

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Medizinische Klinik D
-Direktor: Univ. - Prof. Dr. med. H. - J. Pavenstädt-

Bedeutung der Aminosäuremutationen C322S und C451M für die Substrataffinität
und Regulation des organischen Kationentransporters Typ 1 der Ratte

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms - Universität Münster

vorgelegt von
Grummich, Oliver

aus
Spremberg

2016

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

Dekan : Univ. - Prof. Dr. med. Dr. h.c. W. Schmitz

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. G. Ciarimboli

2. Berichterstatter: Priv. – Doz. Dr. rer. nat. K. Kusche - Vihrog

Tag der mündlichen Prüfung: 22.03.2016

Zusammenfassung

Bedeutung der Aminosäuremutationen C322S und C451M für die Substrataffinität und Regulation des organischen Kationentransporters Typ 1 der Ratte

vorgelegt von Grummich, Oliver

Für den Transport organischer Kationen über die basolaterale Membran der Epithelzellen der proximalen Nierentubuli sind organische Kationentransporter (OCT) von Bedeutung. Der organische Kationentransporter Typ 1 der Ratte (rOCT1) wird im S1 und S2 - Segment der proximalen Nierentubuli exprimiert. Dieser Transporter besteht aus 556 Aminosäuren, 12 Transmembrandomänen (TD), einer großen extrazellulären Schleife (zwischen TD 1 und 2) und einer großen intrazellulären Schleife (zwischen TD 6 und 7), welche mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen für Kinasen trägt. Eine Regulation des rOCT1 durch unterschiedliche Kinasen, z.B. PKC, PKA oder die p56^{lck} - Tyrosinkinase, ist bekannt.

In dieser Arbeit haben wir die Auswirkung der Substitution des Cysteins in der Aminosäurekettenposition 322 (in der großen intrazellulären Schleife) und des Cysteins 451 (am cytosolischen Ende der TD 10) durch Serin bzw. Methionin einzeln (C322S bzw. C451M) und zusammen (C322S/C451M) auf die Funktion und Regulation des rOCT1 untersucht. Dazu wurde die Aktivität des Transporters, nach seiner stabilen Transfektion in HEK293 - Zellen, über die Geschwindigkeit der zellulären Aufnahme seines fluoreszierenden kationischen Substrates 4-(4-(Dimethylamino)styryl)-N-Methylpyridinium (ASP⁺, 1 µM) mittels Fluoreszenzmikroskopie gemessen.

Wir konnten nachweisen, dass sich die Affinität bzw. die apparente Affinität des Transporters für die Kationen ASP⁺, Tetraethylammonium (TEA⁺) und Tetrapentylammonium (TPA⁺) durch die Doppelmutation nicht ändert (K_m - Werte: 20 ± 1 µM bzw. 35 ± 2 µM für ASP⁺ und IC₅₀ - Werte: 58 ± 4 µM bzw. 67 ± 10 µM für TEA⁺ und 103 ± 3 nM bzw. 168 ± 7 nM für TPA⁺ beim nativen (WT) bzw. doppelt mutierten Transporter (C322S/C451M)). Eine Proteinkinase C (PKC) - Aktivierung mit 1 µM 1,2-Dioctanoyl-sn-Glycerol (DOG) führte beim WT zu einer signifikanten Stimulation der ASP⁺ - Aufnahme (+35 ± 10%, n = 10), während eine Inhibition der p56^{lck} - Tyrosinkinase mit 10 µM Aminogentisin diese signifikant hemmte (-46 ± 7%, n = 19). Diese Transporterstimulation durch die PKC war sowohl nach der Doppelmutation C322S/C451M (-9 ± 12%, n = 8) als auch der Einzelmutation C322S aufgehoben (-4 ± 9%, n = 10), während sie sich nach der Einzelmutation C451M (+28 ± 9%, n = 21) weiterhin nachweisen ließ. Hingegen änderte die Doppelmutation nicht den hemmenden Effekt einer p56^{lck} - Tyrosinkinase - Inhibition (-52 ± 5%, n = 17). Auch hatte die Doppelmutation weder eine Auswirkung auf die Reduktion des ASP⁺ - Transportes, ausgelöst durch eine Inhibition von Calmodulin mit 5 µM Calmidazolium (-87 ± 2%, n = 12 bzw. -83 ± 2%, n = 16 beim WT bzw. C322S/C451M), noch auf die stimulierende Wirkung des Thiolgruppenmodulators Methylmethanethiosulfonat (MMTS, 1 mM) (+26 ± 7%, n = 18 bzw. +26 ± 8%, n = 17 beim WT bzw. C322S/C451M). Schließlich verringerte sich die apparente Affinität für TPA⁺ durch Hemmung von Calmodulin mit 0,1 µM Calmidazolium sowohl beim nativen als auch beim doppelt mutierten Transporter (IC₅₀ - Werte: 103 ± 3 nM bzw. 302 ± 22 nM beim WT und 168 ± 7 nM bzw. 405 ± 37 nM beim C322S/C451M ohne bzw. mit Calmidazolium).

Diese Daten zeigen, dass die Doppelmutation des rOCT1 in Position C322 und C451 seine Affinität für die untersuchten organischen Kationen nicht ändert, während eine Inhibition des zellulären Calmodulins mit Calmidazolium die apparente Affinität des Transporters für das organische Kation TPA⁺ verringert. Desweiteren hebt die Mutation des Cysteins 322, nicht hingegen die des Cysteins 451, die Regulation des Transporters durch die PKC auf, während weder Cystein 322 noch Cystein 451 einen Einfluss auf seine Regulation durch die p56^{lck} - Tyrosinkinase, Calmodulin und MMTS zu haben scheinen.

ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

Bedeutung der Aminosäuremutationen C322S und C451M für die
Substrataffinität und Regulation des organischen Kationentrans-
porters Typ 1 der Ratte

in der/im (Klinik, Institut, Krankenanstalt):

Medizinischen Klinik D, Experimentelle Nephrologie des
Universitätsklinikums Münster

unter der Anleitung von:

Prof. Dr. rer. nat. G. Ciarimboli

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Halle, 31.03.2015

Ort, Datum

Oliver Grummich/

Name/ Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis.....	VII
2. Einleitung.....	1
2.1. Organische Kationen und ihr Transport über die Zellmembran.....	1
2.2. Klassifikation der OCT.....	3
2.3. Organlokalisation der OCT.....	6
2.4. Funktionelle Bedeutung der OCT.....	8
2.5. Struktur des rOCT1.....	15
2.6. Regulation des rOCT1.....	29
3. Ziel der Arbeit.....	37
4. Material und Methoden.....	38
4.1. Expression des rOCT1 durch Humane Embryonale Kidney (HEK293) – Zellen...38	
4.2. Dynamische Fluoreszenzmikroskopie.....	39
4.3. Reagenzien.....	41
4.4. Statistische Auswertung.....	42
5. Ergebnisse.....	43
5.1. Einfluss der Doppelmutation (C322S/C451M) auf die Affinität des rOCT1.....	43
5.2. Einfluss der Einzel – und/oder Doppelmutation auf die Regulation des rOCT1 durch die PKC, p56 ^{lck} - Tyrosinkinase, MMTS und Calmodulin.....	50
5.3. Einfluss der Doppelmutation auf die TPA ⁺ - Affinitätsänderung durch Calmidazolium.....	57
6. Diskussion.....	61
7. Zusammenfassung.....	73
8. Referenzen.....	74
9. Danksagung.....	85
10. Vorträge.....	86
11. Lebenslauf.....	87

1. Abkürzungsverzeichnis

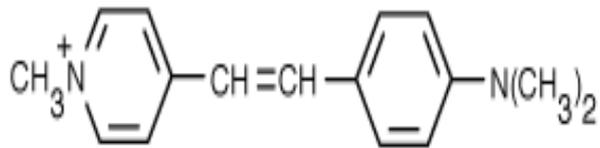
ABC – Transporter	ATP Binding Cassette - Transporter
ASP ⁺	4-(4-(Dimethylamino)styryl)-N-Methylpyridinium
DOG	1,2-Dioctanoyl-sn-Glycerol
dTub	Desoxytubercidin
HEK293	Humane Embryonale Kidney293 - Zelllinie
HeLa	Humane Zervixkarzinom - Zelllinie
LLC – PK ₁	Lilly Laboratories Cell - Porcine Kidney - Zelllinie
MMTS	Methylmethanethiosulfonat
MPP ⁺	1-Methyl-4-Phenylpyridinium
mRNA	Messenger RNA
NMN ⁺	N-Methylnicotinamid
OC	Organische Kationen
OCT	Organische Kationentransporter
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
rOCT1	Organischer Kationentransporter Typ 1 der Ratte
RT – PCR	Reverse Transkriptase - Polymerase Kettenreaktion
SLC	Solute Carrier
TAA	Tetraalkylammoniumverbindungen
TD	Transmembrandomäne
TEA ⁺	Tetraethylammonium
TPA ⁺	Tetrapentylammonium

2. Einleitung

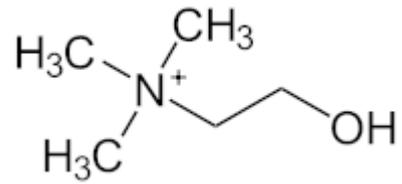
2.1. Organische Kationen und ihr Transport über die Zellmembran

Organische Kationen (OC) sind organische Verbindungen mit permanenter oder transienter positiver Ladung. Erhält ein Molekül erst durch eine reversible Bindung eines Protons eine positive Ladung, ist dies vom pK - Wert des entsprechenden Moleküls und vom pH - Wert des ihn umgebenden Mediums abhängig (Henderson - Hasselbalch - Gleichung) (83). Zu den organischen Verbindungen, die demnach bei einem physiologischen pH - Wert von 7,4 vollständig oder anteilig als Kationen vorliegen, gehören sowohl endogene Substanzen, wie z.B. Neurotransmitter (Dopamin, Serotonin, Noradrenalin, Acetylcholin) (19), als auch rund 40% der in der Klinik gebräuchlichen Medikamente (94), z.B. die Antiarrhythmika Lidocain und Disopyramid (47), der Betablocker Metoprolol (32), das Antibiotikum Trimethoprim, das Antihistaminikum Cimetidin (10), das Antiparkinsonmittel Amantadin (39) und das Antidiabetikum Metformin (68). Schließlich zählen auch einige toxische Substanzen, wie z.B. das Neurotoxin 1-Methyl-4-Phenylpyridinium (68) und das Herbizid Paraquat (24), dazu. Die Struktur ausgewählter OC ist in **Abb.1** dargestellt.

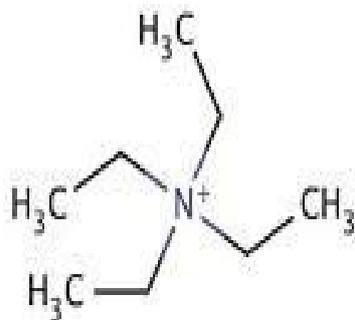
Da die Permeabilität der Zellmembran für geladene Moleküle gering ist, bedarf es für den Transport positiv geladener organischer Verbindungen in die Zelle hinein bzw. aus ihr heraus spezieller Hilfsstrukturen. Diese Rolle übernehmen unterschiedliche membranöse Transportsysteme (84).



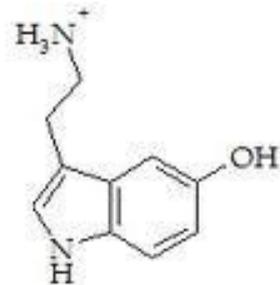
**4-(4-(Dimethylamino)styryl)-N-Methylpyridinium
(ASP⁺)**



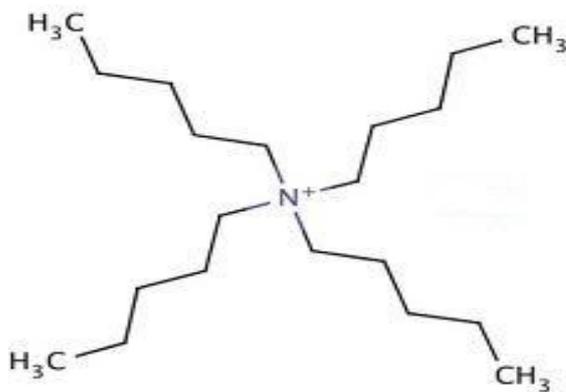
Cholin



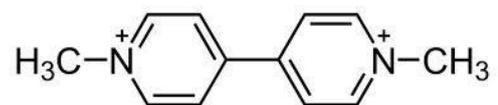
**Tetraethylammonium
(TEA⁺)**



Serotonin



**Tetrapentylammonium
(TPA⁺)**



Paraquat

Abb.1. Darstellung der Strukturformel ausgewählter organischer Kationen. Die Kationen auf der linken Seite wurden in dieser Doktorarbeit verwandt.

2.2. Klassifikation der OCT

Membrangebundene Transportproteine werden, in Abhängigkeit von ihrer Funktionsweise, eingeteilt in: 1.) Ionenkanäle, 2.) Wasserkanäle, 3.) Ionenpumpen, 4.) ABC - Transporter und 5.) Solute Carrier (SLC) (50).

Die SLC bilden die Gruppe mit den meisten Mitgliedern. Sie arbeiten entweder als Ionen - gekoppelte Symporter oder Antiporter, oft unter Ausnutzung eines Natriumkonzentrationsgradienten, oder als Uniporter, angetrieben nur vom Konzentrationsgradienten des zu transportierenden Substrates und/oder dem Membranpotential. Im Gegensatz zu Ionenkanälen binden die Transporter ihr Substrat auf der einen Zellmembranseite, durchlaufen eine Konformationsänderung und entlassen es wieder auf der anderen Membranseite (Alternating - Access - Modell) (1, 2). Zu den Substraten der verschiedenen SLC gehören neben organischen/anorganischen Ionen beispielsweise auch Zucker und Vitamine. Anhand ihrer Aminosäuresequenzhomologien teilt man die SLC zurzeit in 55 Genfamilien (SLC1 - 55) ein (49). Der in dieser Doktorarbeit untersuchte organische Kationentransporter Typ 1 der Ratte (rOCT1) gehört zur SLC22 - Familie (SLC22A1). Einen Überblick aller Mitglieder dieser Transporterfamilie des Menschen gibt **Abb.2**.

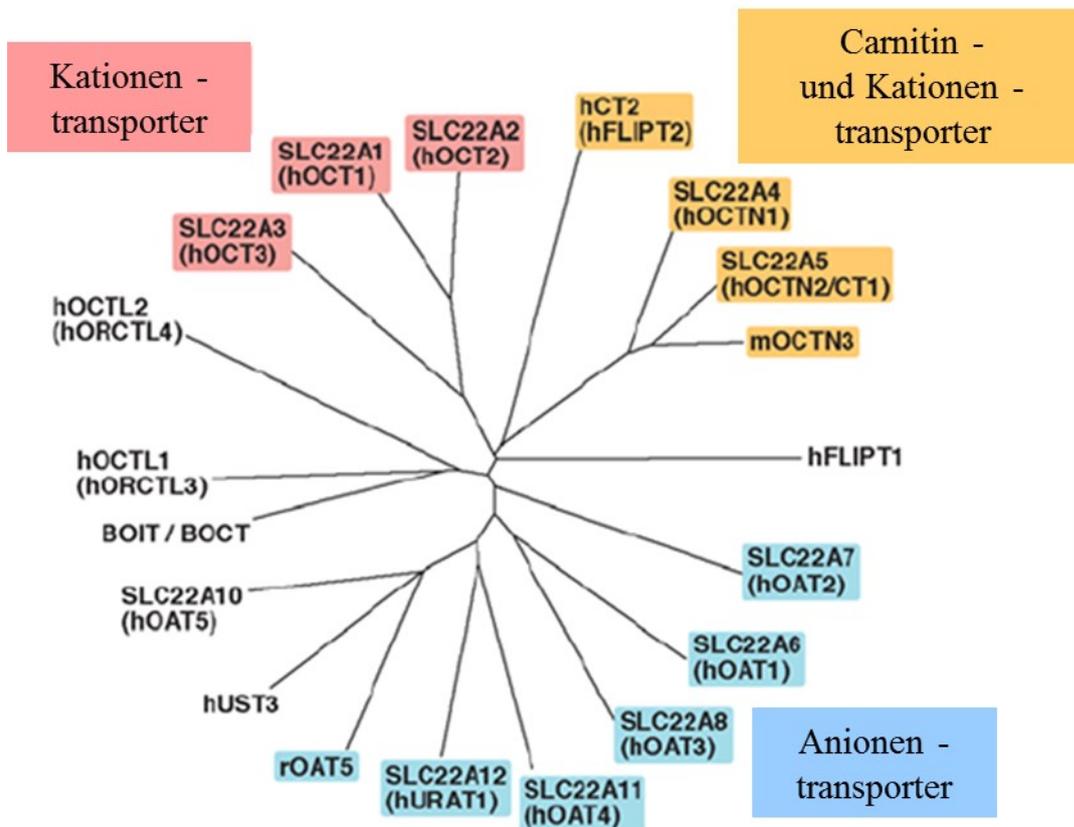


Abb.2. Übersicht der SLC22 - Familie des Menschen. hFLIPT1/2 = human fly - like putative transporter, hURAT1 = human urate transporter, hUST3 = hOAT7, BOIT/BOCT = brain - type organic cation transporter, hOCTL1/2(hORCTL3/4) = human organic cation transporter like, hOCTL1 = hORCTL3 = hOAT10. Ein hOCTN3 konnte beim Menschen bisher noch nicht nachgewiesen werden (aus Koepsell H und Endou H, 2004 (75)).

Demnach zählen zu dieser Familie nicht nur die organischen Kationentransporter (OCT), sondern auch die organischen Kationen/Carnitintransporter (OCTN), die organischen Anionentransporter (OAT) und der Uratransporter (URAT1) (75).

Einige Eigenschaften haben die meisten Mitglieder der SLC22 - Familie gemeinsam, nämlich ihre Poly Spezifität, 12 alpha - helikale Transmembrandomänen (TD), eine große glykosylierte extrazelluläre Schleife zwischen TD 1 und TD 2, eine große intrazelluläre Schleife zwischen TD 6 und 7 und einen zum Cytosol gerichteten N - und C - Terminus (75). Drei unterschiedliche Subtypen des OCT (OCT1 - 3) konnten bisher bei verschiedenen Spezies nachgewiesen werden: der rOCT1 (44), rOCT2 (97) und rOCT3 (61) bei der Ratte, der mOCT1 (115), mOCT2 (90) und mOCT3 (132, 141) bei der Maus und der hOCT1 (40, 142), hOCT2 (40) und hOCT3 (46, 132) beim Menschen.

Außerdem sind beim Kaninchen der rbOCT1 (123) und rbOCT2 (146) und beim Schwein der pOCT2 (45) bekannt.

Über die oben genannten Eigenschaften aller Mitglieder der SLC22 - Familie hinaus haben die OCT - Subtypen weitere gemeinsame Merkmale, nämlich einen elektrogenen, vom Membranpotential abhängigen Kationen - Transport in beide Richtungen der Plasmamembran, welcher Na^+ und pH - unabhängig ist (76). Diese Ähnlichkeiten sind mit ihren Aminosäuresequenzhomologien erklärbar. So stimmt die Sequenz zwischen hOCT1 und hOCT2 zu 70% überein (75) und die zwischen hOCT1 und hOCT3 immerhin noch zu 50% (141). Als Ursache der Überschneidungen in der Aminosäurefolge ist ein gemeinsamer genetischer Ursprung wahrscheinlich. Den Stammbaum der humanen OCT zeigt ebenfalls **Abb.2**. Darauf ist zu erkennen, dass z.B. der phylogenetische Abstand zwischen hOCT1 und hOCT3 größer ist als jener zwischen hOCT1 und hOCT2, was sich in der o.g. geringeren Aminosäuresequenzübereinstimmung widerspiegelt. Es wird vermutet, dass in der Phylogenese die OCT - Subtypgene durch Duplikationen eines „Ur“ - Kationentransportergens mit nachfolgenden mutagenen Modifikationen der Genkopien entstanden sind. Da so gewissermaßen auf ein einmal bewährtes Gen zurückgegriffen werden konnte, mussten die verschiedenen Subtypen nicht immer wieder völlig neu evolviert werden. Über die allgemeine Häufigkeit solcher Genduplikationen und das weitere Schicksal von Genkopien im Laufe der Evolution publizierten Lynch M. und Conery J.S. im Jahr 2000 eine vielbeachtete Arbeit (86). Dementsprechend befinden sich die Gene des hOCT1, hOCT2 und hOCT3 auf dem Chromosom 6 des Menschen auch in unmittelbarer Nähe, kommen also geclustert vor (132, 34). Solche Gencluster existieren beim Menschen ebenfalls bei den Genen der Alpha -, Beta - und Gammapolypeptidkette des Fibrinogens (59) und bei denen der Beta - Globin - Familie des Hämoglobins (38). Während sie beim Menschen auch bei den meisten anderen Mitgliedern der SLC22 - Familie vorkommen, sind sie allerdings bei den anderen Transporterfamilien und bei den homologen Formen der Invertebraten eher selten (33, 34). Da die jeweiligen Paarmitglieder zwar ähnliche Transporteigenschaften, aber nicht identische Substratspezifitäten haben, könnte ihre Entstehung eine phylogenetische Anpassung an komplexer gewordene Umweltbedingungen und damit an eine größere Vielfalt von zu transportierenden endogenen und exogenen organischen Ionen sein.

Das Gen des in dieser Arbeit untersuchten rOCT1 konnte mittels der „Fluoreszenz - in - situ - Hybridisation“ (FISH) auf dem langen Arm des Chromosoms 1 in Position 1q11-12 nachgewiesen werden (72).

Erwähnenswert ist noch, dass verschiedene Transportersubtypen nicht immer durch verschiedene Gene kodiert werden müssen. So werden zunehmend Varianten entdeckt, die durch „Alternatives - Splicen“ entstehen. Einer splice - Variante des rOCT1, genannt rOCT1A, fehlen zwar als Folge des Verlustes eines Exons die ersten beiden Transmembrandomänen, sie zeigt in vitro aber trotzdem ähnliche funktionelle Eigenschaften wie der rOCT1 (143). Hingegen ist hOCT2A, eine bekannte splice - Variante des hOCT2 (**siehe Abb.3**), nur noch zu 81% mit dem nativen Protein identisch und differiert mit diesem auch in der Substrataffinität und der Organverteilung seiner mRNA (130). Somit ergibt sich allein schon durch das „Alternative - Splicen“ von Transportergenen eine Möglichkeit der Anpassung der Transportleistung für organische Kationen an die spezifischen Bedürfnisse der sie exprimierenden Organe.

2.3. Organlokalisierung der OCT

Die Organlokalisierung der OCT - Subtypen ist innerhalb einer Spezies unterschiedlich. So findet man den höchsten mRNA - Gewebespiegel des rOCT1 in der Niere, eine geringere Genexpression hingegen in Leber, Darm, Haut und Milz (44, 119). Subzellulär ließ sich das rOCT1 - Protein in der basolateralen Membran sowohl der Epithelzellen des S1 - und S2 - Segmentes der proximalen Nierentubuli (60, 121) als auch der Enterozyten des Dünndarms (74) nachweisen. In der Leber wurde es in der sinusoidalen Membran der Hepatozyten detektiert (89). Auch für die mRNA des rOCT2 wurde in der Niere die größte Menge gemessen, während sie sich in anderen Organen kaum nachweisen ließ (97, 119). Renal ist das rOCT2 - Protein in der basolateralen Membran der Epithelzellen des S2 - und S3 - Segmentes der proximalen Tubuli lokalisiert (60, 121). Für die mRNA des rOCT3 fand sich hingegen eine weiter gefächerte Gewebsverteilung mit den größten Mengen in der Plazenta (61). Zusätzlich konnten seine Transkripte in Blutgefäßen, Thymus, Haut (119), Darm, Herz, Niere, Lunge (61), oberem cervicalen Ganglion (79), Zerebellum, Cortex cerebri und

Hippocampus (140) nachgewiesen werden. In der Niere wird das rOCT3 - Protein in den proximalen und distalen Tubuli exprimiert (125). Vergleicht man die mRNA - Mengen der Subtypen in der Niere untereinander, so ergibt sich bei der Ratte folgende Reihenfolge: rOCT2 > rOCT1 > rOCT3 (127, 119, 125).

Die molekularen Ursachen dieser differierenden Organexpression der OCT - Subtypen können sowohl in ihrer Transkription als auch Translation liegen. So ist z.B. das isolierte Vorkommen des mURAT1, ebenfalls ein Mitglied der SLC22 - Familie (**siehe Abb.2**), in den proximalen Tubulusepithelzellen der Mausniere auf das Vorkommen des heterodimeren Transkriptionsfaktors HNF 1 alpha/beta und auf das spezifische Methylierungsmuster seines Genpromotors in diesen Zellen zurückzuführen (66). Da die Promotorregion des mURAT1 - Gens in den Zellen des Nierencortex der Maus im Vergleich zu anderen Organen hypomethyliert ist, könnte dies seine starke Expression in den proximalen Nierentubuli erklären. Dementsprechend konnten Aoki et al. nicht nur nachweisen, dass der Promotor des vorwiegend in der Niere vorkommenden hOCT2 ein gewebsspezifisches Methylierungsmuster besitzt, sondern auch, dass eine experimentelle Hypermethylierung zu einer Hemmung der Aktivität dieses Promotors und seiner Bindung des Transkriptionsfaktors USF1 führt (6). Beispiele für eine Regulation der Transporterverteilung über die Translation liefern, zumindest innerhalb eines Organes, die Ergebnisse aus dem Vergleich der Verteilung seiner mRNA mit seinem Protein. So konnte mittels „in - situ - Hybridisation“ die mRNA des rOCT1 und rOCT2 zwar in allen 3 Segmenten des proximalen Tubulus' der Rattenniere nachgewiesen werden, das Protein des rOCT1 allerdings vorwiegend im S1 - und S2 - Segment und das des rOCT2 im S2 - und S3 - Segment (60). Eine ähnliche differente Verteilung des Transkriptions - und Translationsproduktes für den rOCT1 findet man auch in der Leber. Seine mRNA ist zwar in allen Hepatozyten des Leberläppchens enthalten, sein Protein allerdings nur in Hepatozyten, die um die Zentralvenen herum angeordnet sind (89).

Unabhängig vom jeweiligen Mechanismus lässt diese unterschiedliche Gewebsverteilung der Transportersubtypen vermuten, dass neben den oben genannten Gemeinsamkeiten auch funktionelle Unterschiede zwischen ihnen existieren müssen, da allgemein die Anforderungen an den Transport von Substanzen organabhängig verschieden sind. Z.B. haben zwar sowohl die Leber als auch die Niere eine Ausscheidungsfunktion, die

physiko - chemischen Eigenschaften der zu eliminierenden Substanzen entscheiden aber unter anderem darüber, über welches der beiden Organe sie bevorzugt ausgeschieden werden (35, 36). So wird z.B. beim Menschen und bei der Ratte das organische Kation Procainamid überwiegend über die Nieren (67%) und nur zu einem geringen Anteil über die Galle (9%) ausgeschieden (35). Dies könnte mit der o.g. unterschiedlichen Ausstattung beider Organe mit verschiedenen OCT - Subtypen erklärt werden. Ein solches unterschiedliches Expressionsmuster von membranösen Transportproteinen zwischen den Organen gibt es nicht nur für die OCT. Es konnte bereits für eine ganze Reihe anderer Transporter nachgewiesen werden, und teilweise spricht man deshalb auch von „organspezifischen“ Transportern (52, 96). Die funktionellen Unterschiede der OCT - Subtypen werden später noch näher erläutert.

Es sei noch erwähnt, dass auch derselbe Subtyp bei verschiedenen Spezies eine unterschiedliche Organverteilung besitzen kann. So wird beim Menschen der OCT1 vorwiegend in der Leber transkribiert (40, 6), der OCT1 der Ratte hingegen vorwiegend in der Niere (s.o.). Solche Unterschiede in der mRNA - Expression identischer Subtypen zwischen den Spezies sind mittlerweile für eine ganze Reihe von Transportern bekannt und sollten bei der Nutzung von Tiermodellen in der Forschung beachtet werden (52). Wegen dieser ungleichen Verteilung verwundert es nicht, dass es auch funktionelle Abweichungen zwischen den homologen OCT - Formen der verschiedenen Spezies geben muss. Hierauf gehe ich zu einem späteren Zeitpunkt noch näher ein.

2.4. Funktionelle Bedeutung der OCT

Aufgrund ihrer starken Expression in den Ausscheidungsorganen Niere, Leber und Darm lag die Vermutung nahe, dass die OCT an der Elimination endogen bzw. exogen zugeführter organischer Kationen aus dem Körper beteiligt sind. Bereits in den 40er - Jahren des vergangenen Jahrhunderts vermutete man wegen seiner schnellen renalen Ausscheidung nach i.v. Applikation, dass das organische Kation TEA⁺ in der humanen Niere nicht nur glomerulär filtrierte, sondern auch tubulär sezerniert wird (109). Die proximalen Tubuli konnten dann später in vivo beim Hund mittels der sog. „Stop - flow Technik“ (110) und in vitro beim Kaninchen nach Isolation der Tubuli als Ort der

TEA⁺ - Sekretion verantwortlich gemacht werden. Da der tubuläre TEA⁺ - Transport auch eine Sättigung zeigte und durch ein zweites Kation inhibierbar war, schlussfolgerte man, dass er transportervermittelt sei, ohne dass der eigentlichen Transporter bis dahin bekannt war (112). Die Zellkulturtechnik ermöglichte später, die Transportprozesse für organische Kationen auch direkt an proximalen Tubulusepithelzellen der Niere (z.B. LLC - PK₁ - Zellen) zu untersuchen (37). Durch Membranvesikelpräparationen konnte schließlich sogar der Kationentransport über die apikale und basolaterale Membran der Zellen getrennt gemessen werden (111). Denn bei ihrer Sekretion in das Tubuluslumen müssen Kationen mindestens zwei Membransysteme überwinden, nämlich das basolaterale und apikale der Tubulusepithelzellen. Dabei vermitteln die OCT (z.B. der rOCT1 bei der Ratte oder der hOCT2 beim Menschen) im proximalen Nierentubulus aufgrund ihrer Lokalisation in der basolateralen Zellmembran den ersten Schritt, also den Transport vom Interstitium in die Zellen hinein. Den zweiten Schritt, nämlich den Transport wieder aus der Zelle heraus in das Tubuluslumen, bewerkstelligen dann verschiedene andere Transportersysteme in der apikalen Membran. Dazu gehören z.B. Protonen/Kationen Antiporter oder das P - Glykoprotein (76). Da organische Kationen in der Niere nicht nur sezerniert, sondern auch reabsorbiert werden und die OCT potentiell bidirektional arbeiten können (die Richtung bestimmt der elektro - chemische Gradient), sind sie auch an deren Reabsorption aus dem Primärharn beteiligt. Einen Überblick über die Transportprozesse für organische Kationen im proximalen Tubulus der Niere des Menschen gibt **Abb.3**.

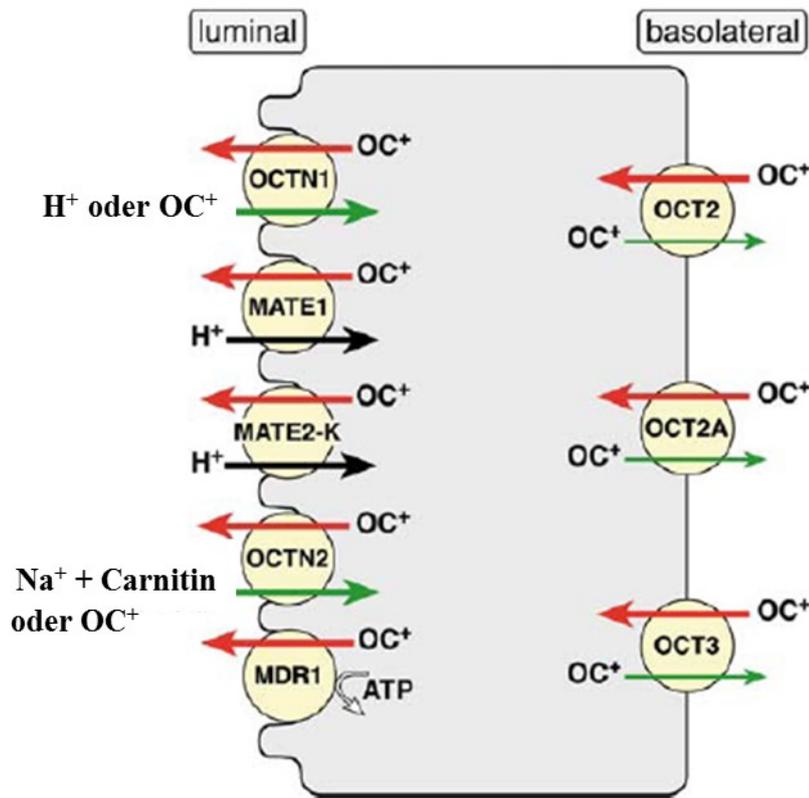


Abb.3. Darstellung der Membrantransportprozesse für organische Kationen im proximalen Nierentubulus des Menschen. Die roten Pfeile stehen für die Sekretion ins Tubuluslumen, die grünen Pfeile für die Reabsorption ins Interstitium. Im Gegensatz zur Ratte ist beim Menschen der Subtyp OCT1 vorwiegend in der Leber lokalisiert und daher nicht dargestellt. OCT2A ist eine Splice - Variante des OCT2 (siehe Text). MATE1 (multidrug and toxin extrusion) und MATE2-K sind sekundär aktive Protonen/Kationen - Antiporter. OCTN1 (novel organic cation transporter) und OCTN2 sind Carnitintransporter, die auch organische Kationen transportieren können. MDR1 ist das primär aktiv arbeitende multidrug resistant protein. OC⁺ steht für organic cations (aus Koepsell H et al., 2007 (76)).

Die Bedeutung der OCT für die Ausscheidung exogen zugeführter bzw. endogen gebildeter Substanzen durch die Niere wird dann am deutlichsten, wenn man die Folgen ihrer gezielten Ausschaltung untersucht. So zeigten für den mOCT1 und den mOCT2 doppelt - ausgeknockte Mäuse zwar weder phänotypische Auffälligkeiten noch eine veränderte Lebensdauer. Gegenüber den Kontrolltieren ließ sich aber ein höherer Plasmaspiegel für das von außen zugeführte Kation TEA⁺, bei gleichzeitigem Verlust der renalen TEA⁺ - Sekretion, nachweisen (57). Dementsprechend zeigte auch das Rattenmodell für Diabetes mellitus (nach Zerstörung der Beta - Zellen des Pankreas

durch i.v. Applikation von Streptozotocin), bei dem sich eine verminderte renale Expression von rOCT1 und rOCT2 nachweisen ließ, eine reduzierte renale Clearance des kationischen endogenen Metaboliten N - Methyl - Nicotinamid (NMN⁺). Interessanterweise konnte die Gabe des klinisch zur medikamentösen Nephroprotektion eingesetzten ACE - Hemmers Ramipril dieses verhindern (124).

Hinsichtlich der Bedeutung der OCT für die Ausscheidungsfunktion der Leber zeigten Mäuse, bei welchen isoliert der mOCT1 ausgeknockt wurde, eine um den Faktor 2,5 reduzierte biliäre Ausscheidung des i.v. applizierten Kations TEA⁺. Da der OCT1 in der Leber in der sinusoidalen Membran der Hepatozyten lokalisiert ist (s.o.), war dies wahrscheinlich Folge einer reduzierten Aufnahme aus dem Plasma in die Leberzellen. Dementsprechend konnte auch ein um den Faktor 4 reduzierter Gehalt an TEA⁺ im Leberhomogenisat nachgewiesen werden (56). Eine Funktionsänderung des OCT1 wirkt sich in der Leber also nicht nur auf die biliäre Sekretion organischer Kationen aus, sondern ebenso auf deren Konzentration und damit Wirkung in den Leberzellen selbst. Dies konnte auch für das orale Antidiabetikum Metformin gezeigt werden. Metformin senkt den Glukose - Plasmaspiegel unter anderem durch eine Hemmung der Glukoneogenese in den Hepatozyten (92, 69) und wird über die Niere durch Filtration und Sekretion ausgeschieden (68). Seine schwerwiegendste Nebenwirkung ist eine Laktazidose, ausgelöst durch die Inhibition der Atmungskette (92, 98). Deshalb wurde Phenformin, ein Wirkstoff aus der gleichen Substanzklasse, bereits in den 1970er - Jahren vom Markt genommen. Experimente mit transfizierten Zellen erwiesen, dass Metformin beim Menschen ein Substrat aller drei bisher bekannten Subtypen des OCT ist, nämlich der hepatischen Isoform hOCT1 (117, 95), der renalen Isoform hOCT2 (68) und der Isoform hOCT3 (95). Versuche mit OCT1 - knock - out Mäusen bestätigten dann die Schlüsselrolle dieses Transporters für die Metforminwirkung auf die Leberzellen. Verglichen mit Wild - Typ Tieren zeigten diese nämlich sowohl eine reduzierte hepatische Aufnahme von Metformin (136, 117) als auch eine verminderte Blutzuckersenkung nach Metformingabe (117). Außerdem war das Laktazidoserisiko reduziert (137). Klinische Untersuchungen an Menschen mit bestimmten Polymorphismen im Gen des hOCT1 (R61C, G401S, 420del, G465R), die in der Zellkultur eine erniedrigte Funktion zeigten, wiesen dementsprechend ebenfalls eine verminderte Metforminwirkung auf den Blutglukosespiegel im oralen Glukosetoleranz-

test nach. Das hOCT1 - R61C Allel besitzt dabei immerhin eine Häufigkeit von 7,2% bei Amerikanern europäischer Abstammung (117). Diese Ergebnisse belegen die Bedeutung des hOCT1 für die Aufnahme von Metformin in die Leberzellen und damit seine blutzuckersenkende Wirkung. Sie liefern auch eine mögliche Erklärung für den schon lange bekannten, individuell unterschiedlichen Metformineffekt beim Menschen. So zeigten z.B. in einer klinischen Studie 34% der Diabetiker unter einer Metformin - Monotherapie einen unzureichenden Abfall des Nüchtern - Blutzuckerspiegels unter den in dieser Studie vorgegebenen Zielwert von 6,7 mmol/l (51).

Die funktionelle Bedeutung der im Darm exprimierten OCT konnte ebenfalls schon teilweise aufgeklärt werden. So zeigten für den mOCT1 ausgeknockte Mäuse eine um 50% reduzierte Ausscheidung des experimentell i.v. zugeführten TEA⁺ in den Dünndarm (56). Da die OCT potentiell bidirektional arbeiten können, ist ihre Beteiligung auch an der intestinalen Absorption, z.B. von oral zugeführten Medikamenten, möglich. So führte eine zeitgleiche Applikation des Sympathomimetikums Etilefrin oder des Anticholinergikums Atropin mit dem bekannten OCT - Substrat MPP⁺ zu einer Inhibition von dessen Aufnahme in Zellen der humanen intestinalen Tumorzelllinie Caco - 2 (91). Außerdem ließ sich die mRNA aller 3 Subtypen des OCT mittels RT - PCR in Caco - 2 Zellen nachweisen. Die Affinität von Transportersubtypen kann durchaus unterschiedlich sein (s.u.). Da das Ausmaß der Inhibition der MPP⁺ - Aufnahme in die Caco - 2 Zellen durch die o.g. Medikamente ähnlich der von isoliert mit hOCT3 transfizierten Zellen ist, wurde in der gleichen Studie postuliert, dass Etilefrin und Atropin vor allem mit dem hOCT3 - Subtyp interagieren. Die mit hOCT3 transfizierten Zellen zeigten außerdem eine signifikant höhere zelluläre Aufnahme beider Medikamente im Vergleich zu nicht transfizierten Kontrollzellen. Das bedeutet, dass diese Medikamente den Kationentransport des hOCT3 nicht nur hemmen, sondern auch selbst von ihm transportiert werden. Da sich schließlich immunhistochemisch eine starke hOCT3 - Proteinexpression nicht nur in den Caco - 2 Zellen, sondern auch in der apikalen Membran der Enterozyten aus normalen menschlichen Jejunum nachweisen ließ, könnte der hOCT3 also an der intestinalen Medikamentenabsorption beteiligt sein (91).

Die OCT sind aber nicht nur in den Ausscheidungsorganen funktionell relevant. So wiesen Wu X et al. die mRNA des OCT3 bei der Ratte (140) und beim Menschen (141)

auch im Gehirn nach. Bei den Nagern wird er dort z.B. in den osmosensitiven circumventrikulären Organen Area postrema und Subfornicales Organ und zusätzlich in dem für die Osmoregulation zuständigen Hypothalamus exprimiert. Tatsächlich zeigten OCT3 - defiziente Mäuse nach einem 24 - stündigen Durstversuch gegenüber den Kontrolltieren eine gesteigerte Salzaufnahme (133).

Ferner führte eine fünftägige intraperitoneale Metamphetamingabe bei Ratten zu einer Downregulation des rOCT3 im Gehirn, in der Niere und in der Lunge mit einer verminderten renalen Ausscheidung, einem erhöhten Plasmaspiegel und einer erhöhten Metamphetaminkonzentration im Gehirn nach seiner erneuten i.v. Gabe nach einem 21 - tägigen freien Intervall. Dies war mit einer gesteigerten motorischen Aktivität gegenüber Kontrolltieren ohne diese vorherige fünftägige Sensibilisierungsphase assoziiert (70). Eine direkte Wechselwirkung von Metamphetamin mit dem rOCT3 ist bekannt (140). Interessanterweise kennt man auch Polymorphismen des hOCT3 - Gens, die signifikant häufiger bei Menschen mit einer gleichzeitigen Metamphetaminabhängigkeit und Abhängigkeit gegenüber weiteren Drogen auftreten als bei Menschen mit einer alleinigen Metamphetaminabhängigkeit (7).

Schließlich scheinen die OCT auch für die Wirkungen und Nebenwirkungen von Tumormedikamenten wichtig zu sein. Z.B. transportiert der in der Niere exprimierte hOCT2 auch das Zytostatikum Cisplatin und spielt daher möglicherweise eine Rolle bei dessen bekannter Nephrotoxizität. Da durch eine gemeinsame Applikation von Cisplatin mit einem weiteren Substrat dieses Transporters (Cimetidin) die Apoptoserate bei mit dem hOCT2 transfizierten HEK293 - Zellen reduziert wird (26), lässt sich die in der klinischen Praxis ausgenutzte Reduktion der Nephrotoxizität von Cisplatin durch eine Koapplikation mit Cimetidin und Verapamil (118) mit einer kompetitiv verminderten zellulären Cisplatin - Aufnahme erklären. Ob auch die eigentlich gewünschte Aufnahme des Zytostatikums in die Zellen des Tumorgewebes durch den gleichen Transporter erfolgt und durch ein solches Vorgehen ebenfalls beeinflusst würde, muss für jedes Medikament und für jede Tumorart getrennt entschieden werden. Zwar konnte bei zahlreichen Cisplatin - sensiblen humanen Tumorzelllinien bisher keine OCT - mRNA gefunden werden (29), andere Tumorzelllinien und auch bestimmte Arten von nativen Tumorgewebe exprimieren aber durchaus OCT bzw. überexprimieren diese sogar. Z.B. konnte eine Überexpression des hOCT2 - Proteins in Zellen der intestinalen

Tumorzelllinie Caco - 2 gegenüber Dünndarmenterozyten nachgewiesen werden (91). Außerdem fand sich die mRNA des hOCT1 auch in 6 weiteren Kolonkarzinom - Zelllinien und die des hOCT2 zwar nicht in gesundem Kolongewebe, aber in 11 von 20 Gewebeproben von Kolontumorpatienten. Eine Inkubation von Kolonkarzinom - Zelllinien mit dem Zytostatikum Oxaliplatin, zusammen mit dem OCT - Inhibitor Cimetidin, reduzierte die zytotoxische Wirkung von Oxaliplatin, wahrscheinlich durch eine dadurch bedingte Hemmung seiner Aufnahme in die Zellen (145). Dementsprechend könnte auch die Resistenzentwicklung von Ösophaguskarzinomzellen während einer Cisplatin - Chemotherapie mit einer verminderten zellulären Aufnahme dieses Chemotherapeutikums als Folge einer geringeren Expression von hOCT1 erklärt werden (82). Ein reduziertes mRNA - Level von hOCT1 in Cisplatin resistenten Ösophaguskarzinom - Zelllinien ist bereits nachgewiesen worden, und eine experimentelle Inhibition der Expression von hOCT1 durch interferierende RNA reduziert die Apoptoserate von Cisplatin - sensiblen Zellen (82).

Anhand dieser wenigen Beispielen sieht man, dass ein genaues Verständnis der Struktur, Funktionsweise und Regulation der OCT von großer Bedeutung ist. Es soll daher im Folgenden auf die bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnisse auf diesem Gebiet näher eingegangen werden.

2.5. Struktur des rOCT1

Ein zweidimensionales Strukturmodell des rOCT1 ist in **Abb.4** dargestellt.

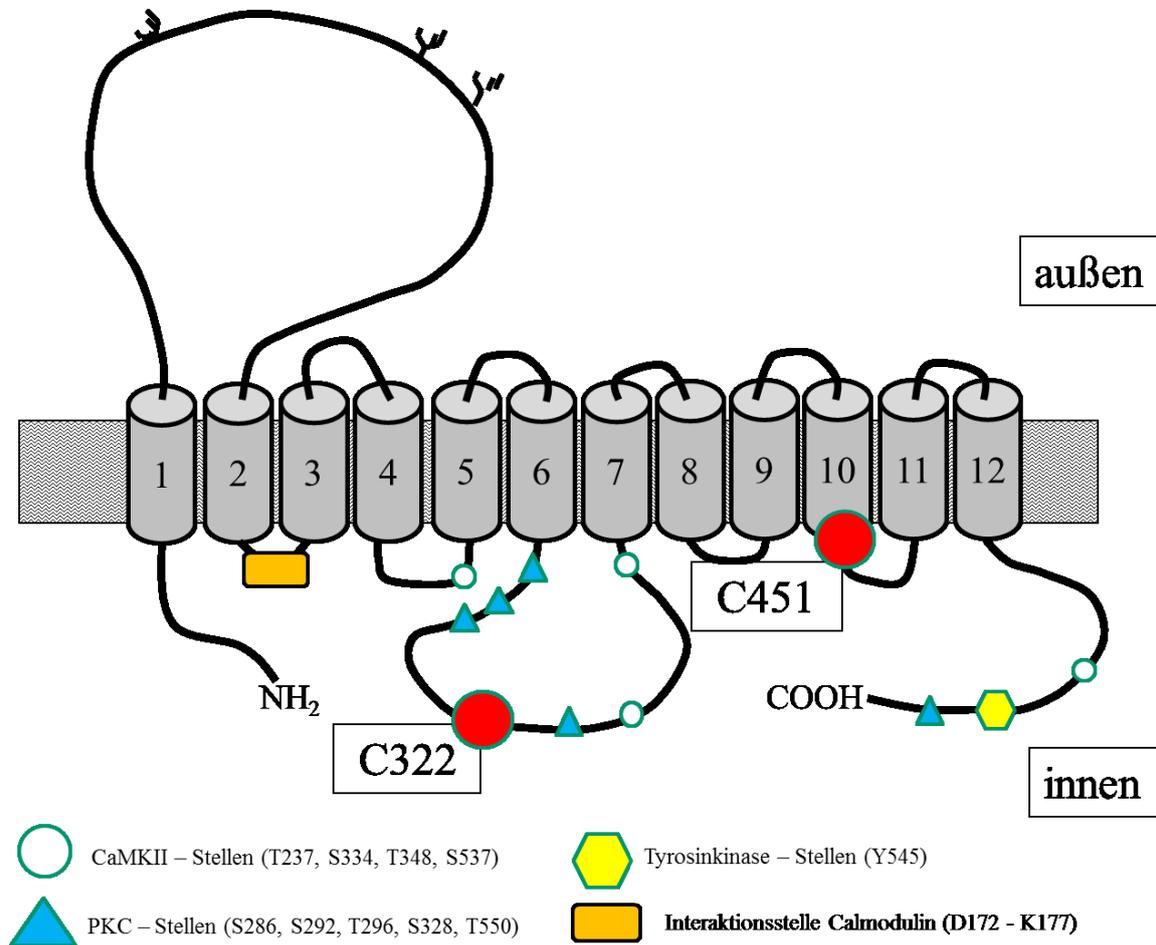


Abb.4. Zweidimensionales Strukturmodell des rOCT1. Die drei möglichen Glykosylierungsstellen in der großen extrazellulären Schleife (Forken) und die potentiellen Phosphorylierungsstellen der Proteinkinase C, der p56^{lck} - Tyrosinkinase, der Ca²⁺/Calmodulin - abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) am rOCT1 sind ebenfalls abgebildet. Außerdem sind die vermutete direkte Interaktionsstelle des Calmodulins mit dem Transporter und die in dieser Arbeit untersuchten Cysteine 322 und 451 markiert (modifiziert nach Ciarimboli et al., 2005 (27)).

Zu erkennen sind die 12 alpha - helikalen Transmembrandomänen (TD), die große glykosylierte extrazelluläre Schleife zwischen TD 1 und TD 2, die große intrazelluläre Schleife zwischen TD 6 und TD 7 und die intrazellulär lokalisierten N - und C - Termini des Transporters als gemeinsame Kennzeichen aller Mitglieder der SLC22 - Familie (s.o.). Zusätzlich sind die, basierend auf der Aminosäuresequenz des

Transporterproteins, vermuteten Phosphorylierungsstellen der PKC, der p56^{lck} - Tyrosinkinase und der Ca²⁺/Calmodulin - abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) am rOCT1 markiert (URL <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/> (abgerufen am 15.04.2015)). Die potentielle direkte Interaktionsstelle des Calmodulins ist ebenfalls dargestellt (URL <http://calcium.uhnres.utoronto.ca/ctdb/flash.htm> (abgerufen am 31.03.2015)). Hervorgehoben sind außerdem das Cystein 322 in der großen intrazellulären Schleife zwischen TD 6 und TD 7 und das Cystein 451 in der TD 10, die in dieser Arbeit näher untersucht wurden.

Der erste Schritt beim Transport einer Substanz durch einen Transporter ist deren Interaktion mit seiner Substratbindungsstelle. Da es sich beim rOCT1 um einen polyspezifischen Transporter handelt, sind dazu ganz unterschiedlich gebaute Moleküle in der Lage. Zu den bekannten Substraten des rOCT1 gehören z.B. die Katecholamine Dopamin, Adrenalin und Noradrenalin (16), verschiedene Nucleoside, wie z.B. die antiretrovirale Substanz Azidothymidin (22) und die in dieser Arbeit benutzten Kationen ASP⁺ (88) und TEA⁺ (44). Außerdem gibt es diverse Substanzen, die zwar mit seiner Substratbindungsstelle interagieren, aber nicht selbst vom rOCT1 transportiert werden. Hierzu zählen u.a. Quinidin, Cyanin 863 (93) und das ebenfalls in vorliegender Doktorarbeit verwendete TPA⁺ (41).

Die Polyspezifität des rOCT1 ist vorteilhaft in den Ausscheidungsorganen Niere und Leber, in denen er stark exprimiert wird (s.o.). Denn in diesen Organen müssen ganz unterschiedlich gebaute Substanzen denselben Zelltypen, nämlich die Tubulusepithel - bzw. die Leberzelle, passieren, um sezerniert zu werden. Diese Überlegungen gelten auch für die Resorption im Darm, denn auch hier passieren verschiedenste Substanzen die gleiche Epithelzellschicht, um in die Pfortader zu gelangen. In der Niere erfolgt eine solche unspezifische Ausscheidung zwar auch durch die Ultrafiltration im Glomerulum. Dies gilt aber nur für die niedermolekularen und nicht proteingebundenen Substanzen (71). Bei proteingebundenen Substanzen hingegen sind die polyspezifischen OCT am ersten Schritt ihrer Ausscheidung, nämlich den Transport über die basolaterale Membran in die Tubulusepithelzelle, beteiligt.

Welche Faktoren bestimmen nun, ob eine Substanz mit der Bindungsstelle des rOCT1 wechselwirkt? Prinzipiell kommen dafür von Seiten der Substanz deren Größe,

Struktur, Hydrophobizität und Ladung, von Seiten des Transporters die Struktur und Ladung seiner Bindungsstelle in Frage. Dies soll im Folgenden kurz erläutert werden.

1.) Die Größe, Struktur und Hydrophobizität einer Substanz

Trotz seiner Polyspezifität ist die Affinität des rOCT1 für verschiedene Substanzen durchaus unterschiedlich. In **Tab.1** ist dies exemplarisch gezeigt. Dort sind die Konzentrationen verschiedener positiv geladener Neurotransmitter, welche einen halbmaximalen transmembranösen Strom (K_m - Wert), bei mit dem rOCT1 transfizierten Oozyten, bewirken, gegenübergestellt (19). Danach ist die Affinität des rOCT1 für Dopamin am höchsten (niedrigster K_m - Wert), für Histamin hingegen am geringsten (höchster K_m - Wert).

Neurotransmitter	K_m - Wert
Dopamin	$19,4 \pm 2,9 \mu\text{M}$, n = 4
Serotonin	$37,6 \pm 9,1 \mu\text{M}$, n = 6
Acetylcholin	$46,8 \pm 3,8 \mu\text{M}$, n = 4
Histamin	$98,6 \pm 9,1 \mu\text{M}$, n = 5

Tab.1. Gegenüberstellung der K_m - Werte des rOCT1 für verschiedene kationische Neurotransmitter. Diese Werte wurden ermittelt durch Messung der konzentrationsabhängigen transmembranösen Ströme, die durch diese Substanzen bei mit dem rOCT1 transfizierten *Xenopus laevis* - Oozyten ausgelöst wurden (aus Busch AE et al., 1996 (19)).

Auch ein polyspezifischer Transporter wie der rOCT1 besitzt also eine gewisse Substratselektivität. Im Vergleich zu einem monospezifischen Transporter ist diese aber geringer.

Organische Kationen, die mit dem rOCT1 interagieren, kann man in zwei Gruppen einteilen, nämlich in die Typ I und Typ II Kationen. Erstere sind positiv geladene, kleine, hydrophile Moleküle mit einem Molekulargewicht zwischen 60 - 350 Da und werden vom Transporter transportiert, sind also seine Substrate. Typ II Kationen hingegen sind positiv geladene, größere und eher hydrophobe Moleküle und stellen nicht transportierte Inhibitoren des rOCT1 dar (93, 18, 58). Allerdings gilt diese

Klassifikation längst nicht für alle organische Kationen, wie z.B. für N-Methyl-Quinidin und N-Methyl-Quinin gezeigt werden konnte. Diese zählen nämlich eigentlich aufgrund ihrer Größe zu den klassischen Typ II Kationen, werden aber trotzdem vom rOCT1 transportiert (131).

Die Rolle der Molekülgröße für die Bindung am Transporter wird allein schon dadurch verständlich, dass die Ausdehnung seiner potentiellen Bindungsstelle natürlicherweise begrenzt ist. So stellten Ullrich K.J. et al. bereits 1991 fest, dass der inhibitorische Effekt verschiedener Tetraalkylammoniumverbindungen (TAA) auf den NMN⁺ Transport über die basolaterale Membran der proximalen Tubuli der Ratte, also dem Ort der erst später nachgewiesenen OCT Expression, ab einer bestimmten Seitenkettenlänge der TAA wieder abfällt (126). Auch Pelis R.M. et al. postulierten in ihrer Arbeit aus dem Jahre 2007, dass das Thiolgruppenreagenz Maleimid - PEO₂ - Biotin deshalb nicht mit der Thiolseitenkette des Cysteins 451 in der Bindungstasche des hOCT2 interagieren kann, weil es mit einer Länge von 25 Angström zu groß ist, um in die Tiefe der Bindungstasche einzudringen. Tatsächlich ließ sich dann später seine Interaktion mit dem nur 19 Angström großen MTSEA - Biotin nachweisen (101).

Außer der Größe gibt es noch weitere Substanzeigenschaften, die für eine Wechselwirkung mit dem Transporter wichtig sind. So zeigten zusätzliche systematische Untersuchungen mit o.g. Tetraalkylammoniumverbindungen, dass bei der hepatischen Isoform hOCT1 mit zunehmender Länge der Seitenketten und damit Größe und Hydrophobizität der TAA zwar deren Transportrate abfällt, aber die Affinität des Transporters für die entsprechenden Substanzen zunimmt. Daraus wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass eine hydrophobe Eigenschaft von Substanzen wichtig für deren Interaktion mit dem hOCT1 ist (144). Die gleiche positive Korrelation zwischen Hydrophobizität der TAA und deren Affinität zum Transporter ließ sich später für den rOCT1 und rOCT2 feststellen (129). Aber nicht nur die Gesamtwasserlöslichkeit einer Substanz beeinflusst deren Interaktion mit den OCT, sondern auch wie die hydrophoben Strukturkomponenten innerhalb dieser Substanz verteilt sind. So war der inhibitorische Effekt verschiedener Phenylpyridin - und Quinolinderivate auf den TEA⁺ - Transport durch den hOCT1 umso ausgeprägter, je linearer deren Struktur bei vergleichbarer Gesamthydrophobizität war (11). Demgemäß nahmen auch van Montfoort J.E. et al. im Jahre 2001 an, dass die o.g. Kationen N-Methyl-Quinin und N-Methyl-Quinidin nicht

nur deshalb im Gegensatz zu ihren nicht methylierten Formen vom rOCT1 transportiert werden, weil sie permanent positiv geladen sind, sondern auch, weil in ihren Molekülen eine räumliche Trennung der Ladung und hydrophoben Strukturkomponente vorliegt (131).

Ein Ziel der weiteren Forschung ist es, aus den Erkenntnissen über die physiko-chemischen Eigenschaften bekannter Substrate der OCT Vorhersagen zu treffen, ob ein beliebiges Medikament durch einen OCT transportiert wird, diesen nur inhibiert oder gar nicht mit ihm wechselwirkt (siehe Pharmacophore für hOCT1 (3) oder für mOAT3 (4)). Dies würde die Medikamentenentwicklung optimieren und könnte helfen, unangenehme Nebenwirkungen zu vermeiden.

2.) Die Struktur der Bindungsstelle

Nicht nur die Affinität eines bestimmten OCT für verschiedene Substanzen ist unterschiedlich (s.o.), sondern auch die der verschiedenen Subtypen für eine identische Substanz. So hat die renale Isoform hOCT2 des Menschen für länger-kettige TAA eine geringere Affinität als die hepatische Isoform hOCT1 (31). Auch für das Paar rOCT1/rOCT2 konnte gezeigt werden, dass sie sich in ihrer Substanzspezifität unterscheiden. So sind die IC_{50} - Werte der monoaminigen Neurotransmitter Dopamin und Serotonin bezüglich ihrer inhibitorischen Wirkung auf den TEA^+ - Transport durch den rOCT1 signifikant verschieden zu denen des rOCT2 (129). Ferner wird Desoxytubercidin (dTub) zwar durch den rOCT1, hingegen kaum durch den rOCT2 transportiert, was mit einem Affinitätsunterschied beider Transporter für dieses Nukleosid einhergeht (23). Solche Unterschiede in den Affinitäten kann man experimentell nutzen, um die Subtypen der OCT zu differenzieren bzw. gezielt auszuschalten (48). Eine mögliche Erklärung dieser Affinitätsunterschiede der Subtypen ist ihre nur begrenzte Übereinstimmung in den Aminosäuresequenzen und damit unterschiedliche Raumstruktur ihrer Substratbindungsstellen. Z.B. sind nur 67% der Aminosäuren des rOCT2 identisch mit denen des rOCT1 (97). Durch gentechnologisch hergestellte Chimären zwischen rOCT1 und rOCT2, bei denen einzelne Transmembrandomänen (TD) dieser Subtypen gegeneinander ausgetauscht wurden, versuchte man deren Transporteigenschaften einander anzugleichen und erhoffte sich dadurch Rückschlüsse auf diejenigen Abschnitte der Transporter, welche für die

Affinitätsunterschiede verantwortlich sind. Dabei wurde z.B. entdeckt, dass die Bindungsstelle für dTub wahrscheinlich innerhalb der TD 2 - TD 7 lokalisiert (23) und die TD 10 an der Wechselwirkung mit dem Inhibitor Corticosteron beteiligt ist (42). Auch gab es zahlreiche Mutationsexperimente, um einzelne Aminosäuren, die Teil der Substratbindungsstelle sind, ausfindig zu machen. Die Arbeitsgruppe um Hermann Koepsell zeigte z.B., dass ein experimenteller Austausch der Aminosäure Asparaginsäure 475 in der TD 11 gegen Glutaminsäure die Affinität des rOCT1 für seine Substrate TEA^+ , NMN^+ und Cholin erhöht. Die Schlußfolgerung daraus war, dass diese Aminosäure Teil der Substratbindungsstelle des Transporters sein müsse. Ferner wurde gefolgert, dass sich die Bindungsstellen für die Substrate zwar überlappen können, aber doch unterschiedlich sein müssen, da sich die Affinität für diese Substrate durch o.g. Mutation unterschiedlich ändert (41). Allerdings sind prinzipiell eine Vielzahl von Aminosäuremutationen vorstellbar, die die Form der Substratbindungsstelle des Transporters nur indirekt über eine Veränderung der gesamten Raumstruktur des Transporterproteins beeinflussen, ohne selbst ein direkter Teil dieser zu sein. Wenn aber eine Mutation die Affinität für mehrere unterschiedliche Substrate steigert, wie im genannten Falle die Asparaginsäuremutation 475, ist ein solcher indirekter Effekt eher unwahrscheinlich.

Wenn bereits der Austausch der Aminosäure Asparaginsäure gegen Glutaminsäure, wodurch lediglich die Stellung einer Carboxylgruppe in der Aminosäureseitenkette um 3 Angström verschoben wird, ausreicht, um die Struktur der Bindungsstelle zu beeinflussen, ist es leicht verständlich, dass auch natürlicherweise auftretende Mutationen dramatische Auswirkungen haben können. Tatsächlich sind schon Polymorphismen der OCT bekannt, deren Eigenschaften von denen der nativen Varianten stark abweichen. So wurden in einer Studie mit 57 Teilnehmern 25 single - nucleotid - Mutationen im Gen des hOCT1 entdeckt, von denen sich 10 in einem der Exons, und damit im kodierenden Bereich, befanden. Von diesen waren wiederum 8 mit einem Aminosäureaustausch im Protein vergesellschaftet im Sinne einer „Missense - Mutation“. Funktionelle Untersuchungen mit Oozyten, welche diese mutierten Varianten nach Transfektion exprimierten, zeigten dann bei 2 eine veränderte Substratselektivität (65).

Somit können nicht nur Polymorphismen in den Genen metabolisierender Enzyme, z.B. der Cytochrome P450 (17), sondern auch solche in den transportierenden Proteinen wie die OCT die Kinetik von Pharmaka und damit deren Wirkungen und Nebenwirkungen beeinflussen. Dies wird in der klinischen Praxis zunehmend berücksichtigt. Die steigende Bedeutung dieser sog. „Pharmakogenetik“ in der Therapie von Krankheiten wirft aber auch verschiedene medizinethische Fragen auf, etwa die, welche Personen Zugang zu solchen Informationen haben werden, oder ob die Abkehr von einer allgemeingültigen Therapie für alle hin zu einer individualisierten Therapie ein exklusives, nur von wenigen Patienten finanzierbares, Angebot werden wird (14).

Interessanterweise kann sich die Struktur der Bindungsstelle und damit die Substrat-affinität eines Transporters auch ohne eine Veränderung seiner Aminosäurefolge ändern. So führt eine experimentelle Stimulation der PKC *in vitro* zu einer erhöhten Affinität des rOCT1 für TEA⁺, TPA⁺ und Quinin (88) und eine Stimulation der PKA zu einer Abnahme der Affinität des hOCT1 für TEA⁺ und Cimetidin (25). Im Falle der PKC - Regulation des rOCT1 ist eine direkte Phosphorylierung des Transporters durch diese Kinase bereits nachgewiesen worden, und so könnte sich als deren Folge die Raumstruktur seiner Bindungsstelle ändern (88). Durch solche Regulationsmechanismen besteht also auch die Möglichkeit, kurzfristig die Transporterfunktion an veränderte Anforderungen, wie z.B. das Substratangebot, anzupassen. Beispielsweise konnte bei isolierten Rattenhepatozyten eine Steigerung der membranassoziierten PKC - Aktivität durch eine 10 - minütige Inkubation mit den Gallensäuren Taurocholsäure bzw. Tauroursodesoxycholsäure nachgewiesen werden (12). Da Gallensäuren durch ihre emulgierende Wirkung eine wichtige Rolle bei der Fettverdauung spielen, könnte ein erhöhtes Angebot an Nahrungsfetten und konsekutiv ein erhöhter hepatischer Gallensäurespiegel auch die Funktion des rOCT1 in der sinusoidalen Membran der Hepatozyten beeinflussen.

Außerdem sind die OCT zwar bidirektional arbeitende Transporter, deren Affinität für eine Substanz kann allerdings auf beiden Seiten der Zellmembran durchaus unterschiedlich sein. Z.B. zeigt der rOCT2 eine 4 - fach höhere Affinität für den nichttransportierten Inhibitor Tetrabutylammonium (TBA) von der extrazellulären Seite im Vergleich zur intrazellulären Seite bei einem Membranpotential von 0 mV (134). Ferner wurde ein

Unterschied im transstimulatorischen Effekt von Tributylmethylammonium (TBuMA) auf den TEA^+ - Transport durch hOCT1 über die Zellmembran von HeLa - Zellen gemessen, in Abhängigkeit von der Plasmamembranseite, auf der es sich befand (144). Offensichtlich ist in die Strukturänderung des Transporters bei seinem Wechsel zwischen der nach extrazellulär und der nach intrazellulär gerichteten Orientierung während eines Transportzyklus' auch seine Substratbindungsstelle einbezogen. Der Sinn ist leicht einsehbar, soll doch entsprechend des allgemeinen Funktionsprinzipes eines Transporters (s.o.) das Substrat auf einer Membranseite gebunden und auf der anderen durch eine Erniedrigung der Affinität wieder aus der Bindung entlassen werden.

Desweiteren verändert sich die Struktur der Bindungsstelle offensichtlich auch mit dem Membranpotential. Dies ist bereits für alle 3 Subtypen des OCT der Ratte nachgewiesen worden. Zunächst konnte für den rOCT3 gezeigt werden, dass eine experimentelle Hyperpolarisation der Zellmembran von -50 mV auf -150 mV dessen Affinität sowohl für das Kation TEA^+ (61) als auch für das Kation MPP^+ steigert (140). Außerdem bewirkte eine experimentelle Erniedrigung des Membranpotentials von Oozyten, welche rOCT2 exprimierten, eine Affinitätssteigerung für Corticosteron. Aufgrund der fehlenden Nettoladung von Corticosteron erklärt sich dies nicht mit einer evtl. veränderten elektostatischen Anziehung dieses Moleküls, sondern nur mit einer Potentialabhängigkeit der Raumstruktur der Bindungsstelle des Transporters (134). Schließlich konnte eine Beeinflussung der Raumstruktur des Transporters durch eine Membranpotentialänderung beim rOCT1 auch direkt festgestellt werden. Nach einer Fluoreszenzmarkierung eines mutagen eingefügten Cysteins in Position 483 anstelle von Phenylalanin in der TD 11 zeigte sich nämlich eine potentialabhängige Änderung des Fluoreszenzsignals, bedingt durch eine Ortsänderung dieser Aminosäure (43). Zwar muß deshalb das Phenylalanin in dieser Position nicht direkt Teil der Bindungsstelle sein, es gelang dadurch aber die Potentialabhängigkeit der Stellung der TD11 oder allgemein der Raumstruktur des rOCT1 nachzuweisen.

All die o.g. Parameter (Aminosäuresequenz, intrazelluläre Regulationswege, Membranseite, Membranpotential) haben offensichtlich einen Einfluss auf die Struktur der Bindungsstelle des rOCT1 und damit auf seine Interaktion mit Substanzen. Ein dreidimensionales Modell dieser Bindungsstelle des rOCT1 wurde unter Nutzung der

Daten aus funktionellen Untersuchungen, Mutationsexperimenten und der bekannten Raumstruktur der Lactose Permease von *Escherichia coli*, eines Mitgliedes der gleichen Transportersuperfamilie wie die OCT, vorgeschlagen und ist in **Abb.5** dargestellt (105). Danach formen die TD 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 und 11 eine große hydrophile Tasche, welche verschiedene, sich teilweise überlappende Bindungsstellen enthält. Der rOCT1 hat also nicht nur eine Bindungsstelle, sondern mehrere in einer großen Bindungsregion bzw. Bindungstasche, und diese Bindungsstellen haben unterschiedliche Affinitäten für bestimmte Substrate bzw. Inhibitoren (43, 77). Aufgrund der Bindungstaschengröße können wahrscheinlich auch mehrere Moleküle gleichzeitig daran binden (105).

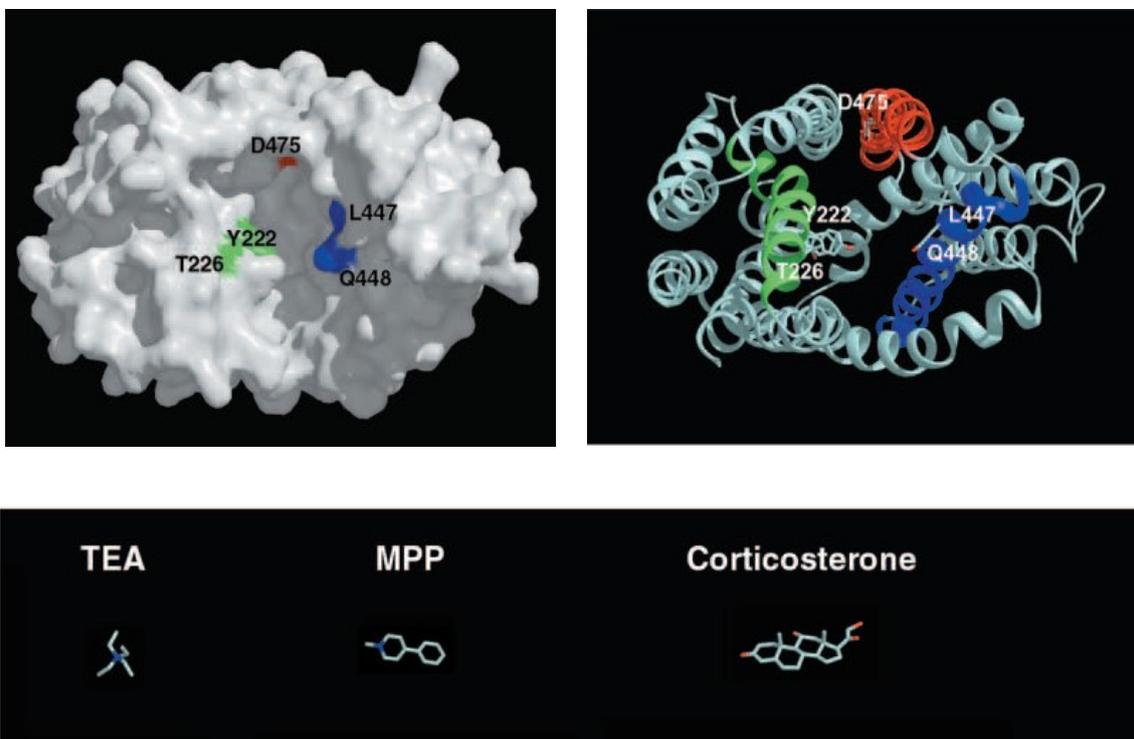


Abb.5. Dreidimensionales Strukturmodell des rOCT1. Dargestellt ist die Orientierung der Bindungstasche zur zytoplasmatischen Seite. Ein Teil der Aminosäuren, deren Mutation in vorangegangenen Studien die Affinität des rOCT1 veränderte, sind abgebildet (Asp 475 in TD 11, Gln 448 und Leu 447 in TD 10, Thr 226 und Tyr 222 in TD 4). Zu erkennen ist, dass diese Aminosäuren alle um die Bindungstasche angeordnet sind. Außerdem sind zum Größenvergleich gegenüber der Bindungstasche die bekannten Substrate TEA⁺ und MPP⁺ und der Inhibitor Corticosteron gezeigt (aus Popp C et al., 2005 (105)).

Trotz einiger Einschränkungen (z.B. wurde die große extrazelluläre Schleife des rOCT1 nicht berücksichtigt) wird dieses Modell dadurch gestützt, dass 9 Aminosäuren, die in Mutationsexperimenten Einfluss auf die Substrataffinität und/oder Selektivität des rOCT1 haben, um diese Bindungstasche lokalisiert sind und so auch mit der wässrigen Umgebung in Kontakt stehen. Dazu gehören, neben der oben bereits erwähnten Asparaginsäure 475 in der TD 11 (41), das Glutamin 448, Leucin 447, Alanin 443 (42) und Arginin 440 (135) in der TD 10, das Threonin 226, Tyrosin 222 und Tryptophan 218 in der TD 4 (105) und das Phenylalanin 160 in der TD 2 (135). Außerdem scheint das Cystein 474 in der TD 11, welches auch bei den anderen Subtypen des OCT in gleicher Position vorkommt, zumindest beim hOCT2 ebenfalls Teil der Bindungstasche zu sein (99). Aufgrund der Nähe des Leucins 447 und Glutamins 448 zu dem in dieser Arbeit untersuchten Cystein 451 in der gleichen 10. Transmembrandomäne lag die Vermutung nahe, dass auch dieses die Substratbindung beeinflusst, allerdings unter dem Vorbehalt, dass eine Nähe in der Aminosäurefolge nicht zwangsläufig auch eine räumliche Nähe im gefalteten Protein bedeuten muss. Man kann allerdings aus der Beobachtung, dass das membranimpermeable Thiolgruppenreagenz Maleimid - PEO₂ - Biotin an den hOCT2 bindet und diese Interaktion durch eine 2 - minütige Vorinkubation, z.B. mit dem Substrat TEA⁺ oder dem Inhibitor TPA⁺, aufgehoben ist, auf die Lokalisation von frei zugänglichen Thiolgruppen im Bereich der Bindungstasche, zumindest beim hOCT2, schließen (99). Dass dazu auch tatsächlich das Cystein 451 gehört, konnte dann ein Jahr später mittels MTSEA - Biotin und HgCl₂, ebenfalls Substanzen, die mit Thiolgruppen wechselwirken, nachgewiesen werden (101). Dass das Cystein 451 und die neun carboxyterminal folgenden Aminosäuren bei den OCT subtypübergreifend und speziesübergreifend hoch konserviert sind (z.B. findet man es neben dem hOCT2 auch beim hOCT1, mOCT1 und rOCT1) (73)), spricht ebenfalls für seine Bedeutung.

Allgemein kann von einer großen Relevanz konservierter Proteinbereiche für die Transporterfunktion ausgegangen werden, weil eben gerade in ihren Genabschnitten zufällige, immer wieder natürlicherweise auftretende, nichtsynonyme Punktmutationen seltener nachweisbar sind als in Genabschnitten für nicht konservierte Proteinbereiche. Offenbar würde dadurch die Transporterfunktion so stark eingeschränkt, dass sie sofort einer negativen Selektion unterliegen (81, 116).

3.) Die Ladung der Substanz und Bindungsstelle

Allein eine optimale Übereinstimmung in der räumlichen Struktur zwischen einer Substanz und der Bindungsstelle des Transporters im Sinne von „Schlüssel und Schloss“ machen noch keine stabile Bindung zwischen ihnen aus. Deshalb soll jetzt auf die potentiellen Bindungskräfte zwischen der Substanz und dem Transporter näher eingegangen werden.

Da es sich beim rOCT1 um einen Kationentransporter handelt, ist die Beteiligung von ionischen Wechselwirkungen naheliegend. Mögliche Kandidaten für eine Wechselwirkung mit positiv geladenen Molekülen sind negativ geladene Aminosäuren in der Peptidkette des Transporters, welche sich zusätzlich in gleicher Position auch bei den anderen OCT - Subtypen finden lassen, hingegen nicht bei OAT. Acht Aminosäuren erfüllen diese Kriterien, darunter auch die Asparaginsäure in Position 475 in der TD11, deren Beteiligung an der Substanzbindung bereits nachgewiesen wurde (s.o.) (18) (**Abb.6**).

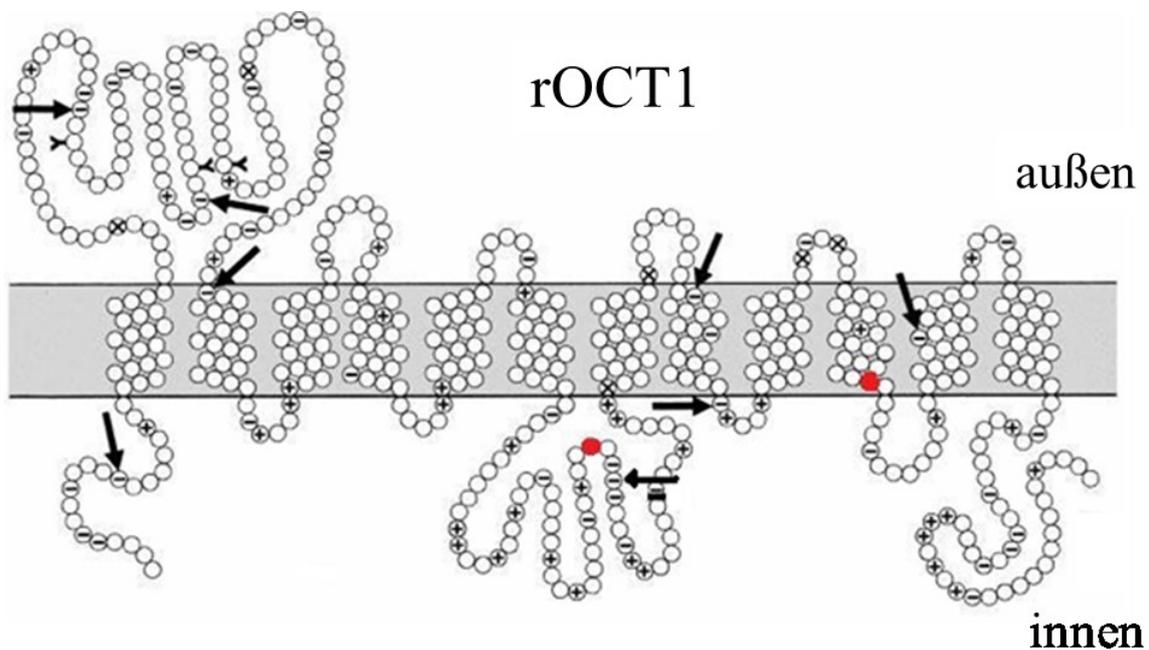


Abb.6. Darstellung sämtlicher geladener Aminosäuren des rOCT1. Gut erkennbar ist deren vorwiegende Lokalisation in den Schleifen zwischen den TD. Die negativ geladenen Aminosäuren, die in gleicher Position auch bei den anderen OCT - Subtypen vorkommen, sind mit einem Pfeil markiert. Zusätzlich rot markiert sind das in dieser Arbeit untersuchte Cysteine 322 in der großen intrazellulären Schleife zwischen TD 6 und TD 7 und das Cystein 451 in der TD 10. ⊖ = Glutaminsäure/Asparaginsäure, ⊕ = Lysin/Arginin, ⊗ = Histidin (modifiziert nach Burckhardt G und Wolff NA, 2000 (18)).

Weiterhin konnte in einer Studie, in der 191 Substanzen hinsichtlich ihres inhibitorischen Effektes auf den ASP^+ - Transport des hOCT1 untersucht wurden, gezeigt werden, dass von den Molekülen, die in der Lage waren, den ASP^+ - Transport um mindestens 50% zu hemmen, 66% positiv, 32% neutral und nur eine Substanz negativ geladen waren (3). Chen R. und Nelson J.A. wiesen bei mit dem rOCT1 transfizierten Oozyten eine erhöhte Transportrate für 2 - Desoxytubercidin (dTub) bei einem pH - Wert von 5,4 im Vergleich zu einem pH - Wert von 7,4 nach (22). Da bei diesem erniedrigten pH - Wert rund 50% des dTub in protonierter Form vorliegen (im Vergleich zu 1% bei pH 7,4), schlossen sie, dass das eigentliche Substrat die positiv ionisierte Form des dTub sei. Zu der gleichen Schlussfolgerung kamen Busch A.E. et al. bei ihren Untersuchungen zu der pH - Abhängigkeit des transmembranösen Stromes, ausgelöst durch Lidocain (20). Ferner konnte gezeigt werden, dass der inhibitorische Effekt von Cimetidin und Trimethoprim auf den TEA^+ - Transport durch den hOCT2 umso ausgeprägter ist, je größer der positiv geladene Anteil dieser Moleküle ist (10). Da sich auch unter pathologischen Bedingungen der pH - Wert ändern kann (z.B. bei einer Laktatazidose oder diabetische Ketoazidose), könnte dies ebenfalls mit einer veränderten Wechselwirkung von reversibel protonierbaren Medikamenten und endogenen Substanzen mit den Transportern einhergehen, mit entsprechenden Auswirkungen auf deren Reabsorption, Verteilung und Ausscheidung.

Andererseits ändert sich der Transport von Substraten mit einer pH - unabhängigen positiven Ladung, wie z.B. TEA^+ (44) oder MPP^+ (62), nicht mit dem pH - Wert. Deshalb scheint die Struktur und Aktivität des rOCT1 selbst nicht vom pH - Wert, zumindest im untersuchten Bereich von 6,4 - 8,4, abhängig zu sein (siehe Kap. 2.2.).

Es ist aber nicht nur relevant, ob eine Substanz überhaupt eine positive Ladung trägt, sondern auch, wie diese im Molekül verteilt ist und wie stark sie ist. So scheint bei einigen Substanzen eine räumliche Trennung zwischen der positiven Ladung und einer aromatischen Ringstruktur im Molekül wichtig zu sein, um vom rOCT1 bzw. hOCT1 transportiert zu werden (131). Außerdem interagieren bisquartäre Ammoniumverbindungen schwächer mit den in der basolateralen Membran lokalisierten organischen Kationentransportern des proximalen Rattentubulus' als monoquartäre (126). Trotz der offensichtlichen Bedeutung der positiven Ladung eines Moleküls sind auch neutrale

oder sogar negativ geladene Substanzen, die mit OCT wechselwirken bzw. solche, die sowohl mit OCT als auch mit organischen Anionentransportern (OAT) interagieren, bekannt. So wird der Transport von TEA^+ sowohl beim rOCT1 als auch beim rOCT2 durch die Anionen Paraaminohippursäure (PAH), Alpha - Ketoglutarat und Probenecid gehemmt. Zumindest für die PAH ist der Inhibitionmechanismus am rOCT2 teilweise kompetitiv, was für eine ähnliche Bindungsstelle von TEA^+ und PAH am Transporter spricht (8). Auch konnte experimentell nachgewiesen werden, dass die Anionen Prostaglandin E_2 und Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ nicht nur durch die hOAT transportiert werden, sondern auch durch den hOCT1 sowie den hOCT2, und dass der hOCT2 sogar eine höhere Affinität für diese Anionen besitzt als die hOAT (67). Entsprechend zeigten Ahn et al. für 10 von 14 untersuchten Kationen mit bekannter OCT - Wechselwirkung eine Interaktion mit dem mOAT3. Zwei werden sogar von ihm transportiert (4). Da OCT und OAT aufgrund ihrer mind. 20% - igen Aminosäuresequenzübereinstimmung zur gleichen Transporterfamilie gerechnet werden (s.o.) und auch eine ähnliche Molekülstruktur haben, sind solche Substratüberschneidungen teilweise bereits erklärbar.

Zum Abschluss der Strukturbetrachtungen soll noch auf die Schleifen zwischen den Transmembrandomänen (TD) eingegangen werden. Die große hydrophile Schleife zwischen TD 1 und TD 2 ist unter den Subtypen der OCT hoch konserviert. Ihre Aminosäuresequenz ist beispielsweise zwischen dem rOCT1 und dem rOCT2 zu 85% identisch (97). Außerdem weist sie zur extrazellulären Seite der Zellmembran, denn spezifische Antikörper gegen sie binden sowohl bei permeabilisierten als auch bei nicht permeabilisierten Zellen (89). Diese Schleife enthält beim rOCT1 drei potentielle Glykosylierungsstellen (**siehe Abb.4**), von denen sich zwei in gleicher Position auch beim rOCT2 und rOCT3 finden lassen (73, 58). Dass der rOCT1 in der Zellmembran von Niere und Leber tatsächlich glykosyliert ist, konnte anhand seiner veränderten Laufgeschwindigkeit im „western - blot“ nach Behandlung mit der N - Glykosidase F nachgewiesen werden (30). Die posttranslationale Glykosylierung von Proteinen spielt eine Rolle für deren Funktion, Faltung, intrazelluläre Sortierung und Umsatz durch Proteasen (85). Ihre Bedeutung für die intrazelluläre Sortierung von OCT wiesen Pelis et al. durch die Untersuchung der 3 potentiellen N - Glykosylierungsstellen in der extrazellulären Schleife des rbOCT2 nach (jeweils Asparagin in Position 71, 96, 112).

Infolge eines Austausches des Asparagins in Position 112 gegen Glutamin zeigte sich nämlich ein verminderter Einbau des rbOCT2 in die Zellmembran. Nach isolierter Entfernung der anderen beiden Glykosylierungsstellen blieb dieser allerdings unverändert (100). Dabei kann sich das Glykosylierungsmuster abhängig vom Besatz mit katalysierenden Glykosyltransferasen von Zellart zu Zellart durchaus unterscheiden. So fielen Meyer - Wentrup et al. ein unterschiedliches Molekulargewicht des rOCT1 in den Membranen transfizierter Oozyten (58 kDa) und nativer Rattenhepatozyten (67 kDa) auf. Sie erklärten ihre Beobachtung mit einer unterschiedlichen posttranslationalen Proteinmodifikation durch Glykosyltransferasen in jenen Zellen (89). Die große extrazelluläre Schleife des rOCT1 enthält auch sechs Cysteine, welche sich ebenso bei den anderen Mitgliedern der OCT - Familie finden lassen. Eine isolierte Mutation jedes dieser Cysteine des rOCT1 führt zu einem Verlust seiner Transportfunktion für das Substrat TEA^+ in transfizierte Oozyten (120). Auch beim hOCT2 war nach einer Mutation von fünf jener Schleifencysteine die zelluläre Aufnahme von TEA^+ und MPP^+ reduziert. Gleichzeitig war die Membranlokalisierung des hOCT2 vermindert und seine Laufgeschwindigkeit im „western - blot“ erhöht. Somit scheint jedes dieser Cysteine für eine korrekte Faltung und damit den Membraneinbau des Transporters wichtig zu sein. Hierfür sind besagte Schleifencysteine auch teilweise durch Disulfidbrücken miteinander verbunden (102). Die korrekte Faltung der großen extrazellulären Schleife ist zusätzlich eine Voraussetzung für die Assoziation mehrerer Transportermoleküle untereinander, wie es beim rOCT1 (64) und hOCT2 (15) nachgewiesen werden konnte. Auf die Bedeutung solcher Transporter - Homooligomere wird im folgenden Kapitel noch näher eingegangen (s.u.).

Schließlich führen Veränderungen der großen extrazellulären Schleife auch zu einer veränderten Substraterkennung des Transporters. Ihr kompletter Austausch beim rOCT1 gegen die korrespondierende Schleife des rOAT1 senkt z.B. die Affinität des rOCT1 für MPP^+ (64). Die bereits oben genannten Einzelmutationen der Glykosylierungsstellen des rbOCT2 in dessen großer extrazellulärer Schleife bewirken eine erhöhte Affinität dieses Transporters für TEA^+ , was für eine Veränderung seiner TEA^+ - Bindungsstelle spricht (100). Außerdem zeigt ein beim Menschen vorkommender Einzelnukleotid - Polymorphismus des hOCT1, der zu einem Austausch des Cysteins in Position 88 gegen Arginin führt, eine für verschiedene Substrate unterschiedlich reduzierte

Transportrate, was ebenfalls mit einer dadurch beeinflussten Substraterkennung erklärbar ist (65). Wahrscheinlich ist die große Schleife aber kein direkter Teil der Transporterbindungstasche, sondern beeinflusst diese eher indirekt durch eine Veränderung der Position der TD 1 und TD 2, zwischen denen sie sich ausspannt und welche nach o.g. Strukturmodell die Bindungstasche mitformen (64).

Auch Mutationen in der großen intrazellulären Schleife zwischen TD 6 und 7 des rOCT1 verändern seine Substrataffinität, wahrscheinlich indirekt über eine Beeinflussung der Bindungstasche durch eine veränderte Raumstruktur des gesamten Proteins. Alternativ kommt dafür aber auch eine Veränderung der Angriffsstellen für Kinasen in Frage, welche hier lokalisiert sind (27). Dass eine Phosphorylierung des Transporters im Rahmen der Regulation dessen Affinität verändern kann, wurde bereits erwähnt. Auf die Regulation des rOCT1 soll im nächsten Kapitel genauer eingegangen werden.

2.6. Regulation des rOCT1

Grundsätzlich ist die Menge an Molekülen, die durch passiv arbeitende Transporter über eine Membran transportiert werden, abhängig von der Triebkraft, also dem elektro - chemischen Gradienten, der Gesamtzahl der Transporterproteinen in der Membran und vom Aktivitätszustand des Einzeltransporters (Schlagfrequenz/Turnoverrate und Affinität). Sowohl die Gesamtzahl als auch der Aktivitätszustand können im Rahmen der Transporterregulation beeinflusst werden.

Für zahlreiche Transporterproteine ist eine Regulation durch Proteinkinasen beschrieben worden, z.B. für den Na^+/H^+ Austauscher 3 (NHE3) (80), den $\text{Na}^+/\text{Glukose}$ Cotransporter 1 (SGLT1) (53) oder den Serotonintransporter (SERT) (107). Dabei muss es allerdings nicht immer zu einer direkten Phosphorylierung der potentiellen Phosphorylierungsstellen des Transporters durch Kinasen kommen. Dies wurde z.B. für den humanen organischen Anionentransporter 1 (hOAT1) nachgewiesen, bei dem trotz mutagenem Austausch seiner potentiellen Proteinkinase C (PKC) - Phosphorylierungsstellen die inhibitorische Wirkung einer PKC - Aktivierung auf ihn erhalten blieb (139). Auch bei den Mitgliedern der OCT sind mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen

für verschiedene Kinasen bekannt (18, 28). Nachdem bereits an isolierten proximalen Tubuli vom Kaninchen eine Zunahme der zellulären Aufnahme von TEA^+ nach experimenteller Stimulation der PKC nachgewiesen werden konnte (54), war es nach Klonierung der OCT auch möglich, deren Regulation direkt zu messen. Im Jahr 2000 gelang es, die Regulation des rOCT1 durch verschiedene Proteinkinasen nachzuweisen. Dabei zeigte sich, dass eine Aktivierung der PKA und PKC bei mit dem rOCT1 transfizierten HEK293 - Zellen eine Stimulation der zellulären Aufnahme des organischen Kations ASP^+ bewirkt. Hingegen führte eine Inhibition der p56^{lcK} - Tyrosinkinase zu einer Hemmung, als Hinweis für eine gewisse Grundstimulation des rOCT1 durch diese Kinase. Eine Inhibition anderer Kinasen, z.B. der platelet - derived growth factor receptor kinase, hatte hingegen keinen Einfluss ((88) und **Tab.2**). Wie weiter oben bereits erwähnt, konnte in der gleichen Arbeit zusätzlich nachgewiesen werden, dass der stimulierende Effekt der PKC von einer direkten Phosphorylierung des Transporterproteins und von einer Änderung der Affinität des rOCT1 für die Kationen TEA^+ , TPA^+ und Quinin begleitet wird. Die Anzahl der Transportermoleküle in der Zellmembran verändert sich hingegen nicht (27). Eine isolierte Mutation von fünf potentiellen PKC - Phosphorylierungsstellen des rOCT1 (S286, S292, T296, S328, T550) (**siehe Abb.4**) führte zum Verlust des PKC - Effektes (27), im Gegensatz zu o.g. Beispiel des hOAT1. Aufgrund der unmittelbaren Nähe der Phosphorylierungsstelle S328 zu dem in dieser Doktorarbeit untersuchten C322 lag die Vermutung nahe, dass auch dessen Mutation den Angriff der PKC am Transporter verändern könnte.

Weiterhin ist bedeutsam, dass die verschiedenen OCT - Subtypen unterschiedlich reguliert werden. So führt eine PKC - Aktivierung zwar wie erwähnt zu einer Steigerung der ASP^+ - Aufnahme in mit dem rOCT1 transfizierte HEK293 - Zellen. Exprimiert derselbe Zelltyp allerdings den hOCT1, wird die ASP^+ - Aufnahme durch eine PKC Aktivierung nicht beeinflusst (25) oder, wie beim hOCT2, sogar gehemmt (13) bzw. bleibt ebenfalls unverändert (21). Einen Überblick über die Steuerung der Subtypen 1 und 2 des OCT beim Menschen und der Ratte durch ausgewählte Regulationswege gibt **Tab.2**.

	rOCT1	rOCT2	hOCT1	hOCT2
PKC	+(88)	0 ₍₁₃₈₎	0 ₍₂₅₎	- ₍₁₃₎ 0 ₍₂₁₎
p56 ^{lck} – Tyrosinkinase	+(88)	+(138)	+(25)	0 (Ciarimboli G, unveröffentlicht)
CaM	+ (Teil dieser Arbeit)	+(138)	+(25)	+(21, 13)
CaMKII	n.u.	+(138)	+(25)	+(21)
MLCK	n.u.	0 ₍₁₃₈₎	0 ₍₂₅₎	+(21)

Tab.2. Darstellung ausgewählter Regulationswege des ASP⁺ - Transportes durch die Isoformen 1 und 2 des OCT der Ratte und des Menschen nach deren Transfektion in HEK293 - Zellen. PKC = Proteinkinase C, CaM = Calmodulin, CaMKII = Ca²⁺/CaM – abhängige Proteinkinase II, MLCK = Myosin light chain Kinase, 0 = kein Effekt; + = Transportstimulation; - = Transporthemmung; **n.u.** = noch nicht untersucht .

Dass eine Kinase bei einem Transporter eine Aktivitätssteigerung, bei einem anderen hingegen zu einer Aktivitätsabnahme führt, kann auf zwei Weisen erklärt werden:

- 1.) Trotzdem alle OCT potentielle Phosphorylierungsstellen besitzen, ist das individuelle Muster dieser Phosphorylierungsstellen zwischen den Subtypen durchaus verschieden (18, 28). Eine Phosphorylierung unterschiedlicher Orte des Transporterproteins könnte dann unterschiedliche Auswirkungen auf seine Funktion haben.
- 2.) Auch wenn der primäre Angriffspunkt einer Kinase an den verschiedenen Transportern identisch sein sollte, z.B. findet man die potentielle PKC - Phosphorylierungsstelle S286 bei fast allen OCT, kann immer noch die Auswirkung einer Phosphorylierung, beispielsweise auf die Raumstruktur der Substratbindungsstelle, verschieden sein. Diese

kann nämlich neben weiteren interferierenden Signalen auch von der individuellen Aminosäuresequenz des Peptids abhängig sein. Da z.B. die Aminosäuresequenz-übereinstimmung zwischen rOCT1 und hOCT2 lediglich 68% beträgt (73), kann damit der beobachtete inverse Effekt einer PKC - Aktivierung auf beide Transporter erklärt werden.

Die unterschiedliche Regulation dieser beiden, in ihrer jeweiligen Spezies vorwiegend nierenlokalisierten Transporter, könnte auch an den bekannten Abweichungen der renalen Kationenausscheidung zwischen den Arten beteiligt sein (106). Hingegen sind die in o.g. Tabelle aufgeführten Unterschiede in der Regulation zwischen hOCT1 und hOCT2 mit ihrer unterschiedlichen Organlokalisation (hOCT1: vorwiegend in der Leber, hOCT2: vorwiegend in der Niere) erklärbar, da die Ansprüche an den Kationentransport auch organabhängig verschieden sind (s.o.).

Die Regulation der org. Kationentransporter ist aber nicht nur subtypabhängig, sondern auch von dem sie exprimierenden Zelltyp. Beispielsweise beobachteten Ciarimboli et al. einen Affinitätsunterschied des hOCT1 für das Substrat TEA^+ je nachdem, ob er in HEK293 - oder in CHO (Chinese hamster ovary) - Zellen vorkommt (25). Auch die Beeinflussung des Kationentransportes bei mit dem rOCT1 transfizierten HEK293 - Zellen mit 8-Br-cGMP ist im Vergleich zu den mit dem gleichen rOCT1 transfizierten *Xenopus leavis* - Oozyten unterschiedlich. Bei den HEK293 - Zellen wurde nämlich eine Inhibition der ASP^+ - Aufnahme nach 10 - minütiger Inkubation mit 100 μM 8-Br-cGMP festgestellt, während sich bei *Xenopus leavis* - Oozyten die Aktivität des rOCT1 nicht änderte (113). 8-Br-cGMP interagiert daher offensichtlich nicht direkt mit dem Transporter, sondern der inhibitorische Effekt erfolgt durch ein regulatorisches Protein. Dieses ist wahrscheinlich unterschiedlich aktiv in beiden Zelllinien. Da z.B. der rOCT1 neben der Niere auch in der Leber vorkommt, könnten, wenn oben erwähnte Regulationswege in beiden Zellarten unterschiedlich aktiv sind, auch seine funktionellen Eigenschaften organabhängig differieren.

Wegen dieser Zelltypabhängigkeit der Transporterregulation ist es von großer Bedeutung, welches Expressionssystem für funktionelle Transporteruntersuchungen im Labor genutzt wird. Diesen Misslichkeiten würde man nur dadurch entgehen, wenn man experimentell nicht nur die Milieuzusammensetzung auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran, in der die Transporter exprimiert werden, sondern auch auf der

intrazellulären Seite vorgeben könnte. Durch eine Expression der Transporter in Proteoliposomen anstatt in Zellen ist dies tatsächlich möglich (62, 63).

Auch eine unterschiedliche extrazelluläre Umgebung in den Körperorganen könnte funktionelle Unterschiede von ein und demselben Transporter in den verschiedenen Organen erklären. Tatsächlich ist eine Beeinflussung der Transporterregulationswege durch extrazelluläre Signale bisher nicht nur im Labor nachgewiesen worden, sondern auch schon *in vivo*. So konnte z.B. bei Ratten indirekt ein Effekt von Geschlechtshormonen auf die die Transporteraktivität regulierende, intrazelluläre Calmodulinsignalkaskade im S3 - Segment proximaler Tubuli festgestellt werden. Ein abschwächender Effekt einer Inhibition des Ca^{2+} /Calmodulin - Komplexes durch Calmidazolium auf die Transportrate des rOCT2 (**siehe Tab.2**) war nur bei männlichen Ratten messbar, nicht hingegen bei den weiblichen. Dieser Befund war zusätzlich mit einer signifikant niedrigeren Calmodulinmenge in der Niere der Weibchen assoziiert (138).

Zusammenfassend kann man also sagen, dass die unterschiedlichen Ansprüche an den Kationentransport der Körperorgane entweder durch eine Expression verschiedener OCT - Subtypen oder durch eine organabhängig unterschiedliche Regulation ein und desselben Subtypes mittels extrazelluläre oder intrazelluläre Signale realisiert werden können.

Die Menge der über die Zellmembran transportierten organischen Kationen ändert sich natürlich auch immer dann, wenn sich die Anzahl der Transportermoleküle in der Zellmembran ändert, sei es über eine veränderte Neusynthese, Abbaugeschwindigkeit oder Verschiebung zwischen Membran und zytoplasmatischen Pool (trafficking). Beim ebenfalls zur SLC22 - Familie gehörenden Harnsäure/Anion - Antiporter (hURAT1) ist nach Wechselwirkung seines karboxyterminalen Endes mit dem ubiquitär vorkommenden Membranprotein PDZK1 eine erhöhte zelluläre Aufnahme von Harnsäure in mit beiden Proteinen ko - transfizierten HEK293 - Zellen bei gleichzeitig erhöhter Transporterzahl in der Zellmembran nachgewiesen worden. PDZK1 scheint also, möglicherweise durch eine Reduktion der Internalisation, die Anzahl der hURAT1 - Moleküle in der Zellmembran zu beeinflussen (5). Beim rOCT1 und hOCT2 wird vermutet, dass die Bildung von Homooligomeren wichtig für deren Einbau in die

Zellmembran ist (78). Dass es zu einer solchen Interaktion mehrere Transportermoleküle untereinander kommen kann, ist mit aufgereinigten rOCT1 - Molekülen bereits im Jahr 2008 nachgewiesen worden (63). In der gleichen Arbeit wurde auch gezeigt, dass es eher zu einer Bildung von Homooligomeren, also zu einer Assoziation mehrerer rOCT1 - Moleküle untereinander, als zu einer Bildung von Heterooligomeren, z.B. zwischen rOCT1 und rOCT2 oder zwischen rOCT1 und rOAT1, kommt. Auch für den hOAT1 konnte eine Homooligomerbildung *in vitro*, beispielsweise durch die Ko - Immunpräzipitation zweier verschieden markierter hOAT1 - Moleküle, nachgewiesen werden (55). Da es außerdem nicht relevant zu sein schien, ob die hOAT1 - Moleküle am N - oder COOH - Terminus markiert wurden, sind für diese Interaktionen Abschnitte zwischen den Enden der Transporterproteine wichtig. Zumindest beim rOCT1 (64) und beim hOCT2 (15) ist dafür die große extrazelluläre Schleife zwischen der TD1 und TD2 verantwortlich. Dementsprechend konnte, obwohl wie erwähnt der native rOCT1 eigentlich vorwiegend Homooligomere bildet, seine Wechselwirkung mit dem rOAT1 dadurch induziert werden, dass seine große extrazelluläre Schleife experimentell durch die korrespondierende Schleife des rOAT1 ausgetauscht wurde (64). Interessanterweise scheint eine solche Interaktion mehrere rOCT1 - Moleküle nicht die Eigenschaften der rOCT1 - Einzeltransporter zu beeinflussen. Das ist zumindest für ihre Affinität für das Substrat MPP^+ nachgewiesen worden (64).

Auch intrazelluläre Regulationswege haben einen Einfluss auf die Transporterzahl in der Zellmembran. Neben einer korrekten Glykosylierung der großen extrazellulären Schleife zwischen TD 1 und TD 2 (s.o.) ist dies experimentell, z.B. an mit dem hOCT2 transfizierten HEK293 - Zellen nach ihrer Inkubation mit dem Calmodulin - Inhibitor Calmidazolium, nachgewiesen worden. Es zeigte sich eine Reduktion der membrangebundenen Transporter. Da gleichzeitig deren Gesamtzahl in der Zelle konstant blieb, kommt es hier zu einer Verschiebung der Transporter aus der Zellmembran in den zytoplasmatischen Pool (13). Aufgrund einer V_{max} - Reduktion für den MPP^+ - Transport bei mit dem hOCT3 transfizierten HEK293 - Zellen nach 60 - minütiger Inkubation mit dem unselektiven Phosphodiesterasehemmer 3 - Isobutyl - 1 - Methylxanthin (IBMX) ist auch hier von einer Transporterzahlreduktion in der

Zellmembran und/oder einer verminderten Turnoverrate der Einzeltransporter auszugehen (87).

Aber nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo*, sind Veränderungen der Transporteranzahl bekannt, z.B. im Rahmen der Ontogenese, bei Krankheiten oder unter hormonellen Einflüssen. So kommt es postnatal zu einer geschlechtsunabhängigen Zunahme der mRNA - Menge des rOCT1 in der Rattenniere (119). Aufgrund der Ausscheidungsfunktion des rOCT1 ergeben sich daraus wahrscheinlich auch unterschiedliche Halbwertszeiten und Plasmaspiegel für seine Substrate abhängig vom Alter der Ratte. Desweiteren findet sich nach einer experimentellen Obstruktion des Gallenganges bei der Ratte ein signifikanter Abfall des mRNA - Spiegels und der Proteinmenge des rOCT1 in der Leber mit einer verminderten hepatischen Aufnahme des intravenös applizierten Modellkations TEA^+ (30). Dementsprechend konnte eine verminderte hOCT1 mRNA - und Proteinmenge in der Leber auch bei Menschen mit erhöhten Serum - Cholestaseparametern nachgewiesen werden mit einer dadurch möglichen Auswirkung auf die hepatische Aufnahme und Wirkung von Medikamenten, wie z.B. Metformin (s.o.) (95). Schließlich ist die 2 - fach höhere Aufnahme von TEA^+ in Gewebsschnitten aus männlichen Rattennieren im Vergleich zu weiblichen zumindest teilweise eine Folge höherer rOCT2 mRNA - und Proteinspiegel in der Niere der Männchen (127). Nach einer Gonadektomie ließ sich dieser Unterschied in den renalen mRNA - Mengen zwischen den Geschlechtern nicht mehr nachweisen (119). Die Gabe von Testosteron an weibliche und männliche Ratten führte hingegen bei beiden Geschlechtern zu einer Erhöhung sowohl der Expression des rOCT2 in der Niere als auch der TEA^+ - Aufnahme in Nierengewebschnitten. Eine Östradiol - Gabe an Männchen verminderte diese Aufnahme hingegen signifikant (128). Aus den letztgenannten Befunden kann geschlossen werden, dass der rOCT2 entweder für eine renale Ausscheidung von geschlechtsabhängig in unterschiedlichen Mengen anfallende Metabolite sorgt oder erst unterschiedliche Plasmaspiegel von endogen gebildeten Substanzen zwischen den Geschlechtern gewährleistet. Eine solche unterschiedliche Expression von Transportern in den Ausscheidungsorganen könnte, neben den bereits erwähnten Geschlechtsdimorphismen ihrer intrazellulären Regulationswege (138), die bekannten Unterschiede in der Kinetik verschiedener Medikamente zwischen den Geschlechtern (114) miterklären.

Interessanterweise ließ sich eine hormonelle Regulation der Transkription für die Subtypen rOCT1 und rOCT3 in der Rattenniere nicht nachweisen und fehlte in anderen Organen auch für den rOCT2 (127, 119). Da Androgene als Steroidhormone an intrazelluläre Rezeptoren binden und dieser Hormon/Rezeptorkomplex dann über sog. androgen - response - elements (ARE) der Promotoren deren Aktivität erhöht, lässt sich aufgrund des Fehlens solcher ARE in der Promotorregion des rOCT1 und rOCT3 deren Nichtstimulierbarkeit durch Testosteron verstehen (9). Dass aber trotz der ARE in der Promotorregion des rOCT2 dessen mRNA - Spiegel zwar in der Niere, aber nicht in anderen bisher untersuchten Organen zwischen den Geschlechtern verschieden ist, könnte auf unterschiedliche Androgenrezeptormengen in den Organen zurückzuführen sein, was immunhistochemisch schon nachgewiesen wurde (122). Tatsächlich mussten in der oben zitierten Studie die Zellen mit dem Genabschnitt für den Promotor und mit dem Gen für den Androgenrezeptor ko - transfiziert werden, damit Testosteron überhaupt die Promotoraktivität des rOCT2 steigern konnte. Eine andere Erklärung wären nierenspezifische Transkriptionsfaktoren, welche evtl. zusätzlich an den Promotor binden müssen, um die Transkription zu ermöglichen. Auf die Rolle von Transkriptionsfaktoren für die gewebsspezifische Transporterexpression wurde bereits weiter oben eingegangen.

3. Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Rolle der Aminosäuren Cystein 322 und Cystein 451 für die Funktion des organischen Kationentransporters Typ 1 der Ratte (rOCT1). Dafür wurde die Auswirkung einer Mutation dieser Cysteine auf die Substrataffinität/Selektivität des Transporters mittels der Modellkationen Tetraethylammonium (TEA^+), Tetrapentylammonium (TPA^+) und 4-(4-(Dimethylamino)styryl)-N-Methylpyridinium (ASP^+) untersucht und erforscht, ob sich seine Regulation durch die Protein-kinase C, p56^{lck} - Tyrosinkinase, Calmodulin und das Thiolgruppenreagenz Methylmethanethiosulfonat (MMTS) verändert.

4. Material und Methoden

4.1. Expression des rOCT1 durch Humane Embryonale Kidney (HEK293) - Zellen

Für diese Arbeit wurden Zellkulturen der Humanen Embryonalen Kidney (HEK293) - Zellen (CRL-1573; American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA) benutzt. Diese Zellen sind zuvor von unserem Kooperationspartner, der Arbeitsgruppe des Institutes für Anatomie und Zellbiologie von Prof. Dr. Koepsell der Universität Würzburg, mit dem rOCT1 in der nicht mutierten (WT) und der einzeln (C322S bzw. C451M) bzw. doppelt mutierten Variante (C322S/C451M) stabil transfiziert worden. Für einige Experimente fanden auch nicht transfizierte Zellen (HEK) Verwendung. In Vorversuchen konnten wir nachweisen, dass diese nicht transfizierten Zellen bei der verwandten ASP^+ - Konzentration von $1 \mu M$ nur eine geringe ASP^+ - Aufnahme zeigen, die weder von klassischen Inhibitoren noch von Regulatoren der OCT beeinflusst wird. Kultiviert wurden die Zellen bei $37^\circ C$, in einer Atmosphäre mit 8% CO_2 , in 50 ml Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland). Diese enthielten Dulbecco's modified Eagle's Nährmedium (DMEM) (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) mit 3,7 g/l $NaHCO_3$, 1,0 g/l D-Glucose, 2,0 mmol/l L-Glutamin (Gibco BRL/Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland), 100000 U/l Penicillin, 100 mg/l Streptomycin und 10 % fetales Kälberserum (Biochrom GmbH). Nur bei den transfizierten Zellen wurde zusätzlich 0,8 mg/ml Geneticin (Gibco BRL/Life Technologies GmbH) zur Selektion der erfolgreich transfizierten Zellen hinzugefügt. Die eigentlichen Experimente führten wir dann mit Zellen durch, die 4 bis 8 Tage nach deren Aussaat auf Deckgläsern einen konfluenten Zellmonolayer gebildet hatten. Jedes Teilexperiment fand an einem Tag mit Zellen gleichen Alters und gleicher Passage statt. Die Kultur und Analyse der gentechnisch veränderten Zellen wurde durch das Landesumweltamt Nordrhein - Westfalen, Essen, Deutschland (No.521-M-1.14/00) genehmigt.

4.2. Dynamische Fluoreszenzmikroskopie

Als Maß für die Aktivität des Transporters wurde mittels der dynamischen Fluoreszenzmikroskopie die zelluläre Aufnahme des fluoreszierenden Modellkations 4-(4-(Dimethylamino)styryl)-N-Methylpyridinium (ASP^+ , $1 \mu\text{M}$) über die Zeit gemessen. Die Messungen fanden deshalb bei Dunkelheit mit einem inversen Mikroskop (Axiovert 135, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) statt. Der Aufbau des Arbeitsplatzes ist in **Abb.7** dargestellt.

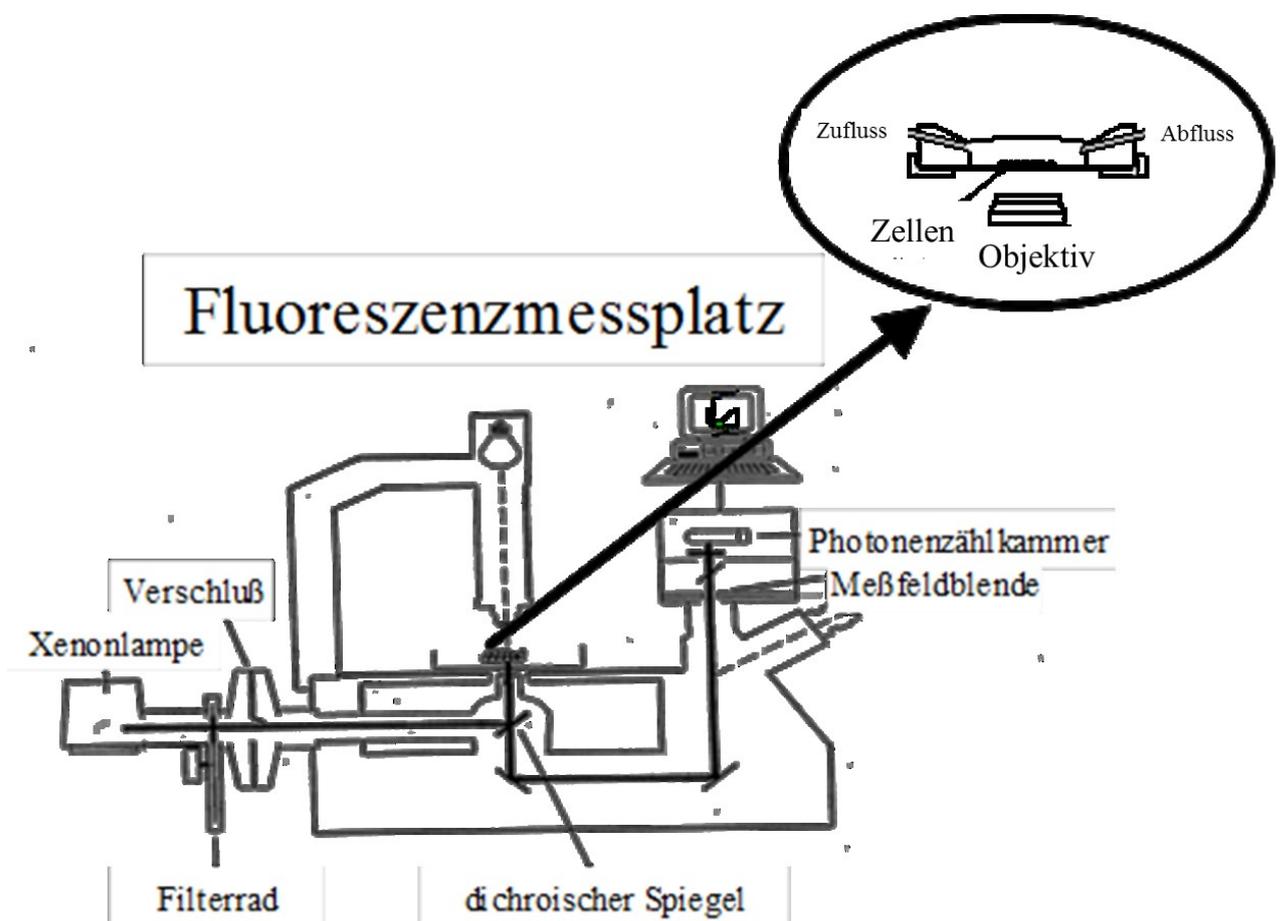


Abb.7. Darstellung des Arbeitsplatzes. Im Einschub ist die Perfusionskammer gezeigt, auf deren Boden sich die Deckgläser mit den transfizierten Zellen befanden.

ASP^+ ist ein bekanntes Substrat des rOCT1 (88). Als quartäre Ammoniumverbindung ist es permanent positiv geladen und besitzt zusätzlich eine reversibel protonierbare Gruppe (siehe **Abb.1**). Sein pK_s – Wert beträgt 3,6. Aufgrund seiner lipophoben

Eigenschaft (n-Octanol/Wasser - Verteilungsquotient = 0,14) ist es kaum membran-gängig. Das Anregungsmaximum von ASP^+ in wässriger Lösung liegt bei 450 nm. Deshalb wurde das Spektrum des Anregungslichtes, welches von einer Xenon - Quarz Lampe (XBO 75W, Carl Zeiss AG) generiert wurde, zunächst durch ein rotierendes Filtrerrad (10 - 30/s) auf eine Wellenlänge zwischen 450 - 490 nm begrenzt und dadurch gleichzeitig in eine pulsierende Form umgewandelt. Eine kontinuierliche Anregung hätte eine zu schnelle Ausbleichung des fluoreszierenden ASP^+ zur Folge gehabt. Nach Durchgang eines Graufilters, der die Lichtintensität zusätzlich auf 10% reduzierte, wurde das Anregungslicht mittels eines dichroischen Spiegels (560 nm) über ein Öl - Immersion Objektiv (100x) zur Perfusionskammer reflektiert. Auf deren Boden befanden sich die mit dem rOCT1 transfizierten Zellen. Das Volumen der Perfusionskammer betrug 0,5 ml. Da die Zellen während der Versuche kontinuierlich mit 10 ml/min einer HCO_3^- - freien Ringer - Lösung perfundiert wurden, wechselte das Kammervolumen 20 mal pro Minute. Die Ringer - Lösung hatte außerdem folgende Zusammensetzung (in mM): NaCl 145,0, K_2HPO_4 1,6, KH_2PO_4 0,4, D-Glucose 5,0, $MgCl_2$ 1,0, Calciumgluconat 1,3. Ihr pH - Wert war 7,4 und ihre Temperatur $37^\circ C$. Diese Temperatur wurde durch einen Thermostat konstant gehalten. Das Emissionsmaximum von ASP^+ in wässriger Lösung beträgt 590 nm. Das vom ASP^+ nach seiner zellulären Aufnahme und Anregung emittierte Licht wurde daher erst nach Durchgang durch einen Emissionsfilter der Wellenlänge 575 - 640 nm von einer Photonen-zählkammer registriert (Hamamatsu H 3460-04, Herrsching, Deutschland).

Die computergestützte Analyse der Versuche geschah mittels Software von U. Fröbe (Universität Freiburg, Deutschland). Dabei wurden die Fluoreszenzsignale pro Sekunde gemittelt und als Funktion über die Zeit aufgetragen. Eine Messung dauerte zwischen 3 und 5 Minuten. Als Transportparameter werteten wir jeweils nur den initialen Anstieg der Graphen aus, da dieser die Aufnahme des Kations in die Zellen am ehesten repräsentiert. Das maximal erreichbare Fluoreszenzsignal ist dagegen zur Auswertung eher ungeeignet, weil es zusätzlich durch den Transport des fluoreszierenden Kations aus der Zelle hinaus, dessen intrazelluläre Kompartimentierung (z.B. in den Mitochondrien mit Änderung des Emissionsspektrums) und Ausbleichung beeinflusst werden könnte (104, 103).

Bei den Transporter - Regulationsversuchen wurden die Zellen in oben genannter Ringer - Lösung mit der entsprechenden Substanz für 10 min vorinkubiert, bevor ASP^+ unter weiterer kontinuierlicher Gabe des Regulators zugesetzt wurde.

Der gesamte Messplatz stand auf einer Kalksteinplatte, die zur Dämpfung von Erschütterungen luftkissengelagert war. Zwei Beispielmessungen sind in **Abb.8** wiedergegeben.

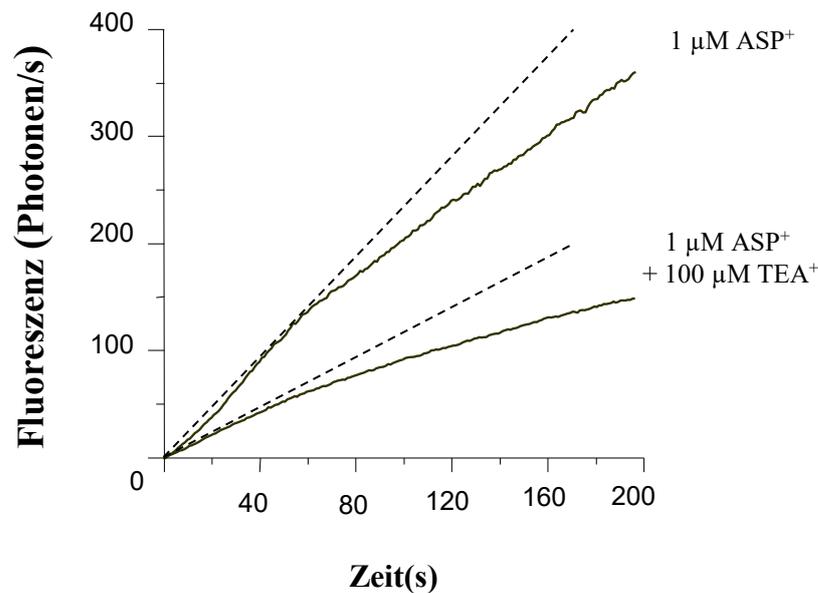


Abb.8. Darstellung von zwei Beispielmessungen, welche die Zunahme des Fluoreszenzsignales über die Zeit durch eine ASP^+ - Aufnahme in die mit dem rOCT1 transfizierten Zellen zeigen sollen. Der Versuch wurde einmal mit und einmal ohne Zugabe eines zweiten kationischen Substrates (TEA^+) durchgeführt, um zusätzlich eine Inhibition der ASP^+ - Aufnahme zu demonstrieren. Die Anstiege der gestrichelten Geraden, welche jeweils durch die initiale Phase der Aufnahmekurve gelegt wurden, werteten wir als Maß für die Transporteraktivität aus.

4.3. Reagenzien

Das fluoreszierende Modellkation ASP^+ bezogen wir von der Molecular Probes - Invitrogen GmbH (Karlsruhe, Deutschland). TEA^+ , TPA^+ und MMTS lieferte die Sigma - Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland). DOG, Calmidazolium und Aminogentisin kauften wir bei der Calbiochem - Novabiochem GmbH (Bad Soden, Deutschland). Alle anderen Substanzen sind Bestellungen bei der Sigma - Aldrich Chemie GmbH oder Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland).

Diese Substanzen wurden in HCO_3^- - freier Ringer - Lösung (Zusammensetzung siehe vorheriges Kapitel 4.2.) gelöst und bei Bedarf vorher in DMSO oder Alkohol als Lösungsmittel aufgenommen. In den benutzten Konzentrationen beeinflussten jene Lösungsvermittler die Experimente nicht.

4.4. Statistische Auswertung

Die Fluoreszenzsignale wurden gemittelt und zusätzlich der Standardfehler des Mittelwertes berechnet (Mittelwert \pm Standardfehler). Die jeweilige Anzahl der benutzten Zellmonolayer bzw. Messungen repräsentiert (n). Die K_m - und IC_{50} - Werte ermittelten wir aus den sigmoidalen Konzentrationsabhängigkeitskurven unter Benutzung des Programms GraphPad Prism, Version 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Dieses Programm konnte auch für den statistischen Vergleich der K_m - und $\log\text{IC}_{50}$ - Werte zweier Kurven benutzt werden. Da für jede Messung immer wieder neue Zellen verwendet wurden, handelte es sich stets um ungepaarte Experimente. Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz eines Unterschiedes zweier Stichprobenmittelwerte durch das Programm IBM SPSS Statistics 22 gebrauchten wir deshalb den t - Test bei unabhängigen Stichproben, wenn zusätzlich eine Normalverteilung vorlag. Bei fehlender Normalverteilung kam der Mann - Whitney - U - Test zur Anwendung. In einigen Fällen führten wir auch eine einfaktorielle ANOVA durch. Als Test auf Normalverteilung nutzten wir den Kolmogorov - Smirnov - Test, als Test auf Varianzgleichheit den Levene - Test. Ein p - Wert von $< 0,05$ wurde jeweils als statistisch signifikant gewertet.

5. Ergebnisse

5.1. Einfluss der Doppelmutation (C322S/C451M) auf die Affinität des rOCT1

Den Einfluss einer gleichzeitigen Cysteinmutation in den Aminosäurepositionen 322 und 451 des rOCT1 auf dessen Affinität untersuchten wir, indem wir die ASP^+ - Aufnahme in HEK293 - Zellen, welche entweder mit dem nicht mutierten Transporter (WT) oder dem doppelt mutierten Transporter (C322S/C451M) transfiziert waren, mit den organischen Kationen TEA^+ oder TPA^+ inhibierten. Beide Kationen hemmten die ASP^+ - Aufnahme konzentrationsabhängig mit einem IC_{50} - Wert für TEA^+ von $58 \pm 4 \mu\text{M}$ bzw. $67 \pm 10 \mu\text{M}$ (**Abb.9**) und für TPA^+ von $103 \pm 3 \text{nM}$ bzw. $168 \pm 7 \text{nM}$ (**Abb.10**) beim WT bzw. C322S/C451M - Transporter. Somit blieb auch nach der Doppelmutation TPA^+ gegenüber TEA^+ der potentere Inhibitor des ASP^+ - Transportes. Der Unterschied der IC_{50} - Werte zwischen WT und C322S/C451M war nicht signifikant. Dies ist Ausdruck einer unveränderten apparenten Affinität des rOCT1 für diese beiden Kationen trotz der Doppelmutation.

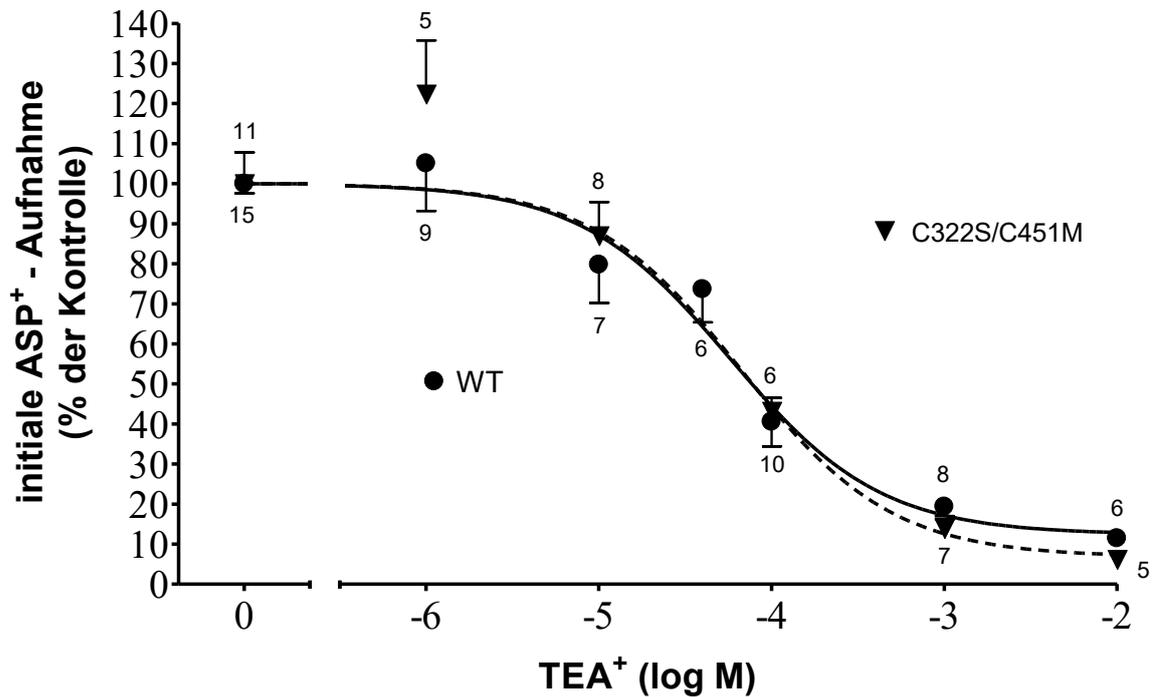


Abb.9. Konzentrationsabhängige Inhibition der initialen ASP⁺ - Aufnahme (1 μ M) durch das organische Kation TEA⁺ bei mit dem nicht mutierten (WT) bzw. doppelt mutierten (C322S/C451M) rOCT1 transfizierten Zellen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM als Prozent der Kontrollexperimente, welche jeweils am gleichen Tag mit Zellen gleichen Alters und gleicher Passage durchgeführt wurden. Zahlen = Anzahl der gemessenen Zellmonolayer. Die aus diesen Kurven errechneten IC₅₀ - Werte sind 58 μ M (WT) bzw. 67 μ M (C322S/C451M) und nicht signifikant verschieden.

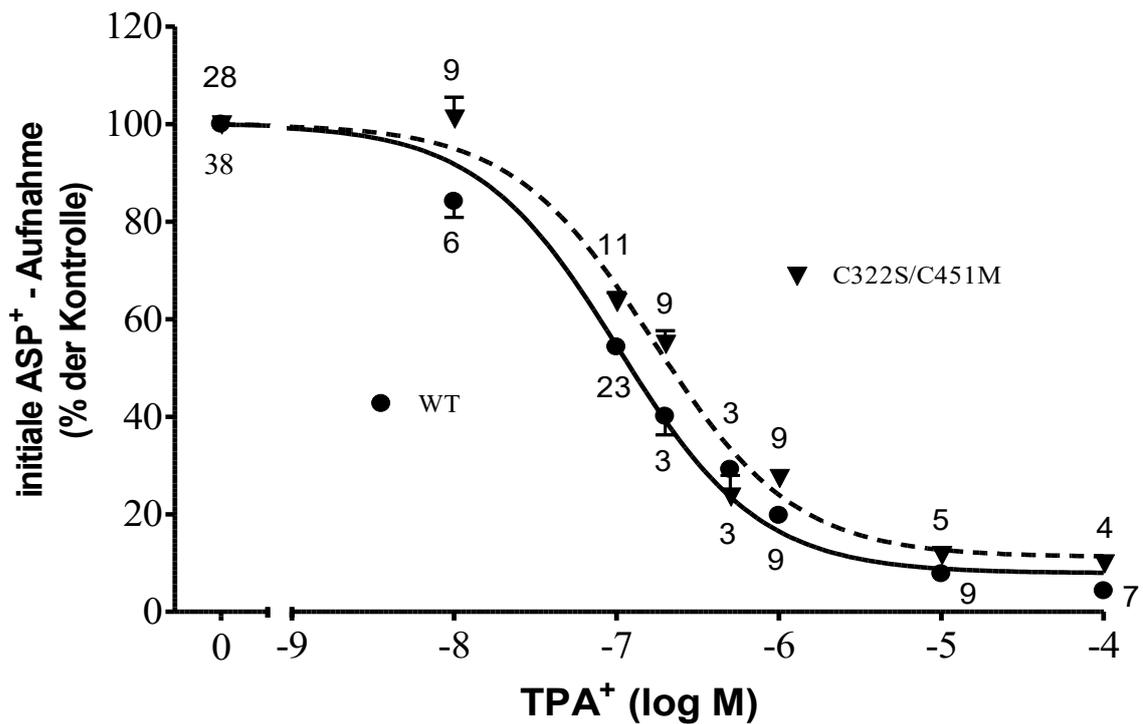


Abb.10. Konzentrationsabhängige Inhibition der initialen ASP^+ - Aufnahme ($1 \mu\text{M}$) durch das organische Kation TPA^+ bei mit dem nicht mutierten (WT) bzw. doppelt mutierten (C322S/C451M) rOCT1 transfizierten Zellen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM als Prozent der Kontrolle, welche jeweils am gleichen Tag mit Zellen gleichen Alters und gleicher Passage durchgeführt wurden. Zahlen = Anzahl der gemessenen Zellmonolayer. Die aus diesen Kurven errechneten IC_{50} - Werte sind 103 nM (WT) bzw. 168 nM (C322S/C451M) und nicht signifikant verschieden.

Da die Transporteraffinität für TEA^+ und TPA^+ aufgrund ihrer fehlenden Eigenfluoreszenz nur indirekt über deren inhibitorische Wirkung auf die direkt messbaren ASP^+ - Aufnahme untersucht werden konnte, wollten wir auch die Frage klären, ob der Verlauf ihrer o.g. Inhibitionskurven durch eine gleichzeitige Affinitätsänderung für ASP^+ beeinflusst wird. So wäre es z.B. durchaus vorstellbar gewesen, dass eine eventuelle Affinitätsänderung für TEA^+ oder TPA^+ durch eine gleichzeitige Affinitätsänderung für ASP^+ gleicher Richtung und gleichen Betrages nicht zur Darstellung kommt. Deshalb bestimmten wir auch den K_m - Wert des rOCT1 für ASP^+ über eine Messung seiner konzentrationsabhängigen zellulären Aufnahme. Allerdings zeigte hier die stets gemessene initiale Aufnahmerate von ASP^+ mit steigender Konzentration keine Sättigung, weil es auch zu einem zunehmenden unspezifischen Eintritt von ASP^+ in die

Zellen durch eine rOCT1 - unabhängige Diffusion über die Zellmembran kommt. Deshalb bestimmten wir zunächst diese rOCT1 - unabhängige zelluläre Aufnahme von ASP^+ mithilfe von nicht transfizierten HEK293 - Zellen (HEK). Auch hier zeigte sich eine konzentrationsabhängige Zunahme des Fluoreszenzsignals, ohne eine Sättigung zu erreichen. Nach Subtraktion dieser Fluoreszenzkurve von der Kurve der mit dem Transporter transfizierten Zellen allerdings, erhielten wir den spezifisch durch rOCT1 vermittelten Transport, und dieser zeigte eine Sättigung. Somit waren wir in der Lage, den K_m - Wert des rOCT1 für ASP^+ zu bestimmen und konnten dadurch nachweisen, dass die Doppelmutation keinen Einfluss auf die ASP^+ - Affinität des Transporters hat (K_m - Wert: $20 \pm 1 \mu M$ für WT (**Abb.11+Abb.13**) und $35 \pm 2 \mu M$ für C322S/C451M (**Abb.12+Abb.13**). Daher waren auch die Befunde aus der o.g. Inhibition der ASP^+ - Aufnahme durch TEA^+ und TPA^+ spezifisch für diese Kationen. Die maximalen Transportraten (V_{max}) für ASP^+ waren zwischen dem WT - Transporter und dem C322S/C451M - Transporter nicht vergleichbar. Ursächlich dafür ist die Annahme, dass bedingt durch die Transfektionsmethode die Transporterzahlen in den transfizierten Zellen höchstwahrscheinlich unterschiedlich sind.

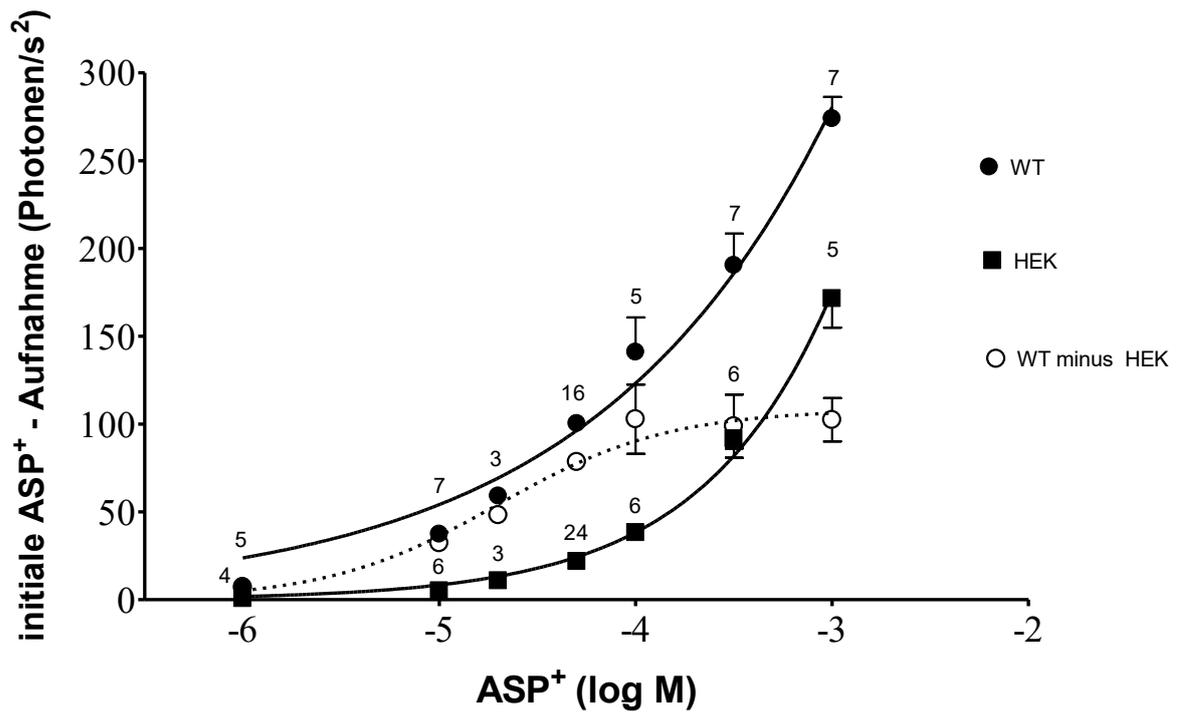


Abb.11. Bestimmung des K_m - Wertes für die spezifische ASP⁺ - Aufnahme durch den nicht mutierten (WT) rOCT1 in die Zellen. Dargestellt ist die fehlende Sättigung der Gesamtaufnahme der mit dem Transporter transfizierten Zellen mit steigender ASP⁺ - Konzentration (WT = obere durchgezogene Linie). Nach Subtraktion der unspezifischen Aufnahme, ermittelt mit nicht transfizierten HEK293 - Zellen (HEK = untere durchgezogene Linie), von dieser Gesamtaufnahme erhielten wir die spezifische Aufnahme durch den nicht mutierten rOCT1 (WT minus HEK = gestrichelte Linie). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM. Zahlen = Anzahl der gemessenen Zellmonolayer. K_m - Wert für ASP⁺ = 20 μ M.

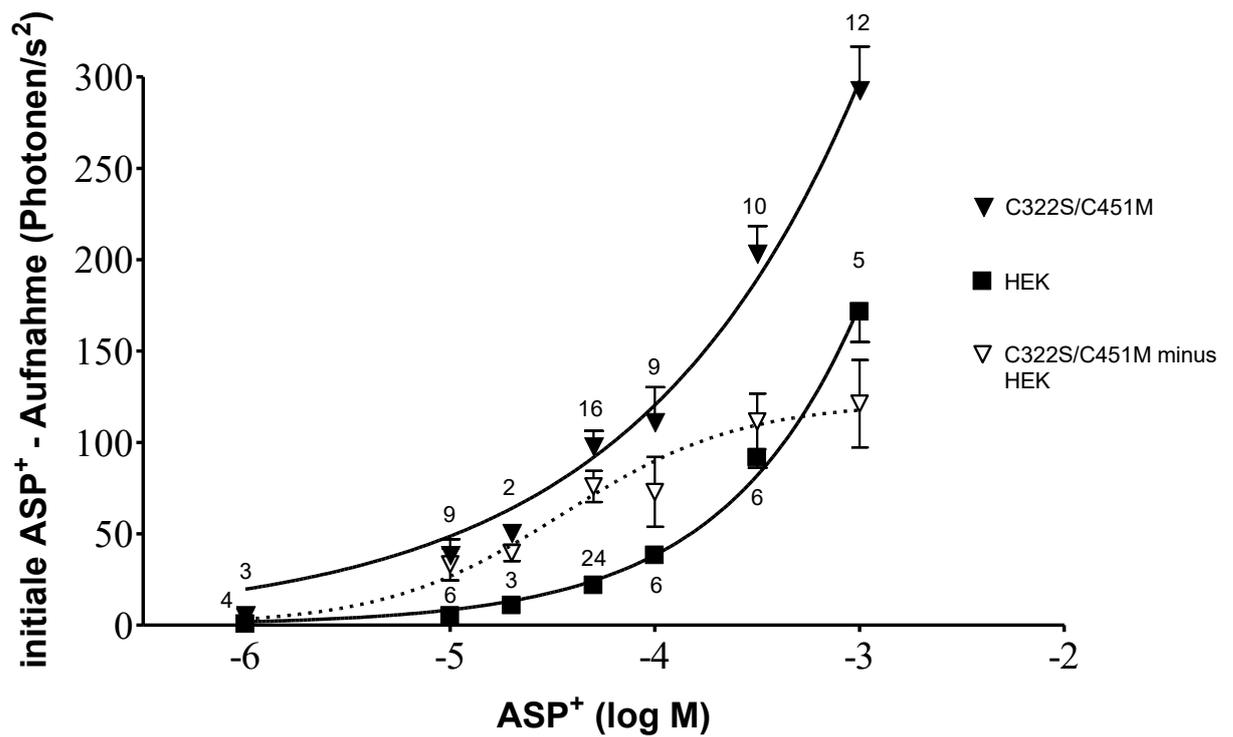


Abb.12. Bestimmung des K_m - Wertes für die spezifische ASP^+ - Aufnahme durch den doppelt mutierten (C322S/C451M) rOCT1 in die Zellen. Nach Subtraktion der unspezifischen Aufnahme, ermittelt mit nicht transfizierten HEK293 - Zellen (HEK = untere durchgezogene Linie), von der Gesamtaufnahme der mit dem doppelt mutierten rOCT1 transfizierten Zellen (C322S/C451M = obere durchgezogene Linie) erhielten wir die spezifische Aufnahme durch den doppelt mutierten rOCT1 (C322S/C451M minus HEK = gestrichelte Linie). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM. Zahlen = Anzahl der gemessenen Zellmonolayer. K_m - Wert für ASP^+ = 35 μ M.

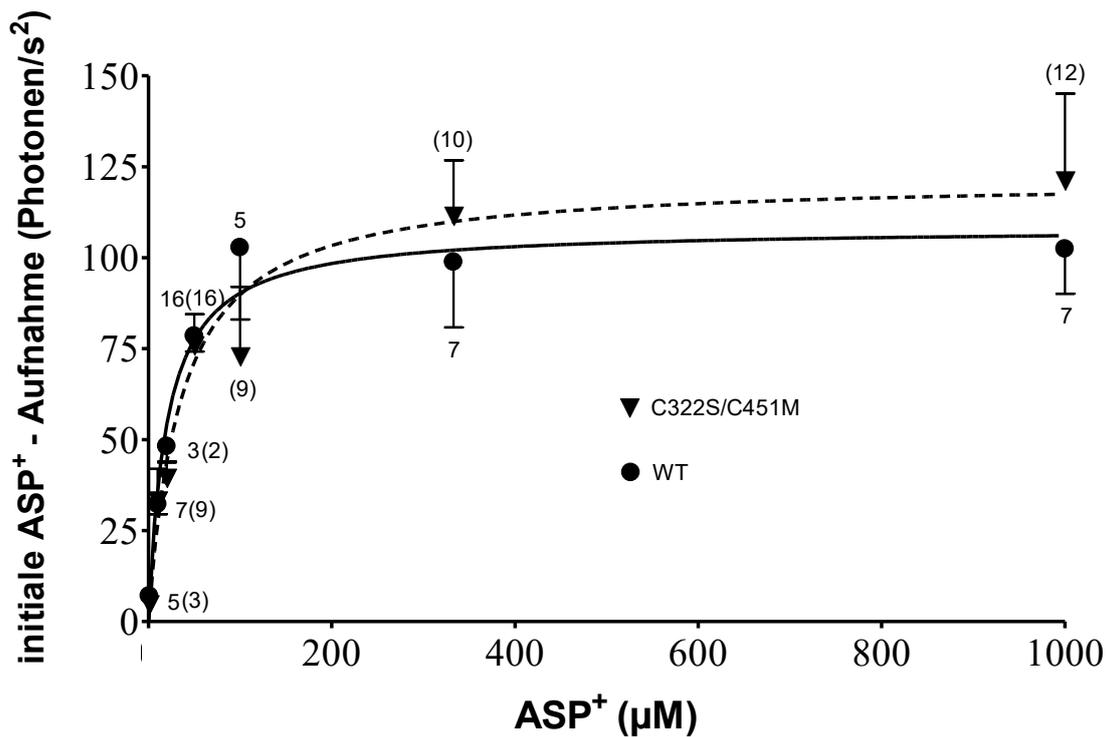


Abb.13. Vergleich der konzentrationsabhängigen spezifischen ASP⁺ - Aufnahme durch den nicht mutierten (WT) und den doppelt mutierten (C322S/C451M) rOCT1 in die Zellen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM. Zahlen = Anzahl der gemessenen Zellmonolayer (in Klammern für C322S/C451M, ohne Klammern für WT). Die K_m - Werte sind 20 μ M für WT und 35 μ M für C322S/C451M und nicht signifikant verschieden.

Um herauszufinden, ob sich die beiden organischen Kationen TEA⁺ und TPA⁺ gegenseitig in ihrem inhibitorischen Effekt auf die ASP⁺ - Aufnahme beeinflussen oder ihre Interaktionsstellen am Transporter sich zwar mit derjenigen von ASP⁺ überlappen, aber dennoch unabhängig voneinander sind, prüften wir, ob sich ihre Wirkungen summieren. Wie in **Abb.14** zu sehen, war der gemeinsame inhibitorische Effekt von TEA⁺ und TPA⁺ in Konzentrationen, welche jeweils für sich allein eine signifikante Hemmung des ASP⁺ - Transportes bei dem nativen rOCT1 bewirkten, nicht größer als der stärkste Einzeleffekt. Dies spricht für eine gemeinsame Interaktionsstelle aller drei Substanzen am nativen rOCT1.

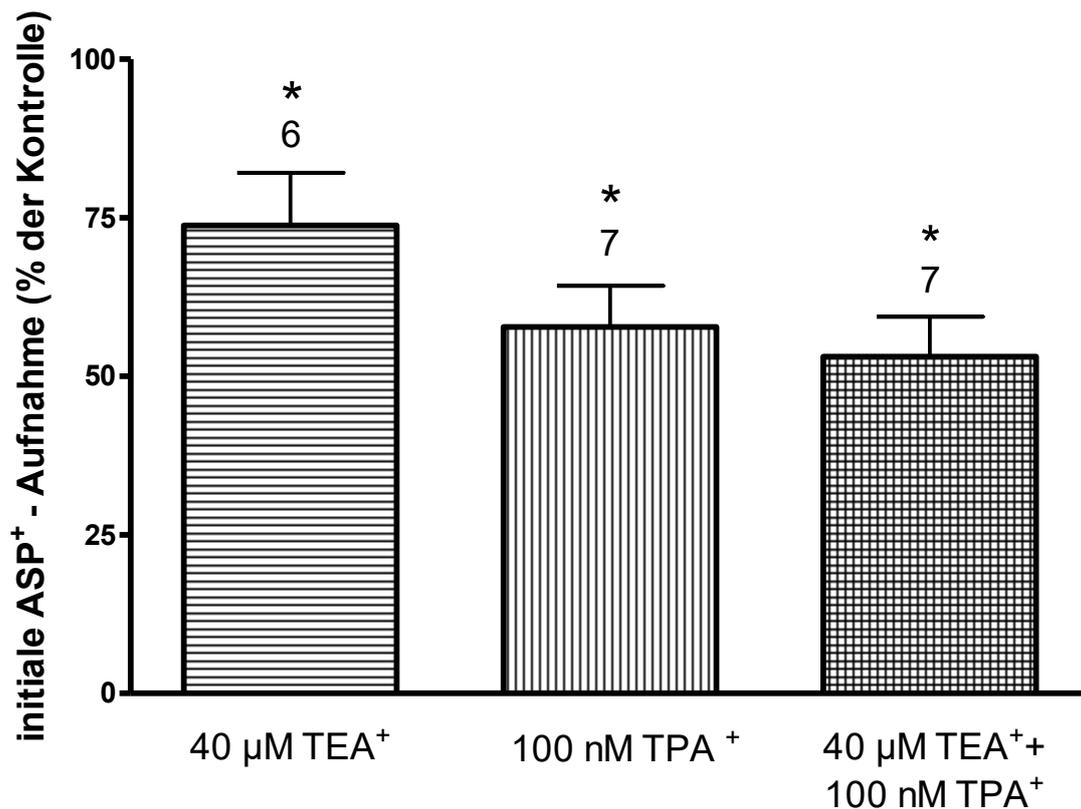


Abb.14. Inhibition der initialen ASP⁺ - Aufnahme (1 μM) durch die organischen Kationen TEA⁺ (40 μM) und TPA⁺ (100 nM) allein und zusammen bei mit dem (WT) rOCT1 transfizierten Zellen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte ± SEM als Prozent der Kontrolle ohne Inhibitoren, welche jeweils am gleichen Tag mit Zellen gleichen Alters und gleicher Passage durchgeführt wurden. Zahlen = Anzahl der gemessenen Zellmonolayer. Die Sternchen zeigen einen signifikanten Unterschied gegenüber den Kontrollen. Der gesamtinhibitorische Effekt war nicht größer als der stärkste Einzeleffekt (ANOVA).

5.2. Einfluss der Einzel - und/oder Doppelmutation auf die Regulation des rOCT1 durch die PKC, p56^{lck} - Tyrosinkinase, MMTS und Calmodulin

Eine Regulation des rOCT1 durch die Proteinkinase C (PKC) und p56^{lck} -Tyrosinkinase ist bekannt ((88) und **Tab.2**). Deshalb untersuchten wir auch die Auswirkungen der Cystein - Mutationen auf diese Regulationswege. Außerdem prüften wir, ob die rOCT1 - Funktion durch die Zugabe des membranpermeablen SH - Gruppenmodulators Methylmethanethiosulfonat (MMTS) oder den Calmodulin - Inhibitor Calmidazolium beeinflusst wird und ob die Doppelmutation dies ändert. Eine 10 - minütige Stimulation

der PKC mit 1 μM des membranpermeablen Diacylglycerol - Analogons 1,2-Dioctanoyl-sn-Glycerol (DOG) führte sowohl beim WT - Transporter als auch beim mutierten C451M - Transporter zu einer signifikanten Stimulation der ASP^+ - Aufnahme in die Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen ohne eine PKC - Stimulation ($+35 \pm 10\%$, $n = 10$ bzw. $+28 \pm 9\%$, $n = 21$ für WT bzw. C451M). Sowohl nach der Doppelmutation (C322S/C451M) als auch Einzelmutation in Position 322 (C322S) war dieser Effekt allerdings aufgehoben ($-9 \pm 12\%$, $n = 8$ bzw. $-4 \pm 9\%$, $n = 10$ für C322S/C451M bzw. C322S). Der bei C322S/C451M und C322S nachgewiesene, leichte inhibitorische Effekt gegenüber den Kontrollen war nicht signifikant (**Abb.15**).

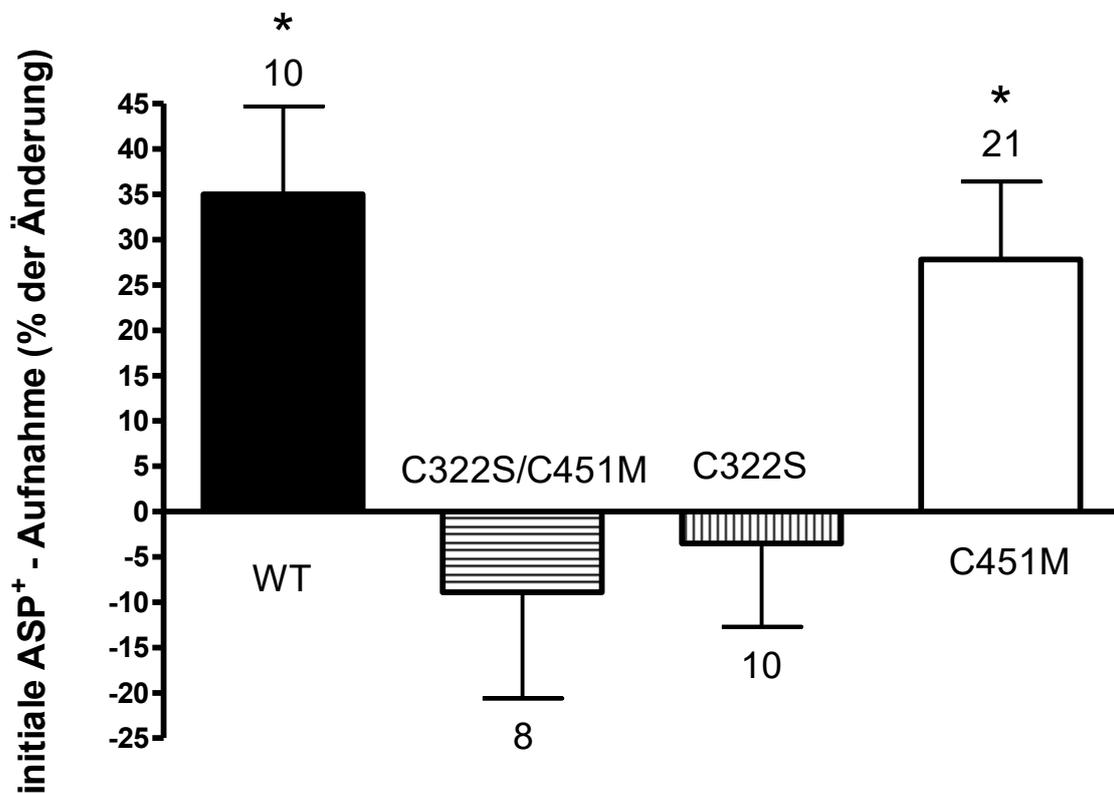


Abb.15. Effekt der Aktivierung der PKC durch 10 min. Inkubation mit 1 μM DOG auf die initiale ASP^+ - Aufnahme (1 μM) bei mit dem nicht mutierten (WT) oder mutierten (C322S/C451M bzw. C322S bzw. C451M) Transporter transfizierten Zellen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM als Prozent der Änderung gegenüber Kontrolleexperimenten ohne PKC - Aktivierung, welche jeweils am gleichen Tag mit Zellen gleichen Alters und gleicher Passage durchgeführt wurden. Zahlen = Anzahl der gemessenen Zellmonolayer. Die Sternchen zeigen einen signifikanten Unterschied gegenüber den Kontrollen. Eine signifikante Stimulation war nur beim WT und C451M nachweisbar.

Eine 10 - minütige Inhibition der p56^{lck} - Tyrosinkinase durch 10 μ M Aminoginistein führte bei allen untersuchten Transportervarianten zu einer signifikanten Inhibition der ASP⁺ - Aufnahme gegenüber den Kontrollzellen ($-46 \pm 7\%$, n = 19, $-52 \pm 5\%$, n = 17, $-38 \pm 7\%$, n = 7 und $-58 \pm 5\%$, n = 10 für WT, C322S/C451M, C322S und C451M) (Abb.16). Dieser inhibitorische Effekt war zwischen den Transportervarianten nicht signifikant verschieden.

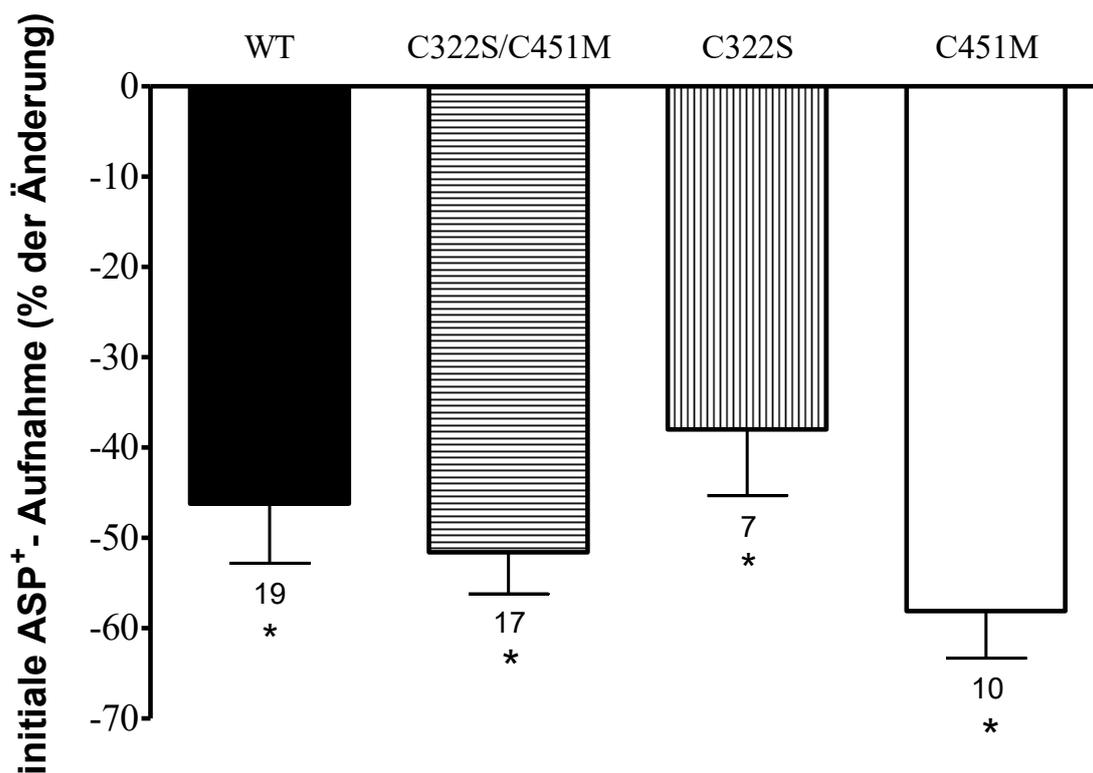


Abb.16. Effekt der Inhibition der p56^{lck} - Tyrosinkinase durch 10 min. Inkubation mit 10 μ M Aminoginistein auf die initiale ASP⁺ - Aufnahme (1 μ M) bei mit dem nicht mutierten (WT) oder mutierten (C322S/C451M bzw. C322S bzw. C451M) Transporter transfizierten Zellen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM als Prozent der Änderung gegenüber Kontrolleexperimenten ohne p56^{lck} - Tyrosinkinase Inhibition, welche jeweils am gleichen Tag mit Zellen gleichen Alters und gleicher Passage durchgeführt wurden. Zahlen = Anzahl der gemessenen Zellmonolayer. Die Sternchen zeigen einen signifikanten Unterschied gegenüber den Kontrollen. Bei allen untersuchten Transportervarianten zeigte sich zwar eine signifikante Inhibition gegenüber den Kontrollen, aber kein signifikanter Unterschied im inhibitorischen Effekt untereinander (ANOVA).

Eine 30 - sekundige Inkubation der mit dem WT - rOCT1 transfizierten Zellen mit 1mM des membranpermeablen SH - Gruppenmodulator Methylmethanethiosulfonat (MMTS) führte zu einer signifikanten Stimulation der ASP⁺ - Aufnahme. Ob die untersuchten Cysteine einen Einfluss auf diesen stimulatorischen Effekt haben, untersuchten wir, indem wir diese Experimente mit Zellen wiederholten, die den doppelt mutierten Transporter exprimierten. Diese zeigten eine gleich große signifikante Stimulation gegenüber den Kontrollen ohne MMTS - Inkubation ($+26 \pm 7\%$, n = 18 bzw. $+26 \pm 8\%$, n = 17 für WT bzw. C322S/C451M). Somit scheinen Cystein 322 und 451 nicht am stimulatorischen MMTS - Effekt beteiligt zu sein. Nach einer 10 - minütigen Inkubation schlug der MMTS - Effekt sowohl bei dem nicht mutierten als auch beim doppelt mutierten Transporter in eine signifikante Inhibition um ($-76 \pm 1\%$, n = 7 bzw. $-74 \pm 6\%$, n = 5 für WT bzw. C322S/C451M) (**Abb.17**). Auch hier bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Transportervarianten.

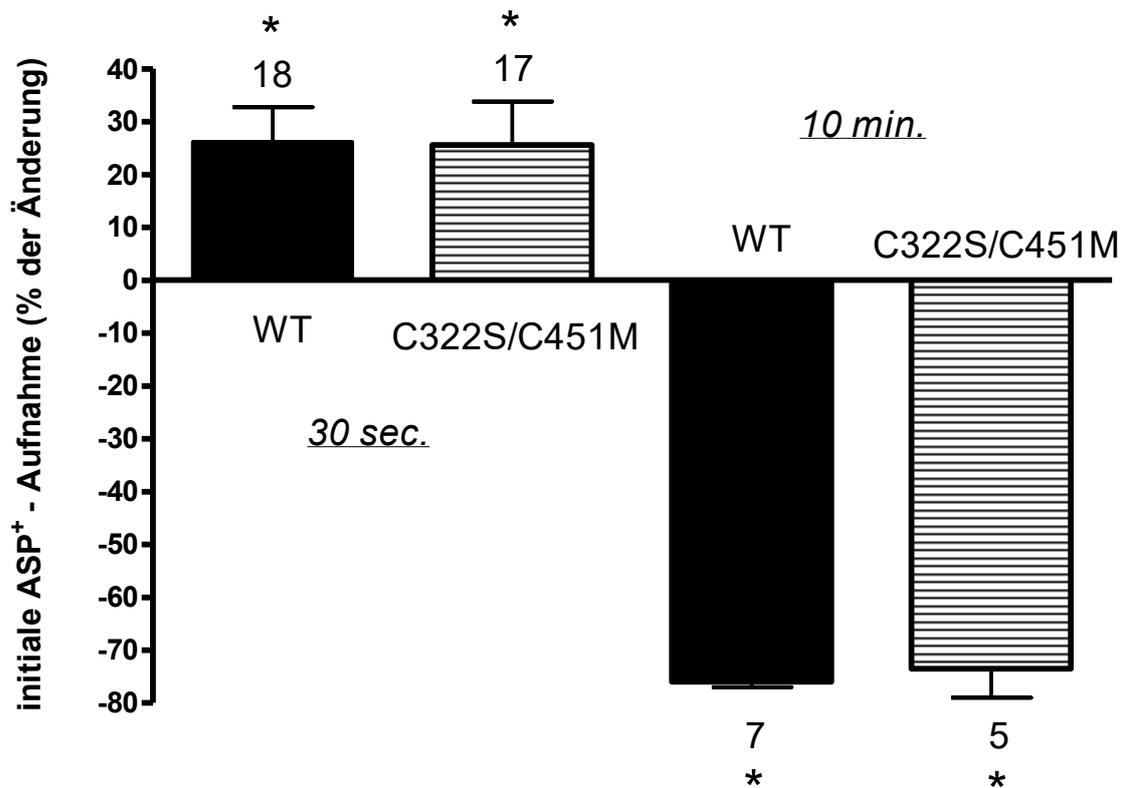


Abb.17. Effekt einer 30 - sekundigen bzw. 10 - minütigen Inkubation mit dem Thiolgruppenmodulator MMTS (1 mM) auf die initiale ASP⁺ - Aufnahme (1 μM) bei mit dem nicht mutierten (WT) oder doppelt mutierten (C322S/C451M) Transporter transfizierten Zellen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte ± SEM als Prozent der Änderung gegenüber Kontrollexperimenten ohne MMTS - Inkubation, welche jeweils am gleichen Tag mit Zellen gleichen Alters und gleicher Passage durchgeführt wurden. Zahlen = Anzahl der gemessenen Zellmonolayer. Die Sternchen zeigen einen signifikanten Unterschied gegenüber den Kontrollen. Sowohl die Stimulation nach 30 sec. als auch die Inhibition nach 10 min. war zwischen beiden Transportervarianten nicht signifikant verschieden.

Um zu testen, ob der Effekt von MMTS nicht nur zeit - sondern auch konzentrationsabhängig ist, inkubierten wir Zellen, die den C322S/C451M - Transporter exprimierten auch 30 Sekunden lang mit unterschiedlichen Konzentrationen von MMTS. Dabei zeigte eine Konzentration von 0,1 mM MMTS keinen Effekt, während 1 mM die ASP⁺ - Aufnahme wie erwähnt signifikant stimulierte und 5 mM sie signifikant hemmte (-1 ± 9%, n = 7, +26 ± 8%, n = 17 und -71 ± 5%, n = 14 für 0,1 mM, 1 mM und 5 mM MMTS) (**Abb.18**).

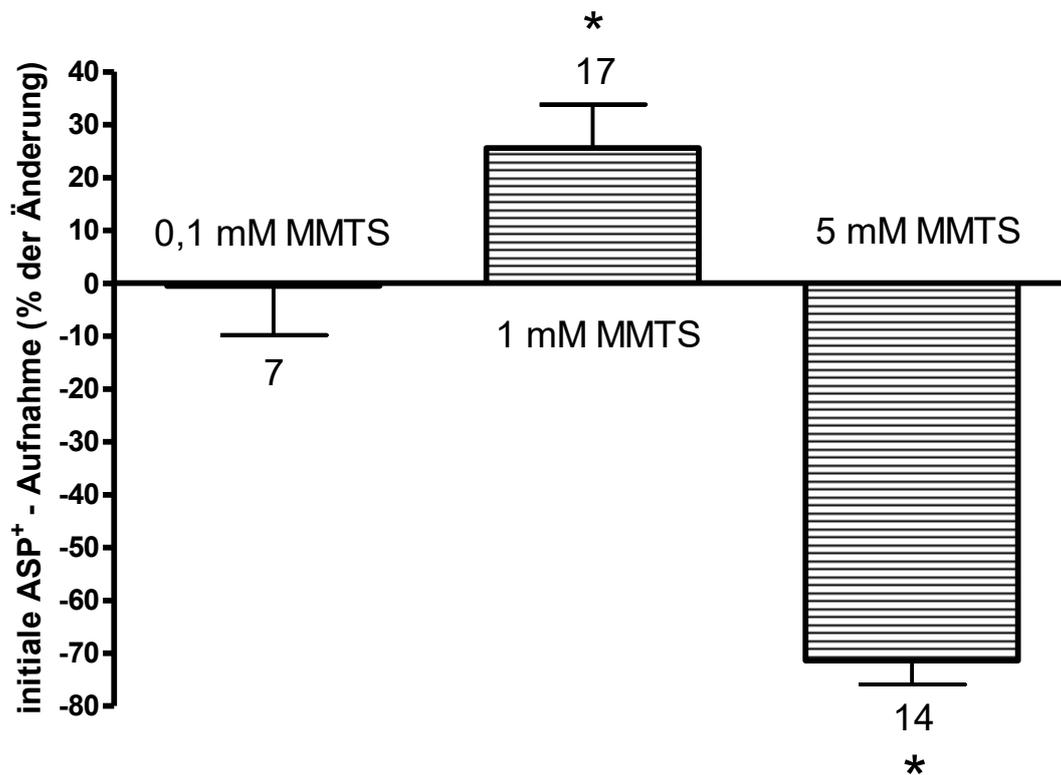


Abb.18. Effekt einer 30 - sekundigen Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen des Thiolgruppenmodulators MMTS auf die initiale ASP⁺ - Aufnahme (1 μ M) bei mit dem doppelt mutierten (C322S/C451M) Transporter transfizierten Zellen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM als Prozent der Änderung gegenüber Kontrollexperimenten ohne MMTS - Inkubation, welche jeweils am gleichen Tag mit Zellen gleichen Alters und gleicher Passage durchgeführt wurden. Zahlen = Anzahl der gemessenen Zellmonolayer. Die Sternchen zeigen einen signifikanten Unterschied gegenüber den Kontrollen. Während 0.1 mM MMTS keinen Effekt zeigte, führte 1 mM zu einer signifikanten Stimulation und 5 mM zu einer signifikanten Hemmung der ASP⁺ - Aufnahme.

Eine Inhibition des Ca²⁺/Calmodulin - Komplexes zeigte bereits bei verschiedenen anderen Transportern eine inhibitorische Wirkung auf den ASP⁺ - Transport (**siehe Tab.2**). Um zu testen, ob dies auch für den rOCT1 zutrifft und ob der Effekt konzentrationsabhängig ist, verglichen wir rOCT1 exprimierende Zellen mit und ohne eine Inkubation mit dem Calmodulininhibitor Calmidazolium. Außerdem verglichen wir den nichtmutierten (WT) mit dem doppelt mutierten (C322S/C451M) Transporter in Bezug auf den Calmidazolium - Effekt. Eine 10 - minütige Inkubation mit 0,1 μ M bzw. 5 μ M Calmidazolium führte sowohl beim WT als auch beim C322S/C451M zu einer

signifikanten Inhibition der ASP⁺ - Aufnahme gegenüber den Kontrollen ohne Inkubation ($-58 \pm 5\%$, $n = 19$ bzw. $-87 \pm 2\%$, $n = 12$ für WT und $-71 \pm 7\%$, $n = 13$ bzw. $-83 \pm 2\%$, $n = 16$ für C322S/C451M mit $0,1 \mu\text{M}$ bzw. $5 \mu\text{M}$ Calmidazolium). Diese Effekte unterschieden sich nicht signifikant zwischen WT und C322S/C451M. Eine Konzentration von $0,01 \mu\text{M}$ reichte beim WT für eine signifikante Inhibition nicht aus ($-20 \pm 7\%$, $n = 4$) (Abb.19).

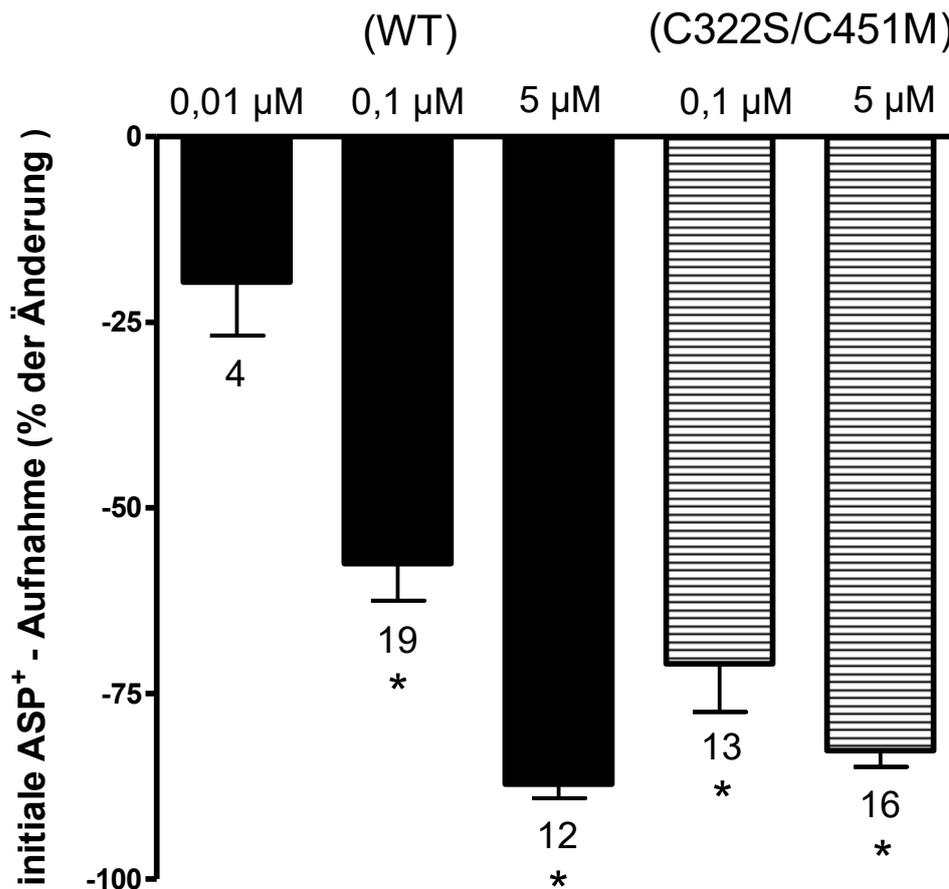


Abb.19. Effekt einer 10 - minütigen Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen des Calmodulin - Inhibitors Calmidazolium auf die initiale ASP⁺ - Aufnahme ($1 \mu\text{M}$) bei mit dem nicht mutierten (WT) bzw. doppelt mutierten (C322S/C451M) Transporter transfizierten Zellen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM als Prozent der Änderung gegenüber Kontrolleexperimenten ohne Calmidazolium - Inkubation, welche jeweils am gleichen Tag mit Zellen gleichen Alters und gleicher Passage durchgeführt wurden. Zahlen = Anzahl der gemessenen Zellmonolayer. Die Sternchen zeigen einen signifikanten Unterschied gegenüber den Kontrollen. Sowohl eine Inkubation mit $0,1 \mu\text{M}$ als auch mit $5 \mu\text{M}$ führten bei beiden Transportervarianten zu einer signifikanten Inhibition gegenüber den Kontrollen, unterschieden sich aber untereinander nicht signifikant. Eine Konzentration von $0,01 \mu\text{M}$ hatte bei dem nativen Transporter keinen signifikanten Effekt.

5.3. Einfluss der Doppelmutation auf die TPA⁺ - Affinitätsänderung durch Calmidazolium

Es ist bekannt, dass eine Inhibition des Ca²⁺/Calmodulin - Komplexes durch Calmidazolium die Affinität des hOCT1 für TEA⁺, Cimetidin und Quinin (25) und die des hOCT2 für TEA⁺ reduziert (21). Wir wollten untersuchen, ob Calmidazolium auch die Affinität des rOCT1 ändert und ob die Doppelmutation diese Wirkung beeinflusst. Dazu verglichen wir die halbmaximalen Konzentrationen für die Inhibition des ASP⁺ - Transportes durch TPA⁺ bei mit dem WT bzw. mit dem C322S/C451M transfizierten Zellen mit und ohne Calmidazolium - Inkubation miteinander. Es zeigte sich nach 10 - minütiger Inkubation mit 0,1 µM Calmidazolium beim WT eine signifikante Verschiebung der Inhibitionskurve nach rechts im Vergleich zu den Kontrollexperimenten ohne eine Inkubation (IC₅₀ - Wert für TPA⁺ ohne bzw. mit Calmidazolium: 103 ± 3 nM bzw. 302 ± 22 nM) (**Abb.20**). Dies spricht für eine reduzierte Affinität des Transporters für dieses Kation durch Calmidazolium. Beim C322S/C451M zeigte sich ebenfalls eine Tendenz zur Affinitätsabnahme unter Calmidazolium, welche noch nicht signifikant war (IC₅₀ - Wert für TPA⁺ ohne bzw. mit Calmidazolium: 168 ± 7 nM bzw. 405 ± 37 nM) (**Abb.21**).

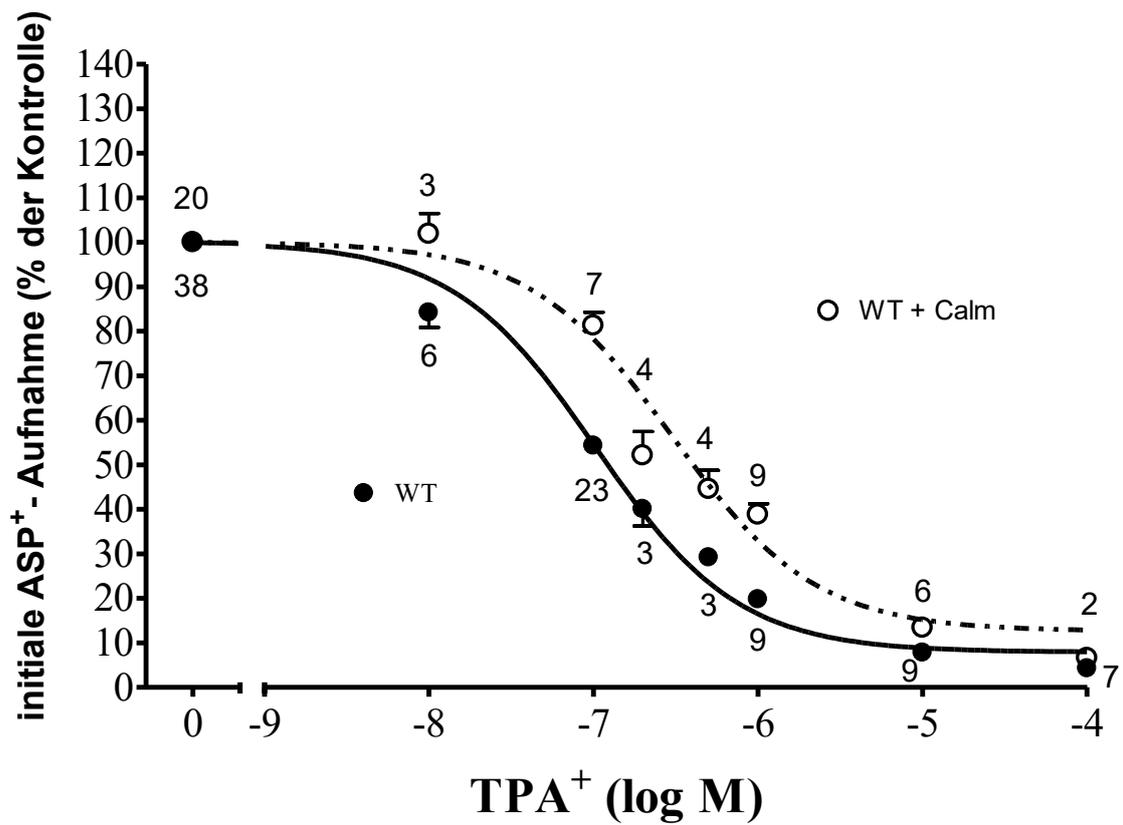


Abb.20. Konzentrationsabhängige Inhibition der initialen ASP⁺ - Aufnahme (1 μ M) durch das organische Kation TPA⁺ bei mit dem nicht mutierten Transporter transfizierten Zellen nach 10 min. Inkubation mit 0,1 μ M Calmidazolium (WT + Calm) bzw. ohne Calmidazolium - Inkubation (WT). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM als Prozent der Kontroll-experimente, welche jeweils am gleichen Tag mit Zellen gleichen Alters und gleicher Passage durchgeführt wurden. Zahlen = Anzahl der gemessenen Zellmonolayer. Die aus diesen Kurven errechneten IC₅₀ - Werte sind 103 nM (WT) bzw. 302 nM (WT + Calm) und signifikant verschieden.

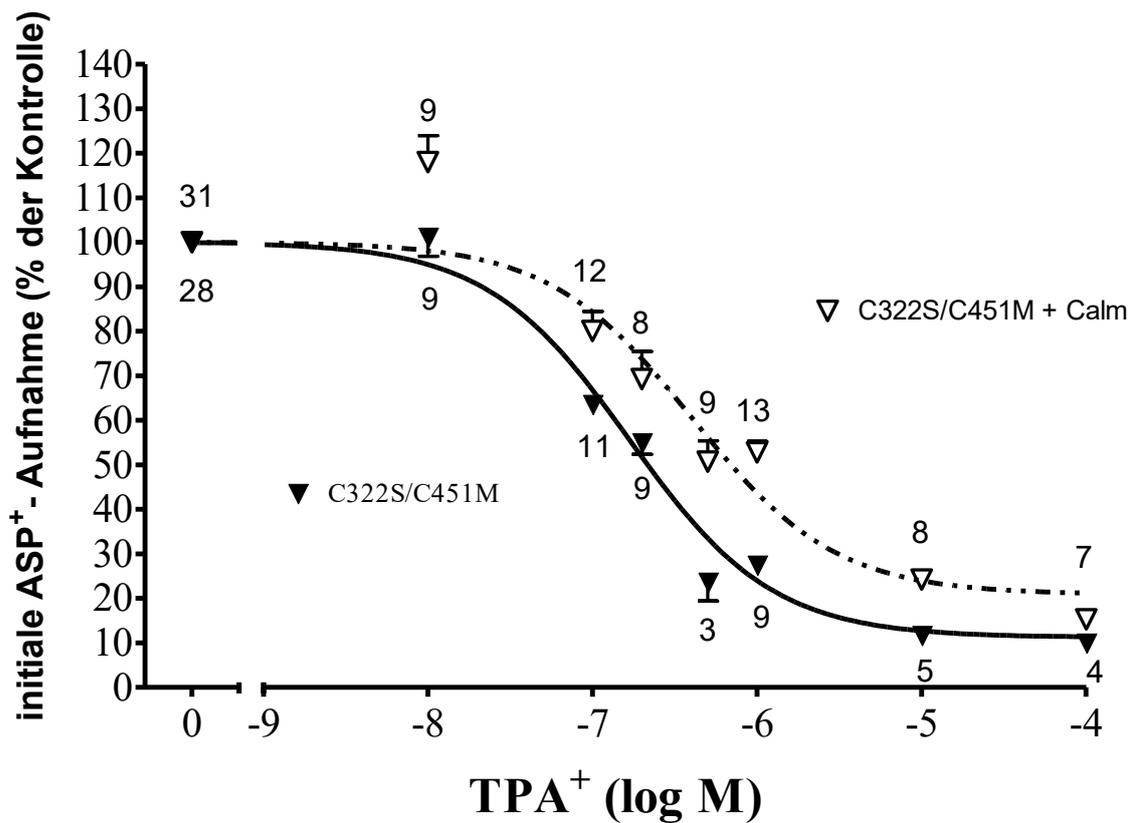


Abb.21. Konzentrationsabhängige Inhibition der initialen ASP⁺ - Aufnahme (1 μ M) durch das organische Kation TPA⁺ bei mit dem doppelt mutierten Transporter transfizierten Zellen nach 10 min. Inkubation mit 0,1 μ M Calmidazolium (C322S/C451M + Calm) bzw. ohne Calmidazolium - Inkubation (C322S/C451M). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM als Prozent der Kontrollexperimente, welche jeweils am gleichen Tag mit Zellen gleichen Alters und gleicher Passage durchgeführt wurden. Zahlen = Anzahl der gemessenen Zellmonolayer. Die aus diesen Kurven errechneten IC₅₀ - Werte sind 168 nM (C322S/C451M) bzw. 405 nM (C322S/C451M + Calm) und noch nicht signifikant verschieden.

Die Gleichheit der apparenten Affinitäten beider Transportervarianten für TPA⁺, die wir schon ohne eine Calmidazolium - Inkubation gesehen haben (s.o.), war auch nach der Inkubation weiterhin vorhanden. Das ist Ausdruck einer Affinitätsänderung gleichen Betrages bei beiden Transportervarianten durch Calmidazolium (IC₅₀ - Quotient mit/ohne Calmidazolium: 2,9 für WT und 2,4 für C322S/C451M (**Abb. 22**)).

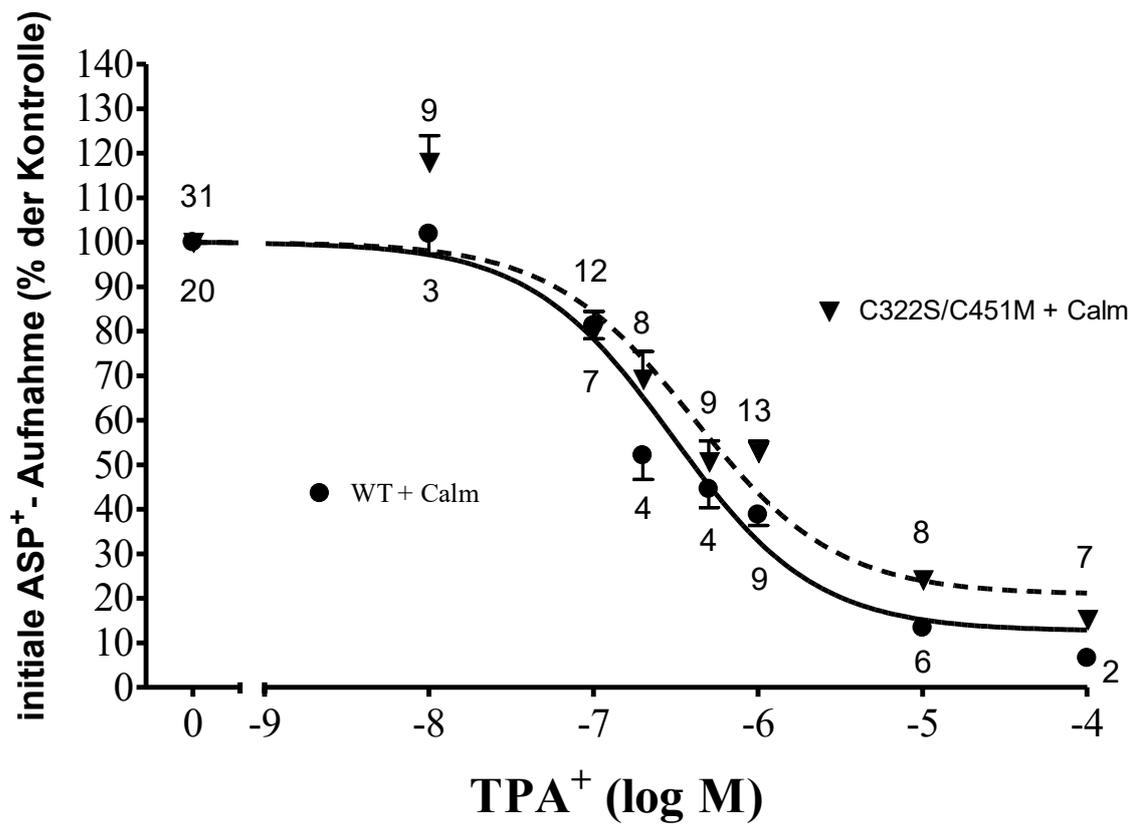


Abb.22. Konzentrationsabhängige Inhibition der initialen ASP⁺ - Aufnahme (1 μ M) durch das organische Kation TPA⁺ bei mit dem nicht mutierten (WT + Calm) bzw. doppelt mutierten (C322S/C451M + Calm) rOCT1 transfizierten Zellen nach 10 min. Inkubation mit 0,1 μ M Calmidazolium. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM als Prozent der Kontrolle, welche jeweils am gleichen Tag mit Zellen gleichen Alters und gleicher Passage durchgeführt wurden. Zahlen = Anzahl der gemessenen Zellmonolayer. Die aus diesen Kurven errechneten IC₅₀ - Werte sind 302 nM (WT + Calm) bzw. 405 nM (C322S/C451M + Calm) und nicht signifikant verschieden.

6. Diskussion

Polyspezifische organische Kationentransporter (OCT) sind beteiligt an der Reabsorption, Distribution und Elimination von organischen Kationen im Organismus. Zu den organischen Kationen gehören sowohl endogene Substanzen als auch zahlreiche Medikamente. Der rOCT1 wird unter anderem in der Niere, der Leber und im Darm der Ratte exprimiert. In der Niere konnte er im S1 und S2 Segment des proximalen Tubulus' nachgewiesen werden. Dort ermöglicht er den Transport organischer Kationen über die basolaterale Membran der Epithelzellen.

In einer vorangegangenen Studie wurde ein stimulierender Effekt des membranpermeablen Thiolgruppenmodulators MMTS auf den Kationentransport des rOCT1 in transfizierten *Xenopus laevis* - Oozyten nachgewiesen (120). Bei der nachfolgenden Untersuchung sämtlicher 16 Cysteine des rOCT1 durch deren mutagenen Austausch ließ sich nach einer simultanen Mutation des Cysteins in Position 322 und 451 dieser stimulierende Effekt auf den Transport des organischen Kations Cholin durch den rOCT1 nicht mehr nachweisen. Auch reduzierte sich die Affinität des Transporters für Cholin durch diese Doppelmutation. Es ist ferner bereits bekannt, dass fünf Aminosäuren (Asp 475, Gln 448, Leu 447, Ala 443 und Arg 440) in der unmittelbaren Nachbarschaft zum Cystein 451 die Substrataffinität des rOCT1 beeinflussen und somit wahrscheinlich Teil seiner Bindungstasche sind (41, 42, 135). Außerdem weiß man, dass eine experimentelle Mutation des Serins in Position 328 der Polypeptidkette des rOCT1, also in der unmittelbaren Nähe zum hier untersuchten Cysteins 322, seine Affinität für TEA^+ , TPA^+ und Quinin reduziert und seine Regulation durch die PKC aufhebt. Die endogene Stimulation des rOCT1 durch die p56^{lck} - Tyrosinkinase bleibt hingegen nach dieser Mutation erhalten (27).

Aufbauend auf diesen Befunden erforschten wir in vorliegender Arbeit die Bedeutung des Cysteins 322 und des Cysteins 451 für die Substrataffinität des rOCT1 und einige bekannte Regulationswege, indem der native rOCT1 mit dem in beiden Cystein - Positionen einzeln oder gleichzeitig mutierten Transporter verglichen wurde.

Dabei konnten wir zeigen, dass der ASP^+ - Transport durch den rOCT1 auch nach gleichzeitiger Mutation dieser beiden Cysteine konzentrationsabhängig durch die organischen Kationen TPA^+ und TEA^+ inhibiert wird, wie dies für den nicht mutierten Transporter bereits bekannt ist. Auch war der inhibitorische Effekt von TPA^+ trotz dieser Mutationen weiterhin stärker als der von TEA^+ ($\text{IC}_{50} - \text{Wert}_{\text{TEA}^+} > \text{IC}_{50} - \text{Wert}_{\text{TPA}^+}$ für WT und C322S/C451M). Offensichtlich verändert sich also die Affinität des Transporters für diese beiden Kationen durch die Doppelmutation nicht. Für das hier untersuchte Cystein 451 wurde schon früher mittels „patch - clamp“ - Technik bei transfizierten Oozyten gezeigt, dass es keinen Einfluss auf die TEA^+ - Bindung am Transporter zu haben scheint, denn auch dort veränderte seine Mutation nicht die Affinität des rOCT1 für TEA^+ (135). Dies bestätigen jetzt unsere Daten. Allerdings konnte in einer anderen Studie mit Einzelmutationen des Transporters in Position S286 bzw. S292, welche wie das Cystein 322 Teil der großen intrazellulären Schleife sind, nachgewiesen werden, dass dadurch zwar die Affinität des rOCT1 für TEA^+ ebenfalls unverändert bleibt, sich die für TPA^+ aber signifikant reduziert (27). Dabei muss bedacht werden, dass der Mechanismus der Inhibition des ASP^+ - Transportes durch TEA^+ und TPA^+ grundlegend verschieden ist. So ist TEA^+ ein lange bekanntes Substrat des rOCT1 (44) und hemmt den ASP^+ - Transport daher kompetitiv. Das hydrophobere TPA^+ (**siehe Abb.1**) wird hingegen selbst nicht durch den rOCT1 transportiert, wie in „patch - clamp“ - Studien aufgrund seiner fehlenden Induktion eines transmembranösen Stromes nachgewiesen werden konnte (41, 8). Dass aber trotz unterschiedlicher Inhibitionsmechanismen auch die Bindungsstelle für TPA^+ innerhalb der Bindungsstasche des rOCT1 liegen muss und sich sogar mit der des TEA^+ überlappt, wiesen wir in dieser Arbeit nach, indem wir den Effekt von TEA^+ und TPA^+ zusammen auf die ASP^+ - Aufnahme in die Zelle prüften. Der gemeinsame inhibitorische Effekt war dabei nicht größer als der größte Einzeleffekt. Bei unterschiedlichen Bindungsstellen hätten wir eine Summation der Effekte erwartet. Dies stützen auch die Ergebnisse von Gorboulev V. et al., indem sie zeigen konnten, dass ein Aminosäureaustausch in Position 475 sowohl die Affinität für TEA^+ als auch für TPA^+ steigert (41). Es ist unwahrscheinlich, dass eine Mutation die Affinität zweier unterschiedlicher Bindungsstellen gleichsinnig beeinflusst.

Wenn man versucht, nur indirekt Aussagen über die Transporteraffinität für eine nicht direkt detektierbare Substanz anhand ihrer inhibitorischen Wirkung auf eine direkt nachweisbare Substanz zu treffen, steht man immer vor dem Problem zu entscheiden, durch welche der beiden Substanzen ein evtl. veränderter Kurvenverlauf bedingt ist. Dementsprechend hätten wir den beobachteten unveränderten ASP^+ - Inhibitionskurvenverlauf für TPA^+ und TEA^+ auch dann erhalten, wenn die Doppelmutation die Affinitäten für die Kationen ASP^+ , TPA^+ und TEA^+ gleichsinnig verändert hätte. Deshalb bestimmten wir auch direkt die ASP^+ - Affinität des unveränderten und doppelt mutierten Transporters durch Erstellen einer konzentrationsabhängigen ASP^+ - Aufnahmekurve und nachfolgender Ermittlung der halbmaximalen Sättigungskonzentration (K_m - Wert). Dabei standen wir allerdings vor dem Problem, dass aufgrund einer mit steigender ASP^+ - Konzentration zunehmenden unspezifischen ASP^+ - Aufnahme in die Zellen die Gesamtaufnahmerate von ASP^+ keine Sättigung zeigte. Somit war auch keine Halbsättigungskonzentration bestimmbar. Um dennoch den K_m - Wert berechnen zu können, eruierten wir zunächst den unspezifischen, also nicht rOCT1 - vermittelten, ASP^+ - Transport in die Zellen für verschiedene Konzentrationen mittels nicht transfizierten HEK293 - Zellen und subtrahierten diesen von der Gesamttransportrate rOCT1 - transfizierter Zellen. Dadurch ergab sich eine konzentrationsabhängige Sättigung des ASP^+ - Transportes in die Zellen, welche den spezifischen Transport durch den rOCT1 repräsentierte. Dieser zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen dem nicht mutierten und dem doppelt mutierten Transporter (K_m - Wert: 20 μM bzw. 35 μM für WT bzw. C322S/C451M).

Zusammenfassend konnten wir also zeigen, dass eine simultane Mutation von C322S und C451M die Affinität des Transporters weder für den nichttransportierten Inhibitor TPA^+ noch für die transportierten Substrate TEA^+ und ASP^+ beeinflusst.

Eine Regulation des rOCT1 durch verschiedene intrazelluläre Regulationswege ist bekannt. So wird in transfizierten HEK293 - Zellen dessen Aktivität durch die PKC, PKA und $p56^{\text{lc}}k$ - Tyrosinkinase stimuliert ((88) und **Tab.2**) und durch das zyklische Nukleotid cGMP gehemmt (113). Deshalb untersuchten wir die Auswirkung der Mutationen C322S und C451M auch auf ausgewählte Regulationswege. Den stimulierenden Effekt der PKC kennzeichnet, dass er mit einer direkten Phosphorylierung

des Transporters vergesellschaftet ist (88). Eine simultane Mutation von fünf potentiellen PKC - Phosphorylierungsstellen des rOCT1 hebt sowohl die Phosphorylierungssteigerung als auch die Aktivitätssteigerung durch die PKC auf (27). Vier dieser Phosphorylierungsstellen sind im Bereich der großen intrazellulären Schleife lokalisiert (**siehe Abb.4**). Eine davon ist das Serin in Position 328. Zwar konnte auch nach dessen isolierter Mutation in der o.g. Studie kein stimulierender Effekt der PKC mehr nachgewiesen werden, die Bestätigung einer direkten Phosphorylierung dieser Aminosäure steht allerdings noch aus. Denn prinzipiell gibt es für einen aufgehobenen Kinase - Effekt als Folge einer Mutation ihrer potentiellen Phosphorylierungsstellen zwei Möglichkeiten:

- 1.) Durch die Mutation wird tatsächlich die direkte Angriffsstelle der Kinase entfernt.
- 2.) Da längst nicht jede potentielle Phosphorylierungsstelle einer Kinase am Transporter auch tatsächlich phosphoryliert wird (139), könnte entweder als Folge einer Konformationsänderung durch eine Mutation ein ganz anderer Angriffspunkt der PKC am Protein unzugänglich werden, oder aber die Stelle einer anderen Kinase, welche wiederum selbst durch die PKC reguliert wird.

Unabhängig davon, welcher dieser Fälle zutrifft, schien es wahrscheinlich, dass die in unserer Arbeit untersuchte Mutation des Cysteins 322 in unmittelbarer Nähe zum Serin 328 ebenfalls einen Einfluss auf die PKC - Regulation des rOCT1 hat. Tatsächlich zeigte sowohl die Einzelmutante C322S als auch die Doppelmutante C322S/C451M einen Verlust des stimulatorischen Effektes einer PKC - Aktivierung auf die Transportrate des rOCT1 (+35% bzw. -4% bzw. -9% für WT bzw. C322S bzw. C322S/C451M). Hingegen blieb bei der Einzelmutation C451M, welche außerhalb der großen intrazellulären Schleife lokalisiert ist, der PKC - Effekt erhalten (+28%). Wahrscheinlich führt daher die Mutation des C322, nicht hingegen die Mutation des C451, zu einer Behinderung der Phosphorylierung des rOCT1 durch die PKC, sei es nun am benachbarten Serin 328 oder an einer anderen ihrer Phosphorylierungsstellen. Entsprechend obiger Überlegungen wäre eine weitere mögliche Erklärung, dass eine andere, durch die PKC regulierte Kinase, ihre Angriffsstelle am rOCT1 als Folge der Mutation des C322 verliert. Außerdem könnte es auch sein, dass die PKC zwar weiterhin in der Lage ist, den Transporter zu phosphorylieren, die Wirkung aber ausbleibt.

Es ist bekannt, dass eine experimentelle PKC - Aktivierung auch die Affinität des rOCT1 für die Kationen TEA⁺ und TPA⁺ erhöht, und dass dieser Transporter einen gewissen basalen Phosphorylierungszustand besitzt (88). Aus dem von uns jetzt nachgewiesenen unveränderten Inhibitionskurvenverlauf für TEA⁺ und TPA⁺ trotz Doppelmutation (s.o.) kann somit auch geschlossen werden, dass eine aufgehobene PKC - Wirkung am rOCT1 im nicht stimulierten Zustand seine Affinität für diese Kationen nicht ändert. Wahrscheinlich ist deshalb auch die bekannte basale Phosphorylierung des rOCT1 nicht PKC vermittelt oder sie reicht nicht aus, um dessen Affinität für diese Kationen zu beeinflussen.

Interessant ist auch die Frage, wie eigentlich eine PKC - Stimulation den ASP⁺ - Transport durch den rOCT1 steigert, welche Eigenschaften des Transporters sich also als Folge seiner gesteigerten Phosphorylierung ändern. Prinzipiell könnte eine vermehrte Transportrate für ASP⁺ entweder durch eine erhöhte Anzahl der Transportermoleküle in der Zellmembran, eine erhöhte Turnover - Rate der Einzeltransporter oder eine Affinitätssteigerung des rOCT1 für ASP⁺ erfolgen. Dass sich die Anzahl der rOCT1 - Transportermoleküle in der Zellmembran durch eine PKC - Stimulation nicht ändert, wurde bereits nachgewiesen und kann daher nicht als Erklärung dienen (27). Geht man davon aus, dass der ASP⁺ - Transport in die Zellen steigt, wenn die Affinität des rOCT1 für dieses Kation zunimmt, wäre eine Rechtsverschiebung der ASP⁺ - Inhibitionskurve durch einen beliebigen kompetitiven Inhibitor die Folge, da ja nun eine höhere Inhibitorkonzentration für eine gleich starke Inhibition nötig wäre. Tatsächlich wiesen Mehrens T. et al. aber in ihrer oben zitierten Arbeit aus dem Jahr 2000 eine unterschiedlich starke Linksverschiebung der ASP⁺ - Inhibitionskurve für TEA⁺, TPA⁺ und Quinin nach einer PKC - Stimulation nach. Diese kann auch nicht Folge einer isolierten Affinitätsabnahme für ASP⁺ sein, denn dann hätten sich die Inhibitionskurven für TEA⁺, TPA⁺ und Quinin um das gleiche Ausmaß verschieben müssen. Tatsächlich war diese Verschiebung aber graduell unterschiedlich, was sich anhand der Quotienten der IC₅₀ - Werte ohne bzw. mit PKC - Stimulation leicht berechnen lässt (58 für TEA⁺, 15 für TPA⁺ und 2 für Quinin) (88). Außerdem wäre bei einer Affinitätsabnahme des rOCT1 für ASP⁺ seine Transportrate gesunken. Dann bliebe noch die Möglichkeit, dass die Affinität des rOCT1 sowohl für TEA⁺,

TPA⁺ und Quinin als auch für ASP⁺ durch eine PKC - Stimulation steigt, für die ersten drei jedoch stärker als für ASP⁺. Damit könnten sowohl die Linksverschiebung der Inhibitionskurven als auch die gesteigerte Transportrate für ASP⁺ durch die PKC in Einklang gebracht werden. Da aber heute davon ausgegangen wird, dass die Bindungsstellen verschiedener Substanzen in der Bindungstasche des rOCT1 nicht identisch sind, sondern sich nur überlappen, ist eine simultane Steigerung der Affinität für solch unterschiedlich gebaute Substanzen durch eine identische Konformationsänderung der Bindungstasche als Folge einer Phosphorylierung zwar möglich, aber eher unwahrscheinlich. Wahrscheinlicher ist, dass sich die Affinität für bestimmte Substanzen erhöht, für andere erniedrigt und für wieder andere gleich bleibt.

O.g. Betrachtungen gelten allerdings nur unter der Annahme, dass die Transportrate des rOCT1 tatsächlich steigt, wenn sich seine Affinität für ein Substrat vergrößert. Es wäre aber durchaus auch denkbar, dass nur eine geringe Zunahme der Affinität die Transportrate tatsächlich erhöht, bei einer weiteren Zunahme diese jedoch wieder abnimmt, weil ein zu fest gebundenes Substrat schlecht wieder auf der anderen Zellmembranseite vom Transporter abgegeben werden kann. Gestützt wird dies durch die Beobachtung, dass bei den Tetraalkylammoniumverbindungen mit steigender Seitenkettenlänge zwar deren Affinität für den hOCT1 steigt, gleichzeitig aber die Transportrate sinkt (144). Darüber hinaus wird durch die Asparaginsäuremutation 475 in der TD 11 des rOCT1 die V_{\max} für TEA⁺, NMN⁺, Cholin stärker gesenkt als für MPP⁺. Da sich gleichzeitig die Affinität für TEA⁺, NMN⁺, Cholin erhöht, jene für MPP⁺ aber gleich bleibt, ist auch das ein Hinweis darauf, dass die intrazelluläre Freisetzung durch eine Affinitätssteigerung reduziert wird und so die Transportrate fällt (41). Die bekannten Unterschiede in der Wirkung von Kinasen auf verschiedene Transportersubtypen, z.B. die der PKC auf den ASP⁺ - Transport durch den rOCT1 (Steigerung), den hOCT1 (kein Effekt) und den hOCT2 (Hemmung) (**siehe Tab.2**), könnten also auch dadurch bedingt sein, dass die PKC durch eine geringe Affinitätssteigerung des Transporters seine Transportrate anhebt (rOCT1), durch eine mittlere Affinitätssteigerung keine Änderung der Transportrate bewirkt (hOCT1) und durch eine massive Affinitätssteigerung diese reduziert (hOCT2).

Letztlich kann die Frage nach der Ursache einer erhöhten ASP^+ - Aufnahme in rOCT1 exprimierende HEK293 - Zellen infolge einer PKC - Stimulation nur durch einen direkten Vergleich der konzentrationsabhängigen ASP^+ - Aufnahmekurven mit und ohne PKC - Stimulation und Bestimmung von K_m und V_{\max} geklärt werden.

Im Gegensatz zur Regulation durch die PKC hatten die untersuchten Cystein - Mutationen keinen Einfluss auf die Regulation des rOCT1 durch die p56^{lck} - Tyrosinkinase. Die Reduktion des rOCT1 - Transportes nach Hemmung dieser Kinase durch Aminoginistin war unverändert erhalten, was auch darauf hinweist, dass der rOCT1 durch die p56^{lck} - Tyrosinkinase endogen aktiviert wird. Dass sich die Mutation des C322 so unterschiedlich auf die Regulation des rOCT1 durch verschiedene Kinasen auswirkt (für PKC aufgehoben, für p56^{lck} - Tyrosinkinase erhalten), könnte wie folgt erklärt werden:

- 1.) Beide Kinasen weisen verschiedene primäre Angriffsstellen am Transporter auf, die durch die Mutation unterschiedlich beeinflusst werden. Dies wird durch die frühere Beobachtung gestützt, dass Mutationen der PKC - Phosphorylierungsstellen des rOCT1 keine Auswirkung auf die Regulation durch die p56^{lck} - Tyrosinkinase haben (27).
- 2.) Trotz der Mutation ist für beide Kinasen zwar weiterhin eine Phosphorylierung des Transporters möglich, nachgeschaltete Reaktionen darauf werden aber verschieden beeinflusst. Dass sich die Wirkung dieser beiden Kinasen auf die Transportereigenschaften unterscheidet, ist bekannt. So führt die PKC z.B. zu der bereits erwähnten Affinitätsänderung für TEA^+ beim rOCT1 (88), nicht hingegen die p56^{lck} - Tyrosinkinase (27). Ein anderes Beispiel für unterschiedliche Effekte von Kinasen ist die Wirkung einer PKC - bzw. PKA - Aktivierung auf den humanen Serotonintransporter (hSERT). Sowohl eine PKC - als auch eine PKA - Aktivierung führen zwar zu einer erhöhten Phosphorylierung dieses Transporters, aber nur die PKC - Aktivierung ändert auch die Serotonin - Aufnahme in Zellen, die diesen Transporter künstlich exprimieren (107). Die Wirkung einer Phosphorylierung durch verschiedene Kinasen ist wahrscheinlich gerade deshalb unterschiedlich, weil ihre Orte der Phosphorylierung am Transporterprotein differieren.
- 3.) Es könnte aber auch sein, dass die p56^{lck} - Tyrosinkinase gar nicht direkt am rOCT1 wirkt, sondern unspezifisch die gesamte Zellfunktion beeinflusst. Damit erklärte sich

auch der ausgeprägte hemmende Effekt einer p56^{lck} - Tyrosinkinase - Inhibition durch Aminoginostein auf den Transport der meisten bisher untersuchten OCT (**siehe Tab.2**).

Eine 30 - sekundige Inkubation mit 1 mM des membranpermeablen Thiolgruppenmodulators MMTS führte sowohl beim nativen Transporter als auch beim doppelt mutierten Transporter zu einer signifikanten Stimulation des ASP⁺ - Transportes (+26% bzw. +26% für WT bzw. C322S/C451M). Dieser Effekt schlug sowohl bei einer längeren Inkubationszeit als auch bei einer höheren Konzentration von MMTS in eine Inhibition um, wahrscheinlich aufgrund einer unspezifischen Wirkung auf weitere Zellproteine durch zelluläre Akkumulation von MMTS. Da MMTS membranpermeabel ist, wird sich seine zytosolische Konzentration zeitabhängig und konzentrationsabhängig erhöhen. Außerdem könnte MMTS auch selbst über den rOCT1 oder andere, von den HEK293 - Zellen endogen exprimierte Transporter (3), in die Zellen gelangen. Dass die untersuchten Cysteine 322 und 451 keinen Einfluss auf den stimulatorischen Effekt von MMTS zu haben scheinen, steht im Gegensatz zu oben genannter Studie, welche den Ausgangspunkt für diese Doktorarbeit bildete (120). Dort zeigte sich nämlich, dass die Doppelmutation C322S/C451M den stimulatorischen Effekt von MMTS auf den Cholintransport bei mit dem rOCT1 transfizierten *Xenopus laevis* - Oozyten aufhob. Diese Diskrepanz ließe sich folgendermaßen erklären:

1.) In Abhängigkeit vom Expressionssystem (dort Oozyten vs. hier HEK293 - Zellen) könnte die Raumstruktur des Transporters, z.B. durch einen unterschiedlichen Phosphorylierungs - oder Glykosylierungsgrad, verschieden sein. Dies ist zumindest für die Struktur der TEA⁺ - Bindungsstelle des hOCT1 zwischen HEK293 - Zellen und CHO (chinese hamster ovary) - Zellen bereits nachgewiesen worden (25). Damit könnte auch die Zugänglichkeit der Seitenketten der Cysteine 322 und 451 für MMTS in Oozyten und HEK293 - Zellen unterschiedlich sein. Dies wäre auch eine Erklärung dafür, warum wir zusätzlich eine wesentlich geringere Stimulation beim WT feststellten als Sturm A. et al.. Auch in experimentell hergestellten und rOCT1 tragende Proteoliposomen, denen die intrazellulären Regulationswege komplett fehlen, ist bereits ein wesentlich geringerer stimulatorischer Effekt von MMTS auf den Kationentransport durch rOCT1 gemessen worden (120).

2.) Die Experimente in der oben zitierten Vorstudie wurden in „patch - clamp“ - Technik bei -50 mV Membranpotential durchgeführt, unsere Experimente hingegen nicht. Da die Funktion des Transporters abhängig vom Membranpotential (20) und dieses zelltypabhängig (Oozyten vs. HEK293 - Zellen) und methodenabhängig (patch - clamp vs. natürliches Membranpotential) unterschiedlich ist, könnte auch dies für die Unterschiede verantwortlich sein.

3.) Die Wirkung von MMTS auf den rOCT1 ist abhängig vom Substrat (dort Cholin vs. hier ASP⁺). Es wurde bereits nachgewiesen, dass die Wirkung von MMTS auf die Effizienz des Kationentransportes substratabhängig ist (120).

4.) MMTS wirkt möglicherweise neben dem Transporter auch auf unterschiedliche weitere regulatorische Zellproteine abhängig vom Expressionssystem ein.

5.) Eine unterschiedliche Membranzusammensetzung von Oozyten vs. HEK293 - Zellen führt zur ungleichen Akkumulation von MMTS in der Membran und damit zu abweichenden MMTS - Konzentrationen am Transporter.

Unsere Interpretation der widersprüchlichen Befunde ist daher folgende: abhängig vom Expressionssystem und/oder Membranpotential ist die Zugänglichkeit des MMTS zu seinem Wirkort am rOCT1 verschieden. In HEK293 - Zellen ist diese Zugänglichkeit durch die Doppelmutation nicht gestört, in Oozyten hingegen schon. Außerdem gehen wir nicht davon aus, dass in unserem Expressionssystem Cystein 322 und Cystein 451 durch MMTS direkt modifiziert werden.

Schließlich untersuchten wir auch den Einfluss der Doppelmutation auf die Regulation des rOCT1 durch den Ca²⁺/Calmodulin - Komplex. Dazu inhibierten wir diesen Komplex durch eine Inkubation der Zellen für 10 Minuten mit Calmidazolium, welches direkt mit den Calziumbindungsstellen des Calmodulins (CaM) interagiert (108). Dadurch reduzierten sich der ASP⁺ - Transport und die Affinität für TPA⁺ sowohl beim WT als auch beim doppelt mutierten Transporter ((ASP⁺ - Transportänderung gegenüber Kontrollen: -87% bzw. -83% für WT bzw. C322S/C451M unter 5µM Calmidazolium) und (IC₅₀ - Werte für ASP⁺ - Inhibition durch TPA⁺: 103 nM bzw. 302 nM für WT und 168 nM bzw. 405 nM für C322S/C451M ohne bzw. mit 0,1 µM Calmidazolium - Inkubation)). Für den ersten Effekt ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen WT und C322S/C451M nachweisen, so dass die untersuchten Cysteine keine

Rolle für die Hemmung des ASP^+ - Transportes durch Calmidazolium zu spielen scheinen. Auch die Inhibitionskurven unter Calmidazolium für TPA^+ waren zwischen den beiden Transportern nicht signifikant verschieden, wie wir es bereits ohne eine Calmidazolium - Inkubation sahen (s.o).

Für alle bisher untersuchten organischen Kationentransporter (rOCT2, hOCT1, hOCT2, hOCT3) (**siehe Tab.2** und (87)) wurde in der Vergangenheit, wie in dieser Arbeit für den rOCT1, ein inhibitorischer Effekt von Calmidazolium nachgewiesen. Dies spricht dafür, dass alle diese OCT durch den Ca^{2+} /Calmodulin - Komplex endogen aktiviert werden und dieser Regulationsweg phylogenetisch sehr alt ist. Interessanterweise scheint aber der Mechanismus, über den der Ca^{2+} /Calmodulin - Komplex die Transporter beeinflusst, subtypabhängig zu sein. So führt seine Inhibition durch Calmidazolium entweder zu einer Affinitätsabnahme des Transporters (rOCT2) (138), (hOCT1) (25) und/oder zu einer Reduktion der Transporterzahl in der Zellmembran (hOCT2) (13, 21). Aufgrund der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse gehen wir auch beim rOCT1 von einer Reduktion der Transporterzahl durch Calmidazolium bei unveränderter Affinität für ASP^+ aus. So kann man nämlich die Ergebnisse, dass Calmidazolium die Transportrate für ASP^+ reduziert, aber gleichzeitig die TPA^+ - Inhibitionskurve für ASP^+ nach rechts verschiebt, zusammen erklären. Wäre die gemessene Reduktion des ASP^+ - Transportes durch Calmidazolium Folge einer Affinitätsabnahme des rOCT1 für ASP^+ , hätte sich die TPA^+ - Inhibitionskurve unter Calmidazolium nicht nach rechts, sondern nach links verschieben müssen, es sei denn, es wäre gleichzeitig zu einer noch stärkeren Affinitätsabnahme für TPA^+ gekommen. Endgültig kann diese Frage aber nur durch eine direkte Quantifizierung der Transportermoleküle in der Membran geklärt werden.

Bis dahin interpretieren wir unsere Ergebnisse so, dass Calmidazolium die Anzahl der rOCT1 - Transportermoleküle in der Zellmembran der transfizierten HEK293 - Zellen reduziert, gleichzeitig die Affinität des rOCT1 für ASP^+ nicht beeinflusst und die für TPA^+ senkt. Somit ergäbe sich wie für den hOCT1 (25) auch für den rOCT1 eine unterschiedliche Beeinflussung der Affinität für verschiedene Substanzen durch Calmidazolium und bestätigt damit die Annahme einer Transporterbindungstasche mit unterschiedlichen, sich nur teilweise überlappenden Bindungsstellen (s.o.).

Die potentiellen Interaktionsstellen des Calmodulins mit seinem Zielprotein kann man sich anhand von dessen Aminosäuresequenz und der daraus resultierenden Ladungsverteilung, Raumstruktur und Hydrophobizität mit einer Datenbank des Ontario Cancer Institutes in Kanada (URL <http://calcium.uhnres.utoronto.ca/ctdb/flash.htm> (abgerufen am 31.03.2015)) bestimmen lassen. Danach liegt die potentielle Bindungsstelle des Calmodulins z.B. beim rOCT2 in der gut zugänglichen intrazellulären Schleife zwischen TD 6 und TD 7, beim hOCT2 hingegen im Bereich der schlecht zugänglichen kurzen intrazellulären Schleife zwischen TD 4 und TD 5. Dementsprechend konnte beim hOCT2 mit „yeast two - hybrid“ - Experimenten, in denen hOCT2 als Köder (*bait*) und Calmodulin als Beute (*prey*) benutzt wurden, auch keine direkte Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen nachgewiesen werden (bisher unpublizierte Ergebnisse von Ciarimboli G et al.). Auch die potentielle Interaktionsstelle des Calmodulins mit dem rOCT1 liegt in einer kurzen intrazellulären Schleife, nämlich der zwischen der TD 2 und TD 3 (**siehe Abb.4**). Dies ist wahrscheinlich der Grund, weshalb die in dieser Arbeit untersuchte Mutation C322 in der großen intrazellulären Schleife zwischen TD 6 und TD 7 keinen Einfluss auf den Effekt einer Calmodulin - Inhibition hat.

Es könnte aber auch sein, dass Calmodulin nur indirekt über Kinasen auf den Transporter einwirkt. Denn auch eine Inhibition der im Calmodulin - Signaltransduktionsweg nachgeschalteten Calmodulin - abhängigen Protein Kinase II (CaMKII) führt bei allen bisher untersuchten OCT zu einer Reduktion der Transportrate und zeigt, dass diese Kinase die Transporter endogen aktiviert (**siehe Tab.2**). Da der inhibitorische Effekt einer Calmodulin - Inhibition auf den rOCT2 den einer alleinigen Inhibition der CaMKII übersteigt, ist auch eine Beteiligung weiterer Mediatoren wahrscheinlich (138). Tatsächlich kann eine andere bekannte Kinase der Calmodulin - Signalkaskade, nämlich die Myosin - light - chain - Kinase (MLCK), den Transport durch organische Kationentransporter ebenfalls beeinflussen. Ihr Effekt ist allerdings subtypabhängig, denn ihre Inhibition wirkt sich zwar nicht auf den Transport des hOCT1 (25) und rOCT2 (138) aus, auf den des hOCT2 hingegen schon (21) (**siehe Tab.2**). Möglicherweise ist gerade diese MLCK in der Reduktion der Transporterzahl involviert, welche als Folge einer Calmodulin - Inhibition durch Calmidazolium bisher nur beim hOCT2 nachgewiesen werden konnte (13). Da wir auch beim rOCT1 von einer Transporterzahlreduktion

durch Calmidazolium ausgehen, könnte dies auch für ihn zutreffen. Allerdings wurde uns durch die o.g. Phosphorylierungsdatenbank der Technischen Universität Dänemarks keine potentielle Phosphorylierungsstelle der MLCK am rOCT1 ausgewiesen. Weitere Experimente müssen daher zeigen, ob diese Kinase auch bei der von uns postulierten Reduktion der membranösen rOCT1 - Anzahl durch Calmidazolium eine Rolle spielt. Dies ist leicht möglich, da man spezifische Inhibitoren jener Kinase kennt.

7. Zusammenfassung

In der hier vorgelegten Doktorarbeit wurde die Bedeutung der Cysteine in Position 322 und 451 des organischen Kationentransporters Typ 1 der Ratte (rOCT1) für dessen Substrataffinität und Regulation untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass sich durch die simultane Mutation dieser beiden Cysteine die Affinität des rOCT1 weder für das nichttransportierte Kation TPA⁺ signifikant ändert noch für dessen Substrate TEA⁺ und ASP⁺. Außerdem führte die Einzelmutation C322S, nicht hingegen die Einzelmutation C451M, zu einem Verlust der stimulatorischen Wirkung einer PKC - Aktivierung auf den ASP⁺ - Transport. Keine der untersuchten Mutationen veränderte die regulatorische Wirkung der p56^{lck} - Tyrosinkinase. Die Doppelmutation C322S/C451M hatte auch keinen Einfluss auf die Wirkung einer Calmidazolium - und MMTS - Inkubation auf den rOCT1.

Wegen der pharmakologischen und physiologischen Relevanz der OCT ist ein genaues Verständnis ihrer Struktur, Funktionsweise und Regulation von großer Bedeutung. Weitere Forschungen in diesem Bereich trügen dazu bei, die Medikamentenentwicklung und Therapie zu optimieren.

8. Referenzen

1. **Abramson J, Smirnova I, Kasho V, Verner G, Iwata S, Kaback HR (2003)** The lactose permease of *Escherichia coli*: overall structure, the sugar binding site and the alternating access model for transport. *FEBS Letters* 555: 96-101
2. **Abramson J, Smirnova I, Kasho V, Verner G, Kaback HR, Iwata S (2003)** Structure and mechanism of lactose permease of *Escherichia coli*. *Science* 301: 610-615
3. **Ahlin G, Karlsson J, Pedersen JM, Gustavsson L, Larsson R, Matsson P, Norinder U, Bergström CAS, Artursson P (2008)** Structural requirements for drug inhibition of the liver specific human organic cation transport protein 1. *Journal of Medical Chemistry* 51: 5932-5942
4. **Ahn SY, Eraly SA, Tsigelny I, Nigam SK (2009)** Interaction of organic cations with organic anion transporters. *The Journal of Biological Chemistry* 284(45): 31422-31430
5. **Anzai N, Miyazaki H, Noshiro R, Khamdang S, Chairoungdua A, Shin HJ, Enomoto A, Sakamoto S, Hirata T, Tomita K, Kanai Y, Endou H (2004)** The multivalent PDZ domain-containing protein PDZK1 regulates transport activity of renal urate-anion exchanger URAT1 via its C terminus. *The Journal of Biological Chemistry* 279(44): 45942-45950
6. **Aoki M, Terada T, Kajiwara M, Ogasawara K, Ikai I, Ogawa O, Katsura T, Inui KI (2008)** Kidney-specific expression of human organic cation transporter 2 (OCT2/SLC22A2) is regulated by DNA methylation. *American Journal of Physiology Renal Physiology* 295: F165-F170
7. **Aoyama N, Takahashi N, Kitaichi K, Ishihara R, Saito S, Maeno N, Ji X, Takagi K, Sekine Y, Iyo M, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujike H, Iwata N, Inada T, Ozaki N (2006)** Association between gene polymorphisms of SLC22A3 and methamphetamine use disorder. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 30(10): 1644-1649
8. **Arndt P, Volk C, Gorboulev V, Budiman T, Popp C, Ulzheimer-Teuber I, Akhoundova A, Koppatz S, Bamberg E, Nagel G, Koepsell H (2001)** Interaction of cations, anions, and weak base quinine with rat renal cation transporter rOCT2 compared with rOCT1. *American Journal of Physiology Renal Physiology* 281: 454-468
9. **Asaka JI, Terada T, Okuda M, Katsura T, Inui KI (2006)** Androgen receptor is responsible for rat organic cation transporter 2 gene regulation but not for rOCT1 and rOCT3. *Pharmaceutical Research* 23(4): 697-704
10. **Barendt WM und Wright SH (2002)** The human organic cation transporter (hOCT2) recognizes the degree of substrate ionisation. *The Journal of Biological Chemistry* 277(25): 22491-22496
11. **Bednarczyk D, Ekins S, Wikel JH, Wright SH (2003)** Influence of molecular structure on substrate binding to the human organic cation transporter, hOCT1. *Molecular Pharmacology* 63(3): 489-498

12. **Beuers U, Throckmorton DC, Anderson MS, Isales CM, Thasler W, Kullak-Ublick GA, Sauter G, Koebe HG, Paumgartner G, Boyer JL (1996)** Tauroursodeoxycholic acid activates protein kinase C in isolated rat hepatocytes. *Gastroenterology* 110(5): 1553-1563
13. **Biermann J, Lang D, Gorboulev V, Koepsell H, Sindic A, Schröter R, Zvirbliene A, Pavenstädt H, Schlatter E, Ciarimboli G (2006)** Characterization of regulatory mechanisms and states of human organic cation transporter 2. *American Journal of Physiology Cell Physiology* 290: 1521-1531
14. **Bondio MG und Michl S (2010)** Individualisierte Therapie. Die neue Medizin und ihre Versprechen. *Deutsches Ärzteblatt* 107(21): 934-936
15. **Brast S, Grabner A, Sucic S, Sitte HH, Hermann E, Pavenstädt H, Schlatter E, Ciarimboli G (2012)** The cysteines of the extracellular loop are crucial for trafficking of human organic cation transporter 2 to the plasma membrane and are involved in oligomerization. *The FASEB Journal* 26(3): 976-986
16. **Breidert T, Spitzenberger F, Gründemann D, Schömig E (1998)** Catecholamine transport by the organic cation transporter type 1 (OCT1). *British Journal of Pharmacology* 125: 218-224
17. **Brockmöller J, Kirchheiner J, Meisel C, Roots I (2000)** Pharmacogenetic diagnostics of cytochrome P450 polymorphisms in clinical drug development and in drug treatment. *Pharmacogenomics* 1(2): 125-151
18. **Burckhardt G und Wolff NA (2000)** Structure of renal organic anion and cation transporters. *American Journal of Physiology Renal Physiology* 278: 853-866
19. **Busch AE, Quester S, Ulzheimer JC, Gorboulev V, Akhoundova A, Waldegger S, Lang F, Koepsell H (1996)** Monamine neurotransmitter transport mediated by the polyspecific cation transporter rOCT1. *FEBS Letters* 395: 153-156
20. **Busch AE, Quester S, Ulzheimer JC, Waldegger S, Gorboulev V, Arndt P, Lang F, Koepsell H (1996)** Electrogenic properties and substrate specificity of the polyspecific rat cation transporter rOCT1. *The Journal of Biological Chemistry* 271(51): 32599-32604
21. **Cetinkaya I, Ciarimboli G, Yalcinkaya G, Mehrens T, Velic A, Hirsch JR, Gorboulev V, Koepsell H, Schlatter E (2003)** Regulation of human organic cation transporter hOCT2 by PKA, PI3K, and calmodulin-dependent kinases. *American Journal of Physiology Renal Physiology* 284: 293-302
22. **Chen R und Nelson JA (2000)** Role of organic cation transporters in the renal secretion of nucleosides. *Biochemical Pharmacology* 60: 215-219
23. **Chen R, Jonker JW, Nelson JA (2002)** Renal organic cation and nucleoside transport. *Biochemical Pharmacology* 64: 185-190
24. **Chen Y, Zhang S, Sorani M, Giacomini KM (2007)** Transport of paraquat by human organic cation transporters and multidrug and toxic compound extrusion family. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 322(2): 695-700
25. **Ciarimboli G, Struwe K, Arndt P, Gorboulev V, Koepsell H, Schlatter E, Hirsch J (2004)** Regulation of the human organic cation transporter hOCT1. *Journal of Cellular Physiology* 201: 420-428
26. **Ciarimboli G, Ludwig T, Lang D, Pavenstädt H, Koepsell H, Piechota HJ, Haier J, Jaehde U, Zisowsky J, Schlatter E (2005)** Cisplatin nephrotoxicity is critically mediated via the human organic cation transporter 2. *American Journal of Pathology* 167(6): 1477-1484

27. **Ciarimboli G, Koepsell H, Iordanova M, Gorboulev V, Dürner B, Lang D, Edemir B, Schröter R, Van le T, Schlatter E (2005)** Individual PKC-phosphorylation sites in organic cation transporter 1 determine substrate selectivity and transport regulation. *Journal of the American Society of Nephrology* 16: 1562-1570
28. **Ciarimboli G und Schlatter E (2005)** Regulation of organic cation transport. *Pflugers Archiv – European Journal of Physiology* 449: 423-441
29. **Ciarimboli G, Deuster D, Knief A, Sperling M, Holtkamp M, Edemir B, Pavenstädt H, Lanvers – Kaminsky C, am Zehnhoff – Dinnesen A, Schinkel AH, Koepsell H, Jürgens H, Schlatter E (2010)** Organic cation transporter 2 mediates cisplatin – induced oto – and nephrotoxicity and is a target for protective interactions. *The American Journal of Pathology* 176(3): 1169-1180
30. **Denk GU, Soroka CJ, Mennone A, Koepsell H, Beuers U, Boyer JL (2004)** Down-regulation of the organic cation transporter 1 of rat liver in obstructive cholestasis. *Hepatology* 39(5): 1382-1389
31. **Dresser MJ, Xiao G, Leabman MK, Gray AT, Giacomini KM (2002)** Interaction of n-tetraalkylammonium compounds and biguanides with a human renal organic cation transporter (hOCT2). *Pharmaceutical Research* 19(8): 1244-1247
32. **Dudley AJ, Bleasby K, Brown CDA (2000)** The organic cation transporter OCT2 mediates the uptake of beta-adrenoceptor antagonists across the apical membrane of renal LLC-PK₁ cell monolayers. *British Journal of Pharmacology* 131(1): 71-79
33. **Eraly SA, Hamilton BA, Nigam SK (2003)** Organic anion and cation transporters occur in pairs of similar and similarly expressed genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 300: 333-342
34. **Eraly SA, Monte JC, Nigam SK (2004)** Novel slc22 transporter homologs in fly, worm, and human clarify the phylogeny of organic anion and cation transporters. *Physiological Genomics* 18: 12-24
35. **Fleck C und Bräunlich H (1984)** Methods in testing interrelationship between excretion of drugs via urine and bile. *Pharmacology & Therapeutics* 25: 1-22
36. **Fleck C und Bräunlich H (1995)** Renal handling of drugs and amino acids after impairment of kidney or liver function – influences of maturity and protective treatment. *Pharmacology & Therapeutics* 67(1): 53-77
37. **Fouda AK, Fauth C, Roch-Ramel F (1990)** Transport of organic cations by kidney epithelial cell line LLC – PK1. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 252(1): 286-292
38. **Fritsch EF, Lawn RM, Maniatis T (1980)** Molecular cloning and characterization of the human beta – like globin gene cluster. *Cell* 19: 959-972
39. **Goralski KB und Sitar DS (1999)** Tetraethylammonium and amantadine identify distinct organic cation transporters in rat renal cortical proximal and distal tubules. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 290(1): 295-302
40. **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 and Cell Biology* 16(7): 871-881
41. **Gorboulev V, Volk C, Arndt P, Akhoundova A, Koepsell H (1999)** Selectivity of the polyspecific cation transporter rOCT1 is changed by mutation of aspartate 475 to glutamate. *Molecular Pharmacology* 56: 1254-1261

42. **Gorboulev V, Shatskaya N, Volk C, Koepsell H (2005)** Subtype-specific affinity for corticosterone of rat organic cation transporters rOCT1 and rOCT2 depends on three amino acids within the substrate binding region. *Molecular Pharmacology* 67(5): 1612-1619
43. **Gorbunov D, Gorboulev V, Shatskaya N, Mueller T, Bamberg E, Friedrich T, Koepsell H (2008)** High-affinity cation binding to organic cation transporter 1 induces movement of helix 11 and blocks transport after mutations in a modeled interaction domain between two helices. *Molecular Pharmacology* 73(1): 50-61
44. **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
45. **Gründemann D, Babin-Ebell J, Martel F, Örding N, Schmidt A, Schömig E (1997)** Primary structure and functional expression of the apical organic cation transporter from the kidney epithelial LLC-PK₁ cells. *The Journal of Biological Chemistry* 272(16): 10408-10413
46. **Gründemann D, Schechinger B, Rappold GA, Schömig E (1998)** Molecular identification of the corticosterone – sensitive extraneuronal catecholamine transporter. *Nature Neuroscience* 1(5): 349-351
47. **Hasannejad H, Takeda M, Narikawa S, Huang XL, Enomoto A, Taki K, Niwa T, Jung SH, Onozato ML, Tojo A, Endou H (2004)** Human organic cation transporter 3 mediates the transport of antiarrhythmic drugs. *European Journal of Pharmacology* 499: 45-51
48. **Hayer-Zillgen M, Brüss M, Bönisch H (2002)** Expression and pharmacological profile of the human organic cation transporters hOCT1, hOCT2 and hOCT3. *British Journal of Pharmacology* 136(6): 829-836
49. **He L, Vasiliou K, Nebert DW (2009)** Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene superfamily. *Human Genomics* 3(2): 195-206.
50. **Hediger MA, Romero MF, Peng JB, Rolfs A, Takanaga H, Bruford EA (2004)** The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 447: 465-468
51. **Hermann LS, Schersten B, Bitzen PO, Kjellström T, Lindgärde F, Melander A (1994)** Therapeutic comparison of metformin and sulfonylurea, alone and in various combinations. *Diabetes Care* 17(10): 1100-1109
52. **Hilgendorf C, Ahlin G, Seithel A, Artursson P, Ungell A-L, Karlsson J (2007)** Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney and organotypic cell lines. *Drug Metabolism and Disposition* 35(8): 1333-1340
53. **Hirsch JR, Loo DDF, Wright EM (1996)** Regulation of Na⁺/Glucose cotransporter expression by protein kinases in xenopus leavis oocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 271(25): 14740-14746
54. **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. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 268(2): 897-901
55. **Hong M, Xu W, Yoshida T, Tanaka K, Wolff DJ, Zhou F, Inouye M, You G (2005)** Human organic anion transporter hOAT1 forms homooligomers. *The Journal of Biological Chemistry* 280(37): 32285-32290

56. **Jonker JW, Wagenaar E, Mol CAAM, Buitelaar M, Koepsell H, Smit JW, Schinkel AH (2001)** Reduced hepatic uptake and intestinal excretion of organic cations in mice with a targeted disruption of the organic cation transporter 1 (Oct1[Slc22a1]) gene. *Molecular and Cellular Biology* 21(16): 5471–5477
57. **Jonker JW, Wagenaar E, van Eijl S, Schinkel AH (2003)** Deficiency in the organic cation transporters 1 and 2 (Oct1/Oct2[Slc22a1/Slc22a2]) in mice abolishes renal secretion of organic cations. *Molecular and Cellular Biology* 23(21): 7902–7908
58. **Jonker JW und Schinkel AH (2004)** Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2, and 3(SLC22A1-3). *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 308(1): 2-9
59. **Kant JA, Fornace AJ, Saxe D, Simon MI, McBride OW, Crabtree GR (1985)** Evolution and organization of the fibrinogen locus on chromosome 4: gene duplication accompanied by transposition and inversion. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 82: 2344-2348
60. **Karbach U, Kricke J, Meyer-Wentrup F, Gorboulev V, Volk C, Loffing-Cueni D, Kaissling B, Bachmann S, Koepsell H (2000)** Localisation of organic cation transporters OCT1 and OCT2 in rat kidney. *American Journal of Physiology Renal Physiology* 279: F679-F687
61. **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. *The Journal of Biological Chemistry* 273(26): 15971-15979
62. **Keller T, Elfeber M, Gorboulev V, Reiländer H, Koepsell H (2005)** Purification and functional reconstitution of the rat organic cation transporter OCT1. *Biochemistry* 44: 12253-12263
63. **Keller T, Schwarz D, Berndard F, Dötsch V, Hunte C, Gorboulev V, Koepsell H (2008)** Cell free expression and functional reconstitution of eukaryotic drug transporters. *Biochemistry* 47: 4552-4564
64. **Keller T, Egenberger B, Gorboulev V, Bernhard F, Uzelac Z, Gorbunov D, Wirth C, Koppatz S, Dötsch V, Hunte C, Sitte HH, Koepsell H (2011)** The large extracellular loop of organic cation transporter 1 influences substrate affinity and is pivotal for oligomerization. *The Journal of Biological Chemistry* 286(43): 37874-37886
65. **Kerb R, Brinkmann U, Chatskaia N, Gorbunov D, Gorboulev V, Mornhinweg E, Keil A, Eichelbaum M, Koepsell H (2002)** Identification of genetic variations of the human organic cation transporter hOCT1 and their functional consequences. *Pharmacogenetics* 12: 591–595
66. **Kikuchi R, Kusuhara H, Hattori N, Kim I, Shiota K, Gonzalez FJ, Sugiyama Y (2007)** Regulation of tissue-specific expression of the human and mouse urate transporter 1 gene by hepatocyte nuclear factor 1 alpha/beta and DNA methylation. *Molecular Pharmacology* 72: 1619-1625
67. **Kimura H, Takeda M, Narikawa S, Enomoto A, Ichida K, Endou H (2002)** Human organic anion transporters and human organic cation transporters mediate renal transport of prostaglandins. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 301(1): 293-298
68. **Kimura N, Okuda M, Inui KI (2005)** Metformin transport by renal basolateral organic cation transporter hOCT2. *Pharmaceutical Research* 22(2): 255-259

69. **Kirpichnikov D, McFarlane SI, Sowers JR (2002)** Metformin: an update. *Annals of Internal Medicine* 137(1): 25-33
70. **Kitaichi K, Morishita Y, Doi Y, Ueyama J, Matsushima M, Zhao YL, Takagi K, Hasegawa T (2003)** Increased plasma concentration and brain penetration of methamphetamine in behaviorally sensitized rats. *European Journal of Pharmacology* 464(1): 39-48
71. **Klinke R, Pape HC, Silbernagel S (2005)** Das Filter als Barriere für Makromoleküle und Erythrozyten. In: *Physiologie*. Thieme Verlag, 5. komplett überarbeitete Aufl. S 339
72. **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. *Mammalian Genome* 7, Brief Data Reports: 247-248
73. **Koepsell H, Gorboulev V, Arndt P (1999)** Molecular pharmacology of organic cation transporters in kidney. *The Journal of Membrane Biology* 167: 103-117
74. **Koepsell H, Schmitt BM, Gorboulev V (2003)** Organic cation transporters. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 150: 36-90
75. **Koepsell H und Endou H (2004)** The SLC22 drug transporter family. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 447: 666-676
76. **Koepsell H, Lips K, Volk C (2007)** Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharmaceutical Research* 24(7): 1227-1251
77. **Koepsell H (2011)** Substrate recognition and translocation by polyspecific organic cation transporters. *Biological Chemistry* 392: 95-101
78. **Koepsell H (2013)** Polyspecific organic cation transporters and their biomedical relevance in kidney. *Current opinion in nephrology and hypertension* 22(5): 533-538
79. **Kristufek D, Rudorfer W, Pifl C, Huck S (2002)** Organic cation transporter mRNA and function in the rat superior cervical ganglion. *Journal of Physiology* 543.1: 117-134
80. **Kurashima K, Yu FH, Cabado AG, Szabo EZ, Grinstein S, Orłowski J (1997)** Identification of sites required for down-regulation of Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 activity by cAMP-dependent protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 272(45): 28672-28679
81. **Leabman MK, Huang CC, DeYoung J, Carlson EJ, Taylor TR, de la Cruz M, Johns SJ, Stryke D, Kawamoto M, Urban TJ, Kroetz DL, Ferrin TE, Clark AG, Risch N, Herskowitz J, Giacomini KM (2003)** Natural variation in human membrane transporter genes reveals evolutionary and functional constraints. *PNAS* 100(10): 5896-5901
82. **Lin R, Li X, Li J, Zhang L, Xu F, Chu Y, Li J (2013)** Long – term cisplatin exposure promotes methylation of the OCT1 gene in human esophageal cancer cells. *Digestive diseases and sciences* 58(3): 694-698
83. **Löffler G, Petrides PE und Heinrich PC (2007)** Puffersysteme. In: *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer-Verlag, 8. Aufl. S 15-18
84. **Löffler G, Petrides PE und Heinrich PC (2007)** Prinzipien des Membrantransportes. In: *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer-Verlag, 8. Aufl. S 178-180
85. **Löffler G, Petrides PE und Heinrich PC (2007)** Biologische Bedeutung der Proteinglycosylierung sowie der Glycoproteine. In: *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer-Verlag, 8. Aufl. S 548-549

86. **Lynch M und Conery JS (2000)** The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* 290: 1151- 1155
87. **Martel F, Keating E, Calhau C, Gründemann D, Schömig E, Azevedo I (2001)** Regulation of human extraneuronal monamine transporter (hEMT) expressed in HEK293 cells by intracellular second messenger systems. *Naunyn Schmiedeberg's Archiv Pharmacology* 364: 487-495
88. **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-depending phosphorylation. *Journal of American Society of Nephrology* 11: 1216-1224
89. **Meyer-Wentrup F, Karbach U, Gorboulev V, Arndt P, Koepsell H (1998)** Membrane localization of the electrogenic cation transporter rOCT1 in rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 248: 673-678
90. **Mooslehner KA und Allen ND (1999)** Cloning of the mouse organic cation transporter 2 gene, *Slc22a2*, from an enhancer – trap transgene integration locus. *Mammalian Genome* 10: 218-224
91. **Müller J, Lips KS, Metzner L, Neubert RHH, Koepsell H, Brandsch M (2005)** Drug specificity and intestinal membrane localization of human organic cation transporters (OCT). *Biochemical Pharmacology* 70: 1851-1860
92. **Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Ruth P, Schäfer – Korting M (2008)** Orale Antidiabetika. In: *Mutschler Arzneimittelwirkungen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 9. vollständig neu bearbeitete und erweiterte Aufl. S 415-421
93. **Nagel G, Volk C, Friedrich T, Ulzheimer JC, Bamberg E, Koepsell H (1997)** A reevaluation of substrate specificity of the rat cation transporter rOCT1. *The Journal of Biological Chemistry* 272(51): 31953-31956
94. **Neuhoff S, Ungell AL, Zamora I, Artursson P (2003)** PH – dependent bidirectional transport of weakly basic drugs across Caco – 2 monolayers: implications for drug – drug interactions. *Pharmaceutical Research* 20(8): 1141-1148
95. **Nies AT, Koepsell H, Winter S, Burk O, Klein K, Kerb R, Zanger UM, Keppler D, Schwab M, Schaeffeler E (2009)** Expression of organic cation transporters OCT1 (SLC22A1) and OCT3 (SLC22A3) is affected by genetic factors and cholestasis in human liver. *Hepatology* 50(4): 1227-1240
96. **Nishimura M und Naito S (2005)** Tissue – specific mRNA expression profile of human ATP – binding cassette and solute carrier transporter superfamilies. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 20(6): 452-477
97. **Okuda M, Saito H, Urakami Y, Takano M, Inui KI (1996)** cDNA cloning and functional expression of a novel rat kidney organic cation transporter, OCT2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 224: 500-507
98. **Owen MR, Doran E, Halestrap AP (2000)** Evidence that metformin exerts its anti - diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *The Biochemical Journal* 348: 607-614
99. **Pelis RM, Zhang X, Dangprapai Y, Wright SH (2006)** Cysteine accessibility in the hydrophilic cleft of human organic cation transporter 2. *The Journal of Biological Chemistry* 281(46): 35272-35280

100. **Pelis RM, Suhre WM, Wright SH (2006)** Functional influence of N-glycosylation in OCT2 - mediated tetraethylammonium transport. *American Journal of Physiology Renal Physiology* 290: 1118-1126
101. **Pelis RM, Dangprapai Y, Wunz TM, Wright SH (2007)** Inorganic mercury interacts with cysteine residues (C451 and C474) of hOCT2 to reduce its transport activity. *American Journal of Physiology Renal Physiology* 292: 1583-1591
102. **Pelis RM, Dangprapai Y, Cheng Y, Zhang X, Terpstra J, Wright SH (2012)** Functional significance of conserved cysteines in the human organic cation transporter 2. *American Journal of Physiology Renal Physiology* 303: 313-320
103. **Pietig G, Mehrens T, Hirsch JR, Cetinkaya I, Piechota HJ, Schlatter E (2001)** Properties and regulation of organic cation transport in freshly isolated human proximal tubules. *The Journal of Biological Chemistry* 276(36): 33741-33746
104. **Pietruck F und Ullrich KJ (1995)** Transport interactions of different organic cations during their excretion by the intact rat kidney. *Kidney International* 47: 1647-1657
105. **Popp C, Gorboulev V, Müller TD, Gorbunov D, Shatskaya N, Koepsell H (2005)** Amino acids critical for substrate affinity of rat organic cation transporter 1 line the substrate binding region in a model derived from the tertiary structure of the lactose permease. *Molecular Pharmacology* 67(5): 1600-1611
106. **Pritchard JB und Miller DS (1993)** Mechanisms mediating renal secretion of organic anions and cations. *Physiological Reviews* 73(4): 765-796
107. **Ramamoorthy S, Giovanetti E, Qian Y, Blakely RD (1998)** Phosphorylation and regulation of antidepressant-sensitive serotonin transporters. *The Journal of Biological Chemistry* 273(4): 2458-2466
108. **Reid DG, MacLachlan LK, Gajjar K, Voyle M, King RJ, England PJ (1990)** A proton nuclear magnetic resonance and molecular modelling study of calmidazolium (R24571) binding to calmodulin and skeletal muscle troponin C. *The Journal of Biological Chemistry* 265(17): 9744-9753
109. **Rennick BR, Moe GK, Lyons RH, Hoobler SW, Neligh R (1947)** Absorption and renal excretion of the tetraethylammonium ion. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 91: 210-217
110. **Rennick BR und Moe GK (1960)** Stop – flow localization of renal tubular excretion of tetraethylammonium. *American Journal of Physiology* 198: 1267-1270
111. **Ross CR und Holohan PD (1983)** Transport of organic anions and cations in isolated renal plasma membranes. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 23: 65-85
112. **Schäli C, Schild L, Overney J, Roch – Ramel F (1983)** Secretion of tetraethylammonium by proximal tubules of rabbit kidneys. *American Journal of Physiology Renal Physiology* 245: 238-246
113. **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. *The Journal of Membrane Biology* 189: 237-244
114. **Schwartz JB (2003)** The influence of sex on pharmacokinetics. *Clinical Pharmacokinetics* 42(2): 107-121
115. **Schweifer N und Barlow DP (1996)** The Lx1 gene maps to mouse chromosome 17 and codes for a protein that is homologous to glucose and polyspecific transmembrane transporters. *Mammalian Genome* 7: 735-740

116. **Shu Y, Leabman MK, Feng B, Mangravite LM, Huang CC, Stryke D, Kawamoto M, Johns SJ, DeYoung J, Carlson E, Ferrin TE, Herskowitz I, Giacomini KM (2003)** Evolutionary conservation predicts function of variants of the human organic cation transporter, OCT1. *PNAS* 100(10): 5902-5907
117. **Shu Y, Sheardown SA, Brown C, Owen RP, Zhang S, Castro RA, Ianculescu AG, Yue L, Lo JC, Burchard EG, Brett CM, Giacomini KM (2007)** Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. *The Journal of Clinical Investigation* 117(5): 1422-1431
118. **Sleijfer DT, Offerman JJG, Mulder NH, Verweij M, van der Hem GK, Schraffordt Koops H, Meijer S (1987)** The protective potential of the combination of verapamil and cimetidine on cisplatin-induced nephrotoxicity in man. *Cancer* 60: 2823-2828
119. **Slitt AL, Cherrington NJ, Hartley DP, Leazer TM, Klaassen CD (2002)** Tissue distribution and renal developmental changes in rat organic cation transporter mRNA levels. *Drug Metabolism and Disposition* 30(2): 212-219
120. **Sturm A, Gorboulev V, Gorbunov D, Keller T, Volk C, Schmitt BM, Schlachtbauer P, Ciarimboli G, Koepsell H (2007)** Identification of cysteines in rat organic cation transporters rOCT1 (C322, C451) and rOCT2 (C451) critical for transport activity and substrate affinity. *American Journal of Physiology Renal Physiology* 293: 767-779
121. **Sugawara-Yokoo M, Urakami Y, Koyama H, Fujikura K, Masuda S, Saito H, Naruse T, Inui KI, Takata K (2000)** Differential localization of organic cation transporters rOCT1 and rOCT2 in the basolateral membrane of rat kidney proximal tubules. *Histochemistry and Cell Biology* 114: 175-180
122. **Takeda H, Chodak G, Mutchnik S, Nakamoto T, Chang C (1990)** Immunohistochemical localization of androgen receptors with mono - and polyclonal antibodies to androgen receptor. *Journal of Endocrinology* 126(1): 17-25
123. **Terashita S, Dresser MJ, Zhang L, Gray AT, Yost SC, Giacomini KM (1998)** Molecular cloning and functional expression of a rabbit renal organic cation transporter. *Biochimica et Biophysica Acta* 1369: 1-6
124. **Thomas MC, Tikellis C, Burns WC, Thallas V, Forbes JM, Cao Z, Osicka TM, Russo LM, Jerums G, Ghabrial H, Cooper ME, Kantharidis P (2003)** Reduced tubular cation transport in diabetes: prevented by ACE inhibition. *Kidney International* 63: 2152-2161
125. **Thomas MC, Tikellis C, Kantharidis P, Burns WC, Cooper ME, Forbes JM (2004)** The role of advanced glycation in reduced organic cation transport associated with experimental diabetes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 311(2): 456-466
126. **Ullrich KJ, Papavassiliou F, David C, Rumrich G, Fritsch G (1991)** Contraluminal transport of organic cations in the proximal tubule of the rat kidney. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 419: 84-92
127. **Urakami Y, Nakamura N, Takahashi K, Okuda M, Saito H, Hashimoto Y, Inui KI (1999)** Gender differences in expression of organic cation transporter OCT2 in rat kidney. *FEBS Letters* 461: 339-342
128. **Urakami Y, Okuda M, Saito H, Inui KI (2000)** Hormonal regulation of organic cation transporter OCT2 expression in rat kidney. *FEBS Letters* 473: 173-176

129. **Urakami Y, Okuda M, Masuda S, Akazawa M, Saito H, Inui KI (2001)** Distinct characteristics of organic cation transporters, OCT1 and OCT2, in the basolateral membrane of renal tubules. *Pharmaceutical Research* 18(11): 1528-1534
130. **Urakami Y, Akazawa M, Saito H, Okuda M, Inui KI (2002)** cDNA cloning, functional characterization, and tissue distribution of an alternatively spliced variant of organic cation transporter hOCT2 predominantly expressed in the human kidney. *Journal of the American Society of Nephrology* 13: 1703-1710
131. **Van Monfoort JE, Müller M, Groothuis GMM, Meijer DKF, Koepsell H, Meier PJ (2001)** Comparison of „type I“ and „type II“ organic cation transport by organic cation transporters and organic anion-transporting polypeptides. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 298(1): 110-115
132. **Verhaagh S, Schweifer N, Barlow DP, Zwart R (1999)** Cloning of the mouse and human solute carrier 22a3 (Slc22a3/SLC22A3) identifies a conserved cluster of three organic cation transporters on mouse chromosome 17 and human 6q26-q27. *Genomics* 55: 209-218
133. **Vialou V, Amphoux A, Zwart R, Giros B, Gautron S (2004)** Organic cation transporter 3 (Slc22a3) is implicated in salt – intake regulation. *The Journal of Neuroscience* 24(11): 2846-2851
134. **Volk C, Gorboulev V, Budiman T, Nagel G, Koepsell H (2003)** Different affinities of inhibitors to the outwardly and inwardly directed substrate binding site of organic cation transporter 2. *Molecular Pharmacology* 64(5): 1037-1047
135. **Volk C, Gorboulev V, Kotzsch A, Müller TD, Koepsell H (2009)** Five amino acids in the innermost cavity of the substrate binding cleft of organic cation transporter 1 interact with extracellular and intracellular corticosterone. *Molecular Pharmacology* 76(2): 275-289
136. **Wang DS, Jonker JW, Kato Y, Kusuhara H, Schinkel AH, Sugiyama Y (2002)** Involvement of organic cation transporter 1 in hepatic and intestinal distribution of metformin. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 302(2): 510-515
137. **Wang DS, Kusuhara H, Kato Y, Jonker JW, Schinkel AH, Sugiyama Y (2003)** Involvement of organic cation transporter 1 in lactic acidosis caused by metformin. *Molecular Pharmacology* 63(4): 844-848
138. **Wilde S, Schlatter E, Koepsell H, Edemir B, Reuter S, Pavenstädt H, Neugebauer U, Schröter R, Brast S, Ciarimboli G (2009)** Calmodulin-associated post-translational regulation of rat organic cation transporter 2 in the kidney is gender dependent. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66: 1729-1740
139. **Wolff NA, Thies K, Kuhnke N, Reid G, Friedrich B, Lang F, Burckhardt G (2003)** Protein kinase C activation downregulates human organic anion transporter 1 – mediated transport through carrier internalization. *Journal of the American Society of Nephrology* 14(8): 1959-1968
140. **Wu X, Kekuda R, Huang W, Fei Y-J, Leibach FH, Chen J, Conway SJ, Ganapathy V (1998)** Identity of the organic cation transporter OCT3 as the extraneuronal monamine transporter (uptake₂) and evidence for the expression of the transporter in the brain. *The Journal of Biological Chemistry* 273(49): 32776-32786
141. **Wu X, Huang W, Ganapathy ME, Wang H, Kekuda R, Conway SJ, Leibach FH, Ganapathy V (2000)** Structure, function, and regional distribution of organic cation transporter OCT3 in the kidney. *American Journal of Physiology Renal Physiology* 279: F449-F458

-
142. **Zhang L, Dresser MJ, Gray AT, Yost SC, Terashita S, Giacomini KM (1997)** Cloning and functional expression of a human liver organic cation transporter. *Molecular Pharmacology* 51: 913-921
 143. **Zhang L, Dresser MJ, Chun JK, Babbitt PC, Giacomini KM (1997)** Cloning and functional characterization of a rat renal organic cation transporter isoform (rOCT1A). *The Journal of Biological Chemistry* 272(26): 16548-16554
 144. **Zhang L, Gorset W, Dresser MJ, Giacomini KM (1999)** The interaction of n-tetraalkylammonium compounds with a human organic cation transporter, hOCT1. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 288(3): 1192-1198
 145. **Zhang S, Lovejoy KS, Shima JE, Lagpacan LL, Shu Y, Lapuk A, Chen Y, Komori T, Gray JW, Chen X, Lippard SJ, Giacomini KM (2006)** Organic cation transporters are determinants of oxaliplatin cytotoxicity. *Cancer Research* 66(17): 8847-8857
 146. **Zhang X, Evans KK, Wright SH (2002)** Molecular cloning of rabbit organic cation transporter rbOCT2 and functional comparisons with rbOCT1. *American Journal of Physiology Renal Physiology* 283: F124-F133

9. Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Schlatter bedanken, dass ich in seiner Forschungsgruppe „Experimentelle Nephrologie“, der medizinischen Klinik D, meine Doktorarbeit anfertigen konnte.

Bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Ciarimboli möchte ich mich herzlichst bedanken für seine Unterstützung und die ständige Ansprechbarkeit: „Grazie mille Giuliano auch für Deine Geduld mit mir“.

Astrid Dirks danke ich für Ihre Unterstützung im Zellkulturlabor.

Über die Hilfe meiner Familie in meinem bisherigen Leben bin ich sehr glücklich.

Schließlich danke ich meiner Partnerin Daniela für ihre Liebe und Wärme. Ohne die immer wieder motivierenden Worte hätte ich wohl noch länger gebraucht, um diese Arbeit abzuschließen: „Obrigado meu amor“.

10. Vorträge

2006 Vortrag auf Transporterkongress, Institut für Physiologie, Universität Göttingen

2006 Posterpräsentation auf Kongress für Nephrologie in Essen (abstract in: Nieren –
und Hochdruckkrankheiten 35(9): 418-419)

