durch polyspezifische, Na⁺-unabhängige Transportsysteme statt, wie es für die Epithelien in Leber, Niere, Dünndarm und Gehirn beschrieben wurde [Koepsell, 1998; Koepsell et al., 1998; Koepsell et al., 1999; Zhang et al., 1998].

Im proximalen Tubulus der Niere konnten bisher sieben verschiedene Transportsysteme für organische Kationen differenziert werden [Koepsell et al. 1998] (Abbildung 2).

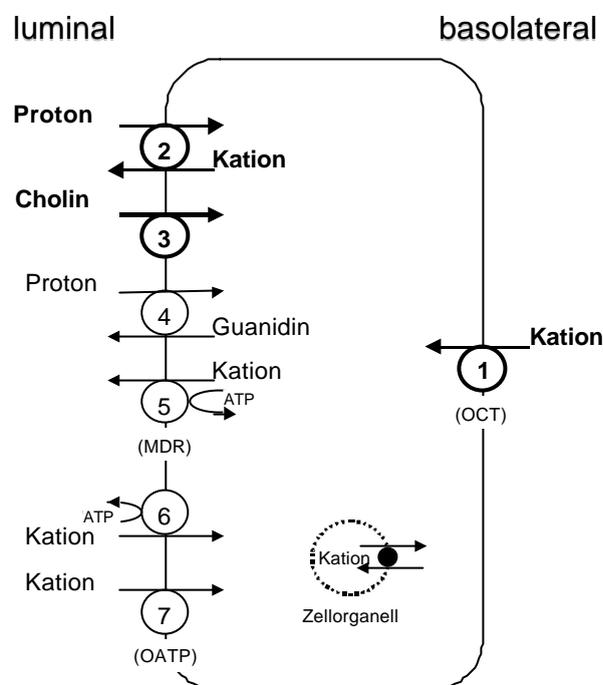


Abbildung 2: Renale proximale Tubuluszelle mit den verschiedenen Transportsystemen für organische Kationen.

Die Systeme ① - ③ sind am besten charakterisiert. System ④ ist ein elektroneutraler Austauscher, mit engerer Substratspezifität; er transportiert Guanidin. Bei den Systemen ⑤ und ⑥ handelt es sich um primär aktive Transporter, welche ATP-abhängig arbeiten. System ⑦ ist der polyspezifische OATP, der zahlreiche organische Anionen und Kationen transportiert. (OCT = organischer Kationentransporter; ATP = Adenosintriphosphat; MDR = multidrug-resistance protein; OATP = organischer Anionentransporter). Eine Anreicherung organischer Kationen in intrazellulären Organellen wird vermutet. [Koepsell et al., 1999; Pritchard and Miller, 1993, 1996 a und b, 1997; Steen et al., 1993].

Sekretion und Reabsorption der Kationen setzen sich jeweils aus zwei Transportschritten zusammen [Holohan and Ross, 1980 und 1981; Koepsell et al., 1999]. Bei der Sekretion erfolgt zunächst die Aufnahme des Kations aus dem Interstitium in die Tubuluszelle durch die basolaterale Membran. Sie wird über zwei polyspezifische Aufnahmesysteme vermittelt. Dabei transportiert das eine Typ1-Kationen (z.B. TEA^+ , NMN^+ , Cholin) [Kim and Dantzer, 1996; McKinney and Kunemann 1985 und 1987] und

das andere Typ2-Kationen (z.B. Vecuronium). Das Transportsystem für Typ1-Kationen ist Na⁺- und pH-unabhängig und wahrscheinlich mit dem OCT1 [Busch et al., 1996a; Gründemann et al., 1994], einem klonierten homologen Transporter, identisch. Dieser transportiert elektrogen und polyspezifisch organische Kationen und wurde unter anderem in der basolateralen Membran des proximalen Tubulus der Rattenniere identifiziert (rOCT1) [Gründemann et al., 1994; Koepsell, 1998; Koepsell et al., 1998; Koepsell et al., 1999; Ullrich et al., 1991] (Ⓛ in Abbildung 2). Des Weiteren kommen für den Transport von Typ1-Kationen in der basolateralen Membran des proximalen Tubulus auch der OCT2 und der OCT3 in Betracht. Dies sind zwei weitere klonierte Transporter [Kekuda et al., 1998; Okuda et al., 1996], die ebenfalls elektrogen und multispezifisch Na⁺- und pH-unabhängig organische Typ1-Kationen transportieren. Der OCT2 ist unter anderem in der basolateralen Membran der Niere exprimiert [Ito, 1999; Koepsell, 1998]. Der OCT3 ist wahrscheinlich ebenfalls in dieser Membran lokalisiert, doch um dies zu belegen, ist zunächst die Entwicklung OCT3-spezifischer Antikörper notwendig [Wu et al., 2000].

Über die basolaterale Aufnahme von Typ2-Kationen in der Niere ist relativ wenig bekannt. Möglicherweise wird sie durch ein noch nicht identifiziertes Transportprotein vermittelt. Auch der basolaterale PAH-Transporter könnte diesen Transport vermitteln, von dem man weiß, dass er durch Kationen inhibiert wird [Koepsell, 1998].

Nach ihrer Aufnahme in die Tubuluszelle können organische Kationen zunächst in intrazellulären Organellen wie Endosomen und Mitochondrien gespeichert werden [Pritchard and Miller, 1993, 1996a und b, 1997; Steen et al., 1993; Zhang et al., 1998] (Abbildung 2). Dieser Transport könnte über einen H⁺-Austauscher erfolgen, der in der Membran solcher Organellen lokalisiert und mit dem Austauscher in der luminalen Plasmamembran identisch sein könnte [Koepsell et al., 1999].

Im zweiten Schritt der Sekretion werden dann die organischen Kationen über die luminalen Membran in das Tubuluslumen transportiert und in den Urin ausgeschieden. Dieser Transport wird von drei Transportsystemen übernommen. Zum einen von zwei Austauschern, von denen der eine ein elektroneutraler, polyspezifischer (Ⓜ in Abbildung 2) [Dantzer and Brokl, 1988; David et al., 1995; Lazaruk and Wright., 1990; Takano et al., 1985; Wright and Wunz, 1987] und der andere ein elektroneutraler

Transporter mit engerer Substratspezifität ist (④ in Abbildung 2). Letzterer transportiert Guanidin und lässt sich nicht durch TEA⁺ und NMN⁺ hemmen [Chun et al., 1997; Miyamoto et al., 1988; Miyamoto et al., 1989]. Bei dem dritten System handelt es sich um P-Glykoproteine, die primär aktive ATP-abhängige Transporter darstellen, welche vor allem die Sekretion relativ hydrophober Kationen ermöglichen (⑤ in Abbildung 2) [Gottesman and Pastan, 1993; Koepsell, 1998]. Zwei Subtypen dieser Proteine wurden unter anderem aus der Maus kloniert [Schinkel et al., 1994].

Die Rückresorption organischer Kationen, die entgegengesetzte Transportrichtung, findet ebenfalls in zwei Schritten statt. Luminal gibt es drei bisher bekannte Transportsysteme. Zum einen den elektrogenen Transporter mit hoher Affinität zu Cholin (③ in Abbildung 2) [Takano et al., 1993; Ullrich and Rumrich, 1996; Wright et al., 1992]. Zum anderen ein ATP-abhängiges Transportprotein (⑥ in Abbildung 2) [McKinney and Hosford, 1993] und außerdem den polyspezifischen OATP (⑦ in Abbildung 2), der die Aufnahme zahlreicher organischer Anionen und Kationen vermittelt [Bergwerk et al., 1996; Dubuissou et al., 1996; Koepsell et al., 1999].

Die Transporter, die den zweiten Schritt der Reabsorption über die basolaterale Membran vermitteln, sind bisher nicht identifiziert. Eventuell sind sie teilweise identisch mit den potenzialabhängigen basolateralen Kationentransportern, welche Kationen in beide Richtungen transportieren können [Koepsell et al., 1999].

1.2.1.3 Organischer Kationentransporter der Ratte Typ 1 (rOCT1)

Einen großen Anteil an den soeben dargestellten Erkenntnissen hatte die Identifizierung organischer Kationentransporter durch Expressionsklonierung. Erstmals gelang dies 1994 Professor Koepsell in Würzburg [Gründemann et al., 1994]. Damals wurde das erste Mitglied einer neuen Familie organischer Kationentransporter, der rOCT1 durch Expressionsklonierung aus Rattenniere identifiziert. Inzwischen wurden mit Hilfe von Homologieklonierung über 30 weitere Mitglieder dieser Familie aus verschiedenen Spezies wie Ratte, Maus, Mensch, Kaninchen, Schwein und Flunder sowie aus den Invertebraten *Drosophila melanogaster* und *Caenoraphditis elegans* kloniert. Eine aktuelle Zusammenstellung findet man in einigen Studien [Burckhardt and Wolff, 2000; Koepsell et al. 1999; Zhang et al. 1998]. Alle diese Transporter gehören zu einer neuen Proteinfamilie, der SCL 22-Familie (solute carrier family 22) [Koehler et al., 1997] und

sie gehören der MFS (major facilitator superfamily) an [Marger and Saier, 1993]. rOCT1 besteht aus 556 Aminosäuren [Gründemann et al., 1994; Koepsell, 1998; Koepsell et al. 1998; Koepsell et al., 1999] und ist auf dem proximalen langen Arm des Rattenchromosoms 1 auf der Genposition 1q11-12 lokalisiert [Koehler et al., 1996; Koepsell, 1998; Koepsell et al. 1998; Koepsell et al., 1999]. Hydrophobiezytitätsanalysen nach ist er, sowie auch alle übrigen Transporter der OCT-Familie, aus elf bis zwölf transmembranären α -Helices aufgebaut [Koepsell et al., 1999]. Die erste große Proteinschleife (zwischen Transmembrandomäne 1 und 2 / Abbildung 3) wird extrazellulär lokalisiert und besitzt drei konservierte Glykolisierungsstellen [Gründemann et al., 1994]. Die zweite große Schleife (zwischen Transmembrandomäne 6 und 7 / Abbildung 3) wird intrazellulär vermutet. Sie trägt einige potenzielle PKC-abhängige Phosphorylierungsstellen [Koepsell et al.; 1998]. Immunhistochemische und funktionelle Studien mit rOCT1-transfizierten Zellen weisen darauf hin, dass der basolaterale organische Kationentransporter im proximalen Tubulus der Niere, in kleinen Darmenterozyten und in sinusoidalen Membranen von Hepatozyten zu finden ist [Gorboulev et al., 1997; Gründemann et al., 1994; Gründemann et al., 1997; Koepsell et al., 1999; Mehrens et al., 2000; Sugawara-Yokoo et al., 2000]. Er ist ein polyspezifischer, elektrogener Kationentransporter und arbeitet Na^+ - und pH-unabhängig [Gorboulev et al., 1997; Koehler et al., 1996; Koepsell, 1998; Koepsell et al. 1998; Koepsell et al., 1999; Mehrens et al., 2000]. Er ist beteiligt am ersten Schritt der renalen Sekretion von Kationen durch die basolaterale Membran im proximalen Tubulus [Koepsell et al., 1999] (System ① in Abbildung 2). Dort sezerniert er kleine endogene organische Substrate, Transmitter, Medikamente, Toxine und Umweltgifte [Breidert et al., 1998; Burckhardt and Wolf, 2000; Busch et al.; 1996 a und b; Busch et al., 1998; Gründemann et al., 1994; Koehler et al., 1996; Koepsell et al., 1999; Martel et al., 1996; Nagel et al., 1997; Ullrich, 1999]. Im Laufe der Zeit ergaben sich wachsende Erkenntnisse zum rOCT1 hinsichtlich seines Aufbaus und seiner Eigenschaften [Arndt et al., 2001; Busch et al.; 1996 b; Koepsell et al., 1999]. Vor einiger Zeit wurden erstmals Ergebnisse geliefert, die seine Regulation betreffen. Sie zeigen eine Stimulation der Transportaktivität des rOCT1, stabil exprimiert in HEK293-Zellen durch PKC, PKA und Tyrosinkinase [Mehrens et al., 2000].

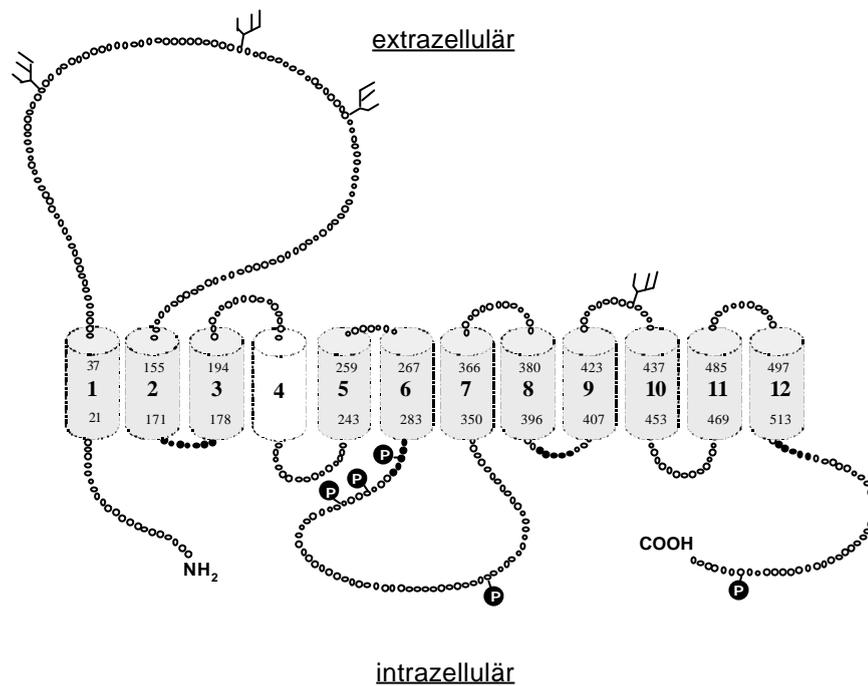


Abbildung 3: Theoretisches Aufbauschema des ersten klonierten organischen Kationentransporters – dem rOCT1 auf Basis einer Kyte-Doolittle Hydrophobizitätsanalyse [Koepsell *et al.*; 1998].

Potenzielle membran-übergreifende α -Helices werden als Zylinder dargestellt (1 - 12). Die glykolisierenden Regionen (Y-förmige Symbole) liegen extrazellulär und die PKC-abhängigen Phosphorylierungsbereiche (P) weisen nach intrazellulär. Schwarze Punkte in den Ketten (•) zeigen Peptide, die als intrazelluläre Signalsequenzen für Nährstofftransporter definiert sind.

1.2.2 Wissensstand zur Untersuchung des Kationentransportes über die Mitochondrienmembran

Wie bereits erwähnt, spielen nicht nur die Transportproteine der Plasmamembran eine bedeutende Rolle bei der Wirkung und Verteilung von Medikamenten, sondern unter anderem auch die Mitochondrien im Inneren der Zelle [Szewczyk and Wojtczak, 2002].

Anfang der 50er-Jahre wurde ihre Feinstruktur erstmals in elektronenmikroskopischen Arbeiten von G. E. Palade und F. S. Sjöstrand beschrieben [Kleinig, 1999]. Das Hauptaugenmerk weiterer Forschungen lag zunächst darin, die Mechanismen des Energieerhaltes in den Mitochondrien zu klären. So gab Mitchell 1961 in vier Postulaten seine chemiosmotische Hypothese zum Energieerhalt heraus [Bernardi, 1999; O'Rourke, 2000]. Je mehr sich die Debatte um den Energieerhalt auf diese Hypothese konzentrierte, desto mehr Studien zum mitochondrialen Ionentransport entwickelten sich parallel. Da aber vor allem in den 80er-Jahren die Meinung vorherrschte, dass Mitochondrien keine Kationenkanäle besäßen, sind die Forschungen mit denen des Membrantransportes in der Plasmamembran nicht vergleichbar [Bernardi, 1999].

Zudem besitzt die innere Mitochondrienmembran einen komplexeren Aufbau als die Plasmamembran, so dass man nicht ohne weiteres davon ausgehen kann, dass dort dieselben Transportmechanismen für den organischen Kationentransport vorhanden sind.

1.2.2.1 Die Mitochondrienmembran

Mitochondrien kommen in allen eukaryotischen Zellen mit Zellkern vor und sind winzige, aber lichtmikroskopisch sichtbare, semiautonome Organellen. Sie spielen sowohl in der oxidativen Energieproduktion der Zellen als auch im anabolen und katabolen Stoffwechsel eine zentrale Rolle.

Mitochondrien besitzen zwei Membranen. Eine äußere Membran, dann den Intermembranraum, nachfolgend die innere Membran und im Inneren liegt die sogenannte Matrix (Abbildung 4).

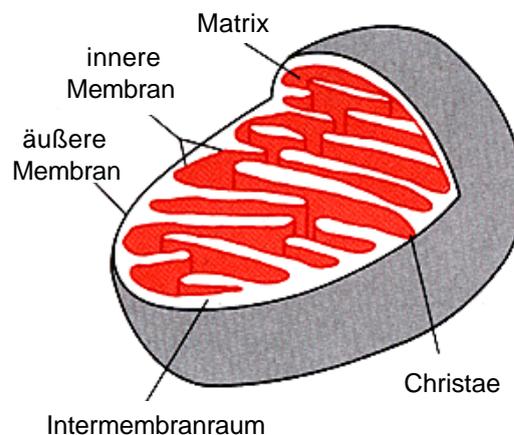


Abbildung 4: Schematischer Aufbau eines Mitochondriums.

Die äußere Membran enthält Porine, die kleinere Moleküle bis zu einer Größe von etwa 6 kDa und Anionen passieren können. Der Intermembranraum beherbergt eine nicht-plasmatische Phase und hat nur wenige Funktionen. Die nachfolgende innere Membran hingegen stellt eine Diffusionsbarriere dar. Sie umschließt die Matrix und enthält zahlreiche Translokatoren für den regulierten Stoffaustausch zwischen Zyto- und Mitoplasma [Kleinig, 1999]. Die innere Membran bildet Invaginationen in die Matrix hinein, die sogenannten Cristae, die eine starke Oberflächenvergrößerung ergeben. Außerdem enthält die innere Membran Bestandteile der Elektronentransportkette, die Proteintranslokase TIM und die ATP-Synthase [Kleinig, 1999].

1.2.2.2 Transportvorgänge in der Mitochondrienmembran

In der inneren Membran liegen die bereits erwähnten Transporter der Elektronentransportkette. Diese schaffen den Protonengradienten, der die Membran energisiert. Diese Energie nutzt dann die ATP-Synthase zur oxidativen Phosphorylierung [Kleinig, 1999]. Da ein Großteil mitochondrialer Proteine kernkodiert ist, gibt es zudem Proteintranslokasen, um diese Eiweiße nach ihrer Synthese im Zytoplasma in die Mitochondrien zu transportieren (TOM = translocase of the outer membrane und TIM = translocase of the inner membrane) [Kleinig, 1999].

Des Weiteren gibt es noch viele Transportproteine in der inneren Membran, die alle zur MCF (mitochondriale Carrier-Familie) gehören und den metabolischen Austausch zwischen Mitochondrienmatrix und Zytoplasma garantieren [Kleinig, 1999].

In den Jahren nach Mitchells Postulaten wurden außerdem immer mehr Kenntnisse über den Transport mono- und divalenter Kationen mit Hilfe von Kanälen und Austauschern entwickelt. Einen Überblick bietet hier Bernardi [Bernardi, 1999]. Zum Transport organischer Kationen über die innere Mitochondrienmembran hingegen ist wenig bekannt. Grund hierfür ist allgemein die Entwicklung der Studien zum Transport über diese Membran, die mit der bezüglich des Plasmamembrantransportes nicht konkurrieren kann [Bernardi, 1999]. Daher gibt es nur einige wenige Untersuchungen zu diesem Themengebiet [Bernardi et al., 1982; Davey et al., 1992; Ramsay and Singer, 1986; Ramsay et al., 1989].

1.3 Zielsetzung und Aufbau der Arbeit

Bisher wurden zahlreiche Studien zum Aufbau und zur Funktion des rOCT1 durchgeführt. Die Regulation des Transportproteins ist jedoch noch nicht abschließend geklärt. Eine weitergehende Charakterisierung ist daher erforderlich, um die pharmakologische Bedeutung bei Transportvorgängen in der Niere aufzuklären. Ziel dieser Arbeit ist es, die Regulationswege des rOCT1 weiter zu analysieren. Hierzu wurde eine mögliche Regulation durch zyklische Nukleotide mit Hilfe der dynamischen ASP⁺-Fluoreszenzmessung untersucht.

Der Transport organischer Kationen über die innere Mitochondrienmembran wurde bisher nur ansatzweise erforscht. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es daher, mit derselben ASP⁺-Fluoreszenzmessmethode eine Möglichkeit zur Untersuchung des organischen Kationentransportes über die innere Mitochondrienmembran zu entwickeln. Darüber hinaus soll festgestellt werden, ob der Kationentransport dort über einen Transporter des Typs OCT vermittelt wird.

Mit Blick auf die Zielsetzungen dieser Arbeit ist folgender Aufbau gewählt worden:

Kapitel 2 gibt eine gemeinsame Erläuterung der für beide Untersuchungen verwendeten Materialien und Methoden, wobei lediglich hinsichtlich der Fluoreszenzmessung zu differenzieren ist (Kapitel 2.7). Die Untersuchungsergebnisse werden in Kapitel 3

dargestellt. Im Rahmen der sich anschließenden Diskussion (Kapitel 4) werden diese Untersuchungsergebnisse analysiert.

In Kapitel 5 werden schließlich die wichtigsten Ergebnisse noch einmal zusammengefasst, und es wird ein Ausblick auf ungelöste Probleme und Fragestellungen gegeben.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Zellen

Für die Untersuchung der Regulation des organischen Kationentransporters rOCT1 wurde dieser stabil in eine humane embryonale Nierenzelllinie (HEK293-Zellen) exprimiert [Busch *et al.*, 1996b; Busch *et al.*, 1998]. Diese rOCT1-HEK293-Zellen wurden von Professor Koepsell aus Würzburg bezogen. HEK293-Zellen sind permanent transformierte Nierenzellen, die aus menschlichen embryonalen Nierenrindenzellen stammen [Graham *et al.*, 1977]. Sie zeigen verschiedene Charakteristika distaler Nierentubuluszellen [Lenz *et al.*, 1999; Simmons, 1990] und wurden in etlichen Studien als Expressionssystem für klonierte Proteine, beispielsweise für organische Kationentransporter benutzt [Breidert *et al.*, 1998; Burckhardt and Wolff, 2000; Busch *et al.*, 1996b; Gründemann *et al.*, 1994; Martel *et al.*, 1996]. In dieser Studie wurden also mit rOCT1-transfizierte HEK293-Zellen genutzt.

2.2 Zellkultur

Für die Experimente mit den rOCT1-HEK293-Zellen wurden die Passagen 17 bis 38 verwendet. Die Zellen wurden in 50 ml Zellkulturflaschen (Fa. Greiner, Frickenhausen) mit Dulbecco`s modifiziertem Eagle`s Medium (Biochrom, Berlin) angezüchtet, welches 10% fötales Kälberserum, je 1% L-Glutamin (Gibco) und Penicillin/Streptomycin (Biochrom) enthielt. Als Zusatz verwendete man 0,8 mg/ml Genitacin (Life Technologies, Eggenstein), um ein Überwuchern der rOCT1-HEK293-Zellen durch die HEK293-Zellen zu verhindern. Die Inkubation fand bei 37° C in einer Atmosphäre von 95% Raumluft plus 5% CO₂ statt. Nach sieben Tagen wurden die Zellen durch Abklopfen und Pipettieren passagiert. Für die Experimente wurden die Zellen auf Deckgläschen (Ø 15 mm, rund, Marke Assistent, Fa. Waldeck, Münster) ausgesät. Je drei der Deckgläschen wurden in eine 35/10 mm Petrischale (Fa. Greiner, Frickenhausen) gegeben. Nach etwa drei bis fünf Tagen wurde die Konfluenz der Zellen erreicht, und die Experimente wurden nach vier bis acht Tagen durchgeführt.

2.3 Superfusionslösung

Als Superfusionslösung wurde eine HCO_3^- -freie Ringer-ähnliche Lösung mit folgenden Bestandteilen (in mmol/l) benutzt:

NaCl	145
K_2HPO_4	1,6
KH_2PO_4	0,4
D-Glukose	5
MgCl_2	1
Calciumglukonat	1,3

→ eingestellt auf pH 7,4 und 37° C

2.4 4-(4-Dimethylaminostyryl)-N-Methylpyridinium (ASP⁺)

Der Farbstoff ASP⁺ wurde von Molecular Probes (Leiden, Niederlande) bezogen. Er ist bei einem physiologischen pH von 7,4 aufgrund des pK_a von 3,6 positiv geladen [Pietruck and Ullrich, 1995]. ASP⁺ ist nicht membrangängig und besitzt eine geringe Lipophilität (n-Octanol/ H_2O Verteilungsquotient = 0,14) [Irrion et al., 1993]. Zudem besitzt es eine Proteinbindung von 47% [Pietruck and Ullrich, 1995]. ASP⁺ wurde in Ringer-ähnlicher Lösung (siehe Kapitel 2.3) gelöst, aliquotiert, bei -20° C tiefgefroren und unmittelbar vor den Experimenten aufgetaut. Der Farbstoff besitzt polychromatische Fluoreszenzeigenschaften. In wässrigen Lösungen beträgt das Anregungsmaximum 450 nm und das Emissionsmaximum 590 nm. Letzteres wechselt je nach Umgebungsmilieu. Membrangebundenes ASP⁺ hat ein Maximum von 550 nm, in energiereichen Mitochondrien und Zellkernen beträgt es 580 nm und 630 nm [Morozova et al., 1981]. Die Gesamtzellemissions- und Anregungsmaxima wurden bei 470 nm und 605 nm gefunden [Rohlicek and Ullrich, 1994].

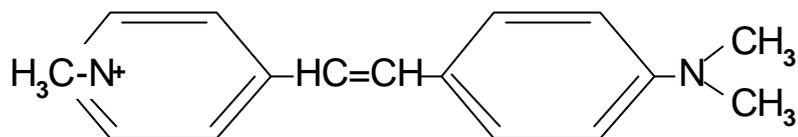


Abbildung 5: 4-(4-Dimethylaminostyryl)-N-Methylpyridinium (ASP⁺).

2.5 Versuchsaufbau

Die fluoreszenzmikroskopischen Experimente wurden mit einem inversen Mikroskop (Axiovert 135, Zeiss, Oberkochen) durchgeführt (Abbildung 6). Gemessen wurde mit einem Öl-Immersion-Objektiv (100x, Apertur 1,3). Das Anregungslicht wurde durch eine Xenon-Quarzlampe (XBO 75W, Zeiss) generiert.

Ein Problem bei Messungen mit Fluoreszenzfarbstoffen stellt dessen Ausbleichen durch das Tages- aber auch das Anregungslicht dar. So wurde das Ansetzen des Farbstoffes unter Rotlicht durchgeführt und die gesamte Versuchsanordnung lichtdicht umhüllt. Zudem musste aus diesem Grund das Anregungslicht deutlich abgeschwächt werden, andererseits musste aber das emittierte Licht noch genügend Intensität oberhalb der Hintergrundfluoreszenz aufweisen.

Eine Reduktion des Problems erfolgte durch die Verwendung eines Filtrerrades mit 10 Hz Umdrehung und einem 450 - 490 nm-Filter (U. Fröbe, Universität Freiburg). Dadurch entstand ein pulsierendes Licht (Anregungssequenz von 15 ms Dauer). Zudem wurde das Licht der Xenonlampe durch einen Graufilter auf zehn Prozent der Ausgangsintensität abgeschwächt [Nitschke et al., 1991]. Nach Passieren des Filtrerrades wurde das Anregungslicht über einen dichroischen Spiegel (560 nm) auf eine Superfusionskammer (Abbildung 7) umgeleitet, die die rOCT1-HEK293-Zellen enthielt. Als Superfusionslösung wurde, wie bereits erwähnt, eine HCO₃⁻-freie Ringer-ähnliche Lösung gebraucht. Das Messareal wurde mit einer Irisblende auf 40 μm², das entspricht etwa fünf Zellen, eingestellt.

Die Emission wurde bei einer Wellenlänge von 575 – 640 nm nach Durchgang eines Bandfilters in einer Photonen­zähl­röhre (Hamamtsu H –3460-04, Herrsching) gemessen. Die zehn Fluoreszenzsignale pro Sekunde wurden gemittelt und als Funktion der Zeit aufgetragen. Über ein AT-486 Computersystem mit spezieller Software (U. Fröbe, Universität Freiburg) wurden die Untersuchungen gemessen und ausgewertet.

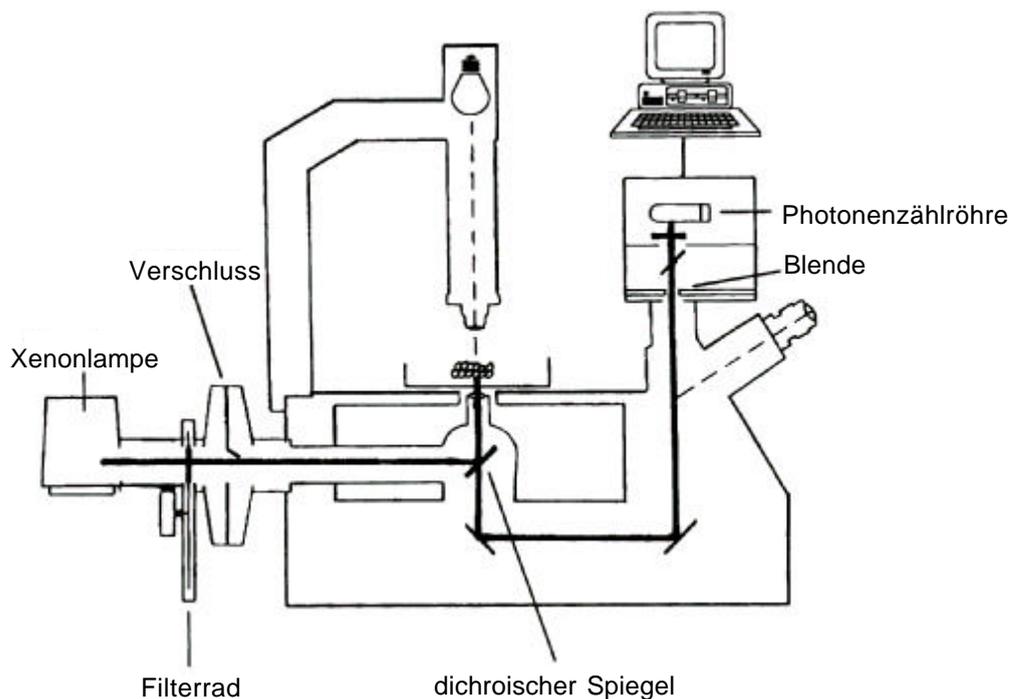


Abbildung 6: Schematische Darstellung des inversen Fluoreszenzmikroskops.

Das Filterrad war mit einem 450– 490 nm Filter sowie einem Graufilter (90% Absorption) ausgestattet und erzeugte das pulsierende Anregungslicht. Dieses Licht wurde über einen dichroischen Spiegel (560 nm) auf die rOCT1-HEK293-Zellen enthaltende Superfusionskammer gelenkt. Das emittierte Licht wurde nach Passieren eines Bandfilters (575- 640 nm) in einer Photonen­zähl­röhre gemessen. Mit Hilfe der Blende wurde das Messfeld auf etwa fünf Zellen eingestellt.

2.6 Superfusionskammer

Die rOCT1-HEK293-Zellen wuchsen auf Deckgläschen, die jeweils den Boden der Superfusionskammer darstellten (Abbildung 7). Die Superfusionskammer befand sich während der Messungen im Fokus des inversen Mikroskops (Abbildung 6). Das Volumen, der aus Plexiglas bestehenden Kammer, betrug etwa 0,5 ml. Die Superfusionslösung wurde durch einen Polyethylenschlauch geleitet. Darin wurde die Lösung über einen Wassermantel im Gegenstromprinzip auf $37 \pm 1^\circ \text{C}$ aufgewärmt. Auf der anderen Seite der Superfusionskammer wurde die Lösung mittels Unterdruck wieder abgesaugt. Um ein Ablösen der Monolayers zu vermeiden, wurden sowohl der Zulauf als auch die Absaugung im oberen Drittel der Kammer angebracht. Die Geschwindigkeit der Superfusionslösung lag bei etwa 10 ml/min, somit wechselte das gesamte Kammervolumen bis zu 20 mal pro Minute. Der gesamte Versuchsaufbau stand fest verankert auf einer Kalksteinplatte. Zur Erschütterungsdämpfung war diese luftkissen-gelagert (Physikinstrumente, Waldbronn).

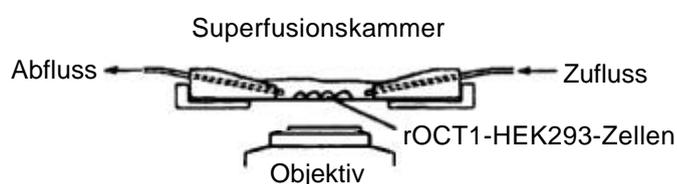


Abbildung 7: Seitenansicht der Superfusionskammer.

Das Deckglas mit den dicht gewachsenen rOCT1-HEK293-Zellen bildete den Boden der Kammer, die auf dem inversen Mikroskop befestigt war. Zu- und Abfluss der Kammer waren gegenüberliegend angeordnet.

2.7 Fluoreszenzmessung

2.7.1 Messung der Regulation des organischen Kationentransporters rOCT1 durch zyklische Nukleotide mittels der ASP⁺-Fluoreszenzmessmethode

Die ASP⁺-Aufnahme in die Zellen wurde als Zunahme der zellulären Fluoreszenz gemessen. Die Zellen wurden bei 450 – 490 nm angeregt, die Emission wurde dann bei 575 – 640 nm ermittelt. Die ASP⁺-Aufnahme wurde fünf bis zehn Minuten lang aufgezeichnet. Die maximale Fluoreszenz und die initiale Aufnahmerate (linear während der ersten halben Minute) wurden als Transportparameter zugrundegelegt. Eine zelleigene Hintergrundfluoreszenz von 20 bis 50 Photonen pro Sekunde wurden vor der ASP⁺-Zugabe gemessen und von jedem Experiment subtrahiert.

Das Messareal wurde mit einer Irisblende auf etwa fünf Zellen eingestellt, von diesen wurde das Fluoreszenzsignal aufgezeichnet. Eine vergleichbare Anzahl an Kontrollexperimenten (ASP⁺-Konzentration = 0,05 µM) und Messungen mit der jeweiligen Testsubstanz wurde am gleichen Tag mit Zellen derselben Passage und desselben Alters durchgeführt, um die Abweichungen zwischen den ungepaarten Experimenten zu reduzieren.

Vor Experimenten mit den Nukleotiden wurden die Zellen zunächst zehn Minuten mit den jeweiligen Substanzen inkubiert. Anschließend folgte die Messung wie oben beschrieben, wobei die ASP⁺-Lösung zusätzlich mit Testsubstanz versetzt war, um den Effekt über die Dauer der Messung ständig konstant zu halten.

Eine Ausnahme bildeten einige Experimente mit der Testsubstanz cGMP (100 µM), die ohne vorherige Inkubation durchgeführt wurden (n = 25).



Abbildung 8 Originalexperiment der Aufnahme des organischen Kations ASP^+ über den Transporter rOCT1 stabil exprimiert in HEK293-Zellen mit Hilfe der Fluoreszenzmessmethode.

2.7.2 Messung des organischen Kationentransportes über die Mitochondrienmembran mittels der ASP^+ -Fluoreszenzmessmethode

Vor dem eigentlichen Experiment wurden die rOCT1-HEK293-Zellen jeweils zur Permeabilisierung der Plasmamembran für zehn Minuten in einer Digitonin-haltigen Lösung (0,1 mM) inkubiert. Danach erfolgte eine Anfärbung der Zellen mit Trypanblau (0,2%) für fünf Minuten. Dies diente der erleichterten Identifizierung von Messarealen mit optimaler Anzahl permeabilisierter Zellen. Im Anschluß folgte die Messung. Zunächst wurde, wie unter 2.7.1 beschrieben, die Eigenfluoreszenz der Zellen ermittelt, dann begann die ASP^+ -Applikation (0,1 mM) für drei Minuten als Vorkontrolle. Um den Effekt wieder aufzuheben, wurde anschließend Superfusionslösung gegeben. Danach erfolgte die Messung mit der jeweiligen Testsubstanz für drei Minuten und die Gabe von Superfusionslösung, um den Effekt wieder aufzuheben. Als Nachkontrolle wurde wieder ASP^+ für drei Minuten wie zur Vorkontrolle gegeben. Ausgewertet wurden nur Experimente, die sowohl Vor- als auch Nachkontrolle enthielten. Die Wirkung der verschiedenen Inhibitoren wurde als prozentuale Änderung gegenüber den Durchschnittswerten von Vor- und Nachkontrolle ermittelt.

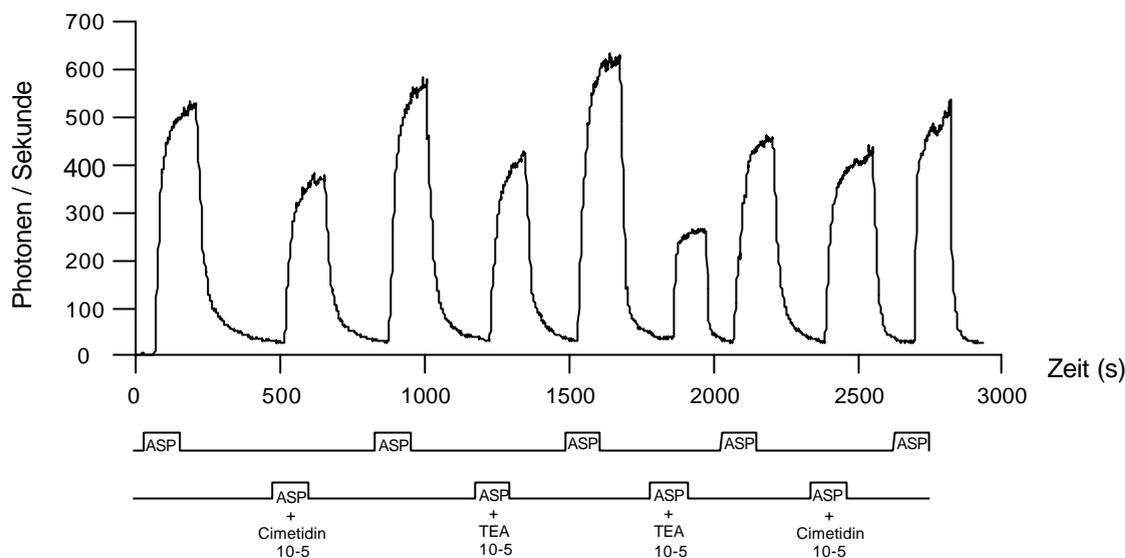


Abbildung 9: Originalexperiment einer Messung des Transportes organischer Kationen über die Mitochondrienmembran mit Hilfe der ASP⁺-Fluoreszenz-messmethode.

Gezeigt werden die Hemmstoffe Cimetidin und TEA⁺ (in mol/l). ASP⁺-Gabe vor und nach dem jeweiligen Hemmstoff ergeben die Vor- und Nachkontrolle.

2.8 Chemikalien

Cimetidin, TEA⁺, Chinin, 8-Br-cGMP, cGMP, cAMP, GMP, GDP, GTP, Trypanblau und alle Standardchemikalien wurden von der Firma Sigma (Deisenhofen) bezogen. ASP⁺ wurde von Molecular Probes (Leiden, Niederlande) und KT5823, sowie Digitonin wurden bei Calbiochem (Bad Soden) erworben.

2.9 Statistik

Die Ergebnisse der Untersuchung werden als Originalaufzeichnung oder als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (MW \pm SEM) und der Anzahl der Fluoreszenzversuche (n) dargestellt. Bei der Untersuchung zur Regulation des rOCT1 stabil exprimiert in HEK293-Zellen handelte es sich um ungepaarte Experimente.

Die Messungen zum organischen Kationentransport über die innere Mitochondrienmembran hingegen liefen als gepaarte Untersuchungen. Als Signifikanzschwelle wurde jeweils eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ($p < 0,05$) festgelegt.

3 ERGEBNISSE

3.1 *Regulation des organischen Kationentransporters rOCT1 durch zyklische Nukleotide*

Zur Untersuchung der möglichen Regulation der ASP^+ -Aufnahme über den Kationentransporter rOCT1 in die HEK293-Zellen durch die cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG), wurde zunächst der Effekt von 8-Br-cGMP getestet. Dies ist das membrangängige Struktur analog des intrazellulären Botenstoffes cGMP.

Nach 10-minütiger Inkubation mit 8-Br-cGMP bei 37° C und ständiger Zugabe des Nukleotids während der Messung wurde eine Hemmung sowohl der initialen Aufnahmerate, als auch der maximalen zellulären Fluoreszenz von ASP^+ sichtbar. Dieser Effekt erwies sich als konzentrationsabhängig (Abbildungen 10 und 13).

Maximale Effekte wurden bei einer Konzentration von 100 μM 8-Br-cGMP erreicht. Die signifikante Hemmung betrug hier beim Fluoreszenzmaximum $84 \pm 3\%$ und bei der initialen ASP^+ -Aufnahmerate $78 \pm 4\%$ (je $n = 18$).

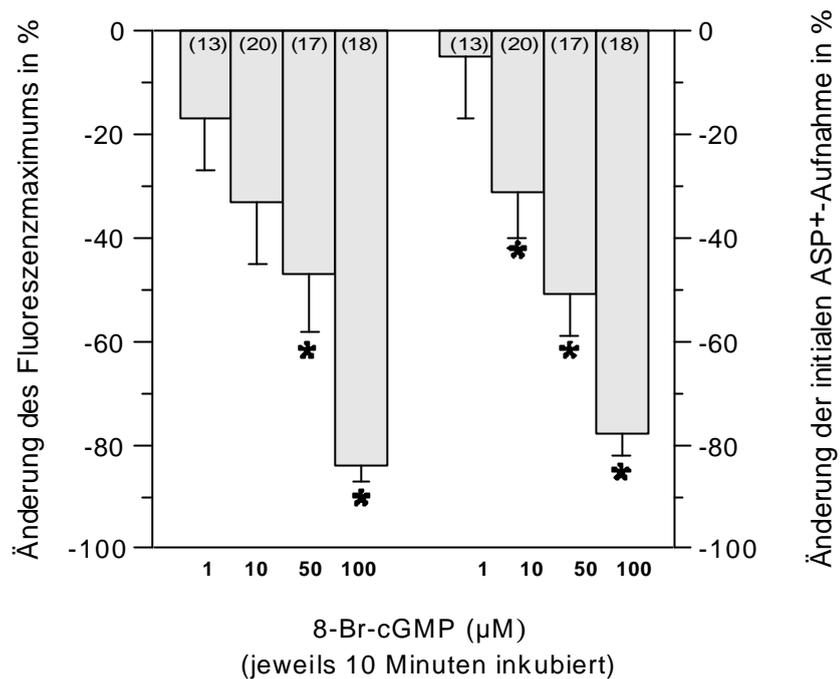


Abbildung 10: Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von 8-Br-cGMP auf das Fluoreszenzmaximum und die initiale Aufnahmerate von ASP⁺ (0,05 µM) in % der Kontrollen.

Die Säulen auf der linken Seite zeigen die maximalen Fluoreszenzänderungen nach Zugabe von ASP⁺ zur Superfusionslösung. Die Säulen rechts geben die Änderungen der initialen Aufnahmerate wieder. Die Daten sind als prozentuale Veränderung zu den Kontrollaufnahmen dargestellt. Die Säulen stellen die MW ± SEM dar, die Zahlen in den Klammern die Anzahl der Experimente. * bezeichnet die statistische Signifikanz ($p < 0,05$) des Effektes. Die Zellen wurden jeweils zehn Minuten vor dem Experiment mit 8-Br-cGMP der entsprechenden Konzentration inkubiert. Direkt im Anschluss folgte die Messung bei ständiger 8-Br-cGMP-Zufuhr.

In der Abbildung 11 wird die zeitabhängige Aufnahme von ASP^+ ($0,5 \mu\text{M}$) durch die rOCT1-HEK293-Zellen von 17 Kontrollexperimenten dargestellt. Nach Inkubation (10 Minuten/ 37°C) von 18 Monolayern der rOCT1-HEK293-Zellen mit 8-Br-cGMP ($100 \mu\text{M}$) wurde die initiale ASP^+ -Anreicherung signifikant gehemmt.

Außerdem zeigt die Abbildung noch eine Zusammenfassung von 15 Experimenten, bei denen die Zellen mit 8-Br-cGMP ($100 \mu\text{M}$) unter Zusatz des spezifischen Protein-kinase G-Inhibitors KT5823 ($1 \mu\text{M}$) inkubiert wurden (10 Minuten/ 37°C). Diese Versuche dienten der Ermittlung einer möglichen Beteiligung der PKG an den mit 8-Br-cGMP erzielten Effekten.

Die Hemmung der initialen Aufnahmerate durch 8-Br-cGMP ($100 \mu\text{M}$) lag beim Zusatz von KT5823 ($1 \mu\text{M}$) signifikant bei $73 \pm 5\%$ zum Zeitpunkt von 180 Sekunden. Ein Eigeneffekt des KT5823 konnte durch dessen alleinige Zugabe während vier Versuchen ausgeschlossen werden (ohne Abbildung).

Auch das erreichte Fluoreszenzmaximum unter 8-Br-cGMP und KT5823 unterschied sich nicht von dem unter alleiniger Zugabe von 8-Br-cGMP. Zur Einsparung von Substanz wurden diese Versuche nur über drei Minuten durchgeführt.

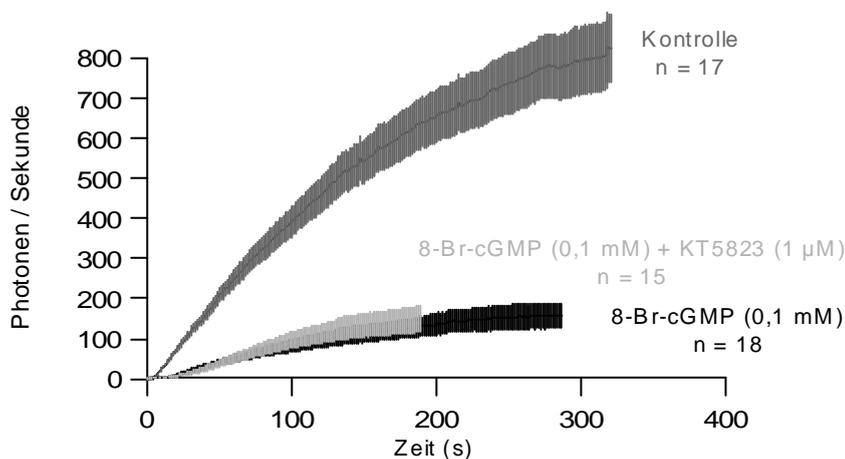


Abbildung 11: Effekte von 8-Br-cGMP in An- und Abwesenheit des spezifischen PKG-Inhibitors KT5823 auf die ASP^+ -Aufnahme im Vergleich zu den Kontrollexperimenten (reine ASP^+ -Gabe).

Die Deckgläschen mit Zellen wurden jeweils 10 Minuten vor Beginn der ASP^+ -Zugabe in den entsprechenden Substanzen inkubiert und die Messung erfolgte bei ständiger Zufuhr dieser Stoffe. Die Kurven zeigen die $\text{MW} \pm \text{SEM}$ mehrerer separater Experimente. n zeigt die Anzahl der benutzten Monolayer mit Zellen an.

Des Weiteren wurde untersucht, ob das nicht membrangängige cGMP ähnliche Effekte auf die ASP⁺-Aufnahme durch rOCT1 in HEK293-Zellen erzielt. Die Abbildungen 12 und 13 fassen die Konzentrationsabhängigkeit der Effekte nach 10-minütiger Inkubation mit cGMP bei 37° C auf die ASP⁺-Aufnahme zusammen. Maximale Effekte wurden bei einer Konzentration von 100 µM cGMP erreicht. Dabei lag die Hemmung der maximalen Fluoreszenz bei $56 \pm 5\%$ (n = 32) sowie für die initiale ASP⁺-Aufnahmerate bei $40 \pm 4\%$ (n = 54).

Um nachzuweisen, dass die Effekte des cGMP unmittelbar, möglicherweise extrazellulär vermittelt werden, wurde außerdem die Änderung der initialen ASP⁺-Aufnahmerate nach akuter Zugabe von cGMP, also ohne vorherige Inkubation, gemessen. Hier unterschied sich die Änderung der initialen ASP⁺-Aufnahmerate nicht signifikant von den Kontrollen ($5 \pm 7\%$ / n = 25). Gezeigt wird dies ebenfalls in Abbildung 12.

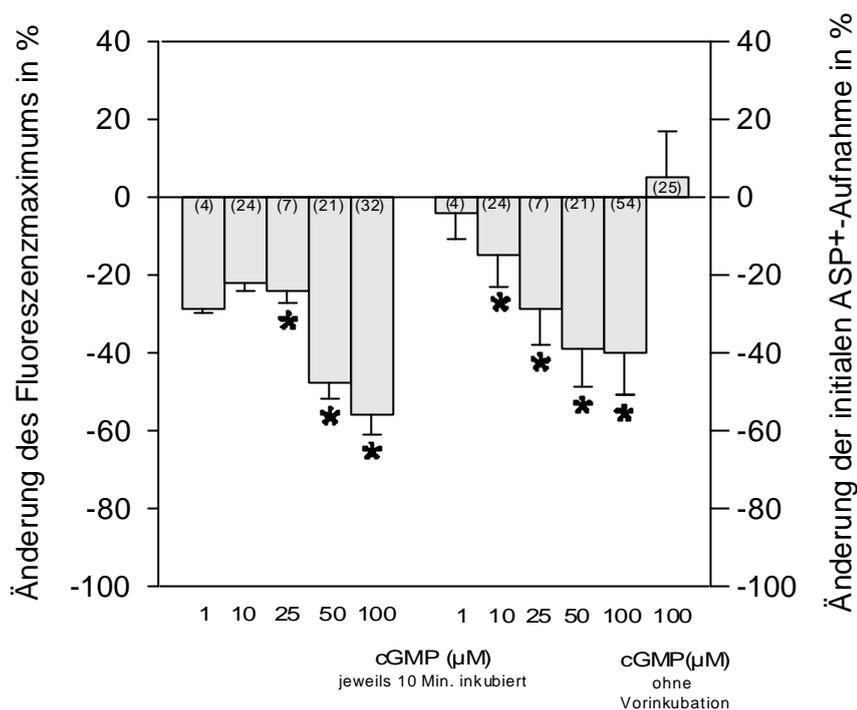


Abbildung 12: Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von cGMP auf das Fluoreszenzmaximum und die initiale Aufnahme von ASP⁺ (0,05 µM) in % der Kontrollen.

Die ersten fünf Säulen zeigen die maximalen Fluoreszenzänderungen nach Zugabe von ASP⁺ zur Superfusionslösung. Die nächsten fünf Säulen geben die Änderungen der initialen Aufnahme wieder. Die Daten sind als prozentuale Veränderung zu den Kontrollaufnahmen dargestellt. Die Säulen stellen die MW ± SEM dar, die Zahlen in den Klammern die Anzahl der Experimente. * bezeichnet die statistische Signifikanz ($p < 0,05$) der Effekte. Die Zellen wurden jeweils zehn Minuten vor dem Experiment mit cGMP der entsprechenden Konzentration inkubiert. Direkt im Anschluss folgte die Messung bei ständiger cGMP-Zufuhr. Die Säule ganz rechts zeigt die Änderung bei akuter Zugabe von 100 µM cGMP ohne vorherige Inkubation.

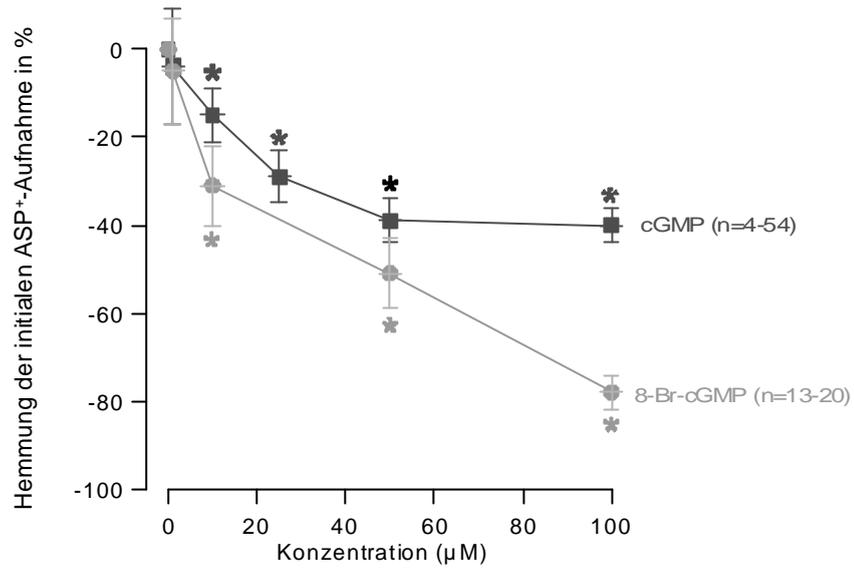


Abbildung 13: Konzentrationsabhängige Effekte der zyklischen Nucleotide 8-Br-cGMP und cGMP auf die initiale ASP⁺-Aufnahmerate in % der Kontrollen.

Die Daten sind als prozentuale Änderung der Kontrollaufnahmen wiedergegeben. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Experimente wieder. * weist auf statistische Signifikanz hin.

Als weiteres zyklisches Nukleotid wurde das cAMP auf seinen Einfluss hinsichtlich des ASP⁺-Transportes getestet. Hier kam es nur zu einem leichten hemmenden Effekt, der nicht weiter untersucht wurde. Maximale Effekte wurden bei einer Konzentration von 100 μ M cAMP (n= 21) beobachtet. Dabei lag die initiale Aufnahme rate signifikant $23 \pm 8\%$ unter der der Kontrolllexperimente (Abbildung 14).

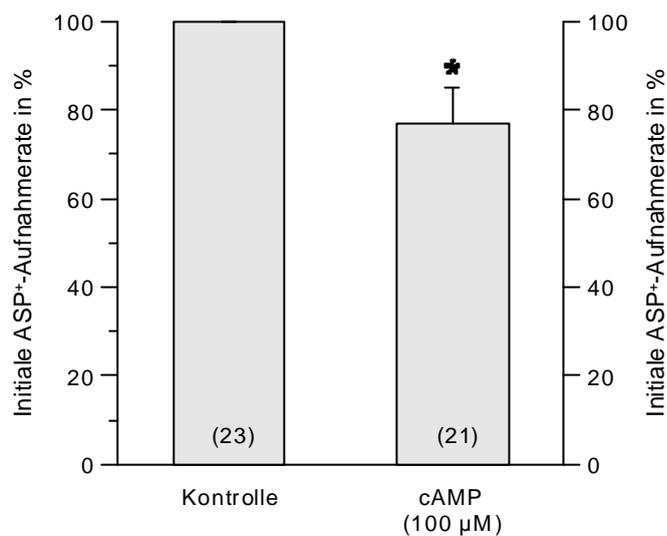


Abbildung 14: Initiale Aufnahmeraten von ASP⁺ (0,05 μ M) ohne (Kontrolle) und mit cAMP (100 μ M), angegeben in % der Kontrollen.

Die Säulen zeigen die initiale Aufnahme rate von ASP⁺ durch rOCT1 und stellen die MW \pm SEM dar. Die Zahlen in den Klammern entsprechen der Anzahl der Experimente. * bezeichnet die statistische Signifikanz ($p < 0,05$). Die Zellen wurden zehn Minuten vor dem Experiment mit cAMP (100 μ M) inkubiert, danach folgte die Messung bei ständiger cAMP-Zufuhr.

Um zu untersuchen, ob der mit 8-Br-cGMP und cGMP beobachtete Effekt spezifisch für die zyklischen Analoge dieser Nukleotide ist, wurden die Zellen auch mit je 100 μM GMP ($n = 11$), GDP ($n = 13$) oder GTP ($n = 11$) für 10 Minuten inkubiert. Keines dieser Nukleotide reduzierte signifikant die initiale ASP^+ -Aufnahme im Vergleich zu den Kontrollbedingungen (Abbildung 15).

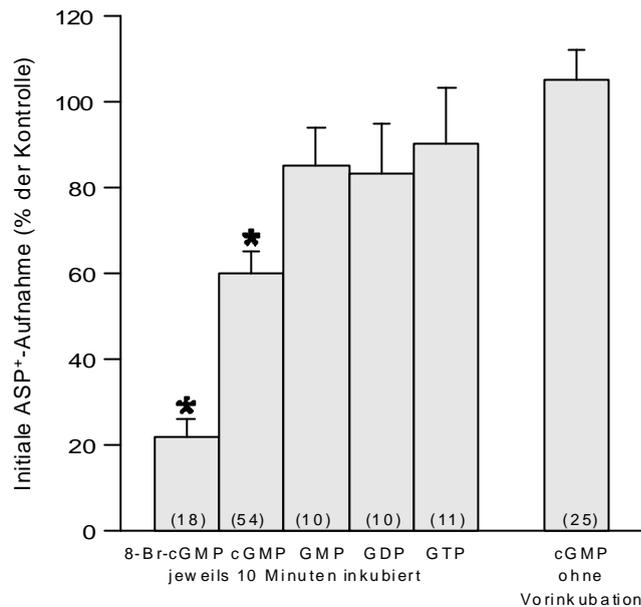


Abbildung 15: Effekte der Nukleotide 8-Br-cGMP, cGMP, GMP, GDP und GTP auf die initiale ASP^+ -Aufnahme in % der Kontrollen.

Die Daten sind als prozentuale Änderung der Kontrollaufnahmen wiedergegeben. Die Säulen stellen die $\text{MW} \pm \text{SEM}$ dar, die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Experimente wieder. * weist auf statistische Signifikanz hin.

3.2 Organischer Kationentransport über die Mitochondrienmembran

3.2.1 Kompetitive Hemmstoffe Cimetidin und TEA⁺

TEA⁺ und Cimetidin sind bekannte Substrate organischer Kationentransporter in der Plasmamembran [Pietruck and Ullrich, 1995; Ullrich et al., 1991] und hemmen diese auch kompetitiv. Mit diesen beiden Stoffen sollte der Transport von ASP⁺ über die innere Membran von Mitochondrien in rOCT1-HEK293-Zellen untersucht werden, um ihn mit dem in der Plasmamembran zu vergleichen. Die Zellen wurden, wie zuvor beschrieben (siehe Kapitel 2.7.2), zur Messung vorbereitet. Für TEA⁺ zeigte sich keine signifikante konzentrationsabhängige Hemmung - weder beim Fluoreszenzmaximum noch bei der initialen Aufnahmerate (Abbildung 16).

Für Cimetidin ergab sich eine konzentrationsabhängige Stimulation der ASP⁺-Fluoreszenz bei den maximalen Fluoreszenzen, aber keine solche Abhängigkeit bei der initialen ASP⁺-Aufnahme (Abbildung 17).

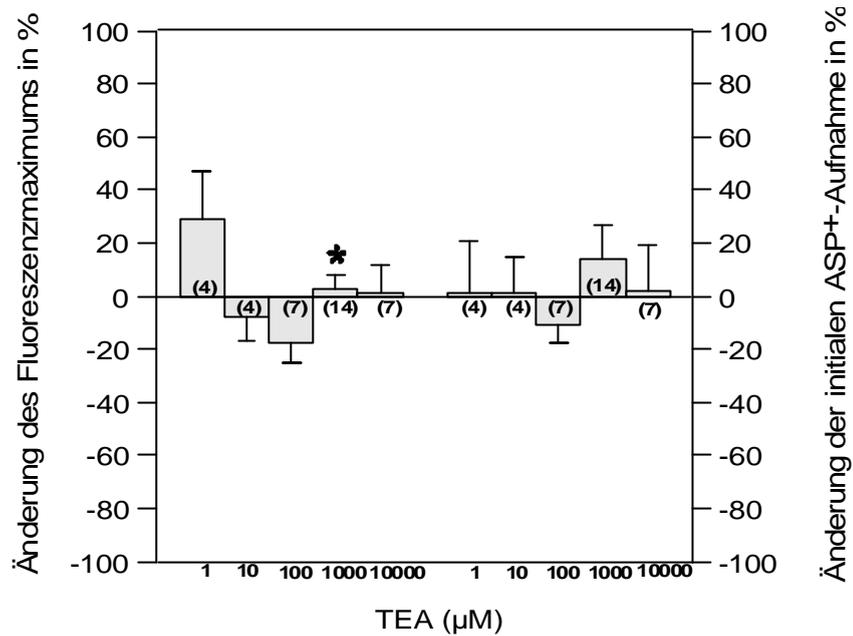


Abbildung 16: Wirkung der verschiedenen Konzentrationen von TEA⁺ auf das Fluoreszenzmaximum und die initiale Aufnahme von ASP⁺ (0,1 mM) über die Mitochondrienmembran in %.

Die Säulen auf der linken Seite zeigen die maximalen Fluoreszenzänderungen nach Zugabe von ASP⁺ (0,1 mM) zur Superfusionslösung. Die Säulen rechts geben die Änderungen der initialen ASP⁺-Aufnahmerate wieder. Die Daten sind als prozentuale Veränderung der Kontrollaufnahmen dargestellt. Die Säulen stellen die MW ± SEM dar, die Zahlen in Klammern die Anzahl der Experimente. Statistische Signifikanz ($p < 0,05$) wurde mit * gekennzeichnet.

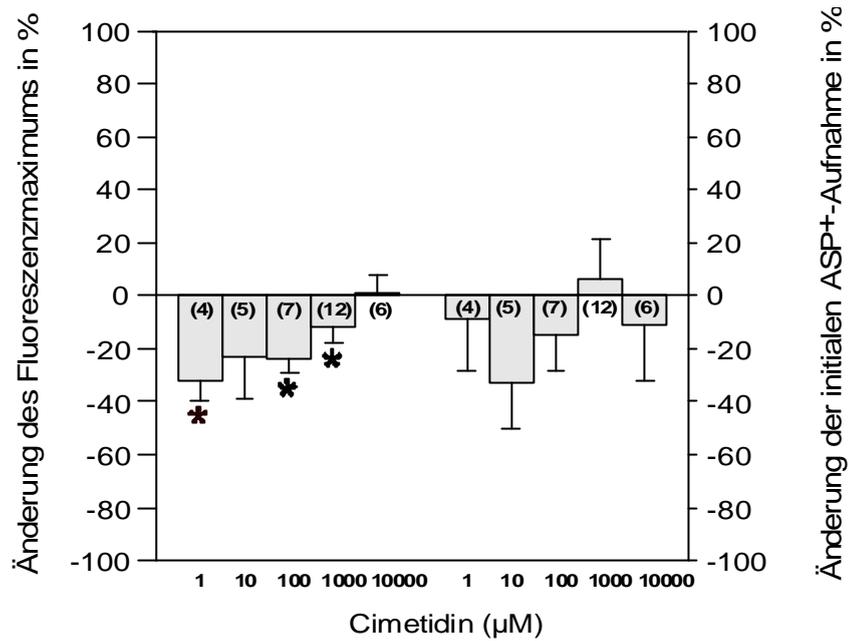


Abbildung 17: Wirkung der verschiedenen Konzentrationen von Cimetidin auf das Fluoreszenzmaximum und die initiale Aufnahme von ASP⁺ (0,1 mM) über die Mitochondrienmembran in %.

Die Säulen auf der linken Seite zeigen die maximalen Fluoreszenzänderungen nach Zugabe von ASP⁺ (0,1 mM) zur Superfusionslösung. Die Säulen rechts geben die Änderungen der initialen ASP⁺-Aufnahmerate wieder. Die Daten sind als prozentuale Veränderung der Kontrollaufnahmen dargestellt. Die Säulen stellen die MW \pm SEM dar, die Zahlen in Klammern die Anzahl der Experimente. Statistische Signifikanz ($p < 0,05$) wurde mit * gekennzeichnet.

3.2.2 Nicht-kompetitiver Hemmstoff Chinin

Im Vergleich zu Cimetidin und TEA⁺ stellt Chinin selbst kein Substrat für organische Kationentransporter dar, sondern ist ein nicht-kompetitiver Hemmstoff, welcher nicht transportiert wird [Nagel *et al.*, 1997]. Während die Änderung des Fluoreszenzmaximums durch Chinin konzentrationsabhängig gehemmt wurde, waren die Effekte auf die initiale Aufnahme rate nicht signifikant.

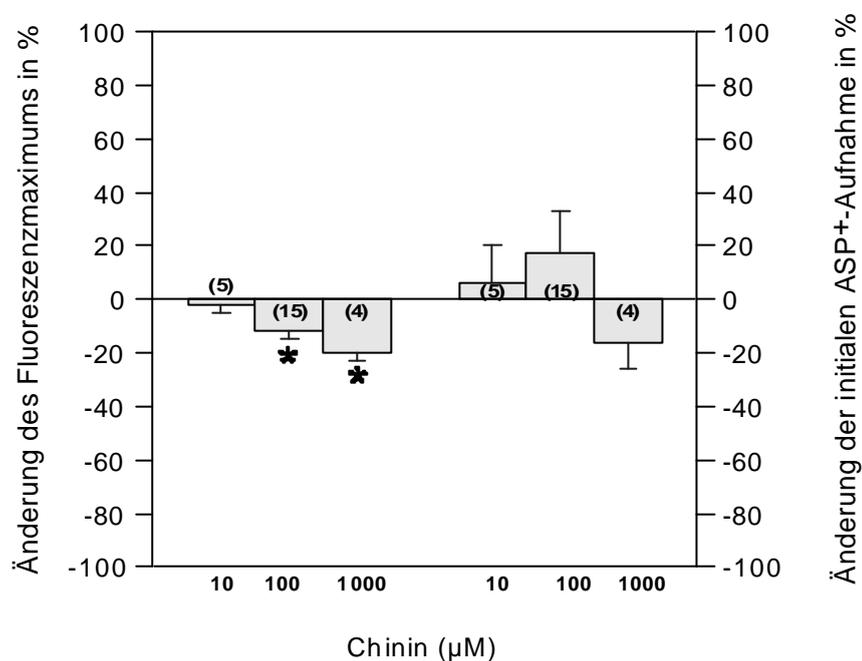


Abbildung 18: Wirkung der verschiedenen Konzentrationen von Chinin auf das Fluoreszenzmaximum und die initiale Aufnahme rate von ASP⁺ (0,1 mM) über die Mitochondrienmembran in %.

Die Säulen auf der linken Seite zeigen die maximalen Fluoreszenzänderungen nach Zugabe von ASP⁺ (0,1 mM) zur Superfusionslösung. Die Säulen rechts geben die Änderungen der initialen ASP⁺-Aufnahmerate wieder. Die Daten sind als prozentuale Veränderung der Kontrollaufnahmen dargestellt. Die Säulen stellen die MW ± SEM dar, die Zahlen in Klammern die Anzahl der Experimente. Statistische Signifikanz (p < 0,05) wurde mit * gekennzeichnet.

4 DISKUSSION

4.1 *Untersuchung der Regulation des organischen Kationentransporters rOCT1 durch zyklische Nukleotide*

In den meisten Untersuchungen zum organischen Kationentransport wurden bisher radioaktive Substanzen als Substrate verwendet [Boom et al., 1992; Brandle et al., 1992; Hohage et al., 1994]. Dies hat neben gesundheitlichen Risiken, technischen Problemen und aufwendiger Abfallentsorgung den Nachteil, dass nur statische Aufnahmewerte mit geringer Zeitauflösung, jedoch keine dynamischen Transportprozesse in lebenden Zellen gemessen werden können. Vorteilhaft ist natürlich, dass prinzipiell jedes organische Kation radioaktiv markiert und als Substrat untersucht werden kann. Eine andere Möglichkeit besteht darin, über indirekte elektrophysiologische Methoden Transportvorgänge geladener Substrate über Zellmembranen zu messen. Andererseits ist die indirekte Messung mittels patch-clamp-Analyse oder der Spannungs-klemmmessung zum Beispiel in einer Oozyte und damit die Erfassung des durch Substratfluss induzierten Stromflusses über die Plasmamembran nicht unabhängig gegenüber sekundär mittransportierten Ionen [Galli et al., 1996]. Außerdem ist dies nur bei elektrogenen Transportvorgängen möglich und in der Regel erfordert dies auch eine Überexpression der Transporter, um messbare Ströme über die Transporter zu erreichen.

Mitte der 90er-Jahre etablierten Ullrich und Mitarbeiter eine Methode, bei der mit dem fluoreszierenden positiv geladenen Styrylfarbstoff 4-(4-Dimethylaminostyryl)-N-Methylpyridinium (ASP^+) durch in vivo-Versuche an der Nierenoberfläche eine dynamische Aufzeichnung von Kationentransport gelang [Pietruck and Ullrich, 1995; Rohlicek and Ullrich, 1994]. Schlatter et al. modifizierten diese fluoreszenztechnische Methode für die Untersuchung kultivierter Zellen [Stachon et al., 1996] und isolierter Tubuli [Pietig et al., 2001]. Dabei wird eben dieses fluoreszierende Kation ASP^+ , das Substrat sowohl für basolaterale als auch für luminale Transportsysteme darstellt [Pietruck and Ullrich, 1995; Ullrich and Rumrich, 1996] eingesetzt [Hohage et al., 1998a; Mehrens et al., 2000; Stachon et al., 1996; Stachon et al., 1997]. Diese Methode ermöglicht

die dynamische Untersuchung des Kationentransportes in sehr hoher zeitlicher Auflösung. Somit kann die Regulation durch Stimulation beziehungsweise Inhibition solcher Transporter mit Hilfe verschiedener Agonisten genau untersucht werden [Hohage et al., 1998a; Stachon et al., 1996; Stachon et al., 1997; Mehrens et al., 2000]. Nachteilig bei Messungen mit Fluoreszenzfarbstoffen ist ihr Ausbleichen durch das Tageslicht. So ist darauf zu achten, dass ASP⁺ bei Rotlicht angemischt werden muss und die Messungen im abgedunkelten Raum stattfinden müssen. Ein weiteres technisches Problem bei der Verwendung von ASP⁺ als Substrat ist seine Anreicherung in Mitochondrien [Mehrens et al., 2000; Stachon et al., 1996]. Daher entspricht die initiale Fluoreszenzzunahme dem Transport von ASP⁺ über die Plasmamembran, während das erreichte Fluoreszenzmaximum ein Gleichgewicht zwischen Einwärts- und Auswärtstransport, intrazellulärer Kompartimentalisierung und Ausbleichen des Farbstoffes darstellt.

Diese Fluoreszenzmessmethode wurde für die Untersuchungen der Regulation des Kationentransporters rOCT1 genutzt. Dazu wurden HEK293-Zellen verwendet, die den rOCT1 stabil exprimierten (rOCT1-HEK293-Zellen). Diese Zellen wurden von Professor Koepsell, Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt. HEK293-Zellen stammen aus menschlichen embryonalen Nierenzellen, welche durch den menschlichen Adenovirus 5 transformiert wurden [Graham et al., 1977]. In vielen Studien wurden diese Zellen bereits als Expressionssystem verwendet [Braidert et al., 1998; Busch et al., 1996b; Busch et al., 1998; Gründemann et al., 1994; Martel et al., 1996; Tamai et al., 1997; Tamai et al., 1998]. Der Vorteil gegenüber, beispielsweise *Xenopus laevis* Oozyten (Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches), als Expressionssystem liegt darin, dass es sich um eine Säugetierzelllinie handelt und daher ein Säugetiertransporter, wie es der rOCT1 ist, unter der Physiologie näher kommenden Bedingungen untersucht werden kann. Außerdem stehen bei Oozyten nur eine begrenzte Zahl an Zellen pro Tier zur Verfügung, was zu präparationsbedingten Unterschieden bei Aufnahmemessungen führen kann [Gründemann, 1994]. Zudem lassen sich die rOCT1-HEK293-Zellen in der Kultur einfach vermehren.

Der in dieser Arbeit mit Hilfe der ASP⁺-Fluoreszenzmessmethode untersuchte rOCT1 wurde zuvor von Mehrens et al. ebenfalls unter Verwendung dieser Methode charakterisiert. Neben der Beschreibung seiner Substratspezifitäten und Elektrogenität

konnte dabei vor allem die Regulation durch PKA, PKC und Tyrosinkinase gezeigt werden [Mehrens et al., 2000].

In der vorliegenden Studie wurde eine mögliche Regulation des rOCT1 über cGMP beziehungsweise die cGMP-abhängige Proteinkinase G untersucht. Dabei zeigte sich unter anderem, dass die Aktivität des rOCT1 durch Zugabe des membrangängigen cGMP-Strukturanalogs 8-Br-cGMP zum Medium nach 10-minütiger Vorinkubation gehemmt wurde. Eine mögliche Beteiligung der PKG an diesem Effekt konnte durch Experimente ausgeschlossen werden, bei denen 8-Br-cGMP mit Zusatz des spezifischen PKG-Inhibitors KT5823 gegeben wurde (Abbildung 11). Zudem zeigte sich die Hemmung ebenfalls, nur etwas abgeschwächt, bei Zugabe des nicht-membrangängigen cGMP. Der hemmende Effekt des cGMP wurde jedoch immer nur dann sichtbar, wenn die verwendeten Zellen vor den Experimenten zehn Minuten inkubiert wurden. Gab man cGMP direkt mit ASP^+ und maß die Aufnahme des Fluoreszenzfarbstoffes in die Zellen, ergab sich keine signifikante Reduzierung des ASP^+ -Transportes (Abbildung 11). Dieses Resultat lässt darauf schließen, dass der Effekt nicht auf eine direkte Interaktion von der extrazellulären Seite mit dem Transporter zurückzuführen ist. Vielmehr ist davon auszugehen, dass cGMP über einen möglichen Nukleotidrezeptor oder, wahrscheinlicher, nach zellulärer Aufnahme über einen intrazellulären Signalweg seine Wirkung auf den Transporter vermittelt. Fraglich bleibt dabei jedoch, wie cGMP in die rOCT1-HEK293-Zellen gelangt. Für zyklische Nukleotide wurde bisher keine Affinität als Substrat für organische Kationentransporter, wohl aber für cAMP und organische Anionentransporter beschrieben [Ullrich, 1999]. Diese Anionentransporter sind aber in HEK293-Zellen nicht endogen exprimiert. Unterstützende Forschungen von Professor Koepsell aus Würzburg mit [3H]cGMP-Aufnahmemessungen an transfizierten und nicht-transfizierten HEK293-Zellen zeigen, dass cGMP durch ein endogenes, Cyanin863-hemmbares cGMP-Aufnahmesystem in die HEK293-Zellen gelangt (Abbildung 19) [Schlatter et al., 2002].

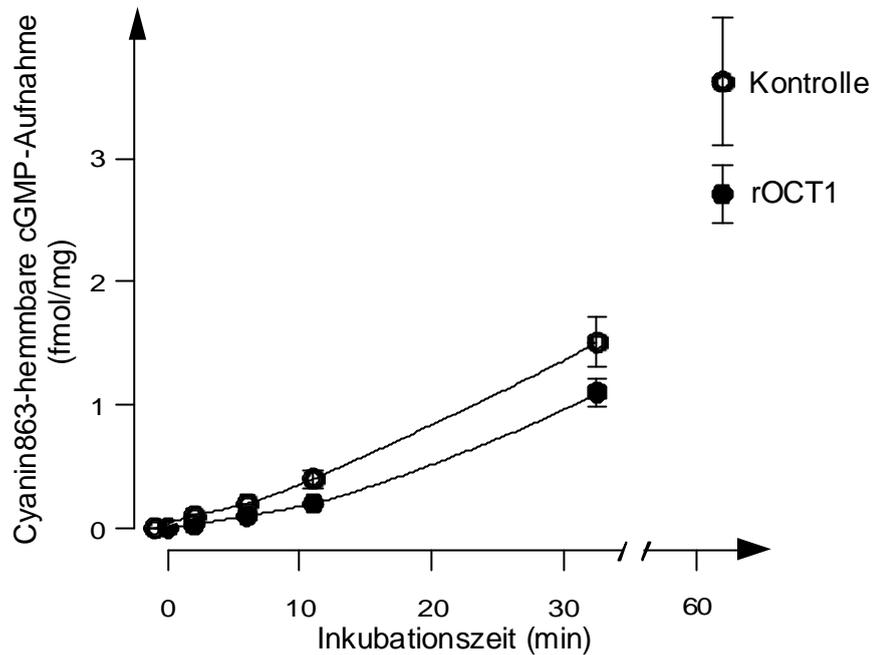


Abbildung 19: Cyanin863-hemmbarer $[^3\text{H}]$ cGMP-Aufnahme durch nicht-transfizierte HEK293-Zellen (Kontrolle) und rOCT1-HEK293-Zellen (rOCT1).

Beide Zelltypen wurden bei 37°C mit 20 nM $[^3\text{H}]$ cGMP in An- und Abwesenheit von Cyanin863 inkubiert. Nach unterschiedlichen Zeitintervallen wurde die Aufnahme gestoppt und die $[^3\text{H}]$ cGMP-Konzentration in den Zellen bestimmt. Vier parallele Aufnahmemessungen mit und ohne Cyanin863 wurden für jeden Zeitpunkt durchgeführt. Die Messungen ohne und mit Cyanin863 wurden subtrahiert und die $\text{MW} \pm \text{SEM}$ dargestellt. (Ergebnisse und Abbildung freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Professor Koepsell, Würzburg).

Die Beteiligung der PKG an diesem Signalweg konnte durch die fehlende Wirkung einer PKG-Hemmung durch den spezifischen Hemmstoff KT5823 ausgeschlossen werden. Weitergehende Untersuchungen von Professor Koepsell ergaben, dass der rOCT1 nach transienter Expression in *Xenopus laevis* Oozyten nicht durch 8-Br-cGMP gehemmt wird [Schlatter et al., 2002]. Diese Befunde deuten darauf hin, dass zytosolisches cGMP möglicherweise über ein Regulatorprotein die Aktivität des rOCT1 beeinflusst, welches in den Oozyten der Amphibien nicht vorhanden ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es sich bei der cGMP-vermittelten Regulation offensichtlich um eine für dieses zyklische Nukleotid spezifische Wirkung handelt, da

weder die Nukleotide GMP, GDP und GTP noch cAMP entsprechende Wirkungen hatten. Eine ähnliche zeitabhängige Hemmung durch cGMP konnte für den menschlichen organischen Kationentransporter Typ 2 (hOCT2) gezeigt werden [Schlatter et al., 2002].

Immunhistochemische und funktionelle Studien zeigen, dass rOCT1 unter anderem in der basolateralen Membran des proximalen Tubulus lokalisiert ist [Gründemann et al., 1994; Karbach et al., 2000; Koepsell et al., 1999; Sugawara-Yokoo et al., 2000]. Untersuchungen des organischen Kationentransportes über die basolaterale Membran isolierter humaner proximaler Tubuli zeigten, dass dieser durch ANP gehemmt wird [Pietig et al., 2001]. Dieser Befund belegt, dass die hier durch cGMP gezeigte Hemmung des OCT1 und ferner auch des hOCT2 [Schlatter et al., 2002] offensichtlich im proximalen Tubulus existiert und somit physiologisch relevant ist. cGMP-abhängige Transportregulation im proximalen Tubulus wurde bisher in zahlreichen Studien beschrieben. Dabei wurden ANP oder Stickstoffmonoxid-Donatoren benutzt, um intrazelluläre cGMP-Konzentrationen zu erhöhen. Dies belegt eine von cGMP-abhängigen Signalwegen gesteuerte Hemmung der Na⁺- und Flüssigkeitsreabsorption im proximalen Tubulus [Cantiello and Ausiello, 1986; Eitle et al., 1998; Linas and Repine, 1999; Wang, 1997]. Diese Effekte werden wahrscheinlich direkt durch eine Hemmung des Na⁺/H⁺-Austauschers oder der Na⁺/K⁺-ATPase vermittelt [Guzman et al., 1995; Reddy et al., 1994; Rocznik and Burns, 1996]. Oder aber sie werden indirekt durch einen Abfall der Triebkraft infolge einer Hemmung eines K⁺-Kanals vermittelt [Hirsch et al., 1999a]. ANP hemmt einerseits die Albumin- [Jacobs et al., 1999] und die Phosphatreabsorption [Hammond et al., 1985]. Andererseits wurde eine Aktivierung von Cl⁻-Kanälen durch ANP in proximalen Tubuluszellen der Ratte gefunden [Darvish et al., 1995]. In IHKE1-Zellen, einer humanen proximalen Tubuluszelllinie, wurde unlängst eine Stimulation des organischen Kationentransportes über die luminale Membran durch Aktivierung der PKG durch ANP gezeigt [Hohage et al., 1998a].

Somit ergibt ein Anstieg zellulären cGMPs im proximalen Tubulus sowohl Stimulation als auch Inhibition von Transportaktivitäten. In den meisten dieser Untersuchungen wurde die Beteiligung von PKG im Transduktionsweg, wie es für ANP oder Stickstoffmonoxid üblich ist, nicht explizit untersucht, womit der genaue Wirkmechanismus des cGMP ungesichert bleibt. Hirsch et al. demonstrierte, dass der ANP-Effekt auf

K^+ -Kanäle von IHKE1-Zellen unabhängig von dieser Kinase ist [Hirsch et al., 1999b]. Außerdem wurde berichtet, dass dieser K^+ -Kanal auch direkt durch extrazelluläres cGMP gehemmt werden kann [Hirsch et al., 2001], was aber für den rOCT1 auf Grund der für die Hemmung notwendigen Inkubationszeit unwahrscheinlich erscheint.

Die Transportaktivität des rOCT1 wurde, wenn auch in weit geringerem Maße, ebenso bei extrazellulärer Zugabe von cAMP beobachtet. Dies ist ein intrazellulärer second-messenger, welcher die PKA aktiviert. In proximalen Tubuluszellen verschiedener Spezies ist bereits eine Transportregulation durch PKA demonstriert worden. So konnte gezeigt werden, dass der Na^+/H^+ -Austauscher in LLC-PK₁-Zellen [Azuma et al., 1996], die Na^+/K^+ -ATPase in isolierten proximalen Tubuli der Ratte [Aperia et al., 1994; Cheng et al., 1997] und der $Na^+-HCO_3^-$ -Kotransporter in isolierten proximalen Tubuli des Kaninchens [Ruiz et al., 1996] durch PKA-Aktivierung gehemmt werden. Außerdem konnte in *Xenopus laevis* Oozyten gezeigt werden, dass der Membraneinbau von Vesikeln, die den Na^+ -Glukose-Kotransporter des Menschen, des Kaninchens oder der Ratte tragen, über PKA hochreguliert wird [Hirsch et al., 1996]. Zudem zeigte eine Studie von Hohage et al. die Aktivierung des organischen Kationentransportes in der apikalen Membran von IHKE1-Zellen, durch Forskolin und 8-Br-cAMP, dem membrangängigen Strukturanalog des intrazellulären cAMP [Hohage et al., 1998a und b]. Schließlich zeigten Hohage et al. und Mehrens et al., dass eine Erhöhung des zellulären cAMPs über Forskolin, die initiale ASP^+ -Aufnahmerate über den rOCT1 erhöhte [Hohage et al., 1998c; Mehrens et al., 2000]. Dieser Effekt wurde durch den spezifischen PKA-Inhibitor KT5720 komplett aufgehoben, was die Beteiligung einer PKA-vermittelten Phosphorylierung belegt. Die im Gegensatz hierzu in dieser Arbeit beobachtete geringe Hemmung der ASP^+ -Aufnahme über den rOCT1 durch nicht membrangängiges cAMP, das extrazellulär gegeben wurde, deutet somit auf einen eher unspezifischen Effekt hin und wurde daher nicht weiter untersucht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein Anstieg zellulären cGMPs im proximalen Tubulus, sei es durch ANP, Stickstoffmonoxid oder durch den Einwärtstransport von extrazellulärem cGMP vermittelt, die Aufnahme organischer Kationen über die basolaterale Membran durch Hemmung des rOCT1 vermindert. Zusätzliche Untersuchungen sind erforderlich, um zu klären, ob cGMP direkt am rOCT1 angreift oder über andere regulatorische Proteine vermittelt wird.

4.2 Organischer Kationentransport über die Mitochondrienmembran

Die Untersuchung des organischen Kationentransportes in der Mitochondrienmembran fand bisher, wie bereits in der Einleitung erörtert, wenig Beachtung. Daher liegt der Kenntnisstand auf diesem Gebiet weit unter dem des Transportes organischer Kationen in der Plasmamembran verschiedenster Gewebe.

In den bisherigen Studien wurden unter anderem kinetische Messungen mittels des Vergleichs von Volumenänderungen der Mitochondrien mit optischen Methoden durchgeführt [Bernardi, 1999]. Das Prinzip beruht darauf, dass Mitochondrien, wenn sie positiv geladene Teilchen aufnehmen, parallel zum Ladungsausgleich durch Anionen Wasser aufnehmen, weil die innere Membran für dieses hoch durchlässig ist [Bernardi, 1999]. Dadurch kommt es zur osmotischen Schwellung der Mitochondrien. Durch Messung des Matrixvolumens lassen sich somit Rückschlüsse auf die Kationenaufnahme ziehen [Bernardi et al., 1982]. Nachteil dieser Methode ist, dass sich nur indirekte Aufnahmewerte organischer Kationen ermitteln lassen. Abgesehen davon, differenziert diese Methode nicht von anderweitig mittransportierten Ionen. Denselben Nachteil hat die Spannungsmessung mittels Elektroden, die eine weitere Möglichkeit der Messmethoden auf diesem Gebiet bietet [Davey et al., 1992; Luvisetto et al., 1994; Mannella et al., 1986]. Zudem besteht noch die Möglichkeit, wie bei den Messungen des Membrantransportes über die Plasmamembran, radioaktiv markierte Kationen einzusetzen [Diwan et al., 1988; Steen et al., 1993]. Vor- und Nachteile dieser Methode wurden bereits in Kapitel 4.1 erörtert.

Folgerichtig war ein Ziel dieser Studie, mit Hilfe der ASP^+ -Fluoreszenzmessung eine neuartige Methode zur Untersuchung des organischen Kationentransportes über die Mitochondrienmembran zu entwickeln. Die Anreicherung von ASP^+ in Mitochondrien ist gut dokumentiert, so wurde dieser Farbstoff initial zur Anfärbung von Mitochondrien verwendet [Morozova et al., 1981].

Die Vorbehandlung der rOCT1-HEK293-Zellen mit Digitonin (0,1 mM) wurde dabei durchgeführt, um sicherzustellen, dass lediglich der Transport über die innere Mitochondrienmembran gemessen wurde. Digitonin permeabilisiert nicht nur die Plasmamembran und bietet somit eine ungehinderte Diffusion von ASP^+ in die Mitochondrien, sondern, wie bereits zuvor gezeigt, führt dies zur Lyse der äußeren

Membran. Somit sind Rückschlüsse auf die Transportvorgänge an der inneren Membran möglich [Diwan et al., 1988; Mannella et al., 1986].

Die Nutzung der ASP⁺-Fluoreszenzmessung ermöglicht zudem, wie bereits in Kapitel 4.1 dargestellt, eine dynamische Ermittlung der Aufnahme des Kations ASP⁺. Ob aber die hier entwickelte Methode wirklich geeignet ist, lediglich den Transport organischer Kationen über die Mitochondrienmembran aufzuzeigen, bleibt zu klären, da es innerhalb der Zelle auch noch weitere Organellen gibt, die organische Kationen aufnehmen. Stachon et al. konnten jedoch zeigen, dass ASP⁺ in sehr hohem Maß in den Mitochondrien angereichert wird, so dass das ASP⁺-Signal unter diesen Bedingungen vermutlich fast ausschließlich durch Anreicherung in den Mitochondrien getragen wird [Stachon et al., 1996].

In der vorliegenden Studie wurde der Transport organischer Kationen über die innere Mitochondrienmembran mit den Stoffen Cimetidin, TEA⁺ und Chinin untersucht. Es sollte geklärt werden, ob es in dieser Membran einen Transporter für organische Kationen gibt und ob dieser identisch mit dem in diesen Zellen exprimierten rOCT1 sein könnte. Dies würde bedeuten, dass der rOCT1 sowohl in der Plasmamembran als auch in der Mitochondrienmembran exprimiert würde.

Cimetidin und TEA⁺ stellen bekannte Substrate des organischen Kationentransportes über die Plasmamembran verschiedener Gewebe dar. Gleichzeitig wirken sie somit auch als kompetitive Hemmstoffe für den Transport anderer positiv geladener Substanzen [Pietruck and Ullrich, 1995; Ullrich et al., 1991]. Chinin selbst stellt kein Substrat für organische Kationentransportsysteme dar, fungiert jedoch als nicht-kompetitiver Inhibitor dieser Translokatoren [Nagel et al., 1997]. Für den rOCT1 in der Plasmamembran dieser transfizierten Zellen sind die Hemmkurven der ASP⁺-Aufnahme durch diese Kationen bereits bekannt [Mehrens et al., 2000].

Für alle drei Stoffe zeigte sich keine der Situation für den rOCT1 entsprechende signifikante Wirkung auf die initiale Fluoreszenzzunahme der permeabilisierten Zellen. Lediglich für Chinin zeigte sich eine konzentrationsabhängige Inhibition der maximal erreichten ASP⁺-Fluoreszenz. Die konzentrationsabhängige Aktivierung der ASP⁺-Aufnahme (Maxima) durch Cimetidin könnte auf eine cis-Stimulation des Transportes hinweisen.

Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass Transport organischer Kationen über die innere Mitochondrienmembran existiert. Dies wurde über einen langen Zeitraum angezweifelt, vor allem in den 80er-Jahren, als es hieß, Mitochondrien besäßen keine Kationenkanäle [Bernardi, 1999]. Denn es wurde ursprünglich vermutet, dass die innere Membran relativ impermeabel für Ionen sei, um einem passiven Verlust des elektrochemischen Protonengradienten vorzubeugen [O'Rourke; 2000]. Weitere Untersuchungen der Transportsysteme in der inneren Mitochondrienmembran zeigen aber inzwischen Gegenteiliges. Mehr Erkenntnisse gibt es diesbezüglich im Bereich des Transports anorganischer Kationen [Bernardi, 1999]. Vereinzelt Studien belegen jedoch ebenso die Existenz des Transports organischer Kationen. Teilweise wurde auch die Regulation dieser Transporte über Stimulatoren dargestellt. So wurde beispielsweise nachgewiesen, dass TPB⁻ die Aufnahme von MPP⁺ in die Matrix erhöht [Davey et al., 1992; Ramsey et al., 1989]. TPB⁻ erhöht ebenfalls die Anreicherung von TPA⁺ im Inneren der Mitochondrien [Bernardi et al., 1982; Luvisetto et al.; 1994]. Diese TPA⁺-Aufnahme könnte elektroneutral und unabhängig vom Membranpotential sein [Luvisetto et al.; 1994]. Bernardi vermutet sogar direkt die Existenz eines organische Kationen/H⁺-Austauschers in Mitochondrien [Bernardi et al., 1982]. Diese Studien erlauben jedoch keinen Rückschluss darauf, ob in der inneren Mitochondrienmembran dieselben molekularen Transportmechanismen für organische Kationen vorhanden sind, wie in der Plasmamembran. Ebenso zeigt keine dieser Studien eine Beeinflussung dieses Transportes über die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Inhibitoren TEA⁺, Cimetidin oder Chinin, die Hinweis auf eine Übereinstimmung der Translokatoren beider Membrantypen liefern könnten.

Abschließend lässt sich sagen, dass der ASP⁺-Transport und damit der Transport organischer Kationen über die innere Mitochondrienmembran existiert. Dieser verläuft jedoch über einen noch weiter zu klärenden Mechanismus, der zwar durch Chinin aber nicht durch TEA⁺ hemmbar ist und durch Cimetidin sogar stimulierbar erscheint und somit nicht dem Typ OCT entspricht.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde der organische Kationentransporter der Ratte Typ 1 (rOCT1), stabil exprimiert in einer permanenten menschlichen Nierenzelllinie (HEK293), bezüglich seiner Regulation durch zyklische Nukleotide untersucht. Als Methode diente die ASP^+ -Fluoreszenzmessung. Dabei stellte das fluoreszierende organische Kation ASP^+ das Substrat für den rOCT1 dar. Es zeigte sich, dass der rOCT1 sowohl durch 8-Br-cGMP als auch durch extrazelluläres cGMP gehemmt wurde. Dieser Effekt war nicht PKG-vermittelt und zeigte sich bei cGMP nur nach 10-minütiger Vorinkubation der Zellen mit dieser Substanz.

Dies führt zu der Annahme, dass eine Erhöhung intrazellulären cGMPs in proximalen Tubuluszellen die Aufnahme organischer Kationen durch Inhibition des rOCT1 verringert. Dieser Effekt ist offensichtlich spezifisch für cGMP und wird nicht durch die nicht zyklischen Guanosinnukleotide oder cAMP ausgelöst.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde ebenfalls mit der ASP^+ -Fluoreszenzmessmethode ermittelt, ob es in der inneren Mitochondrienmembran einen Transporter für organische Kationen gibt und ob dieser eventuell identisch mit einem Transporter des OCT-Typs ist. Dazu wurden die Substanzen Cimetidin, TEA^+ und Chinin als bekannte Substrate beziehungsweise als Inhibitor des organischen Kationentransportes in der Plasmamembran verwendet.

Generell zeigte sich eine Aufnahme von ASP^+ über die innere Mitochondrienmembran, jedoch zeigte diese keine Charakteristika des organischen Kationentransportes über Transporter des OCT-Typs.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Aperia A, Holtbäck U, Syrén ML, Svensson LB, Fryckstedt J, Greengard P 1994 Activation/deactivation of renal Na⁺, K⁺-ATPase: A final common pathway for regulation of natriuresis. *FASEB J* 8: 436-439
- Arndt P, Volk C, Gorboulev V, Budiman T, Popp C, Ulzheimer-Teuber I, Akhoundova A, Koppatz S, Bamberg E, Nagel G, Koepsell H 2001 Interactions of cations, anions, and weak base quinine with renal cation transporter rOCT2 compared with rOCT1. *Am J Physiol* 281: F454-F468
- Azuma KK, Balkovetz DF, Magyar CE, Lescale-Matys L, Zhang YB, Chambrey R, Warnock DG, Mc Donough AA 1996 Renal Na⁺/H⁺ exchanger isoforms and their regulation by thyroid hormone. *Am J Physiol* 270: C585-C592
- Bergwerk AJ, Shi X, Ford AC, Kanai N, Jacquemin E, Burk RD, Bai S, Novikoff PM, Stieger B, Meier PJ, Schuster VL, Wolkoff AW 1996 Immunologic distribution of an organic anion transport protein in rat liver and kidney. *Am J Physiol* 271: G231-G238
- Bernardi P, Pozzan M, Azzone GF 1982 Mitochondrial oscillation and activation of H⁺/cation exchange. *J Bioenerg Biomembr* 14: 387-403
- Bernardi P 1999 Mitochondrial transport of cations: Channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev* 79: 1127-1155
- Boom SP, Gribnau FW, Russel FG 1992 Organic cation transport and cationic drug interactions in freshly isolated proximal tubular cells of the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 263: 445-450
- Brändle E, Fritsch G, Greven J 1992 Affinity of different local anesthetic drugs and catecholamines for the contraluminal transport system for organic cations in proximal tubules of rat kidneys. *J Pharmacol Exp Ther* 260: 734-741
- Breidert T, Spitzenberger F, Gründemann D, Schömig E 1998 Catecholamine transport by the organic cation transporter type 1 (OCT1). *Br J Pharmacol* 125: 218-224
- Burckhardt G, Wolff NA 2000 Structure of renal anion and cation transporters. *Am J Physiol* 278: F853-F866
- Busch AE, Quester S, Ulzheimer JC, Waldegger S, Gorboulev V, Arndt P, Lang F, Koepsell H 1996a Electrogenic properties and substrate specificity of the polyspecific rat cation transporter rOCT1. *J Biol Chem* 271: 32599-32604

-
- Busch AE, Quester S, Ulzheimer JC, Gorboulev V, Akhoundova A, Waldegger S, Lang F, Koepsell H 1996b Monoamine neurotransmitter transport mediated by the polyspecific cation transporter rOCT1. *FEBS Lett* 395: 153-156
- Busch AE, Karbach U, Miska D, Gorboulev V, Akhoundova A, Volk C, Arndt P, Ulzheimer JC, Sonders MS, Baumann C, Waldegger S, Lang F, Koepsell H 1998 Human neurons express the polyspecific cation transporter hOCT2, which translocates monoamine neurotransmitters, amantadine, and memantine. *Mol Pharm* 54: 342-352
- Cantiello HF, Ausiello DA 1986 Atrial natriuretic factor and cGMP inhibit amiloride-sensitive Na^+ transport in the cultured renal epithelial cell line, LLC-PK₁. *Biochem Biophys Res Commun* 134: 852-860
- Cheng XJ, Höög JO, Nairn AC, Greengard P, Aperia A 1997 Regulation of Na^+/K^+ -ATPase activity by PKC is modulated by state of phosphorylation of Ser-943 by PKA. *Am J Physiol* 273: C1981-C1986
- Chun JK, Zhang L, Piquette-Miller M, Lau E, Tong LQ, Giacomini KM 1997 Characterization of guanidine transport in human renal brush border membranes. *Pharm Res* 14: 936-941
- Dantzer WH, Brokl OH 1988 TEA transport by snake renal tubules: Choline effects, countertransport, H^+ -TEA exchange. *Am J Physiol* 255: F167-F176
- Darvish N, Winaver J, Dagan D 1995 A novel cGMP-activated Cl^- channel in renal proximal tubules. *Am J Physiol* 268: F323-F329
- Davey GP, Tipton KF, Murphy MP 1992 Uptake and accumulation of 1-methyl-4-phenylpyridinium by rat liver mitochondria measured using an ion-selective electrode. *Biochem J* 288: 439-443
- David C, Rumrich G, Ullrich KJ 1995 Luminal transport system for H^+ /organic cations in the rat proximal tubule. Kinetics, dependence on pH; specificity as compared with the contraluminal organic cation-transport system. *Pflügers Arch* 430: 477-492
- Diwan JJ, Yune HH, Bawa R, Haley T, Mannella CA 1988 Enhanced uptake of spermidine and methylglyoxal-bis-(guanyldrazone) by rat liver mitochondria following outer membrane lysis. *Biochem Pharmacol* 37: 957-961
- Dresser MJ, Gray AT, Giacomini KM 2000 Kinetic and selectivity differences between rodent, rabbit, and human organic cation transporters (OCT1). *J Pharmacol Exp Ther* 292: 1146-1152

-
- Dubuisson C, Cresteil D, Desrochers M, Decimo D, Hadchouel M, Jacquemin E 1996 Ontogenic expression of the Na⁺-independent organic anion transporting polypeptide (oatp) in rat liver and kidney. *J Hepatol* 25: 932-940
- Eitle E, Hiranyachattada S, Wang H, Harris PJ 1998 Inhibition of proximal tubular fluid absorption by nitric oxide and atrial natriuretic peptide in rat kidney. *Am J Physiol* 274: C1075-C1080
- Galli A, Blakely R, DeFelice L 1996 Norepinephrine transporters have channel modes of conduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 8671-8676
- Ganapathy V, Ganapathy ME, Nair CN, Mahesh VB, Leibach FH 1988 Evidence for an organic cation-proton antiport system in brush-border membranes isolated from the human term placenta. *J Biol Chem* 263: 4561-4568
- Gorboulev V, Ulzheimer JC, Akhoundova A, Ulzheimer-Teuber I, Karbach U, Quester S, Baumann C, Lang F, Busch AE, Koepsell H 1997 Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters. *DNA Cell Biol* 16: 871-881
- Gottesman MM, Pastan I 1993 Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 62: 385-427
- Graham F, Smiley J, Russell W, Nairn R 1977 Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36: 59-72
- Gründemann D 1994 Kapitel 1.2.2 *Xenopus*-Oozyten als Expressionssystem *In*: Gründemann D (Hrsg.): Klonierung und Charakterisierung des basolateralen Transporters für organische Kationen aus der Rattenniere durch funktionelle Expression in Oozyten von *Xenopus laevis*; Verlag Shaker, Aachen; zugl.: Frankfurt am Main, Univ., Diss., 1994
- Gründemann D, Gorboulev V, Gambaryan S, Veyhl M, Koepsell H 1994 Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. *Nature* 372: 549-552
- Gründemann D, Babin-Ebell J, Martel F, Ording N, Schmidt A, Schömig E 1997 Primary structure and functional expression of the apical organic cation transporter from kidney epithelial LLC-PK₁ cells. *J Biol Chem* 272: 10408-10413
- Guzman NJ, Fang MZ, Tang SS, Ingelfinger JR, Garg LC 1995 Autocrine inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase by nitric oxide in mouse proximal tubule epithelial cells. *J Clin Invest* 95: 2083-2088

-
- Hammond TG, Yusufi ANK, Knox FG, Dousa FG 1985 Administration of atrial natriuretic factor inhibits sodium-coupled transport in proximal tubules. *J Clin Invest* 75: 1983-1989
- Hirsch JR, Loo DDF, Wright EM 1996 Regulation of Na⁺/glucose cotransporter expression by protein kinases in *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem* 271: 14740-14746
- Hirsch JR, Meyer M, Magert MJ, Forsmann WG, Mollerup S, Herter P, Weber G, Cermak R, Ankorina-Stark I, Schlatter E, Kruhoffer M 1999a cGMP-dependent and -independent inhibition of a K⁺ conductance by natriuretic peptides: Molecular and functional studies in human proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol* 10: 472-480
- Hirsch JR, Weber G, Kleta I, Schlatter E 1999b A novel cGMP-regulated K⁺ channel in immortalized human kidney epithelial cells (IHKE-1). *J Physiol* 519: 645-655
- Hirsch JR, Weber G, Kleta I, Schlatter E 2001 cGMP serves as an extracellular regulator of a Ca²⁺-dependent K⁺ channel in immortalized human proximal tubule cells. *Cell Physiol Biochem* 11: 77-82
- Hohage H, Mörth DM, Querl IU, Greven J 1994 Regulation by protein kinase C of the contraluminal transport system for organic cations in rabbit kidney S2 proximal tubules. *J Pharmacol Exp Ther* 268: 897-901
- Hohage H, Stachon A, Feidt C, Hirsch JR, Schlatter E 1998a Regulation of organic cation transport in IHKE-1 and LLC-PK₁ cells. Fluorimetric studies with 4-(4-dimethylaminostyryl)-N-methylpyridinium. *J Pharmacol Exp Ther* 286: 305-310
- Hohage H, Stachon A, Feidt C, Hirsch JR, Schlatter E 1998b Effects of protein kinase activation on organic cation transport in human proximal tubular cells. *Nova Acta Leopoldina NF 78 306*: 293-298
- Hohage H, Lelleck S, Stachon A, Haxelmans S, Koepsell H, Schlatter E 1998c Forskolin activates the organic cation transporter rOCT expressed in HEK293 cells. *Nova Acta Leopoldina NF 78 306*: 355
- Holohan PD, Ross CR 1980 Mechanisms of organic cation transport in kidney plasma membrane vesicles: 1. Countertransport studies. *J Pharmacol Exp Ther* 215: 191-197
- Holohan PD, Ross CR 1981 Mechanisms of organic cation transport in kidney plasma membrane vesicles: 2. delta pH studies. *J Pharmacol Exp Ther* 216: 294-298

-
- Irion G, Ochsenfeld L, Naujok A, Zimmermann HW 1993 The concentration jump method. Kinetics of vital staining of mitochondria in HeLa cells with lipophilic cationic fluorescent dyes. *Histochemistry* 99: 75-83
- Iseki K, Sugawara M, Saitoh N, Miyazaki K 1993 The transport mechanisms of organic cations and their zwitterionic derivatives across the intestinal brush-border membrane. II. Comparison of the membrane potential effect on the uptake by membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1152: 9-14
- Ito S 1999 Drug secretion systems in renal tubular cells: Functional models and molecular identity. *Pediatr Nephrol* 13: 980-988
- Jacobs EMG, Vervoort G, Branten AJW, Klasen I, Smits P, Wetzels JFM 1999 Atrial natriuretic peptide increases albuminuria in type I diabetic patients: Evidence for blockade of tubular protein reabsorption. *Eur J Clin Invest* 29: 109-115
- Junqueira LC 2002 Kapitel 18.1 Niere *In: Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO (Hrsg.): Histologie 5. Auflage, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York-Barcelona-Hongkong-London-Mailand-Paris-Tokio / 4. Aufl. u.d.T.: Schiebler TH: Histologie*
- Karbach U, Kricke J, Meyer-Wentrup F, Gorboulev V, Volk C, Loffing-Cueni D, Kaissling B, Bachmann S, Koepsell H 2000 Localization of organic cation transporters OCT1 and OCT2 in rat kidney. *Am J Physiol* 279: F679-F687
- Kekuda R, Prasad PD, Wu X, Wang H, Fei YJ, Leibach FH, Ganapathy V 1998 Cloning and functional characterization of a potential-sensitive, polyspecific organic cation transporter (OCT3) most abundantly expressed in placenta. *J Biol Chem* 273: 15971-15979
- Kim YK, Dantzer WH 1996 Specificity of basolateral organic cation transport in snake renal proximal tubules. *Am J Physiol* 270: R1025-R1030
- Kleinig H 1999 Kapitel 10 Mitochondrien und Atmung *In: Kleinig H, Sitte P (Hrsg.): Zellbiologie: Ein Lehrbuch ; 4. Auflage, G.Fischer, Stuttgart-Jena-Lübeck-Ulm*
- Koehler MR, Gorboulev V, Koepsell H, Steinlein C, Schmid M 1996 rOCT1, a rat polyspecific transporter gene for the excretion of cationic drugs, maps to chromosome 1q11-12. *Mamm Genome* 7: 247-248
- Koehler MR, Wissinger B, Gorboulev V, Koepsell H, Schmid M 1997 The two human organic cation transporter genes SLC22A1 and SLC22A2 are located on chromosome 6q26. *Cytogenet Cell Genet* 79: 198-200

-
- Koepsell H 1998 Organic cation transporters in intestine, kidney, liver, and brain. *Annu Rev Physiol* 60: 243-266
- Koepsell H, Busch AE, Gorboulev V, Arndt P 1998 Structure and function of renal organic cation transporters. *News Physiol Sci* 13: 11-16
- Koepsell H, Gorboulev V, Arndt P 1999 Molecular pharmacology of organic cation transporters in kidney. *J Membr Biol* 167: 103-117
- Lazaruk KD, Wright SH 1990 MPP⁺ is transported by the TEA⁺-H⁺ exchanger of renal brush-border membrane vesicles. *Am J Physiol* 258: F597-F605
- Lenz W, Herten M, Gerzer R, Drummer C 1999 Regulation of natriuretic peptide (urodilatin) release in a human kidney cell line. *Kidney Int* 55: 91-99
- Linas SL, Repine JE 1999 Endothelial cells regulate proximal tubule epithelial cell sodium transport. *Kidney Int* 55: 1251-1258
- Luisetto S, Schemehl I, Canton M, Azzone GF 1994 The effect of respiration on the permeability of the mitochondrial membrane to ions. *Biochim Biophys Acta* 1186: 12-18
- Mannella CA, Capolongo N, Berkowitz R 1986 Correlation between outer-membrane lysis and susceptibility of mitochondria to inhibition by adriamycin and polyamines. *Biochim Biophys Acta* 848: 312-316
- Marger MD, Saier MH Jr. 1993 A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends Biochem Sci* 18: 13-20
- Martel F, Vetter T, Russ H, Gründemann D, Azevedo I, Koepsell H, Schömig E 1996 Transport of small organic cations in the rat liver. The role of the organic cation transporter OCT1. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 354: 320-326
- McKinney TD, Kunnemann ME 1985 Procainamide transport in rabbit renal cortical brush-border membrane vesicles. *Am J Physiol* 249: F532-F541
- McKinney TD, Kunnemann ME 1987 Cimetidine transport in rabbit renal cortical brush-border membrane vesicles. *Am J Physiol* 252: F525-F535
- McKinney TD, Hosford MA 1992 Organic cation transport by rat hepatocyte basolateral membrane vesicles. *Am J Physiol* 263: G939-G946
- McKinney TD, Hosford MA 1993 ATP-stimulated tetraethylammonium transport by rabbit renal brush-border membrane vesicles. *J Biol Chem* 268: 6886-6895

-
- Mehrens T, Lelleck S, Cetinkaya I, Knollmann M, Hohage H, Gorboulev V, Boknik P, Koepsell H, Schlatter E 2000 The affinity of the organic cation transporter rOCT1 is increased by protein kinase C dependent phosphorylation. *J Am Soc Nephrol* 11: 1216-1224
- Miller DS, Villalobos AR, Pritchard JB 1999 Organic cation transport in rat choroid plexus cells studied by fluorescence microscopy. *Am J Physiol* 276: C955-C968
- Miyamoto Y, Ganapathy V, Leibach FH 1988 Transport of guanidine in rabbit intestinal brush-border membrane vesicles. *Am J Physiol* 255: G85-G92
- Miyamoto Y, Tiruppathy C, Ganapathy V, Leibach FH 1989 Multiple transport systems of organic cations in renal brush-border membrane-vesicles. *Am J Physiol* 256: F540-F548
- Mol WE, Fokkema GN, Weert B, Meijer DK 1988 Mechanisms for the hepatic uptake of organic cations. Studies with the muscle relaxant vecuronium in isolated hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 244: 268-275
- Morozova GI, Dobretsov GE, Dubur GI, Dubur RR, Golitsyn VM 1981 4-(n-Dimethylaminostyryl)-1-methylpyridinium fluorescence in a living cell. *Tsitologiya* 23: 916-923
- Moseley RH, Takeda H, Zuggler LJ 1996 Choline transport in rat liver basolateral plasma membrane vesicles. *Hepatology* 24: 192-197
- Moseley RH, Zuggler LJ, Van Dyke RW 1997 The neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridinium is a substrate for the canalicular organic cation/H⁺ exchanger. *J Pharmacol Exp Ther* 281: 34-40
- Nagel G, Volk C, Friedrich T, Ulzheimer JC, Bamberg E, Koepsell H 1997 A reevaluation of substrate specificity of the rat cation transporter rOCT1. *J Biol Chem* 272: 31953-31956
- Nakamura H, Sano H, Yamazaki M, Sugiyama Y 1994 Carrier-mediated active transport of histamine H₂ receptor antagonists, cimetidine and nizatidine, into isolated rat hepatocytes: Contribution of type I system. *J Pharmacol Exp Ther* 269: 1220-1227
- Nitschke R, Fröbe U, Greger R 1991 Antidiuretic hormone acts via V₁ receptors on intracellular calcium in the isolated perfused rabbit cortical thick ascending limb. *Pflügers Arch* 417: 622-632

-
- Okuda M, Saito H, Urakami Y, Takano M, Inui K 1996 cDNA cloning and functional expression of a novel rat kidney organic cation transporter, OCT2. *Biochem Biophys Res Commun* 224: 500-507
- O'Rourke B 2000 Pathophysiological and protective roles of mitochondrial ion channels. *J Physiol* 529: 23-36
- Oude Elferink RP, Meijer DK, Kuipers F, Jansen PL, Groen AK, Groothuis GM 1995 Hepatobiliary secretion of organic compounds; molecular mechanisms of membrane transport. *Biochim Biophys Acta* 1241: 215-268
- Pietig G, Mehrens T, Hirsch JR, Cetinkaya I, Piechota H, Schlatter E 2001 Properties and regulation of organic cation transport in freshly isolated human proximal tubules. *J Biol Chem* 276: 33741-33746
- Pietruck F, Ullrich KJ 1995 Transport interactions of different organic cations during their excretion by the intact rat kidney. *Kidney Int* 47: 1647-1657
- Pritchard JB, Miller DS 1993 Mechanisms mediating renal secretion of organic anions and cations. *Physiol Rev* 73: 765-796
- Pritchard JB, Miller DS 1996a Intracellular compartmentation of organic anions and cations during renal secretion. *Cell Physiol Biochem* 6: 50-59
- Pritchard JB, Miller DS 1996b Renal secretion of organic anions and cations. *Kidney Int* 49: 1649-1654
- Pritchard JB, Miller DS 1997 Renal secretion of organic cations: A multistep process. *Advanced Drug Delivery Reviews* 25: 231-242
- Ramsay RR, Singer TP 1986 Energy-dependent uptake of N-methyl-4-phenylpyridinium, the neurotoxic metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, by mitochondria. *Biol Chem* 261: 7585-7587
- Ramsay RR, Mehlhorn RJ, Singer TP 1989 Enhancement by tetraphenylboron of the interaction of the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺) with mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 159: 983-990
- Reddy S, Györy AZ, Dyne M, Salipan-Moore N, Pollock C, Field MJ, Cockayne DJH 1994 Effect of atrial natriuretic peptide on cellular element concentrations in rat proximal tubules: Evidence for inhibition of the sodium pump. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 21: 775-780
- Rennick BR, Moe GK, Lyons RH, Hoobler SW, Neligh R 1947 Absorption and renal excretion of the tetraethylammonium ion. *J Pharmacol Exp Ther* 92: 210-217

-
- Roczniak A, Burns KD 1996 Nitric oxide stimulates guanylate cyclase and regulates sodium transport in rabbit proximal tubule. *Am J Physiol* 270: F106-F115
- Rohlicek V, Ullrich KJ 1994 Simple device for continuous measurement of fluorescent anions and cations in the rat kidney in situ. *Renal Physiol Biochem* 17: 57-61
- Ruiz OS, Qiu YY, Wang LJ, Arruda JA 1996 Regulation of the renal Na-HCO₃ cotransporter: V. Mechanism of the inhibitory effect of parathyroid hormone. *Kidney Int* 49: 396-402
- Rudnick G, Clark J 1993 From synapse to vesicle: The reuptake and storage of biogenic amine neurotransmitters. *Biochim Biophys Acta* 1144: 249-263
- Schinkel AH, Smit JJ, van Tellingen O, Beijnen JH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, van der Valk MA, Robanus-Maandag EC, te Riele HP 1994 Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Clin Investig* 77: 491-502
- Schlatter E, Mönnich V, Cetinkaya I, Mehrens T, Ciarimboli G, Hirsch JR, Popp C, Koepsell H 2002 The organic cation transporters rOCT1 and hOCT2 are inhibited by cGMP. *J Membr Biol* 189: 237-244
- Schloss P, Mayser W, Betz H 1992 Neurotransmitter transporters. A novel family of integral plasma membrane proteins. *FEBS Lett* 307: 76-80
- Simmons NL 1990 A cultured human renal epithelioid cell line responsive to a vasoactive intestinal peptide. *Exp Physiol* 75: 309-319
- Stachon A, Schlatter E, Hohage H 1996 Dynamic monitoring of organic cation transport processes by fluorescence measurements in LLC-PK₁ cells. *Cell Physiol Biochem* 6: 72-81
- Stachon A, Hohage H, Feidt C, Schlatter E 1997 Characterisation of organic cation transport across the apical membrane of proximal tubular cells with the fluorescent dye 4-Di-1-ASP. *Cell Physiol Biochem* 7: 264-274
- Steen H, Maring JG, Meijer DK 1993 Differential effects of metabolic inhibitors on cellular uptake of organic cations in rat liver. *Biochem Pharmacol* 45: 809-818
- Sugawara-Yokoo M, Urakami Y, Koyama H, Fujikara K, Masuda S, Saito H, Naruse T, Inui K-I, Takata K 2000 Differential localization of organic cation transporters rOCT1 and rOCT2 in the basolateral membrane of rat kidney proximal tubules. *Histochem Cell Biol* 114: 175-180

-
- Szewczyk A, Wojtczak L 2002 Mitochondria as a pharmacological target. *Pharm Rev* 54: 101-128
- Takano M, Inui K, Okano T, Hori R 1985 Cimetidine transport in rat renal brush border and basolateral membrane vesicles. *Life Sci* 37: 1579-1585
- Takano M, Katsura T, Tomita Y, Yasuhara M, Hori R 1993 Transport mechanisms of choline in rat renal brush-border membrane. *Biol Pharm Bull* 16: 889-894
- Tamai I, Yabuuchi H, Nezu J, 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
- Tamai I, Ohashi R, Nezu J, Yabuuchi H, Oku A, Shimane M, Sai Y, Tsuji A 1998 Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high-affinity human carnitine transporter OCTN2. *J Biol Chem* 273: 20378-20382
- Ullrich KJ 1999 Affinity of drugs to the different renal transporters for organic anions and cations: *In situ* K_i values. In: *Membrane Transporters as Drug Targets*. G.L. Amidon, W. Sadée (eds.), Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 159-179
- Ullrich KJ, Papavassiliou F, David C, Rumrich G, Fritsch G 1991 Contraluminal transport of organic cations in the proximal tubule of the rat kidney. I. Kinetics of N1-methylnicotinamide and tetraethylammonium, influence of K^+ , HCO_3^- , pH; inhibition by aliphatic primary, secondary and tertiary amines and mono- and bisquaternary compounds. *Pflügers Arch* 419: 84-92
- Ullrich KJ, Rumrich G 1993 Renal transport mechanisms for xenobiotics: Chemicals and drugs. *Clin Investig* 71: 843-848
- Ullrich KJ, Rumrich G 1996 Luminal transport system for choline⁺ in relation to the other organic cation transport systems in the rat proximal tubule-Kinetics, specificity: Alkyl/aryl amines, alkyl amines with OH, O, SH, NH₂, ROCO, RSCO and H₂PO₄-groups, methylaminostyryl, rhodamine, acridine, phenantrene and cyanine compounds. *Pflügers Arch* 432: 471-485
- Wang T 1997 Nitric oxide regulates HCO_3^- and Na^+ transport by a cGMP-mediated mechanism in the kidney proximal tubule. *Am J Physiol* 272: F242-F248
- Whittico MT, Gang YA, Giacomini KM 1990 Cimetidine transport in isolated brush border membrane vesicles from bovine choroid plexus. *J Pharmacol Exp Ther* 255: 615-623

- Wright SH, Wunz TM 1987 Transport of tetraethylammonium by rabbit renal brush-border and basolateral membrane vesicles. *Am J Physiol* 253: F1040-F1050
- Wright SH, Wunz TM, Wunz TP 1992 A choline transporter in renal brush-border membrane-vesicles: Energetics and structural specificity. *J Membr Biol* 126: 51-65
- Wu X, Huang, W, Ganapathy ME, Wang H, Kekuda R, Conway SJ, Leibach FH, Ganapathy V 2000 Structure, function, and regional distribution of the organic cation transporter OCT3 in the kidney. *Am J Physiol* 279: F449-F458
- Zhang L, Brett CM, Giacomini KM 1998 Role of organic cation transporters in drug absorption and elimination. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38: 431-460

PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

Originalpublikationen

Schlatter E, Mönnich V, Cetinkaya I, Mehrens T, Ciarimboli G, Hirsch JR, Popp C, Koepsell H 2002 The organic cation transporters rOCT1 and hOCT2 are inhibited by cGMP. *J Membr Biol* 189: 237-244

Abstracts

Mehrens T, Mönnich V, Hohage H, Cetinkaya I, Hirsch JR, Koepsell H, Schlatter E 1999 The organic cation transporter rOCT1 expressed in HEK293 cells is regulated by cGMP. *Pflügers Arch* 437 (5):R184

Schlatter E, Cetinkaya I, Gorboulev V, Knollmann M, Lelleck S, Mehrens T, Mönnich V, Yalcinkaya G, Koepsell H 2000 Regulation of the organic cation transporters rOCT1 and hOCT2 by protein kinases. *International Meeting Transporters 2000, Spanien.*

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name: Verena Mönnich
Geburtsdatum: 04. September 1973
Geburtsort: Datteln
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1980-1984 Albert-Schweitzer-Grundschule in Datteln
1984-1993 Städtisches Gymnasium Datteln
06/1993 Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

1993 – 1999 Studium der Zahnmedizin an der
Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster
04/1995 Naturwissenschaftliche Vorprüfung
03/1996 Zahnärztliche Vorprüfung
07/1999 Staatsexamen im Fach Zahnmedizin
und Approbation als Zahnärztin

Beruflicher Werdegang

01/2000-08/2002 Zahnärztliche Tätigkeit als Ausbildungsassistentin
in der Gemeinschaftspraxis ZA Houben / Dr. J. Haverkamp
in Recklinghausen
seit 09/2002 Zahnärztliche Tätigkeit als Ausbildungsassistentin
in der Zahnarztpraxis Dr. W. Elsen in Recklinghausen

DANKSAGUNG

Prof. Dr. Eberhard Schlatter möchte ich für die Möglichkeit zur Promotion, die interessante Themenstellung und seine jederzeitige Bereitschaft zu einem kollegialen Gespräch ganz herzlich danken.

Privatdozent Dr. Helge Hohage möchte ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes danken.

Für die Einarbeitung in die Methode bedanke ich mich bei Sabine Haxelmans und Dr. Thomas Mehrens.

Mein ganz besonderer Dank gilt Privatdozent Dr. Jochen Hirsch für seine außerordentliche Geduld bei der Beantwortung aller meiner Computer-Fragen.

Für die Unterstützung in der Laborarbeit möchte ich Heike Stegemann, Ingrid Kleta und Joachim Windau danken.

Einen lieben Dank möchte ich Dr. Silke Gaßmann für die Vermittlung dieser Arbeit aussprechen. Sie hat mir geholfen, gesteckte Ziele nicht aus den Augen zu verlieren.

Dr. Ibrahim Cetinkaya möchte ich hiermit für seine Hilfe und Unterstützung danken.

Prof. Dr. Hermann Koepsell danke ich für die Bereitstellung der rOCT1-HEK293-Zellen und für die weiterführenden Untersuchungsergebnisse, die richtungsweisend für den Diskussionsteil dieser Dissertation waren.

Meine Mutter Annegret Mönnich hat mir das Studium und diese Promotion erst ermöglicht. Vielen Dank für deine Unterstützung, Geduld und Liebe!

Meiner Schwester Anne Mönnich und Christoph Müller danke ich herzlich für ihre tatkräftige Hilfe bei der Gliederung, beim Korrekturlesen dieser Arbeit und der Formatierung des Textes.

Dr. Wibke Steffen möchte ich für ihre aufheiternden Telefonate während des Verfassens dieser Arbeit danken.

Björn Nübel danke ich sehr herzlich für seine Liebe, Geduld und Unterstützung.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertationsschrift selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst zu haben und dass die Literatur, deren Ergebnisse in diese Arbeit eingeflossen sind, vollständig angegeben ist.

Eine Dissertation dieser oder ähnlicher Form ist von mir nicht bei einer anderen Abteilung oder entsprechenden Einrichtung einer Hochschule eingereicht worden.

Münster, den 15. Januar 2003