

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie  
(Prof. Dr. med. J. Brockmöller)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

# **Charakterisierung der weltweiten genetischen Variabilität des Transporters für organische Kationen OCT1**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Robert Johannes Ulrich Stalmann**

aus

Oberhausen

Göttingen 2017

Dekan:	Prof. Dr. H. K. Kroemer
Referent/in	Prof. Dr. Mladen Tzvetkov
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. Heike Bickeböller
Drittreferent/in:	Prof. Dr. Margarete Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 09.08.2017

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Charakterisierung der weltweiten genetischen Variabilität des Transporters für organische Kationen OCT1" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den .....  
.....  
(Unterschrift)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Pharmakotherapie und die Rolle der personalisierten Medizin .....	1
1.2 Pharmakogenetik.....	2
1.2.1 Grundlagen und Geschichte.....	2
1.2.2 Genetische Einflüsse auf die Pharmakodynamik.....	4
1.2.3 Genetische Einflüsse auf die Pharmakokinetik .....	5
1.3 OCT1.....	8
1.3.1 Bedeutung hepatozellulärer Transporter für den Arzneimittelmetabolismus .....	8
1.3.2 Der polyspezifische Uptake-Transporter OCT1.....	11
1.3.3 Die genetische Variabilität von OCT1.....	14
1.3.4 Die Bedeutung von OCT1 für die Arzneimitteltherapie .....	20
1.4 Ziel dieser Arbeit.....	25
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>26</b>
2.1 Material.....	26
2.1.1 Reagenzien.....	26
2.1.2 Geräte und Material .....	28
2.1.3 Software .....	30
2.1.4 Verwendete DNA .....	31
2.2 Methoden.....	32
2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	32
2.2.2 Multiplex-PCR .....	33
2.2.3 Gradienten-PCR.....	33
2.2.4 Emulsions-PCR .....	33
2.2.5 Gelelektrophorese .....	35
2.2.6 Kapillargelelektrophorese.....	35
2.2.7 DNA-Quantifizierung mittels Spektrophotometrie.....	36
2.2.8 DNA-Quantifizierung mittels Fluorometrie.....	36
2.2.9 DNA-Quantifizierung mittels Mikrofluidik-Gelelektrophorese.....	37
2.2.10 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR).....	37
2.2.11 DNA-Aufreinigung mittels Gelelektrophorese und Gelextraktion .....	39
2.2.12 DNA-Aufreinigung mittels Gelfiltration.....	40
2.2.13 DNA-Aufreinigung mittels Magnetseparation .....	40
2.2.14 DNA-Aufreinigung mittels <i>solid phase reverse immobilisation</i> .....	40

---

2.2.15	DNA-Sequenzierung nach Sanger (Kettenabbruch-Synthese) .....	41
2.2.16	Genotypisierung mittels Einzelbasenverlängerung .....	42
2.2.17	Rekonstruktion der Haplotypen .....	48
2.2.18	Einschätzung der Fehlerwahrscheinlichkeit auf Grund nicht-repräsentativer Stichproben .....	48
2.2.19	Ionen-Halbleiter-DNA-Sequenzierung (Ion Torrent™) .....	48
2.2.20	Auswertung und Qualitätskontrolle der Sequenzierungs-Ergebnisse .....	61
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>65</b>
3.1	Identifikation von genetischen Varianten mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung .....	66
3.2	Genotypisierung auf ausgewählte Varianten .....	71
3.3	OCT1-Allele .....	74
3.4	Der Verlust der OCT1-Aktivität im weltweiten Vergleich .....	81
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>84</b>
4.1	Bekannte und neu identifizierte <i>loss-of-funktion</i> -Varianten von OCT1 .....	84
4.1.1	Funktionale Eigenschaften der beobachteten <i>loss-of-funktion</i> -Varianten .....	86
4.2	Die weltweite genetische Variabilität von OCT1 .....	88
4.3	Mögliche Ursachen für die beobachtete Variabilität in der Frequenz des OCT1- Funktionsverlusts .....	97
4.3.1	Gendrift und historische Werdegänge von Populationen als mögliche Ursachen für die beobachtete Variabilität in der Frequenz von OCT1-Funktionsverlust .....	98
4.3.2	Selektionsdrücke als mögliche Ursache für die interregionale Variabilität des OCT1- Funktionsverlustes .....	105
4.4	Potentielle therapeutische Konsequenzen des Verlusts der OCT1-Aktivität .....	112
4.5	Limitation dieser Studie .....	117
4.6	Konklusion und Ausblick .....	118
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>121</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>123</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>129</b>
	Internetquellen .....	148
	Erklärung zu den Rechten an verwendeten Abbildungen .....	149

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Transporter und hepatischer Arzneimittelmetabolismus.....	9
Abbildung 2: Auswirkungen defizienter Aktivität hepatischer Uptake-Transporter.....	10
Abbildung 3: Arzneimitteltransporter in der menschlichen Leber.....	10
Abbildung 4: Die Sekundärstruktur von OCT1 .....	12
Abbildung 5: Phänotypen der OCT1-Funktion in Individuen und ihre Verteilung in der deutschen Bevölkerung.....	20
Abbildung 6: Reaktionsansatz einer Emulsions-PCR.....	34
Abbildung 7: Beispiele von Elektropherogrammen nach SNaPshot-Einzel-Basen- Primerverlängerung .....	47
Abbildung 8: Prinzip der Ionen-Halbleiter-Sequenzierung .....	49
Abbildung 9: Sequenzierungsstrategie.....	54
Abbildung 10: Vorbereitung der DNA-Library.....	56
Abbildung 11: Strategie der Analyse der NGS-Daten .....	64
Abbildung 12: Überblick des Projekt-Workflows .....	65
Abbildung 13: Histogramm der Coverage pro Pool.....	67
Abbildung 14: Struktur des OCT1-Gens mit resequenzierten Regionen.....	68
Abbildung 15: Ergebnisse der Hochdurchsatz-Sequenzierung.....	69
Abbildung 16: Untersuchte Varianten und ihre Lokalisation innerhalb des OCT1-Gens .....	71
Abbildung 17: Bekannte und vorausgesagte OCT- <i>loss-of-function</i> -Varianten und ihre Verteilung in unterschiedlichen Regionen der Welt .....	72
Abbildung 18: Globale Verteilung des genetisch determinierten Verlusts der OCT1-Aktivität .....	81
Abbildung 19: Genetisch determinierter Verlust der OCT1-Aktivität in Europa .....	82
Abbildung 20: Genetisch determinierter Verlust der OCT1-Aktivität in den Populationen Chinas .....	83
Abbildung 21: Aminosäureaustausche im OCT1-Protein mit Einfluss auf die Transporterfunktion.....	87
Abbildung 22: Vergleich der Divergenz zwischen den untersuchten Populationen (A) sowie zwischen den Weltregionen (B).....	93
Abbildung 23: Die Ausbreitung des modernen Menschen über die Welt.....	99
Abbildung 24: Korrelationsanalysen zwischen dem Verlust der OCT1-Aktivität und der geographischen Distanz zu Addis Abeba, Äthiopien .....	100
Abbildung 25: Korrelationsanalysen zwischen der Frequenz des Verlusts der OCT1-Aktivität und OATP1B1-Aktivität in HGDP-CEPH-Populationen.....	110
Abbildung 26: Frequenz des OCT1-Verlusts und Todesfälle durch Intoxikation nach Populationen im Jahr 2008.....	115

Alle verwendeten Abbildungen wurden entweder selbst angefertigt oder unterliegen der Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) und wurden verwendet unter Zitierung der Erschaffer.

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bekannte nicht-synonyme Varianten in OCT1 und deren Effekt auf der OCT1-Funktion .....	15
Tabelle 2: OCT1-Allele, ihre Auswirkungen auf die OCT1-Aktivität und die Allelfrequenz in der deutschen Bevölkerung.....	19
Tabelle 3: Zusammensetzung des HGDP-CEPH-Panels.....	31
Tabelle 4: Zusammensetzung der Proben des 1000 Genome Project.....	32
Tabelle 5: Amplikons und Primer der Vor-PCR 1.....	43
Tabelle 6: Amplikons und Primer der Vor-PCR 2.....	43
Tabelle 7: Primer-Mischung der Primerverlängerungsreaktion 1 (SNaPshot-Primer-Mix 1) .....	45
Tabelle 8: Primer-Mischung der Primerverlängerungsreaktion 2 (SNaPshot-Primer-Mix 2) .....	46
Tabelle 9: PCR-Amplikons für die Resequenzierung .....	50
Tabelle 10: Sequenzen und Charakteristik der Primer in Multiplex-PCR 1 .....	51
Tabelle 11: Sequenzen und Charakteristik der Primer in Multiplex-PCR 2.....	52
Tabelle 12: Adapter-Sequenzen.....	55
Tabelle 13: Resequenzierte Regionen.....	66
Tabelle 14: Zuordnung der resequenzierten Bereiche.....	67
Tabelle 15: Prädiktion des Einflusses auf die Proteinfunktion .....	69
Tabelle 16: Auswertung der manuellen Evaluation von Resequenzierungsdaten.....	70
Tabelle 17: Allele von OCT1 .....	75
Tabelle 18: Allelfrequenzen der OCT1-Allele in den untersuchten Populationen weltweit .....	77
Tabelle 19: Globale Analyse der molekularen Varianz im OCT1-Gen .....	89
Tabelle 20: Wahrscheinlichkeiten für die zufällige Genese abweichender Frequenzen in einigen Populationen.....	91
Tabelle 21: Populationsgenetische statistische Eigenschaften des OCT1-Gens für die verschiedenen Weltregionen .....	96
Tabelle 22: Übersicht aller hier identifizierten OCT1-Varianten.....	124

## Abkürzungsverzeichnis

ASP <sup>+</sup>	4-(4-Dimethylaminostyryl)-N-Methylpyridinium
CEPH	Centre d'Étude du Polymorphisme Humain
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
CYP2D6	Cytochrom P450 Enzym 2D6
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ECR	<i>evolutionary conserved region</i> , evolutionär konservierte Region
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	<i>et alii</i>
ExoI	Exonuklease 1
HGDP	<i>human genome diversity panel</i>
HNF1	<i>hepatocyte nuclear factor 1</i>
HNF4	<i>hepatocyte nuclear factor 4</i>
ISP	<i>Ion Sphere Particle</i>
LOF	<i>loss of function</i> , Verlust der Funktion
MAF	<i>minor allele frequency</i>
MPP <sup>+</sup>	1-Methyl-4-Phenylpyridinium
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OAT	<i>organic anion transporter</i> , Transporter für organische Anionen
OCT	<i>organic cation transporter</i> , Transporter für organische Kationen
OCTN	<i>organin cation transporter novel</i> , Transporter für organische Zwitterionen und Kationen
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PKA	Proteinkinase A
qPCR	quantitative PCR
SAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i>
SLC	<i>solute carrier</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> , Einzelnukleotid-Polymorphismus
SPRI	<i>solid phase reverse immobilization</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA (-Puffer)
TEA <sup>+</sup>	Tetraethylammonium
UAW	unerwünschte Arzneimittelwirkung
USF1	<i>upstream stimulatory factor 1</i>
UV	ultraviolett
ZNS	Zentralnervensystem



# 1 Einleitung

## 1.1 Pharmakotherapie und die Rolle der personalisierten Medizin

Die Pharmakotherapie, die Behandlung von Krankheiten unter Verwendung von Arzneimitteln, ist ein wesentliches Standbein der modernen, evidenzbasierten Medizin. Als bedeutsamer Bestandteil der konservativen Therapiemethoden ist sie eines der wichtigsten Instrumente in der Hand des Arztes. Allein in Deutschland werden jährlich ca. 36 Milliarden Tagesdosen verschrieben (Schwabe und Paffrath 2012). Die Fortschritte der Pharmakologie im 20. Jahrhundert haben entscheidend zu einer längeren Lebenserwartung und besseren Lebensqualität beigetragen (McDermott 1978; Cutler und Meara 2004). Gegen bakterielle und einige virale Infektionen stehen wirksame Mittel zur Hand und Schmerzen können effektiv gelindert werden. Für einige in der Vergangenheit nicht oder nur schwer zu behandelnde Krankheiten, z.B. das *acquired immune deficiency syndrome* (AIDS) oder die chronische myeloische Leukämie (CML), stellt die Pharmakotherapie Behandlungsoptionen bereit. Durch wirksame Immunsuppressiva wurde die moderne Transplantationsmedizin ermöglicht.

Jedoch ist die Anwendung von Pharmaka nicht ohne Risiken. Bereits 1538 schrieb der berühmte Arzt und Philosoph Paracelsus "Alle Dinge sind Gift, und nichts ist ohne Gift; allein die Dosis macht, daß ein Ding kein Gift sei." (Theophrastus Paracelsus 1965). Mit anderen Worten, jede Substanz, die dem Körper zugeführt wird, kann schädlich wirken, wenn dies in ausreichend hoher Dosis geschieht. Für Pharmaka, also Substanzen, die wegen ihrer Fähigkeit gewählt werden, in die Prozesse des menschlichen Körpers einzugreifen, gilt dies umso mehr. In der Tat ist die Bedeutung des griechischen Wortes *φάρμακον*, von dem das heutige Wort Pharmakon und alle verwandten Begriffe abgeleitet sind, sowohl "Heilmittel" als auch "Gift".

Die Anwendung von Medikamenten ist daher immer ein Abwägen zwischen Nutzen und Schaden. Eine zu geringe Dosierung und der erwünschte Effekt bleibt aus. Eine zu hohe Dosis und unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW) können auftreten. Die Spanne der möglichen Nebenwirkungen reicht von relativ harmlosen wie Müdigkeit oder passageren Hauterscheinungen bis zu hochgefährlichen Störungen des Immunsystems oder der Regulation von autonomen Prozessen, z.B. lebensbedrohliche Herzrhythmusstörungen oder Atemsuppression. Auch der beabsichtigte Effekt eines Medikamentes kann problematisch werden, wenn er in zu hohem Ausmaß eintritt. So kann z.B. eine symptomatische Bradykardie oder Hypotonie als Folge der Überdosierung eines Betablockers auftreten.

Etwa 5% aller Krankenhausaufenthalte werden durch unerwünschte Arzneimittelwirkungen verursacht (Einarson 1993; Pirmohamed et al. 2004). Zwischen 0,15% und 0,95% der hospitalisierten Patienten versterben an den Folgen oder unter Beteiligung von unerwünschten Arzneimittelwirkungen (Porter und Jick 1977; Ebbesen et al. 2001). Auf Deutschland bezogen würde dies zwischen 8.000 und 57.000 Todesfälle pro Jahr bedeuten (Schönhöfer 1999; Schnurrer und Frölich 2003). Dabei beruht ein nicht unbeträchtlicher Anteil auf Problemen mit der Dosierung. Diese hohe Inzidenz hat durch die Belastung des Gesundheitssystems auch gesellschaftliche Folgen.

Heute basiert der Einsatz von Medikamenten auf umfangreichen Studien, welche Evidenz für den Nutzen und die Risiken der Behandlung liefern. Diese Studien belegen nicht nur, dass ein Medikament tatsächlich die gewünschte Wirkung hat und Nebenwirkungen sich in akzeptablen Grenzen halten, sondern haben auch das Ziel, die optimale Dosis für die Durchschnittsbevölkerung zu finden. Die auf dieser Basis empfohlene Dosierung kann aber interindividuelle Unterschiede nicht immer ausreichend berücksichtigen.

Die Spannbreite der interindividuellen Unterschiede ist jedoch groß. Diese Unterschiede können die Interaktion mit den Zielmolekülen im Körper (Pharmakodynamik) betreffen, aber auch die Aufnahme, Verteilung, Metabolisierung und Ausscheidung von Medikamenten im menschlichen Körper (Pharmakokinetik). Die gleiche oral aufgenommene Dosis kann bei zwei Patienten zu deutlich unterschiedlichen Plasmaspiegeln der entsprechenden Substanz führen. Steigt die Plasmakonzentration eines Arzneimittels über den therapeutischen Bereich hinaus, so treten vermehrt toxische Nebenwirkungen auf. Bleibt die Konzentration unter dem therapeutischen Bereich, so tritt die beabsichtigte Wirkung nicht oder in zu geringem Ausmaß ein.

Solche individuellen Eigenschaften, die dazu führen, dass ein Medikament seine Wirkung nicht entfalten kann oder aber zu gefährlichen unerwünschten Arzneimittelwirkungen führt, müssen daher identifiziert und aufgeklärt werden. Wenn bekannt ist, dass ein Patient Träger solcher Eigenschaften ist, so können Medikation und Dosierung entsprechend angepasst werden. Die Effektivität und Sicherheit der Behandlung steigt. Dies zu erreichen ist ein wichtiges Ziel auf dem Weg zu einer personalisierten, auf das Individuum abgestimmten Medizin.

## **1.2 Pharmakogenetik**

### **1.2.1 Grundlagen und Geschichte**

Die Pharmakogenetik befasst sich mit genetisch bedingten Einflüssen auf die Pharmakodynamik und Pharmakokinetik von Arzneimitteln. Neben anderen Faktoren wie Alter, Geschlecht, Körpergewicht, Vorerkrankungen, Komedikation kann die genetische Ausstattung Konsequenzen von großer Bedeutung für die Arzneimittelwirkung haben.

Eines der ersten Beispiele, beobachtet in den 1950er Jahren, ist das Muskelrelaxans Succinylcholin (Suxamethonium). Etwa 1:3500 Menschen der europäischen Bevölkerung sind homozygote Träger genetischer Varianten des Enzyms Butyrylcholinesterase (auch Serumcholinesterase), welche zum Verlust der Enzymfunktion führen (Kalow 1956; Whittaker 1986). Diese Defizienz führt zu einem abnormal langsamen Abbau von Succinylcholin, weshalb die muskelrelaxierende Wirkung und insbesondere die respiratorische Paralyse deutlich länger anhält als bei normaler Enzymfunktion (Kalow und Gunn 1957; Lockridge 1990). Auch bei der Verwendung von Mivacurium kann es bei betroffenen Patienten statt einiger Minuten bis zu acht Stunden dauern, bis normale Atmung und neuromuskuläre Aktivität wieder möglich sind (Østergaard et al. 1993; Goudsouzian et al. 1993). Interessanterweise zeigt sich in der spezifischen Population der Vysya in Coimbatore (Südindien) auf Grund eines spezifischen Polymorphismus die Zahl der Individuen mit fehlender Butyrylcholinesterase-Aktivität auf 1:24 (4,16% der Bevölkerung) erhöht (Manoharan et al. 2006).

Im Jahr 1957 entwickelte Arno Motulsky anhand dieses und anderer Beispiele das Kernkonzept der Pharmakogenetik. Er postulierte, dass individuelle Unterschiede in Wirksamkeit und Toxizität von Medikamenten durch vererbare genetische Unterschiede zu erklären sein können (Motulsky 1957). Der Begriff der Pharmakogenetik selbst wurde 1959 vom Heidelberger Humangenetiker Friedrich Vogel geprägt (Vogel 1959). Seitdem hat das Feld immer mehr an Bedeutung gewonnen (Meyer 2004). Dazu beigetragen haben insbesondere die Sequenzierung des menschlichen Genoms (Venter et al. 2001; Lander et al. 2001) und die Entwicklung der Sequenzierungsmethoden der so genannten *Next-Generation* (Margulies et al. 2005; Shendure et al. 2005). Als Grundprinzip der Pharmakogenetik kann formuliert werden, dass eine Veränderung in der genetischen Sequenz zu Veränderungen der Pharmakodynamik oder Pharmakokinetik eines Medikamentes führen kann.

Genetische Veränderungen (Mutationen) reichen vom Austausch einer einzelnen Base (*single nucleotide polymorphism*, SNP) über Spleiß-Varianten und Veränderungen der Expression eines Gens durch Mutationen in regulatorischen Bereichen bis zu größeren Deletionen und Insertionen, die ganze Gene oder Genbereiche beeinflussen. Im Durchschnitt ist jeder Mensch Träger von ca. 3,3 Millionen SNPs, ca. 18.000 davon in den kodierenden Bereichen, ca. 420.000 Insertionen oder Deletionen (ca. 381 in den kodierenden Bereichen) und ca. 71.000 Substitutionen länger als eine Base (ca. 274 in den kodierenden Bereichen) (Shen et al. 2013).

Synonyme Mutationen verändern zwar die Sequenz eines Gens, auf Grund der Degeneration des genetischen Codes aber nicht die Aminosäureabfolge des kodierten Proteins. Nichtsynonyme Mutationen, oft SNPs oder kleine Deletionen oder Insertionen, dagegen führen auf Grund der Änderung der genetischen Sequenz dazu, dass für

mindestens eine abweichende Aminosäure kodiert wird. In der Folge kommt es zur Synthese eines veränderten Proteins.

Je nach den Eigenschaften der ursprünglichen und veränderten Aminosäure sowie der Position des Aminosäureaustauschs können die Auswirkungen von gering bis zum kompletten Funktionsverlust des Proteins reichen. Große Unterschiede in den Eigenschaften der Aminosäure (z.B. Ladung, Hydrophilie, molekulare Größe) oder eine spezielle Lokalisation innerhalb des Proteins (z.B. innerhalb des aktiven Zentrums oder einer anderen relevanten Domäne oder an Positionen, die für die Faltung und Struktur relevant sind) machen einen größeren Einfluss auf die Funktion wahrscheinlicher. Varianten, die statt eines Aminosäureaustauschs ein Stopp-Codon einfügen oder das Leseraster verändern, führen zu verkürzten oder deutlich veränderten Proteinen, die mit hoher Wahrscheinlichkeit in ihrer Funktion beeinflusst sind.

Ist das betroffene Protein das Zielmolekül (*drug target*) eines Medikamentes, so sind interindividuelle Unterschiede in der Pharmakodynamik zu erwarten. Handelt es sich bei dem veränderten Protein um ein Arzneimittel-metabolisierendes Enzym oder einen Transporter, so sind Unterschiede in der Pharmakokinetik zu erwarten. Solche Varianten sind von Interesse für die Pharmakogenetik, insbesondere wenn sie als Polymorphismen, also mit einer Frequenz  $>1\%$  in einer Population auftreten.

### 1.2.2 Genetische Einflüsse auf die Pharmakodynamik

Genetisch bedingte Unterschiede können die Pharmakodynamik in verschiedener Weise betreffen. Eine Veränderung des Zielmoleküls eines Medikamentes kann dazu führen, dass das Medikament nicht mehr in gleicher Weise mit diesem interagieren kann. Der Wirkmechanismus ist auf biochemischer bzw. biophysikalischer Ebene gestört, der beabsichtigte Effekt kann sich nicht mehr normal entfalten. Die Wirkung des Medikamentes ist reduziert, abweichend oder ganz fehlend. Alternativ können sich die Parameter der Interaktion quantitativ ändern mit Konsequenzen für die Beziehung zwischen Dosis und Wirkung. So kann z.B. eine höhere Konzentration des Wirkstoffes am Wirkort nötig sein, um den gleichen Effekt zu erreichen. Auch Polymorphismen in den regulatorischen Bereichen können eine Veränderung der Pharmakodynamik verursachen. So kann z.B. bei einer Erhöhung der Expression des Targets eine höhere Dosis des Medikaments benötigt werden, um die gleiche Wirkung (z.B. Hemmung) zu bewirken.

Ein Beispiel für pharmakogenetische Effekte auf die Pharmakodynamik sind Polymorphismen im 5-HT<sub>3B</sub> Rezeptor-Gen. Neben anderen Faktoren beeinflussen diese die Wirkung der Antiemetika aus der Gruppe der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten Tropisetron und Ondansetron. Patienten, welche homozygote Träger einer spezifischen Deletion von drei Basenpaaren im 3-HT<sub>3B</sub>-Promotor sind, leiden trotz Antiemetika-Gabe verstärkt unter Chemotherapie-induzierter Übelkeit und Erbrechen (Tremblay et al. 2003).

In der Therapie mit Cumarin-Derivaten (Warfarin, Marcumar) besteht eine große Variabilität in der erforderlichen Dosis für eine optimale antikoagulatorische Einstellung. Neben weiteren Faktoren sind Polymorphismen in der Vitamin-K-Epoxidreduktase VKORC1, dem Target dieser Medikamente, von einiger Bedeutung für die Sensitivität bzw. Resistenz gegenüber Cumarin-Derivaten (Rieder et al. 2005). Es wurde gezeigt dass der Promotor-Polymorphismus -1639G>A zu einer Veränderung der VKORC1 Expression führt. Träger zweier A-Allele, welche eine reduzierte Expression aufweisen, sind mit hoher Warfarin-Sensitivität assoziiert und mögen trotz (nicht-pharmakogenetisch) individualisierter Dosierung und Monitoring nach aktueller klinischer Praxis ein erhöhtes Risiko für Antikoagulation jenseits des Zielbereiches und Blutungsereignisse haben (Pirmohamed et al. 2013). Jedoch konnte bisher nicht gezeigt werden, dass das Einbeziehen des Genotyps in Dosierungsalgorithmen einen signifikanten Vorteil gegenüber einer optimierten algorithmischen Dosierung nach klinischen Parametern darstellt (Kimmel et al. 2013).

Weitere Beispiele für die Bedeutung genetischer Faktoren in der Pharmakotherapie kommen aus dem Bereich der Onkologie. Gemäß dem Konzept der *Targeted Therapy* wirken einige neue Medikamente hochspezifisch an Zielen, welche nur in den entarteten Zellen existieren. So entfaltet z.B. das Medikament Imatinib seine Wirkung an einer veränderten Tyrosinkinase, die vom für die chronisch myeloische Leukämie typischen BCR-ABL-Fusionsgen kodiert wird (Druker et al. 1996). BCR-ABL entsteht durch eine chromosomale Aberration bekannt als Philadelphia-Chromosom. Fehlt diese Aberration (wie bei etwa 5% der CML-Patienten) oder ist BCR-ABL zusätzlich mutiert, so kann Imatinib keine Wirkung haben. Die Genotypisierung gehört daher bei der CML zur unabdingbaren Diagnostik. In ähnlicher Weise kann der Antikörper Trastuzumab nur gegen Brustkrebs-Entitäten mit Überexpression des HER2-Proteins wirken (Slamon et al. 2001).

### 1.2.3 Genetische Einflüsse auf die Pharmakokinetik

Interindividuelle Unterschiede, welche die Pharmakokinetik beeinflussen, können an vielen Stellen entstehen. Genetisch bedingte Unterschiede können die Aufnahme, Verteilung, Metabolisierung oder Ausscheidung von Medikamenten beeinflussen.

Neben anderen Faktoren der Pharmakokinetik ist der Arzneimittelmetabolismus von entscheidender Bedeutung für die Plasmakonzentration eines Medikamentes und damit auch die Konzentration am Wirkort. Davon wiederum ist die Wirksamkeit des Medikamentes abhängig. Wird ein Wirkstoff zu schnell abgebaut, so erreicht trotz scheinbar korrekter Dosierung nur eine ungenügende Menge des Wirkstoffes den Wirkort oder die notwendige Konzentration wird nur für kurze Zeit erreicht. Es kann keine oder nur eine verringerte Wirkung eintreten. Wird er dagegen zu langsam abgebaut, so kann eine normale Dosis bereits zu Wirkstoffkonzentrationen jenseits des therapeutischen Bereiches führen. Alternativ kann über eine längere Einnahme der Wirkstoff kumulieren. In beiden

Fällen können eine übermäßige Wirkung oder unerwünschte Arzneimittelwirkungen eintreten. Im Falle von Prodrugs ist nicht nur der Abbau sondern auch die Überführung in ihre aktive Form durch den Arzneimittelstoffwechsel vermittelt. Hier gilt umgekehrt, dass eine zu schnelle Metabolisierung zu erhöhten Konzentrationen und den damit verbundenen Konsequenzen führen kann.

Diese Bedeutung für den Arzneimittelmetabolismus wird insbesondere illustriert durch die Enzyme der Cytochrom P450 Gruppe. Als Beispiel sei CYP2D6 genannt, das im Metabolismus einer großen Anzahl von Medikamenten eine Rolle spielt. CYP2D6 ist hochvariabel mit einer Vielfalt genetischer Varianten, von denen bekannt ist, dass sie die Enzymfunktion reduzieren, komplett aufheben oder stark erhöhen können (Zanger et al. 2004). Je nach Genotyp können Individuen phänotypisch als defiziente (langsame) Metabolisierer, intermediäre Metabolisierer, normale (schnelle) Metabolisierer und ultraschnelle Metabolisierer eingeordnet werden (Sachse et al. 1998; McElroy et al. 2000). Dieser Status wiederum beeinflusst die Pharmakokinetik einer Reihe von Antidepressiva und Antipsychotika mit der Konsequenz notwendiger Dosisanpassungen (Kirchheiner et al. 2004; Brockmöller und Tzvetkov 2008). Auch zeigt sich sowohl die Lebensqualität als auch das klinische Outcome unter der Therapie von Brustkrebs mit Tamoxifen deutlich vom CYP2D6-Status beeinflusst (Goetz et al. 2005; Goetz et al. 2008; Brauch und Schwab 2014a, 2014b; Province et al. 2014).

Der Thrombozytenaggregationshemmer Clopidogrel, der vor allem bei koronarer Herzkrankheit, insbesondere post-Myokardinfarkt und post-Stentimplantation eingesetzt wird, ist unter anderem angewiesen auf das Enzym CYP2C19, um von einer Prodrug zu seinem aktiven Metaboliten bioaktiviert zu werden (Hulot et al. 2006). Genetische Varianten, die zu einer geringeren oder fehlenden Aktivität des Enzyms führen, haben daher negative Konsequenzen für die Bioverfügbarkeit des aktiven Metaboliten. Patienten, die nach perkutaner Koronarintervention mit Clopidogrel behandelt werden und Träger von einem oder mehr CYP2C19-Allelen mit reduzierter Aktivität sind, haben ein signifikant erhöhtes Risiko kardiovaskulärer Ereignisse, insbesondere Stent-Thrombosen (Mega et al. 2010). Für heterozygote Träger kann dies durch eine erhöhte orale Dosis ausgeglichen werden, nicht jedoch bei homozygoten Trägern (Mega et al. 2011).

Die Elimination des in der Onkologie verwendeten Topoisomerase-Hemmers Irinotecan geschieht hauptsächlich mittels Glucuronidierung durch das Enzym Uridin-diphosphoglucuronsäuretransferase Typ 1A1 (UGT1A1), gefolgt von renaler Ausscheidung. Ist die Aktivität von UGT1A1 verringert, so ist daher auch die Elimination von SN-38, dem aktiven Metaboliten von Irinotecan, reduziert. Das UGT1A1\*28-Allel führt zu einer geringeren Expression des Enzyms und ist mit einem erhöhtem Risiko schwerer Hämatotoxizität assoziiert (Innocenti et al. 2004; Hoskins et al. 2007). Von der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) wurde dieser Zusammenhang bereits 2005 in die Warnhinweise zu Irinotecan aufgenommen.

Auch genetisch bedingte Veränderungen in Transporterproteinen können einen bedeutsamen Einfluss auf die effektiven Konzentrationen von Arzneimitteln im Körper ausüben. Spezialisierte Gewebe und auf Zellebene die Zellmembran (und intrazelluläre Strukturen) stellen Barrieren zwischen Kompartimenten dar, die viele Stoffe nur durch Transporter vermittelt passieren können. Sowohl das Erreichen des letztendlichen Wirkortes als auch des Ortes der Elimination sind daher häufig abhängig von Transportern.

Ist ein solcher Transporter von einer genetisch bedingten Veränderung betroffen, welche dazu führt, dass er seine Funktion nicht mehr oder nur noch in deutlich verringertem Ausmaße ausführen kann, so hat dies Auswirkungen für die Pharmakokinetik und damit oft auch die Wirksamkeit des betroffenen Arzneimittels. Kann etwa ein Wirkstoff, der seine Wirkung in der Leber entfalten soll, nicht mehr die Zellmembran passieren, so wird die notwendige intrazelluläre Konzentration in den Hepatozyten nicht erreicht und die Wirkung kann nicht eintreten. Kann ein Arzneimittel nicht (in ausreichendem Maße) in Hepatozyten aufgenommen werden, um durch Biotransformation eliminiert zu werden, oder wird er in verringertem Maße durch tubuläre Sekretion in der Niere ausgeschieden, so können Konzentrationen jenseits des therapeutischen Bereiches mit entsprechenden Risiken auftreten.

Als bekanntes Beispiel sei der Einfluss von genetischen Variationen im Transporter für organische Anionen OATP1B1 auf die Pharmakokinetik von Simvastatin genannt. OATP1B1 ist ein Influx-Transporter, der an der basolateralen Hepatozyten-Membran exprimiert wird. Damit kann OATP1B1 die Aufnahme von Arzneimitteln, u.a. der Statine Simvastatin, Pitavastatin oder Atorvastatin, aus dem Portalblut vermitteln. Die Punktmutation c.521T>C, die zu dem Aminosäureaustausch Val174Ala führt, resultiert in einer deutlichen Reduktion der Expression des Transporters und somit verringerter Aufnahme in Hepatozyten und hepatischer Elimination. Konsequenterweise zeigen Patienten mit c.521CC-Genotyp bis zu dreifach erhöhte Plasmakonzentrationen im Vergleich zu Patienten mit TT-Genotyp (Pasanen et al. 2006; Niemi 2010). Die Inzidenz von Myopathien, der primären UAW von Simvastatin, ist gegenüber Patienten, die nicht Träger des Polymorphismus sind, 4,5fach erhöht pro vorhandenem c.521C-Allel (Link et al. 2008). Dementsprechend wird empfohlen, die Maximaldosis von Statinen in Abhängigkeit vom SLCO1B1 c.521 Genotyp zu formulieren (Giacomini und Huang 2013).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass individuelle genetische Faktoren einen erheblichen Einfluss auf die Wirksamkeit und Nebenwirkungen von Medikamenten haben können. Solche interindividuellen genetischen Unterschiede zu identifizieren und in der klinischen Praxis zu berücksichtigen, ist ein wichtiges Ziel der personalisierten Medizin. Neben Veränderungen in den Zielmolekülen oder metabolisierenden Enzymen sind auch genetische Variationen in Transportern von Medikamenten von großer Bedeutung.

## 1.3 OCT1

Diese Arbeit befasst sich im Speziellen mit einem solchen genetisch stark variablen Arzneimitteltransporter, dem vor allem in der Leber exprimierten Transporter für organische Kationen OCT1.

### 1.3.1 Bedeutung hepatozellulärer Transporter für den Arzneimittelmetabolismus

Als größtes Organ der Biosynthese und Biotransformation nimmt die Leber eine zentrale Rolle in Arzneimittelmetabolismus und –elimination ein. Mehr als 90% der Cytochrom P450 Enzyme, der wichtigsten Enzyme in der Phase I des Arzneimittelmetabolismus, werden in der Leber exprimiert. Eine große Anzahl von Medikamenten wird in der hepatischen Biotransformation inaktiviert, also in Metaboliten mit geringerer oder fehlender pharmakologischer Potenz überführt. Lipophile Substanzen, welche nicht direkt renal eliminiert werden können, werden in der Leber zu hydrophilen Konjugaten umgewandelt oder biliär ausgeschieden. Die biliäre Elimination ist nach der renalen der wichtigste Ausscheidungsweg für Fremdstoffen. Der hepatische *first-pass*-Effekt ist ein entscheidender Faktor in der niedrigen oralen Bioverfügbarkeit vieler Medikamente. Andere Arzneimittel wie z.B. Codein oder Tramadol, so genannte Prodrugs, werden durch hepatische Biotransformation aktiviert, also zu Metaboliten mit höherer oder der eigentlichen pharmakologischer Potenz umgewandelt. Für diese Medikamente ist der hepatische Arzneimittelmetabolismus eine obligate Voraussetzung für die Entfaltung des beabsichtigten Effekts. Schließlich beruht der Wirkmechanismus einer Anzahl von Medikamenten, wie z.B. Metformin oder Sorafenib, auf dem Eingriff in Synthese- und Stoffwechselfunktionen der Leber.

Unabdingbare Voraussetzung für alle diese Prozesse ist die Aufnahme der jeweiligen Substanzen in die Hepatozyten (siehe Abbildung 1). Lipophile Substanzen können allein mittels Diffusion durch die Plasmamembran gelangen und so in die Hepatozyten aufgenommen werden. Der Umfang der Diffusion ist von dem Konzentrationsgradienten, dem Verteilungskoeffizienten und Ionisationsgrad der Substanz abhängig. Hydrophile oder begrenzt lipophile Substanzen, die nicht in ausreichendem Umfang durch transmembranöse Diffusion aufgenommen werden können, benötigen Transporter, um in Hepatozyten aufgenommen werden zu können. Transporter können eingeteilt werden in passive Transporter, welche die Aufnahme durch erleichterte Diffusion vermitteln, und aktive Transporter, welche ihre Substrate unter Verbrauch von Energie ggf. auch gegen dem Konzentrationsgradienten über die Plasmamembran befördern. Sie können ferner eingeteilt werden nach ihrer zellulären Funktion, ihrer biophysikalischen Funktionsweise, ihrer Spezifität oder den von ihnen transportierten Substanzen bzw. Substanzklassen.



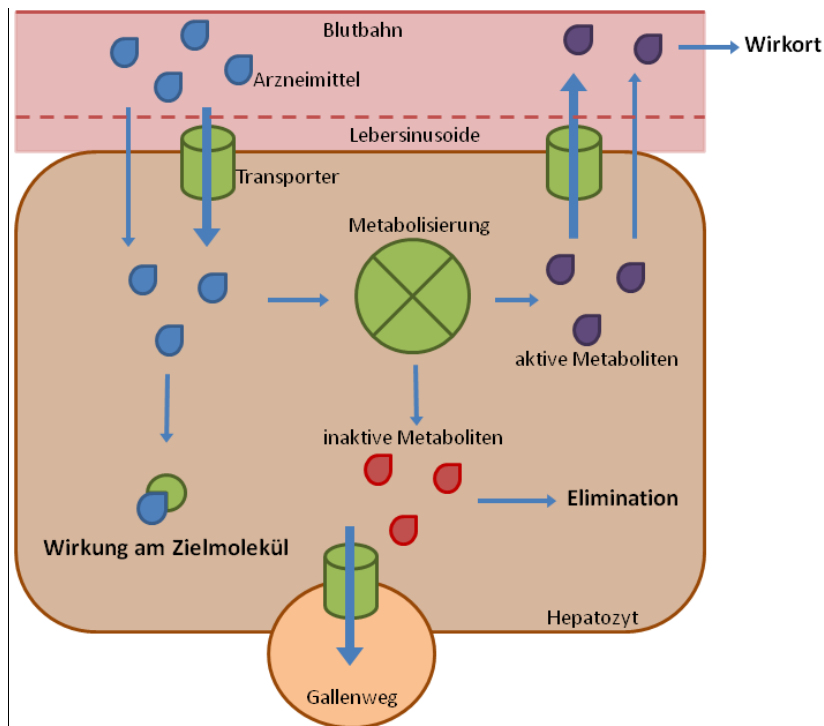


Abbildung 1: Transporter und hepatischer Arzneimittelmetabolismus

Arzneimittel werden von Transportern der basalen Hepatozytenmembran aus dem Blut der Lebersinusoiden in die Zelle aufgenommen oder erreichen das Zellinnere durch direkte Diffusion. Dort können sie ggf. ihre Wirkung entfalten, metabolisiert werden und/oder wieder ausgeschieden werden. Arzneimittel können zu aktiven Metaboliten oder zu inaktiven Metaboliten (hepatische Elimination) biotransformiert werden. Die Ausscheidung von Arzneimitteln und Metaboliten aus den Hepatozyten kann wiederum transportergestützt oder durch unmittelbare Diffusion geschehen. Sie können so zurück in die Blutbahn gehen (und so ggf. weiter zu ihrem Wirkort gelangen) oder aber in die Gallenwege sekretiert werden.

Fehlt die Aktivität eines für die hepatozelluläre Aufnahme notwendigen Transporters, weil dieser z.B. durch eine andere Substanz inhibiert wird oder auf Grund eines genetischen Defektes seine Funktion nicht ausüben kann, so können die entsprechenden Substrate ggf. nicht mehr oder nur noch in begrenztem Umfang in die Zelle aufgenommen werden. Im Falle von Arzneimitteln als betroffenen Substraten kann dies deutliche Auswirkungen auf die Pharmakokinetik und Wirksamkeit bzw. das Auftreten von unerwünschten Arzneimittelwirkungen haben (siehe Abbildung 2). Hepatisch eliminierte Medikamente werden langsamer abgebaut, was zu höheren maximalen Plasmakonzentrationen und längeren Halbwertszeiten führt. Medikamente, welche in den Hepatozyten ihre Wirkung entfalten, werden dagegen auf Grund von geringeren hepatischen Konzentrationen auch geringere Wirkung zeigen.

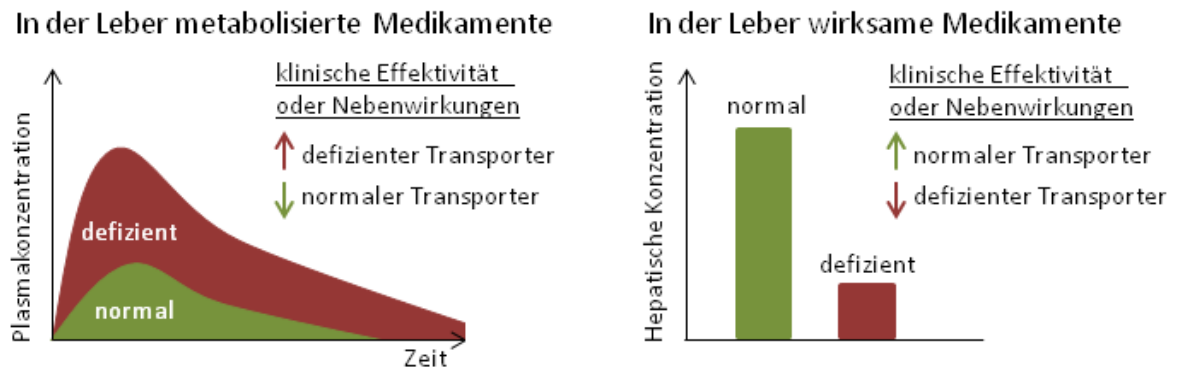


Abbildung 2: Auswirkungen defizienter Aktivität hepatischer Uptake-Transporter

Je nachdem, ob ein Medikament hepatisch eliminiert wird oder die Hepatozyten als Wirkort hat, hat die defiziente Aktivität von hepatischen Aufnahmetransportern unterschiedliche Auswirkungen. Hier gezeigt sind die zu erwartenden Konzentrationen in Plasma bzw. Hepatozyten von Medikamenten jeweils bei normaler und defizienter Aktivität des für ihre Aufnahme in der Leber notwendigen Transporters. Zusätzlich gezeigt sind die resultierenden Auswirkungen auf die klinische Effektivität bzw. Nebenwirkungen.

Hepatozyten besitzen eine Anzahl verschiedener Transporter, Uptake-Transporter für die Aufnahme von Substanzen aus dem Blut und Efflux-Transporter für die Abgabe von Substanzen (Metabolite, Syntheseprodukte, Substanzen zur Ausscheidung) zurück ins Blut oder in die Gallenwege, jeweils für verschiedene Stoffklassen (z.B. organische Kationen, organische Anionen, Polypeptide, Gallensalze). Einer der der wichtigsten hepatischen Transporter ist der Transporter für organische Kationen OCT1 (siehe Abbildung 3), ein Transporter der basalen Hepatozytenmembran, der insbesondere die Aufnahme von Xenobiotika, körperfremden Substanzen ohne Nahrungswert, vermittelt.

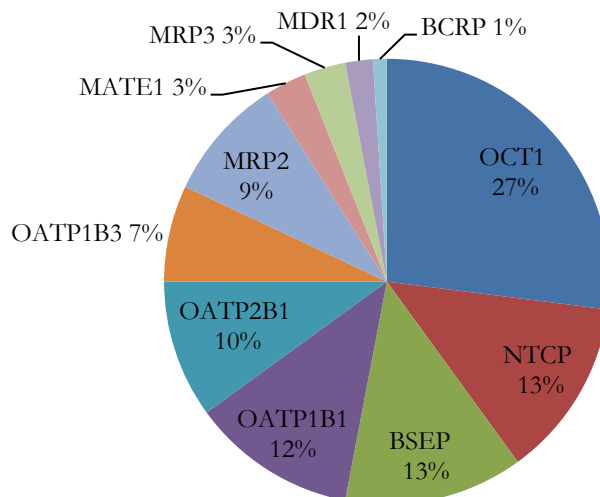


Abbildung 3: Arzneimitteltransporter in der menschlichen Leber

Angegeben ist der relative Anteil des jeweiligen Transporters an den quantifizierbaren Arzneimitteltransportern in menschlichem Lebergewebe in Prozent. Zahlen nach Wang et al. 2015.

### 1.3.2 Der polyspezifische Uptake-Transporter OCT1

Der Transport von Pharmaka und anderer Xenobiotika über die Plasmamembran ins Zellinnere wird vermittelt durch Uptake-Transporter, welche verschiedenen Familien zugehörig sind. Von besonderer pharmakologischer Bedeutung sind die polyspezifischen Transporter, die also eine Vielzahl von Substraten verschiedener Größe und Molekülstruktur transportieren können und nicht auf einzelne oder wenige spezifische Molekülstruktur spezialisiert (oligospezifisch) sind. Zu nennen sind z.B. die Transporter für organische Anionen- und Polypeptide der OATP/SLCO Familie, die Oligopeptid/H<sup>+</sup> Co-Transporter der SLC15 Familie und die Transporter für organische Kationen, Anionen oder Zwitterionen der SLC22 Familie.

Die SLC22 Familie (*solute carrier family 22*) umfasst eine Anzahl von verschiedenen Transportern, eingeteilt in die Gruppen von Transportern für organische Kationen (OCTs), Transportern für organische Kationen und Zwitterionen (OCTNs) und Transportern für organische Anionen (OATs) (Koepsell und Endou 2004). Die Transporter für organische Kationen OCT1, OCT2 und OCT3 sind polyspezifische Transporter, welche für ihre Substrate die erleichterte Diffusion über die Plasmamembran vermitteln.

OCT1 wird beim Menschen vor allem in der Leber exprimiert und ist in der sinusoidalen Membran der Hepatozyten lokalisiert (Gorboulev et al. 1997; Meyer-Wentrup et al. 1998; Nies et al. 2008; Nies et al. 2009). In der Tat ist OCT1 mit einem Anteil von 27% am Gesamtumfang der mit Abstand am stärksten exprimierte Arzneimitteltransporter in Hepatozyten (siehe Abbildung 3, (Wang et al. 2015)). Damit spielt OCT1 eine wichtige Rolle bei der hepatischen Aufnahme von Medikamenten und Giftstoffen mit kationischen oder schwach basischen Eigenschaften. Interindividuelle Variationen in Expression oder Funktion können die hepatische Metabolisierung, Arzneimittelwirkung oder Toxizität von OCT1-Substraten beeinflussen.

Kleinere Mengen von OCT1 mRNA wurden auch in Tubulus-Epithelzellen in der Niere, intestinalen Epithelzellen und anderen menschlichen Geweben detektiert (Müller et al. 2005; Koepsell et al. 2007; Tzvetkov et al. 2009; Drozdziak et al. 2014). OCT2 wird am stärksten in der Niere exprimiert (Gorboulev et al. 1997; Nishimura und Naito 2005; Jung et al. 2008), OCT3 wird in einem weiten Spektrum von Geweben exprimiert jedoch nicht in vergleichbarem Ausmaß wie OCT1 (Verhaagh et al. 1999; Koepsell et al. 2007; Nies et al. 2009). OCT2 und OCT3 haben daher keinen oder nur einen geringen Einfluss auf den hepatischen Arzneimittelmetabolismus.

Humanes OCT1 (hOCT1) ist ein Protein von 553 Aminosäuren Länge, welches strukturell - wie auch andere Mitglieder der *Major Facilitator Superfamily* (MFS) - aus 12 pseudo-symmetrisch angeordneten alpha-helikalen Transmembrandomänen aufgebaut ist. Weiter besitzt OCT1 einen großen extrazellulären Loop zwischen der ersten und der zweiten Transmembrandomäne sowie einen intrazellulären Loop zwischen den Transmembran-

domänen 6 und 7 (siehe Abbildung 4). Innerhalb des großen intrazellulären Loops sind mehrere vorausgesagte Phosphorylierungsstellen lokalisiert (Gründemann et al. 1994; Zhang et al. 1997; Burckhardt und Wolff 2000; Koepsell et al. 2003). Im extrazellulären Loop sind drei vorausgesagten Glykosylierungsstellen gelegen (Gründemann et al. 1994; Zhang et al. 1997; Koepsell et al. 2003; Nies et al. 2008). Disulfidbrücken, die innerhalb des extrazellulären Loop gebildet werden, sind von Bedeutung für die korrekte Lokalisation in der Plasmamembran von OCT1 und seines Paralogs OCT2 (Keller et al. 2011; Brast et al. 2012; Pelis et al. 2012).

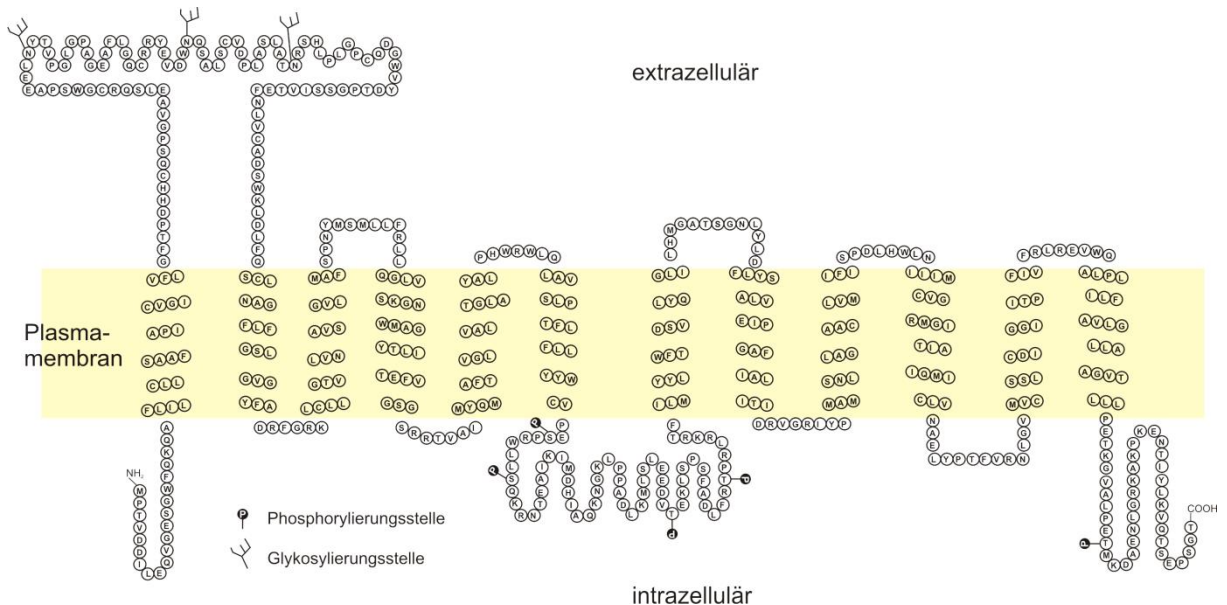


Abbildung 4: Die Sekundärstruktur von OCT1

12 alpha-helikale Transmembrandomänen, ein großer extrazellulärer und ein großer intrazellulärer Loop machen die Struktur von OCT1 aus. Modifiziert nach Seitz et al. 2015, S. 19. Glykosylierungs- und Phosphorylierungsstellen nach Zhang et al. 1997.

OCT1 transportiert ein weites Spektrum von organischen Kationen, schwachen Basen, die bei physiologischem pH positiv geladen vorliegen, und neutralen Substanzen mit verschiedenen molekularen Strukturen (Nies et al. 2011; Motohashi und Inui 2015). Die wichtigsten Determinanten für OCT1-Substrate sind positive Ladung und das molekulare Volumen (Hendrickx et al. 2013). Substrate von OCT1 sind nahezu immer kleiner als 500 Å<sup>3</sup> und haben meist eine relative molekulare Masse unter 500 (Koepsell et al. 2007; Hendrickx et al. 2013). Die K<sub>M</sub>-Werte bewegen sich im mikro- bis millimolaren Bereich (Nies et al. 2011; Motohashi und Inui 2015).

Der Transport durch OCT1 vermittelt die erleichterte Diffusion der Transportersubstrate, er ist bidirektional und elektrogen (Gründemann et al. 1994; Busch et al. 1996; Gorboulev et al. 1997; Nagel et al. 1997; Gorboulev et al. 1997). Die treibende Kraft des Transports ist der elektrochemische Gradient des Substrates. Als positiv geladene Moleküle werden die typischen OCT1-Substrate daher bevorzugt von außen nach innen transportiert.

Abgesehen von den Effekten auf das Membranpotential ist der Transport unabhängig von Natrium- oder Protonengradienten (Busch et al. 1996; Keller et al. 2011).

In Analogie zu anderen Transportern der *Major Facilitator Superfamily* wird für OCT1 davon ausgegangen, dass er sowohl in einer nach außen als auch einer nach innen gerichteten Konformation vorliegen kann (Abramson et al. 2003; Huang et al. 2003; Koepsell und Keller 2016). In der nach außen gerichteten Konformation binden extrazelluläre Transportersubstrate innerhalb einer in einer großen Spalte gelegenen Substratbindungstasche. Dadurch wird eine Konformationsänderung des Transporters in die nach innen gerichtete Konformation induziert, welche auch die Substrate nach innen transloziert. Es wird vermutet, dass OCT1-Substratbindungstaschen besitzt, welche überlappende Interaktionsdomänen für unterschiedliche Substrate und Inhibitoren enthalten (Gorboulev et al. 1999; Ciarimboli et al. 2005; Popp et al. 2005). Untersuchungen an rOCT1, dem OCT1-Ortholog der Ratte, konnten eine Anzahl von Aminosäuren in der vierten (Trp218, Trp222, Trp226), zehnten (Ala443, Leu447, Gln448) und elften (Asp275) Transmembrandomäne sowie im großen intrazellulären Loop (Cys322) und zwischen der zehnten und elften Transmembrandomäne (Cys451) identifizieren, welche im Zentrum der großen Spalte lokalisiert sind und an der Bindung von Kationen beteiligt sind (Gorboulev et al. 1999; Gorboulev et al. 2005; Popp et al. 2005; Sturm et al. 2007; Volk et al. 2009).

Die Aktivität von OCT1 unterliegt der endogenen Regulation durch intrazelluläre Proteinkinasen. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) eine inhibierende Wirkung auf OCT1 ausübt, während die Aktivierung des  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Signalwegs und der Calmodulin-abhängigen Kinase II (CaMKII) oder der Tyrosinkinase p56<sup>lck</sup> eine aktivierende Wirkung auf OCT1 hat (Ciarimboli et al. 2004). Untersuchungen an rOCT1 legen nahe, dass die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung an spezifischen Positionen innerhalb des großen intrazellulären Loop (siehe Abbildung 4) Konformationsänderungen induziert, welche auch die Substratbindungstasche beeinflussen und dadurch zu Änderungen von Affinität und Substratspezifität führen (Mehrens et al. 2000; Ciarimboli et al. 2005).

Bekannte endogene Substrate von OCT1 sind Serotonin und Spermidin (Sala-Rabanal et al. 2013; Boxberger et al. 2014). Auch Thiamin (Vitamin B1) ist Substrat von OCT1 (Chen et al. 2014a). Ob die Prostaglandine E2 und F2 $\alpha$  Substrate von OCT1 sind, wird noch kontrovers diskutiert (Kimura et al. 2002; Harlfinger et al. 2005).

Unter den durch OCT1 transportierten Xenobiotika sind zu nennen die Modell-Kationen 1-Methyl-4-Phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>), Tetraethylammonium (TEA<sup>+</sup>) und 4-(4-Dimethylaminostyryl)-N-Methylpyridinium (ASP<sup>+</sup>) (Zhang et al. 1997; Zhang et al. 1998; Ciarimboli et al. 2004). *In vivo* von sicherlich größerer Bedeutung ist der Transport von Alkaloiden wie z.B. das toxische Monocrotalin (Tu et al. 2013).

Etwa 40% der oral eingenommenen Medikamente liegen bei physiologischem pH als Kationen oder schwache Basen vor (Neuhoff et al. 2003). Konsequenterweise konnte für

eine große Anzahl von Medikamenten gezeigt werden, dass sie mit OCT1 interagieren (Nies et al. 2011; Motohashi und Inui 2015). So sind bekannte Substrate von OCT1 unter anderem die antiviralen Medikamente Acyclovir und Ganciclovir, das Antidiabetikum Metformin, das Antiemetikum Tropisetron, das Antihistaminikum Ranitidin, das Zytostatikum Daunorubicin sowie die Schmerzmittel Morphin und O-Desmethyltramadol, der aktive Metabolit von Tramadol (Takeda et al. 2002; Bourdet et al. 2005; Shu et al. 2007; Tzvetkov et al. 2012; Tzvetkov et al. 2013; Andreev et al. 2016). Dagegen haben z.B. die Medikamente Quinin, Quinidin, Clonidin, Verapamil und Midazolam eine inhibierende Wirkung auf OCT1 (Zhang et al. 1998; Ahlin et al. 2008).

Neben der endogenen Regulation durch Proteinkinasen und Arzneimittelinteraktionen am Transporter wird die Aktivität von OCT1 auch durch Faktoren auf genetischer Ebene beeinflusst, auf die im Folgenden eingegangen wird.

### 1.3.3 Die genetische Variabilität von OCT1

OCT1 wurde erstmalig 1994 aus Rattenleber kloniert (Gründemann et al. 1994). Es war der erste Vertreter der Gruppe der elektrogenen Transporter organischer Kationen. Das menschliche Homolog wurde 1997 identifiziert (Gorboulev et al. 1997; Zhang et al. 1997). Das für das menschliche OCT1 kodierende Gen (SLC22A1) liegt zusammen mit den Genen für OCT2 und OCT3 (SLC22A2, SLC22A3) in einem Cluster auf dem langen Arm von Chromosom 6 (6.q26-q27) nahe des IGF2R-Gens (*insulin-like growth factor receptor 2*). Allen drei OCTs gemeinsam ist eine Struktur bestehend aus 11 Exons und 10 Introns. Die Aminosäuresequenz-Identität zwischen OCT1 und OCT2 ist 70% und zwischen OCT1 und OCT3 sowie zwischen OCT2 und OCT3 jeweils 50%.

Die Expression von OCT1 unterliegt der Regulation durch mehrere Faktoren. So binden die trans-regulatorischen Faktoren USF1 und USF2 (upstream stimulatory factor) an ein E-Box Element 90bp *upstream* des Transkriptionsstarts (Kajiwara et al. 2008) und HNF4 (*hepatic nuclear factor 4*) an zwei Tandem-Repeat Sequenzen 160bp *upstream* des Transkriptionsstarts (Saborowski et al. 2006). Der vor allem in der Leber exprimierte Transkriptionsfaktor HNF1 (*hepatic nuclear factor 1*) bindet an einer evolutionär konservierten Region (ECR) in Intron 1 und hat den stärksten bekannten regulatorischen Effekt auf die Expression (O'Brien et al. 2013). Auch der gewebespezifische Grad der DNA-Methylierung des OCT1-Gens, welcher in menschlichen Hepatozyten im Vergleich zu anderen Geweben sehr gering ist, hat Auswirkungen auf die Expression (Schaeffeler et al. 2011; Petrik 2013). Diese beiden Faktoren mögen die starke leberspezifische Expression von OCT1 zu großem Teil erklären. Schließlich ist bekannt, dass pathophysiologische Zustände wie Cholestase und durch maligne Entartung verursachte Variationen in der DNA-Methylierung des OCT1-Gens die Expression von OCT1 beeinflussen können (Nies et al. 2008; Schaeffeler et al. 2011).

OCT1 ist auf genetischer Ebene hochpolymorph. Die NCBI-SNP-Datenbank listet für das SLC22A1-Gen mehr als 2500 SNPs (National Center for Biotechnology Information 2014). Davon liegen etwa 79% in den Introns und Gen-flankierenden Regionen, etwa 17% in den kodierenden Bereichen und etwa 4% in den untranslatierten Bereichen.

In der Tat hat OCT1 unter den Transportern für organische Kationen die höchste genetische Variabilität in seinen kodierenden Bereichen (Leabman et al. 2003; Tzvetkov et al. 2015). Dies gilt sowohl bezogen auf die absolute Anzahl bekannter Polymorphismen (synonym und nicht-synonym) als auch auf die durchschnittliche Heterozygotie als Maß der genetischen Variabilität. Insbesondere die Anzahl und durchschnittliche Heterozygotie von nicht-synonymen Polymorphismen und das Verhältnis zwischen der durchschnittlichen Heterozygotie nicht-synonymer und der synonymen Polymorphismen sind für OCT1 mit Abstand am höchsten unter den Transportern für organische Kationen (Tzvetkov et al. 2015). Die Gründe dafür sind bisher nicht aufgeklärt, jedoch mag dies ein Hinweis auf eine Abweichung von der Neutralität gemäß der neutralen Theorie der molekularen Evolution sein.

Charakteristisch für OCT1 sind nicht-synonyme Varianten, welche mit einer Reduktion oder einem vollständigen Verlust der Transporterfunktion einhergehen, so genannte *loss-of-function*-Varianten. Die Resequenzierungsanalysen von Kerb et al. in 2002 und Shu et al. in 2003 sowie folgende Untersuchungen konnten eine große Anzahl von nicht-synonymen Polymorphismen identifizieren und ihre Auswirkung auf die OCT1-Funktion charakterisieren. So sind zur Zeit des Beginns dieser Arbeit 14 *loss-of-function*-Varianten von OCT1 bekannt (siehe Tabelle 1), auf die in Folge näher eingegangen wird.

Tabelle 1: Bekannte nicht-synonyme Varianten in OCT1 und deren Effekt auf der OCT1-Funktion

Aminosäure austausch	rs-Nummer	Auswirkungen	Referenzen
Ser14Phe	rs34447885	substratabhängig reduzierte oder erhöhte Aktivität	(Shu et al. 2003; Shu et al. 2007)
Arg61Cys	rs12208357	stark reduzierte Aktivität	(Kerb et al. 2002; Shu et al. 2003)
Cys88Arg	rs55918055	kompletter Verlust der Aktivität	(Kerb et al. 2002)
Glu97Lys	NA	reduzierte Aktivität	(Chen et al. 2010)
Pro117Leu	rs200684404	reduzierte Aktivität	(Chen et al. 2010)
Ser189Leu	rs34104736	substratabhängig normale oder reduzierte Aktivität	(Shu et al. 2003; Shu et al. 2007)
Arg206Cys	rs756787089	reduzierte Aktivität	(Chen et al. 2010)
Gly220Val	rs36103319	kompletter Verlust der Aktivität	(Shu et al. 2003; Shu et al. 2007)

Pro283Leu	rs4646277	kompletter Verlust der Aktivität	(Saito et al. 2002; Takeuchi et al. 2003; Itoda et al. 2004)
Arg287Gly	rs4646278	kompletter Verlust der Aktivität	
Pro341Leu	rs2282143	substratabhängig normale oder reduzierte Aktivität	(Shu et al. 2003; Shu et al. 2007)
Gly401Ser	rs34130495	stark reduzierte Aktivität	(Kerb et al. 2002; Shu et al. 2003; Shu et al. 2007)
Met408Val	rs628031	geringer Effekt (widersprüchliche Berichte)	(Shu et al. 2003; Shu et al. 2007)
Met420del	rs202220802	substratabhängig normale oder reduzierte Aktivität	(Kerb et al. 2002; Shu et al. 2003; Shu et al. 2007)
Gly465Arg	rs34059508	kompletter Verlust der Aktivität	(Shu et al. 2003; Shu et al. 2007)

Angegeben sind jeweils der betreffende Aminosäureaustausch, die rs-Nummer unter der die Variante in den verschiedenen Datenbanken zu finden ist und eine kurze Zusammenfassung der Auswirkung auf die Proteinfunktion.

Die häufigste OCT1-*loss-of-function*-Variante ist eine Deletion der drei Basen des Codon 420, welches für Methionin kodiert. Die Variante wird als Met420del bezeichnet. Die Auswirkungen der Variante Met420del unterscheiden sich je nach betrachtetem Substrat. Der Transport der Modellsubstrate MPP<sup>+</sup> und ASP<sup>+</sup> sowie des Medikaments Debrisoquin werden durch die Variante nicht bzw. nur sehr gering beeinflusst (Shu et al. 2003; Ahlin et al. 2011; Tzvetkov et al. 2012). Der Transport von Morphin und Metformin dagegen ist um >60% reduziert, der von Tropisetron um >80% und der von O-Desmethyltramadol komplett fehlend (Shu et al. 2007; Tzvetkov et al. 2011; Tzvetkov et al. 2012; Tzvetkov et al. 2013). Weiterhin wurde eine erhöhte Sensitivität gegenüber OCT1-inhibierenden Substanzen wie z.B. dem Medikament Verapamil beobachtet, was im Sinne einer Arzneimittelwechselwirkung betreffend den OCT1 Transport von Bedeutung sein mag (Ahlin et al. 2011). Der genaue molekulare Mechanismus, durch welchen die Deletion des in der neunten Transmembrandomäne lokalisierten Met420 die OCT1-Funktion beeinflusst, ist noch unbekannt. Ein Einfluss auf die Membranlokalisation konnte aber bereits ausgeschlossen werden (Ahlin et al. 2011). Met420del wurde zuvor in Deutschen und Amerikanern europäischer Abstammung mit hoher Frequenz, in Amerikanern afrikanischer Abstammung mit geringerer Frequenz und in Amerikanern asiatischer Abstammung nicht gefunden (Kerb et al. 2002; Shu et al. 2003; Nies et al. 2009).

Die Variante Arg61Cys ist im großen extrazellulären Loop von OCT1 lokalisiert und verursacht eine Reduktion des OCT1-medierten Transports um mindestens 70% für alle bisher untersuchten Substrate (Kerb et al. 2002; Shu et al. 2003; Shu et al. 2007; Ahlin et al. 2011; Tzvetkov et al. 2011; Tzvetkov et al. 2012; Tzvetkov et al. 2013). Arg61Cys führt zu einer deutlichen Reduktion der korrekten Lokalisation des Transporters an die



Plasmamembran (Shu et al. 2007; Ahlin et al. 2011). Eine mögliche Erklärung für diese Effekte ist der zusätzliche Cysteinrest, der durch diese Variante entsteht. Untersuchungen an rOCT1 und OCT2 zeigten, dass die Cysteinreste des großen extrazellulären Loop involviert sind in der Stabilisierung des Loops durch Disulfidbrücken, was für die Insertion in die Plasmamembran und Oligomerisierung von großer Bedeutung ist (Keller et al. 2011; Brast et al. 2012; Pelis et al. 2012). Ein zusätzliches Cystein im großen extrazellulären Loop mag diese Mechanismen stören. Diese Variante ist häufig bei Deutschen und Amerikanern europäischer Abstammung, tritt aber bei Amerikanern afrikanischer und asiatischer Abstammung nicht auf (Kerb et al. 2002; Shu et al. 2003; Nies et al. 2009).

Die Variante Cys88Arg tritt immer in Kombination mit Met420del auf und führt dann zu einem kompletten Verlust der OCT1-Aktivität unabhängig vom Substrat. Cystein88 ist im großen extrazellulären Loop von OCT1 lokalisiert. Cysteinreste des großen extrazellulären Loops sind durch Bildung von Disulfidbrücken beteiligt an Mechanismen, welche für die Insertion in die Plasmamembran von Bedeutung sind (Keller et al. 2011; Brast et al. 2012; Pelis et al. 2012). Dies gilt auch für die zu Cys88 in OCT1 äquivalente Position (Cys89) im Paralog OCT2. Übereinstimmend damit führt der Aminosäureaustausch Cystein88 zu Arginin zur Unterbindung der Lokalisation von OCT1 an die Plasmamembran (Herraez et al. 2013). Die Variante Cys88Arg tritt in geringer Frequenz (<1%) bei Deutschen und Amerikanern europäischer Abstammung auf und wurde in anderen Populationen nicht beobachtet (Kerb et al. 2002; Nies et al. 2009).

Die Variante Gly401Ser verursacht eine sehr starke Reduktion der OCT1-Aktivität unabhängig vom Substrat (Kerb et al. 2002; Shu et al. 2003; Shu et al. 2007; Tzvetkov et al. 2011; Tzvetkov et al. 2012; Tzvetkov et al. 2013). Gly401 ist im intrazellulären Loop zwischen den Transmembrandomänen acht und neun gelegen. Es ist noch ungeklärt durch welchen exakten Mechanismus die Substitution die OCT1-Aktivität beeinflusst. Gly401Ser tritt bei Deutschen und Amerikanern europäischer Herkunft auf, in geringerer Frequenz (<1%) auch bei Amerikanern afrikanischer Abstammung, nicht aber asiatischer Abstammung (Kerb et al. 2002; Shu et al. 2003; Nies et al. 2009).

Die Variante Gly465Arg verursacht einen kompletten Verlust der OCT1-Aktivität (Shu et al. 2003; Shu et al. 2007; Tzvetkov et al. 2011; Tzvetkov et al. 2012; Tzvetkov et al. 2013). Die Substitution betrifft einen im intrazellulären Loop zwischen den Transmembrandomänen 10 und 11 gelegenen evolutionär konservierten Glycinrest. Für diese Variante konnte gezeigt werden, dass sie die Lokalisation von OCT1 an die Plasmamembran komplett unterbindet (Shu et al. 2003; Ahlin et al. 2011). Der genaue molekulare Mechanismus ist noch ungeklärt, jedoch tritt dieser Effekt nicht auf bei Substitution von Gly465 durch Alanin (Shu et al. 2003). Gly465Arg ist bei Deutschen und Amerikanern europäischer Herkunft zu finden, nicht aber bei Amerikanern afrikanischer oder asiatischer Abstammung (Kerb et al. 2002; Shu et al. 2003; Nies et al. 2009).

Die Varianten Pro283Leu und Arg287Gly führen zu einem kompletten Verlust der OCT1-Aktivität für die Modellsubstrate TEA<sup>+</sup> und MPP<sup>+</sup> (Takeuchi et al. 2003; Sakata et al. 2004). Die Aminosäuren Prolin283 und Arginin287 sind im großen intrazellulären Loop von OCT1 gelegen. Weder Expression noch Membranlokalisierung werden durch diese Aminosäureaustausche beeinflusst (Sakata et al. 2004). Beide Varianten wurden in geringer Frequenz in asiatischen Populationen beobachtet, nicht aber in europäisch-stämmigen (Saito et al. 2002; Itoda et al. 2004; Kang et al. 2007; Nies et al. 2009).

Die Varianten Ser14Phe, Ser189Leu und Pro341Leu zeigen ähnlich wie Met420del einen substratspezifischen Einfluss auf die OCT1-Funktion (Shu et al. 2003; Shu et al. 2007). Ser14Phe verursacht einen deutlich erhöhten Transport des Modellsubstrats TEA<sup>+</sup> und reduzierten Transport von Metformin. Ser189Leu verursacht einen reduzierten Transport von Metformin, der Transport von TEA<sup>+</sup> ist jedoch normal. Pro341Leu verursacht einen reduzierten Transport von TEA<sup>+</sup>, der Transport von Metformin ist jedoch normal. Der Mechanismus des Einflusses auf die Transportfunktion ist jeweils noch nicht geklärt. Ser14Phe wurde bei Amerikanern afrikanischer Abstammung gefunden, Ser189Leu bei Amerikanern europäischer Abstammung, Pro341Leu in hoher Frequenz in asiatischen Populationen sowie Amerikanern afrikanischer und asiatischer Abstammung und in geringer Frequenz bei deutschen Individuen (Shu et al. 2003; Itoda et al. 2004; Kang et al. 2007; Nies et al. 2009).

Die Variante Gly220Val verursacht einen kompletten Verlust der OCT1-Aktivität (Shu et al. 2003; Shu et al. 2007). Bei der Variante handelt sich um einen Aminosäureaustausch an einem evolutionär konservierten Glycinrest in der vierten Transmembrandomäne. Es ist noch ungeklärt, durch welchen Mechanismus diese Variante die OCT1-Aktivität beeinflusst. Gly220Val wurde mit einer geringen Frequenz (<1%) bei Amerikanern afrikanischer Abstammung, nicht aber asiatischer oder europäischer Abstammung oder bei deutschen Individuen, gefunden (Shu et al. 2003; Nies et al. 2009).

Die Varianten Glu97Lys, Pro117Leu und Arg206Cys wurden in chinesischen und japanischen Populationen identifiziert (Itoda et al. 2004; Chen et al. 2010). Alle drei führen zu einer signifikanten Reduktion der OCT1-Aktivität. Pro117 und Glu97 sind im großen extrazellulären Loop lokalisiert, Arg206 ist zwischen der dritten und vierten Transmembrandomäne lokalisiert. Für Arg206Cys konnte gezeigt werden, dass die Variante in der Lokalisation von OCT1 an die Zellmembran interferiert (Chen et al. 2010). Für Glu97Lys und Pro117Leu ist der Mechanismus der Funktionseinschränkung von OCT1 noch ungeklärt. Glu97Lys und Pro117Leu treten in der japanischen und chinesischen Population auf, die Variante Arg206Cys konnte bisher nur in einem einzelnen Individuum identifiziert werden. Ob und in welcher Frequenz diese Varianten auch in anderen Populationen auftreten ist bislang nicht systematisch untersucht.

Bezüglich des Einflusses der Variante Met408Val auf die OCT1-Funktion gibt es widersprüchliche Berichte. Shu et al. konnten keine Reduktion des OCT1-Transports von

Modellsubstraten oder Metformin beobachten. Darüber hinaus veränderte die Anwesenheit von Met408Val die Effekte anderer *loss-of-function*-Varianten nicht (Shu et al. 2003; Shu et al. 2007). Im Gegensatz dazu berichteten Giannoudis et al. von einem modifizierenden Einfluss von Met408 Val auf den Effekt von Met420del auf den Transport von Imatinib (Giannoudis et al. 2013). Demnach führt Met420del zu einer starken Reduktion des Imatinib-Transports, welche durch Met408Val aufgehoben wird. Allerdings mag nach Tzvetkov et al. die Kombination von Met420del und Abwesenheit von Met408Val *in vivo* gar nicht auftreten und der *rescue*-Effekt von Met408Val konnte bei keinem der anderen Substraten beobachtet werden (Tzvetkov et al. 2014). Weiterhin zeigten ausführliche Untersuchungen, dass Imatinib kein Substrat von OCT1 ist, was ebenfalls in deutlichem Widerspruch zu den Ergebnissen von Giannoudis et al. steht (Nies et al. 2014). Met408Val tritt in sehr hoher Frequenz bei Deutschen, Amerikanern europäischer, afrikanischer und asiatischer Abstammung sowie bei Japanern und Koreanern auf (Kerb et al. 2002; Shu et al. 2003; Itoda et al. 2004; Kang et al. 2007; Nies et al. 2009).

Die Kombinationen nicht-synonymer genetischer Varianten von OCT1, welche zusammen vererbt werden, werden in der Fachliteratur als OCT1-Allele bezeichnet. Es waren vor dieser Arbeit 6 Hauptallele von OCT1 bekannt (siehe Tabelle 2). Die Allele von OCT1 können eingeteilt werden nach den Auswirkungen auf die Funktion des Transporters. Die Allele OCT1\*2 bis \*6 führen zu einer komplett fehlenden oder stark reduzierten Aktivität. Das Allel OCT1\*1 dagegen ist komplett aktiv. Je nachdem, ob ein Individuum Träger zweier, eines oder keines aktiven OCT1-Allels ist, kann es eingeteilt werden in die Kategorien normaler, intermediärer oder defizienter OCT1-Transporter (siehe Abbildung 5). Auf Grund der substratspezifischen Effekte einiger OCT1-Allele - als deutlichstes Beispiel ist das Allel OCT1\*2 gekennzeichnet durch die Variante Met420Del zu nennen - ist diese Einteilung jedoch zudem auch abhängig vom untersuchten OCT1-Substrat.

Tabelle 2: OCT1-Allele, ihre Auswirkungen auf die OCT1-Aktivität und die Allelfrequenz in der deutschen Bevölkerung

Haplotyp	Arg61Cys	Cys88Arg	Gly401Ser	Met420del	Gly465Arg	OCT1-Aktivität	Allel-frequenz
OCT1*1	Arg	Cys	Gly	Met	Gly	normal	70,3%
OCT1*2	Arg	Cys	Gly	del	Gly	defizient	14,8%
OCT1*3	Cys	Cys	Gly	Met	Gly	defizient	10,1%
OCT1*4	Arg	Cys	Ser	Met	Gly	defizient	2,4%
OCT1*5	Arg	Cys	Gly	del	Arg	defizient	1,8%
OCT1*6	Arg	Arg	Gly	del	Gly	defizient	0,6%

Gezeigt sind jeweils die Aminosäureaustausche, welche das Allel definieren, in Gelb, die Klassifikation der OCT1-Aktivität des Allels und die Allelfrequenz in der deutschen Bevölkerung. Zahlen nach (Tzvetkov et al. 2012).

Vorangegangene Studien haben die Frequenz der häufigen *loss-of-function*-Varianten Arg61Cys, Cys88Arg, Gly401Ser, Gly465Arg und Met420del und der resultierenden Allele bei Deutschen und Amerikanern europäischen Abstammung untersucht (Kerb et al. 2002; Shu et al. 2003; Nies et al. 2009; Tzvetkov et al. 2012). Demnach sind für Substrate wie Metformin, Tropisetron und Tramadol etwa vierzig Prozent der Individuen Träger eines inaktiven OCT1-Allels (intermediäre Transporter), und 9% sind Träger von zwei (defiziente Transporter) (siehe Abbildung 5). Für Substrate, für welche die Met420del Variante als aktiv gewertet wird, wie Debrisoquin müssen 22% als intermediäre und 2,4% als defiziente Transporter eingeordnet werden (Tzvetkov et al. 2015).

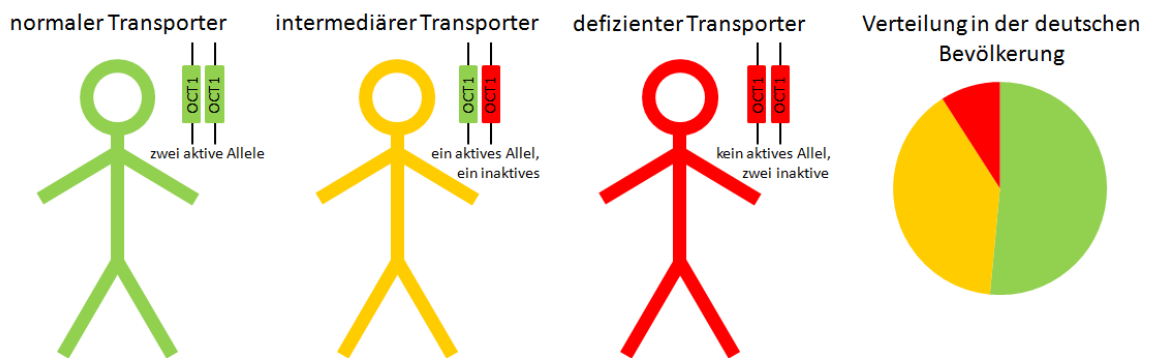


Abbildung 5: Phänotypen der OCT1-Funktion in Individuen und ihre Verteilung in der deutschen Bevölkerung

Werden OCT1-Allele als aktiv oder inaktiv klassifiziert so können Individuen nach der Anzahl der aktiven bzw. inaktiven Allele eingeteilt werden. Träger zweier aktiver Allele sind normale Transporter, Träger eines aktiven und eines inaktiven Allels sind intermediäre Transporter und Träger zweier inaktiver Allele sind defiziente Transporter, welche kein (vollständig) aktives OCT1 besitzen.

Der Vergleich der Daten der bisher untersuchten Populationen zeigt, dass interethnische Unterschiede in der Verteilung und Frequenz von OCT1-*loss-of-function*-Varianten existieren. So wurden mehrere Varianten in den europäisch-stämmigen Populationen beobachtet, aber nicht oder mit deutlich geringerer Frequenz in anderen. Auch in den Populationen von Afrikanern und Amerikanern afrikanischer Abstammung wurden Varianten beobachtet, die in asiatischen Populationen oder bei Amerikanern asiatischer Abstammung nicht beobachtet werden konnten. Jedoch gibt es noch keine vollständigen Daten zu Auftreten und Frequenz aller bekannten *loss-of-function*-Varianten jeweils alle relevanten Populationen umfassend.

### 1.3.4 Die Bedeutung von OCT1 für die Arzneimitteltherapie

OCT1-*loss-of-function*-Varianten können den Transport von OCT1-Substraten beeinflussen. Für mehrere Medikamente, die von nicht unbeträchtlicher klinischer Bedeutung sind, konnte bereits gezeigt werden, dass die Pharmakokinetik durch OCT1-*loss-of-function*-Varianten beeinflusst wird. Hier zu nennen sind vor allem die Medikamente Metformin, Tropisetron, Tramadol, Morphin und Sumatriptan.

Metformin ist ein Wirkstoff aus der Gruppe der Biguanide, welcher in der Therapie des nicht-insulinabhängigen Diabetes mellitus eingesetzt wird. Die Biguanide, von denen Metformin aktuell das einzige in dieser Indikation zugelassene Medikament ist, sind strukturell verwandt mit dem Alkaloid Galegin, welches in der Geißbraute (*Galega officinalis*) vorkommt (Witters 2001; Bailey und Day 2004). Gegenwärtig wird Metformin als das Mittel der ersten Wahl in der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 angesehen (Nathan et al. 2009; Inzucchi et al. 2012). Darüber hinaus wird Metformin auch in der Therapie des polyzystischen Ovarial-syndroms (PCOS) verwendet. Insgesamt werden mehr als 600 Millionen definierte Tagesdosen jährlich in Deutschland verordnet (Schwabe und Paffrath 2012). Bei weiter steigender Inzidenz von Diabetes und aktuellen Untersuchungen zu möglichen weiteren Anwendungsgebieten für Metformin wie Diabetesprophylaxe oder Krebsprävention ist zu erwarten, dass das Verschreibungsvolumen weiter ansteigen wird.

Die Wirkung von Metformin wird zu einem wichtigen Anteil vermittelt durch die Hemmung der hepatischen Glukoneogenese. Das vollständige Ausmaß der Wirkmechanismen von Metformin ist jedoch noch nicht endgültig aufgeklärt. Metformin wird unverändert renal ausgeschieden. Als unerwünschte Arzneimittelwirkungen können vor allem zu Beginn einer Behandlung gastrointestinale Beschwerden auftreten. Diarrhoe, Bauchkrämpfe, Übelkeit und Erbrechen sind sehr häufige Nebenwirkungen (Mutschler et al. 2013). Die Monotherapie mit Metformin verursacht keine Hypoglykämien. Das Risiko anderer oraler Antidiabetika Hypoglykämien zu verursachen kann in der Kombinationstherapie mit Metformin jedoch erhöht sein. Die gefährlichste Nebenwirkung von Metformin ist die Laktatazidose. Diese sehr seltene Komplikation tritt bei starker Kumulation von Metformin, z.B. bei hochgradiger Niereninsuffizienz, auf und ist mit einer hohen Letalität verbunden.

Der Transport von Metformin in die Hepatozyten wird primär durch OCT1 vermittelt (Shu et al. 2007). So weisen Oct1 (-/-) *knockout*-Mäuse trotz unveränderter Plasmakonzentration eine vielfach geringere hepatische Metformin-Konzentration auf (Wang et al. 2002). Auch beim Menschen wird bei Vorliegen von OCT1-*loss-of-function*-Varianten deutlich weniger Metformin in die Zellen aufgenommen (Shu et al. 2007). Auch gesunde (nicht diabetische) Träger von OCT1-*loss-of-function*-Varianten zeigen im oralen Glucose-Toleranztest unter Metformin signifikant höhere Blutzuckerwerte als Träger zweier Allele ohne Einfluss auf die Funktion (Shu et al. 2007). Umfangreiche klinische Untersuchungen an Diabetes-Patienten konnten bisher dennoch keinen klaren und reproduzierbaren Einfluss von OCT1 Polymorphismen auf die klinische Effektivität von Metformin in der Therapie von Diabetes feststellen (Zhou et al. 2009). Zwar wurden in einigen Studien signifikante Assoziationen mit reduzierter Effektivität beobachtet, jedoch war die Anzahl der untersuchten Individuen in diesen Studien deutlich geringer (Shikata et al. 2006; Becker et al. 2009; Becker et al. 2010). Es konnte jedoch eine Assoziation zwischen OCT1 Polymorphismen und einer erhöhter Inzidenz von gastrointestinalen Nebenwirkungen belegt werden (Tarasova et al. 2012; Dujic et al. 2015).

Tropisetron ist ein Arzneimittel aus der Gruppe der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten. Es wird auf Grund seiner antiemetischen Wirkung primär als Mittel gegen Chemotherapie-induzierte Übelkeit und Erbrechen (CINV) und post-operative Übelkeit und Erbrechen (PONV) verwendet. Neben diesem primären Anwendungsgebiet gibt es Versuche, Tropisetron – aktuell in der *off-label* Anwendung – zur Schmerzlinderung bei Fibromyalgie, sowie manchen rheumatischen Erkrankungen und myofaszialen Syndromen einzusetzen (Stratz und Müller 2003). In Deutschland werden etwa 120.000 definierte Tagesdosen im Jahr verschrieben (Schwabe und Paffrath 2012).

Die Wirkung von Tropisetron beruht auf antagonistischer Wirkung an 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren peripher an afferenten Nerven sowie im ZNS. Dort wird die Wirkung von Serotonin, welches als Reaktion auf Chemotherapeutika von den enterochromaffinen Zellen des Dünndarms ausgeschüttet wird, unterdrückt. Tropisetron wird vorwiegend hepatisch metabolisiert bevor es eliminiert wird. Die Metabolisierung wird hauptsächlich durch CYP2D6 katalysiert. Nebenwirkungen von Tropisetron sind am häufigsten Kopfschmerzen oder Obstipation. Es ist bekannt, dass diese mit höherer Wahrscheinlichkeit bei defizienten Metabolisierern auftreten (Novartis 2004). Weiterhin können Schwindel, Müdigkeit, andere gastrointestinale Störungen, sowie Überempfindlichkeitsreaktionen vom Typ 1, in sehr seltenen Fällen bis zum anaphylaktischen Schock, auftreten (Mutschler et al. 2013). Bei Überdosierung sind optische Halluzinationen, eine erniedrigte Krampfschwelle und bei bestehender Hypertonie ein weiterer Blutdruckanstieg als mögliche Auswirkungen bekannt.

Die hepatische Aufnahme von Tropisetron ist abhängig von OCT1 (Tzvetkov et al. 2012). Patienten, welche Träger zweier *loss-of-function*-Allele von OCT1 sind, zeigten höhere Plasmakonzentrationen von Tropisetron und signifikant stärkere antiemetische Wirkung. Klinische Daten zu eventuell häufiger auftretenden oder stärkeren Nebenwirkungen liegen noch nicht vor. Auch bei Ondansetron, einem anderen häufig angewendeten 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten, zeigten sich ähnliche Effekte auf die Pharmakokinetik und antiemetische Wirkung (Tzvetkov et al. 2012). Die Gründe dafür sind aber noch nicht aufgeklärt, da in *in-vitro*-Versuchen kein Transport von Ondansetron durch OCT1 gezeigt werden konnte.

Morphin ist ein Arzneimittel aus der Gruppe der Opioide. Morphin wurde im Jahr 1804 durch Friedrich Sertürner zum ersten Mal aus Opium isoliert und war das erste Alkaloid, welches in Reinform isoliert werden konnte. Auch heute noch wird Morphin primär aus Bestandteilen des Schlafmohns (*Papaver somniferum*) gewonnen (International Narcotics Control Board 2015).

Als potentes Analgetikum findet Morphin primär Einsatz in der Schmerztherapie. Starke oder stärkste akute oder chronische Schmerzen stellen Indikationen dar. Als hochpotentes Opioid wird Morphin gemäß dem WHO-Stufenschema der Schmerztherapie in Monotherapie oder in Kombination mit Koanalgetika und adjuvanten Therapeutika

eingesetzt. Darüber hinaus wird Morphin, teilweise *off-label*, auch in der symptomatischen Therapie von Husten, Angst oder Atemnot eingesetzt. Das Verschreibungsvolumen umfasst mehr als 17 Millionen definierte Tagesdosen pro Jahr in Deutschland (Schwabe und Paffrath 2012).

Die Arzneimittelwirkung von Morphin beruht auf seiner Wirkung als Agonist an Opioidrezeptoren ( $\mu$  und mit geringerer Affinität  $\kappa$ ) im Zentralnervensystem. Die Schmerzweiterleitung wird unterbunden und das Schmerzempfinden gesenkt. Bei oraler Gabe unterliegt Morphin einem starken *first-pass*-Effekt (Faura et al. 1998). Morphin wird überwiegend durch Glucuronidierung in der Leber metabolisiert. Die glucuronidierten Metabolite werden renal ausgeschieden. Als hochpotentes Opioid hat Morphin als Nebenwirkungen Übelkeit, Erbrechen und Verstopfung, sowie Benommenheit und Stimmungsveränderungen (Mutschler et al. 2013). Auch hat Morphin ein hohes Potential für die Entwicklung einer Opioid-Abhängigkeit. Bei Überdosierung kommen als weitere Nebenwirkungen Hypotonie, starke Sedierung und Hypoventilation bis zur gefährlichen Atemsuppression vor. Bei längerer Gabe kann es zur Toleranzentwicklung kommen, was eine Erhöhung der Dosis notwendig macht, um weiterhin den gleichen Effekt zu erreichen.

Morphin ist als hydrophile schwache Base einzuordnen und wird durch OCT1 transportiert (Tzvetkov et al. 2013). Bei Vorliegen von *loss-of-function*-Varianten kommt es zu einer deutlichen Reduktion der hepatozellulären Aufnahme von Morphin und damit einer verminderten Metabolisierung (Tzvetkov et al. 2013; Fukuda et al. 2013; Venkatasubramanian et al. 2014). Dementsprechend zeigen Träger eines oder zweier inaktiver OCT1-Allele signifikant erhöhte Plasmakonzentrationen von Morphin und es gibt Hinweise auf eine erhöhte Rate von Nebenwirkungen, insbesondere bei Kindern.

Tramadol ist ebenfalls ein Opioid. Im Gegensatz zu Morphin wurde es synthetisch entwickelt. Tramadol wird zur Therapie von mäßig starken bis starken akuten oder chronischen Schmerzen angewandt. In Deutschland werden jährlich mehr als 85 Millionen definierte Tagesdosen Tramadol verschrieben (Schwabe und Paffrath 2012).

Tramadol wirkt als Agonist an  $\mu$ -Opioidrezeptoren, aber auch als Noradrenalin- und Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer und Serotonin-Freisetzungsmittel (*releasing agent*), sowie an mehreren weiteren Rezeptortypen (Mutschler et al. 2013). Von großer Bedeutung für die Wirkung von Tramadol ist die hepatischen Metabolisierung durch das Enzym CYP 2D6 zu seinem aktiven Metaboliten O-Desmethyltramadol (auch als M1 bezeichnet) (Poulsen et al. 1996; Stamer et al. 2003). O-Desmethyltramadol ist ein 300-fach potenterer Agonist am  $\mu$ -Opioid Rezeptor als Tramadol (Raffa et al. 1993). Wie Morphin wird auch der aktive Metabolit O-Desmethyltramadol überwiegend durch den hepatischen Metabolismus in nicht aktive Phase II Metabolite, vor allem Glucuronide, überführt, die renal ausgeschieden werden.

Das Nebenwirkungsprofil von Tramadol entspricht als weiteres Opioid weitgehend dem des Morphins, das Risiko von Atemsuppression und Obstipation wurde aber als geringer

angesehen. Seit kurzem jedoch wird Atemsuppression als bedrohliche Nebenwirkung von Tramadol neu diskutiert, insbesondere bei Kindern und im Kontext des CYP2D6-Metabolisiererstatus (Orliaguet et al. 2015). Auch eine Assoziation zwischen der Therapie mit Tramadol und dem Auftreten von Hypoglykämien wurde beobachtet (Fournier et al. 2015). Insbesondere zu Beginn der Therapie besteht ein erhöhtes Risiko für Hypoglykämien, welche einen Krankenhausaufenthalt erforderlich machen.

Bei Überdosierung von Tramadol kommen auf Grund der Opioidrezeptor-unabhängigen Wirkungen zusätzlich zu den Konsequenzen der Opioid-Überdosierung eine erniedrigte Krampfschwelle und ein Serotonin-Syndrom (auch bei Kombination mit SSRI, MAO-Hemmern oder Trizyklischen Antidepressiva) in Frage.

Die hepatozelluläre Aufnahme von O-Desmethyltramadol, nicht jedoch von Tramadol selbst, ist abhängig von OCT1 (Tzvetkov et al. 2011). *Loss-of-function*-Varianten von OCT1 führen zu einer Reduktion des so vermittelten Transports. In Untersuchungen an gesunden Probanden zeigte sich eine signifikant erhöhte Plasmakonzentration von O-Desmethyltramadol in Trägern von OCT1-*loss-of-function*-Varianten (Tzvetkov et al. 2011). Auch eine stärkere und längere Miosis, als Indikator für die Opioidwirkung, wurde beobachtet.

Auch für Sumatriptan, ein Arzneimittel aus der Gruppe der Triptane, welches in der Therapie von Migräne sowie Cluster-Kopfschmerz Anwendung findet, wurde kürzlich festgestellt, dass es mit hoher Affinität durch OCT1 transportiert wird (Matthaei et al. 2016). Sumatriptan unterliegt bei oraler Aufnahme einem starken *first-pass*-Effekt und Patienten mit Leberfunktionsstörungen zeigen erhöhte Plasmakonzentrationen des Medikamentes (ratiopharm GmbH 2013). Auch bei Trägern zweier defizienter OCT1-Allele wurden deutlich erhöhte Plasmakonzentrationen von Sumatriptan beobachtet (Matthaei et al. 2016). Daten zu klinischer Effektivität und Nebenwirkungen von Sumatriptan und anderen Triptanen im Zusammenhang mit OCT1 liegen jedoch noch nicht vor.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der partielle oder komplette Verlust der OCT1-Aktivität deutliche Auswirkungen auf die Pharmakokinetik mehrerer wichtiger Medikamente hat. Vorangegangene Studien haben eine Anzahl von *loss-of-function*-Varianten von OCT1 in verschiedenen Populationen identifizieren können. Die Frequenzen, mit der diese Varianten jeweils in allen untersuchten Populationen auftreten, waren jedoch noch nicht in allen Fällen geklärt. Wichtiger noch, die untersuchten Populationen repräsentieren nur einen kleinen Teil der Weltpopulationen bzw. sind, wie z.B. im Fall der chinesischen Bevölkerung, aus einer Anzahl von Unterpopulationen zusammengesetzt. Hier besteht Bedarf für weitere systematische Untersuchungen.



## 1.4 Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die genetische Variabilität von OCT1 weltweit zu charakterisieren. Dabei soll auf die folgenden Fragen eingegangen werden:

1. Wie ist die Verteilung und Frequenz von OCT1 Polymorphismen in Populationen weltweit, insbesondere in bisher nicht untersuchten Weltregionen?
2. Lassen sich bisher noch nicht bekannte Polymorphismen in den kodierenden Bereichen von OCT1 identifizieren? In welcher Frequenz treten sie auf?
3. Was ist der Anteil von intermediären und defizienten OCT1 Transportern in den Populationen der Welt? Welche Unterschiede zwischen den Populationen zeigen sich?
4. Lassen sich Muster erkennen, welche Hinweise auf die Gründe für die genetische Variabilität von OCT1 und die beobachteten interethnischen Unterschiede geben können?

Diese Untersuchungen sollen zusammen mit vertieften funktionellen Untersuchungen, welche von Arbeitsgruppen-Kollegen durchgeführt wurden, dazu dienen, eine Weltkarte des genetisch bedingten Verlusts der OCT1-Aktivität zu erstellen. Diese Karte mag es ermöglichen, pharmakogenetisch bedingte interethnische Unterschiede in Wirksamkeit und Nebenwirkungen von Arzneimitteln, welche OCT1-Substrate sind, besser zu verstehen und in der klinischen Praxis zu beachten. Zudem soll sie dazu beitragen, die Gründe für die starke genetische Variabilität von OCT1 aufzuklären

Zu diesem Zweck wurde eine umfangreiche populationsgenetische Analyse durchgeführt, in welche die Daten von 2171 nicht untereinander verwandten Individuen aus 67 Populationen weltweit einfließen. Darunter wurden mittels massiv paralleler Sequenzierung die kodierenden Bereiche des OCT1-Gens von 1079 Individuen aus 53 Population weltweit (962 Individuen des HGDP-CEPH-Panels (Cann et al. 2002) sowie 117 Deutsche) auf Aminosäureaustausche mit potentielltem Effekt auf die Proteinfunktion untersucht. Zudem wurden aus der Datenbank des 1000 Genome Project (The 1000 Genomes Project Consortium 2012) die genetischen Daten von weiteren 1092 Individuen aus 14 Population entnommen und zusätzlich analysiert.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Reagenzien

<b>Reagenzien</b>	<b>Hersteller</b>
1 % Ethidiumbromid-Lösung	Merck, Darmstadt
10x SAP Puffer	usb, Staufen
100 bp DNA-Ladder GC 015-004	Genecraft, Köln
5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR SuperMix	Solis BioDyne, Tartu, Estland
Agarose Ultra Pure	Invitrogen, Karlsruhe
Agencourt AMPure XP Kit	Beckman Coulter, Krefeld
Big Dye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Borsäure 100 %	Merck, Darmstadt
Bromphenolblue Na-Salt (for Electrophoresis)	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden
EDTA	Merck, Darmstadt
EDTA 0,5M in Wasser gelöst	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethanol 96 %	Merck, Darmstadt
Ethanol denaturiert 99 %	Chemie-Vertrieb Hannover
Exonuclease I E.coli (20 u/µl)	Fermentas, St. Leon-Roth
FastAP	Thermo Scientific, Osterode
FastAP Puffer	Thermo Scientific, Osterode
Gelmedium 3130 POP-6™ Performance Optimized Polymer	Applied Biosystems, Foster City, CA USA
GeneRead Library Quant System (DNA Standard)	Qiagen, Hilden)
Glycerol 85 %	Central Pharmacy, Clinic Hospital Göttingen
Hi-Di™ Formamide	Applied Biosystems, Darmstadt
High Sensitivity DNA Assay Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, CA USA

HotStarTaq DNA Polymerase	Qiagen, Hilden
Ion OneTouch™ 200 Template Kit	Life Technologies, Darmstadt
IonXpress™ Plus Fragment Library Kit	Life Technologies, Darmstadt
Isopropanol ≥ 99,9 %	Merck, Darmstadt
Molekulargewichtsmarker GeneScan-120LIZ®	Applied Biosystems, Darmstadt
Multiplex PCR Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Multiplex PCR Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QiaQuick® Gel Extraction Kits	Qiagen, Hilden
qPCR® Core Kit (RT-QP73-05)	Eurogentec, Köln
qPCR® Core Kit for SYBR® Green (RT-SN10-15)	Eurogentec, Köln
Q-Solution	Qiagen, Hilden
Qubit® dsDNA BR Assay Kit	Life Technologies, Darmstadt
Sephadex™ G-50 Superfine	Amersham Bioscience, Freiburg
Sephadex™ G-50 Superfine	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Shrimp Alkaline Phosphatase (1u/μl)	usb, Staufen
SNaPshot® Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
SnapShot™ Multiplex Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Tris 100 %	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Tween 20 (Polyoxyethylen-Sorbit-Monolaurat)	BioRad, München

### 6x Ladepuffer

Glycerol	35,3 ml
EDTA	10 ml
Bromphenolblau	0,25 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 100 ml

### 5x TBE Puffer

Tris (pH von 8,3)	109,02 g
-------------------	----------

Borsäure	55,64 g
EDTA	9,3 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

1x TBE Puffer wird aus dem 5x TBE Puffer durch Zugabe von 4 Volumen ddH<sub>2</sub>O (z.B. 400 ml 5x TBE-Puffers mit 1600 ml ddH<sub>2</sub>O) hergestellt.

### 2.1.2 Geräte und Material

#### Geräte und Materialien

#### Hersteller

3130xl Capillary 50 cm	Applied Biosystems, Foster City, CA USA
3130xl Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt
7900HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
96 Millipore MAHV N45 Plate	Millipore, Bedford, USA
96er PCR-Platte	ABgene, Epsom
96-Well Filterplatte MultiScreen®-HV MAHVN4550	Millipore, Irland
Absolute qPCR Seal (Versiegelungsfolie)	Thermo Scientific, Osterode
Adapter-Küvette Modell 105.800 5808	Implen, München
Adhäsive PCR Versiegelungsfolie	ABgene, Epsom
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Santa Clara, CA USA
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Biofuge pico	Heraeus, Hanau
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
BioRobot® EZ1	Qiagen, Hilden
Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge JA-20 Rotor	Beckman, München
Chip Priming Station (Agilent Bioanalyzer Zubehör)	Agilent Technologies, Santa Clara, CA USA
DNA LoBind Tubes 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Flat cap strips, 12er	ABgene, Epsom

Flat cap strips, 8er	ABgene, Epsom
Fluor-STM-MultiImager	Bio-Rad, stad, Land
Fluor-S™ MultiImager	BioRad, Hercules, USA
Gel-Gusskammer, Modell 40-0911	PeqLab, Erlangen
Gelkämme, 12 Zahn, 1 mm, Modell 40-0911	PeqLab, Erlangen
Ion 316™ Chips	Life Technologies, Darmstadt
Ion OneTouch™ Enrichment System	Life Technologies, Darmstadt
Ion OneTouch™ Instrument	Life Technologies, Darmstadt
Ion Personal Genome Machine®	Life Technologies, Darmstadt
Labofuge 400R	Heraeus, Hanau
Laufkammer, Modell 40-0911	PeqLab, Erlangen
Magnetrahmen Dynal® MPC-S	Life Technologies, Darmstadt
Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Membran-Vakuum Pumpe	Vacuubrand, Wertheim
MS 2 Mini shaker-Vortexer	IKA, Staufen
Nanodrop-Küvette	Implen, München
Netzgerät Biometra® Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen
optisch klare 0,5-ml-Plastik-Tubes (Qubit)	Life Technologies, Darmstadt
Parafilm®	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Hamburg
Pipettenspitzen (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Hamburg
Plattenhalter für die Sequenzierung	Applied Biosystems, Darmstadt
Plattenhalter für Sephadex-Filtration	Millipore, Schwalbach
PTC-200 Peltier Thermal Gradient Cycler	MJ Research/BioRad, Hercules, USA
QIACube System	Qiagen, Hilden
QIAgility Pipettierroboter	Qiagen, Hilden
Qubit® 2.0 Fluorometer	Life Technologies, Darmstadt
Reaktionsgefäße (Tubes) 1,5 ml und 2 ml	Sarstedt, Hamburg
Spectrafuge™ Mini Centrifuge	Labnet International, Edison, NJ USA
Sterile Polypropylen-Tubes 15 ml	Greiner, Frickenhausen
Sterile Polypropylen-Tubes 50 ml	Sarstedt, Hamburg
TaqMan 7900HT	Applied Biosystems, Darmstadt

Thermo-Fast 384er Platte	ABgene Epsom
Thermo-Fast 96er Platte	ABgene, Epsom
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge VWR Galaxy Mini Centrifuge	VWR, Wien, Österreich
UV-Transilluminator TI 2	Biometra, Göttingen
Vortex-Adapter (Agilent Bioanalyzer Zubehör)	Agilent Technologies, Santa Clara, CA USA
Zentrifuge Heraeus Multifuge X3R	Thermo Scientific, Osterode

### 2.1.3 Software

Software	Hersteller
3100 Data Collection Software	Applied Biosystems , Darmstadt
3130xl Genetic Analyser	Applied Biosystems, Darmstadt
Clone Manager Suite	SECentral
DNA Sequencing Analysis	Applied Biosystems, Darmstadt
Gene Mapper v3.7	Applied Biosystems, Darmstadt
NextGENe	Softgenetics, State College, PA, USA
Lasergene Genomics Suite,	
SeqMan NGen	DNASStar, Madison, WI, USA
OLIGO Primer Analysis Software	Molecular Biology Insights, Colorado Springs, CO, USA
PHASE 2.1	Matthew Stephens Lab, University of Chicago Harvard University,
Poly-Phen-2	<a href="http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/">http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/</a>
PROVEAN	J. Craig Venter Institute, La Jolla, California, USA
Python 2.7	Python Software Foundation, <a href="http://www.python.org">www.python.org</a>
Quantity One R Version 4.3.1	Bio-Rad, München
SDS 2.4	Applied Biosystems, Darmstadt
Sequencing Analysis 5.2	Applied Biosystems, Darmstadt
SIFT	J. Craig Venter Institute, La Jolla, CA, USA
Staden Package	Staden Package Project, Sourceforge
Torrent Suite	Life Technologies, Darmstadt

### 2.1.4 Verwendete DNA

Um die Variabilität von OCT1 auf weltweiter Ebene zu charakterisieren, wurden 1079 DNA-Proben von Individuen aus 53 verschiedenen Populationen untersucht. Davon wurden 962 Proben vom französischen Centre d'Etude du Polymorphisme (CEPH) bezogen (siehe Tabelle 3) und waren Teil des *Human Genome Diversity Panel* (Cann et al. 2002). 117 Proben von gesunden deutschen Probanden entstammten einer vorherigen Studie (Tzvetkov et al. 2009). Die Sammlung der Blutproben, welchen die verwendete DNA entstammte, war gemäß der Deklaration von Helsinki mit informierter Einwilligung der betreffenden Individuen und mit Genehmigung der jeweiligen Ethikkommissionen geschehen (Cann et al. 2002; Tzvetkov et al. 2009). Die Proben waren anonymisiert bis auf die Angaben des Geschlechts, der Populationszugehörigkeit und der geographische Region, aus der sie stammten.

Tabelle 3: Zusammensetzung des HGDP-CEPH-Panels

Region	Populationen	Individuen
Subsahara-Afrika	7	108
Nordafrika und Mittlerer Osten	4	162
Europa	8	159
Zentralasien	10	229
Ostasien und Ozeanien	18	240
Amerika	5	64

Zur Vermeidung von Kontamination wurden für die Experimente DNA aus verdünnten Aliquots der primären aus lymphoblastoiden Zelllinien gewonnenen genomischen DNA des HGDP-CEPH-Panels und der direkt aus Blutproben gewonnenen Proben der deutschen Probanden verwendet. Um Zuordnungsfehler in der Genotypisierung auszuschließen, wurde jeweils das bestimmte Geschlecht mit dem angegebenen verglichen sowie ein Viertel der Proben zufällig ausgewählt ein zweites Mal unabhängig analysiert und die Ergebnisse verglichen.

Die Daten, welche aus diesen 1079 DNA-Proben gewonnen wurde, wurden erweitert durch die Daten von 1092 Individuen aus dem *1000 Genomes Project*. Diese Individuen entstammten 14 Populationen, davon fünf Populationen gemischten Ursprungs oder mit unklarer geographischer Herkunft (siehe Tabelle 4). Die Daten dieser fünf Populationen wurden nicht in die globale Analyse des OCT1-Funktionsverlustes oder die populationsgenetische Analyse einbezogen. Es bestanden keine Überschneidungen zwischen den Proben des HGDP-CEPH-Panels und denen des *1000 Genomes Project*.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Proben des 1000 Genome Project

Region	Populationen	Individuen
Afrika	2	185
Europa	4	294
Ostasien	3	286
gemischte Populationen	5	327

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode zur *in-vitro*-Vervielfältigung eines definierten DNA-Abschnittes (Template). Dabei wird die zu amplifizierende DNA-Region durch zwei synthetisch hergestellte Oligonukleotide von 18 bis 50 Nukleotiden Länge, sogenannte Primer, durch Anlagerung an den Start- und Endpunkt definiert. Der PCR-Prozess umfasst eine Anzahl von Zyklen (hier zwischen 25 und 40), wobei jeder Zyklus typischerweise aus drei Schritten besteht. Die drei Schritte des PCR-Zyklus sind Denaturierung, Annealing (Anlagerung) und Elongation (Verlängerung). Der Reaktionsansatz einer PCR besteht aus einer Pufferlösung mit Elektrolyten in der die Template-DNA, die Primer, eine hitzefeste DNA-Polymerase sowie Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) aller vier Nukleobasen enthalten sind.

In der Denaturierungsphase wird bei 95°C die doppelsträngige DNA durch das Aufbrechen von Wasserstoffbrückenbindungen in zwei Einzelstränge aufgetrennt. Der initiale Denaturierungsschritt ist bei der hier verwendeten Hotstart-Polymerase von besonderer Bedeutung und dauert deutlich länger als bei der Verwendung gewöhnlicher hitzefester DNA-Polymerase. In diesem Schritt wird die inaktive Form der Polymerase durch Abspaltung einer inhibierenden Gruppe in die aktive überführt. Unspezifische Bindungen, die bei niedrigeren Temperaturen auftreten können, werden so vermieden.

In der Annealing-Phase wird die Temperatur gesenkt, um das Anlagern der Primer an die komplementären DNA-Abschnitte (Primerhybridisierung) zu ermöglichen. Ist die Annealing-Temperatur optimal gewählt, so ist dieser Vorgang hochspezifisch. Die optimale Annealingtemperatur wird entweder in Abhängigkeit von Zusammensetzung und Länge der Primer gewählt oder experimentell ermittelt.

In der Elongationsphase wird die Temperatur zurück auf 72°C erhöht. In diesem Schritt wird durch die hitzebeständige DNA-Polymerase der Forward-Primer in 3'-Richtung komplementär zur Template-DNA bis zum Reverse-Primer verlängert. Aus einem Strang werden so zwei, im nächsten Zyklus durch erneute Replikation vier, und so weiter im Sinne



einer exponentiellen Vervielfältigung. Am Ende der Zyklen findet ein finaler Elongationsschritt statt, um alle begonnenen Elongationen zu vervollständigen. Alle diese Temperatureinstellungen und der Ablauf der Zyklen werden durch ein programmierbares PCR-Gerät durchgeführt.

### 2.2.2 Multiplex-PCR

In diese Arbeit wurde eine besondere Form der PCR, die sogenannte Multiplex-PCR, angewandt. Beim Verfahren der Multiplex-PCR werden mehrere (hier bis zu 11) unterschiedliche Target-Regionen, so genannte Amplikons, parallel in einem einzigen Reaktionsansatz amplifiziert. Dies erfordert eine passende Auswahl von Primer-Paaren und zu amplifizierenden Sequenzen, um Wechselwirkungen zu vermeiden, sowie Reaktionsbedingungen, die keine der Einzel-PCRs favorisieren.

Hier wurde der für Multiplex-PCRs optimierte Mastermix des Qiagen Multiplex-PCR-Kits (Qiagen, Hilden) verwandt. Optimale Annealing-Temperaturen und Primerkonzentrationen wurden durch Gradienten-PCR (2.2.3) und quantitative Echtzeit-PCR (2.2.9) ermittelt.

### 2.2.3 Gradienten-PCR

Die Gradienten-PCR wird vorwiegend eingesetzt, um die optimale Annealing-Temperatur zu ermitteln. Dabei werden für den gleichen Reaktionsansatz PCRs mit verschiedenen Annealing-Temperaturen (hier zwischen 50° und 70° C) aber sonst identischen Bedingungen durchgeführt. Um Sample-spezifische Effekte auszuschließen, wird ein Template-Mix bestehend aus fünf verschiedenen Samples benutzt. Diese multiplen PCRs werden meist in einem Durchgang mittels eines Temperaturgradienten über die verschiedenen Reaktionsgefäße eines PCR-Gerätes durchgeführt. Dieser wird durch eine spezielle Gerätefunktion ermöglicht.

Die Reaktionsprodukte werden jeweils per Gelelektrophorese (siehe Kapitel 2.2.4) aufgetrennt und dargestellt. Es werden diejenigen Reaktionsbedingungen ausgewählt, unter denen sich exakt alle erwarteten Amplikons mit guter Bandenintensität und mit minimaler interner Variation der Intensität im Gelelektrophoresebild zeigen.

### 2.2.4 Emulsions-PCR

Eine weitere Variante der PCR ist die Emulsions-PCR. Sie wird vor allem im Kontext von Sequenzierungsmethoden der zweiten Generation (*next generation sequencing*) eingesetzt. Das Ziel ist dabei, einzelne Template-Moleküle innerhalb einer Mischung von Templates zu amplifizieren ohne dass die Amplikons eines Templates sich mit denen der anderen vermischen. Auf diese Weise kann jedes Set von Amplikons separat sequenziert werden.

Um dies zu erreichen kommt als Reaktionsumgebung eine Wasser-in-Öl Emulsion zum Einsatz. Diese wird erzeugt indem die wässrige Lösung des Reaktionsansatzes in einer

hitzestabilen und nicht mit der Reaktion interferierenden Ölphase in Emulsion gebracht wird. Innerhalb der Emulsion existiert so eine sehr große Anzahl von mikroskopischen Tröpfchen des wässrigen Reaktionsansatzes, welche durch das umgebende Öl voneinander getrennt sind und damit separate Reaktionsräume (Mikroreaktoren) darstellen. Weiterhin kommen DNA-Trägerpartikel zum Einsatz, die via an die DNA ligierte Adaptoren die Template-DNA auf ihrer Oberfläche binden können. Ein Trägerpartikel („bead“) kann dabei eine große Anzahl von DNA-Molekülen tragen.

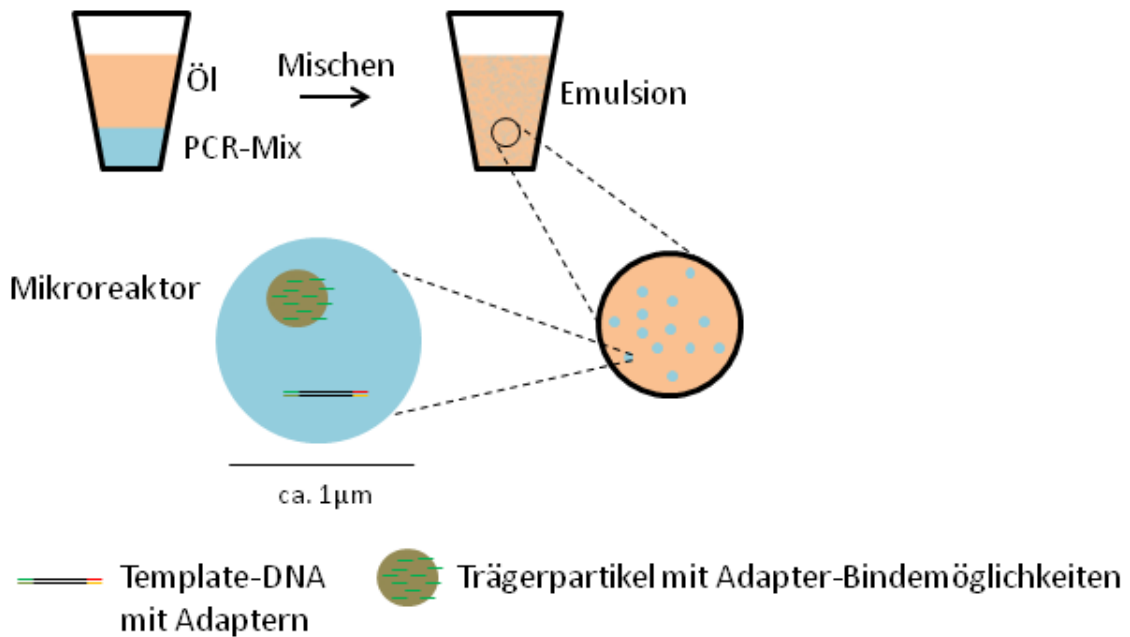


Abbildung 6: Reaktionsansatz einer Emulsions-PCR

Der PCR-Mix aus wässriger Pufferlösung mit dNTPs, Primern, DNA-Polymerase und DNA-Template wird mit der nichtreaktiven Ölphase vermischt, so dass sich eine Emulsion bildet, in der jeder mikroskopische wässrige Tropfen einen eigenen Reaktionsraum bildet. Mittels ligierten Adaptoren kann die Template-DNA (und replizierte Kopien) an Trägerpartikel binden, die nach erfolgter PCR die Herausreinigung der Reaktionsprodukte erlauben.

Um dem Ziel der Emulsions-PCR gerecht zu werden, muss ein einzelner Reaktionsraum exakt ein Trägerpartikel, ein Template-Molekül, sowie den PCR-Mix (Puffer, dNTPs, Primer und Polymerase) enthalten. Die Verteilung der Komponenten ist stochastisch in Abhängigkeit von der jeweiligen Konzentration im Reaktionsansatz. Die Konzentrationen von Template, Trägerpartikeln, Primern und Polymerase werden demnach so kalkuliert, dass die Anzahl der korrekt bestückten Reaktionsräume maximiert wird. Unter diesen Bedingungen wird ein einziges DNA-Molekül an das Trägerpartikel gebunden, amplifiziert und die generierten Kopien ebenfalls gebunden. Das Resultat ist ein klonal beladenes Trägerpartikel. Im Anschluss an die PCR wird die Reaktions-Emulsion mittels Isopropanol und Detergenz-Puffer gebrochen und die beladenen Trägerpartikel durch Zentrifugation und Magnetseparation aufgereinigt.

### 2.2.5 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist ein Verfahren zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge. Die DNA wird in die Taschen eines von ionischer Flüssigkeit umgebenen Agarosegels gegeben, welches dann unter elektrische Spannung gesetzt wird. Agarose ist ein pflanzliches Polysaccharid, das im Gel eine Polymer-Netzwerkstruktur mit Poren ausbildet. Auf Grund ihrer Phosphatgruppen ist DNA negativ geladen. Unter dem Einfluss des elektrischen Feldes wandert sie daher in Richtung der Kathode. Da sich kleine Fragmente schneller durch das Molekülsieb der Agarose bewegen können als größere werden die Fragmente dabei durch die Netzstruktur des Gels ihrer Molekülgröße entsprechend aufgetrennt. Mit steigender Agarose-Konzentration steigen auch der Grad der Vernetzung der Polymere und die Dichte des Gels, was die Bewegungsgeschwindigkeiten der Fragmente unterschiedlicher Länge beeinflusst.

Hier wurden für optimale Auflösung im Größenbereich der untersuchten DNA (180 bp – 650 bp) 2,5% Agarose-Gele eingesetzt. Es wurde also 1,25 g Agarose zu 50 ml 1x Tris-Borsäure-EDTA (TBE) Puffer hinzugegeben und die entstehende Lösung unter Sichtkontrolle in einem Mikrowellenherd aufgeköcht bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach dem Abkühlen auf unter 60°C wurde dem Gel 2,5 µl 1% Ethidiumbromid-Lösung hinzugefügt. Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basenpaare der DNA und fluoresziert unter UV-Licht, was die Darstellung der aufgetrennten DNA erlaubt.

Anschließend wurde das Gel in die mit Kämmen bestückte Gusskammer gegossen. Nachdem es vollständig abgekühlt war wurden die Kämmen entfernt und das Gel in die mit TBE befüllte Laufkammer gelegt. Jeweils zehn µl der Proben (ggf. mit ddH<sub>2</sub>O auf 10 µl aufgefüllt) versetzt mit je 2 µl 6x Laufpuffer wurden in die Taschen des Gels pipettiert. In eine separate Tasche wurden 5 µl 100 bp DNA-Ladder pipettiert. Die Gelelektrophorese wurde bei 120 V durchgeführt bis die Laufpufferfront nach visueller Kontrolle weit genug vorangeschritten war, dass eine ausreichende Auftrennung gewährleistet war. Die Dokumentation der Gele erfolgte mittels UV-Abbildungsgerät und Bildaufnahmesoftware. Durch Vergleich der Sample-Banden mit dem Größenstandard ließ sich die Größe der jeweiligen Fragmente approximieren und somit zuordnen.

### 2.2.6 Kapillargelelektrophorese

Das Prinzip der Kapillargelelektrophorese ist das gleiche wie bei der gewöhnlichen Gelelektrophorese. DNA wird während der Bewegung im elektrischen Feld durch ein Gelmedium der Größe nach aufgetrennt. Der Unterschied besteht darin, dass dies bei der Kapillargelelektrophorese innerhalb eines dünnen Kapillarrohres stattfindet. Dadurch kann die Länge der Trennstrecke sehr lang sein (hier 50 cm) und es wird nur eine sehr kleine Menge des Samples benötigt. Nahe des Endes der Kapillare befindet sich ein Detektor, welcher die zu analysierenden Stoffe detektiert. Vorteile des Verfahrens sind die hohe Präzision und Trennschärfe sowie die einfache Automatisierung.

### 2.2.7 DNA-Quantifizierung mittels Spektrophotometrie

DNA-Konzentrationen in Lösung können bestimmt werden, indem mit einem Photometer die Absorption von ultraviolettem Licht mit einer Wellenlänge von 260 nm gemessen wird. Unter Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes kann aus der Absorption die Konzentration berechnet werden.

Hier wurde ein Photometer mit Adapter-Küvette benutzt. Zunächst wurde die Kontaktfläche der Adapter-Küvette mit 70% Ethanol gereinigt und getrocknet. Zwei  $\mu\text{l}$  der zu messenden Lösung wurden auf die zuvor gereinigte Küvette aufgetragen und die Absorption bei 260 und 280 nm gemessen. Neben den zu messenden Lösungen wurde immer auch eine Leermessung des Lösungsmittels ohne DNA durchgeführt.

Die DNA-Konzentration wurde aus dem Absorptionswert anhand des Lambert-Beerschen Gesetzes berechnet:

$$E_{260\text{nm}} = -\ln\left(\frac{I_1}{I_0}\right) = c \epsilon_{260\text{nm}} d$$

Dabei ist  $E_{260\text{nm}}$  die Extinktion bei 260 nm

$I_1$ : Intensität des transmittierten Lichts

$I_0$ : Intensität des eingestrahnten Lichts

$c$ : Konzentration von DNA in der Flüssigkeit [mol/l]

$\epsilon_{260\text{nm}}$ : spektraler Absorptionskoeffizient von DNA bei 260 nm

$d$ : durchstrahlte Strecke in cm

Ein Absorptionswert von 1 für Licht der Wellenlänge 260 nm bei pH 7,0 und einer durchstrahlten Strecke von 1 cm entspricht einer Konzentration von 50 ng/ $\mu\text{l}$ . Als Maß für die Qualität der DNA Proben galt das Verhältnis der Absorption bei 260 und 280 nm (DNA rein von Proteinkontamination:  $A_{260}/A_{280}$  von 1,6-1,8).

### 2.2.8 DNA-Quantifizierung mittels Fluorometrie

Auch fluorometrische Verfahren können zur Bestimmung der DNA-Konzentrationen angewandt werden. Statt der Licht-Absorption wird dazu die Fluoreszenz von Farbstoffen bei Anregung mit Licht spezifischer Wellenlängen gemessen. Hier kam ein DNA-Assay Kit zum Einsatz, welches Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, welche nur dann auf Exzitation reagieren, wenn sie an doppelsträngige DNA gebunden sind.

Die Quantifizierung geschah nach Protokoll des Kits. In Kurzform: Es wurde zunächst die Arbeitslösung in einem Plastik-Behälter vorbereitet, indem Qubit® dsDNA BR Reagenz im Verhältnis 1:200 im dazugehörigen Puffer verdünnt wurde. Jeweils 1  $\mu\text{l}$  der Samples wurde dann zu 199  $\mu\text{l}$  der Arbeitslösung in optisch klaren 0,5-ml-Plastik-Tubes gegeben, mittels Vortex-Gerät vermischt und für 2 Minuten inkubiert. Danach wurde die Messung

im Fluorometer durchgeführt. Bei zusätzlicher Angabe der für die Messung verwandten Konzentration (1  $\mu\text{l}$  Sample in 200  $\mu\text{l}$  Gesamtmenge) wurde anhand der Daten einer vorher gemessenen Standard-Verdünnungsreihe die DNA-Konzentration automatisch berechnet.

### 2.2.9 DNA-Quantifizierung mittels Mikrofluidik-Gelelektrophorese

Eine Gelelektrophorese-basierte DNA-Auftrennung und –Konzentrationsbestimmung kann mit hoher Genauigkeit auch durch Geräte auf Basis von Mikrofluidik durchgeführt werden. Dabei sind kammerbestücktes Gel und Laufkammer der klassischen Gelelektrophorese durch Gel-gefüllte Kapillaren ersetzt. Hier kam das Agilent High Sensitivity DNA Assay Kit sowie ein Agilent 2100 Bioanalyzer-Gerät zum Einsatz.

Die Beladung des Mikrofluidik-Chips geschah nach Herstellerangaben. Kurz gesagt, es wurde zunächst ein Gel-Farbstoff-Mix vorbereitet. Nach Temperaturäquilibrierung zu Raumtemperatur (30 Minuten) wurden 15  $\mu\text{l}$  High Sensitivity DND Farbstoff-Konzentrat zu einem vorgefertigten Behälter mit Gelmatrix hinzugegeben, die Lösung mittels Vortex-Gerät gemischt und herunterzentrifugiert. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 2240 g wurde die Lösung dann lichtgeschützt bei 4°C bis zur Anwendung aufbewahrt.

Ein Agilent High Sensitivity DNA Assay Chip wurde auf der Chip Priming Station vorbereitet, indem 9  $\mu\text{l}$  Gel-Farbstoff-Mix (zu Raumtemperatur äquilibriert) in die dafür markierte Kavität pipettiert wurden. Mit einer luftgefüllten Spritze (Kapazität 1 ml) wurde 60 Sekunden lang per Luftdruck der Gel-Farbstoff-Mix in die Kanäle des Mikrofluidik-Chips getrieben. Die Vorrats-Kavitäten (Wells) wurden mit 9  $\mu\text{l}$  Gel-Farbstoff-Mix vorbereitet und die Wells für Samples und Ladder mit 5  $\mu\text{l}$  Marker geladen. Der fertig vorbereitete Chip wurde nun mit jeweils 1  $\mu\text{l}$  Sample pro Well (bzw. 1  $\mu\text{l}$  Ladder) beladen. Mittels Vortex-Adapter wurde der Chip für eine Minute in das Vortex-Gerät gespannt. Die Messungen der Samples erfolgte danach automatisiert im Bioanalyzer-Gerät.

### 2.2.10 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

Die quantitative Echtzeit-PCR ist eine Variante der PCR, die zusätzlich zur Amplifikation eine sehr genaue Messung der eingesetzten Menge der Template-DNA erlaubt. Dazu wird doppelsträngige DNA durch einen interkalierenden Farbstoff oder eine Zielsequenz durch spezifische Sonden mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und in Echtzeit die Fluoreszenz im Verlauf der Amplifikation gemessen. Die Fluoreszenz nimmt dabei proportional zur Menge der Reaktionsprodukte zu. Anhand der bestimmten Amplifikationskurve lässt sich in der exponentiellen Phase der Amplifikation eine Quantifizierung vornehmen.

Bei Verwendung eines interkalierenden Farbstoffes, welcher alle doppelsträngige DNA markiert, kann nicht zwischen verschiedenen Reaktionsprodukten unterschieden werden. Dazu sind Sequenz-spezifische Sonden erforderlich. Hier wurde durch eine Schmelzkurvenanalyse die Spezifität der Reaktion beurteilt und damit sichergestellt, dass

keine unspezifischen Produkte die Messung verfälschen. Dazu wird am Ende der Amplifikation die Temperatur kontinuierlich von 50° bis 95°C erhöht. Ist der Schmelzpunkt eines Fragmentes erreicht, so denaturiert der Doppelstrang in Einzelstränge und der Fluoreszenzfarbstoff wird freigesetzt, was sich in der fluorometrischen Echtzeitmessung als Abnahme der Fluoreszenz zeigt. Es wird die Änderung des Fluoreszenzsignals als Funktion der Zeit gegenüber der Temperatur aufgetragen. Anhand der Peaks der resultierenden Schmelzkurve zeigt sich, ob ein einzelnes Reaktionsprodukt oder aber eine Mischung mit Nebenprodukte oder Primerdimeren vorhanden ist. Dies ermöglicht eine Beurteilung der Spezifität und Qualität der Reaktion.

Hier wurde ein fertiger PCR-Mix mit dem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff EvaGreen® eingesetzt.

### **Reaktionsansatz**

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen</b>
5x PCR SuperMix	2,60 µl
Primermix	0,26 µl
ddH <sub>2</sub> O	7,14 µl
Gesamtvolumen	10,00 µl
cDNA	3,00 µl

Um sicher zu stellen, dass in der exponentiellen Phase der Amplifikation die Gesamtmenge des Produktes im Messbereich liegt, wurden die Samples um den Faktor 10<sup>7</sup> verdünnt (Verdünnungsschritte 1:100, 1:100, 1:100, 1:10). Jedes der Samples wurde doppelt oder dreifach gemessen, um Pipettierfehler oder aus anderen Gründen fehlgeschlagene Reaktionen identifizieren und ausschließen zu können.

Der Reaktionseinsatz wurde auf qPCR-Platten vorgelegt und die jeweilige DNA-Probe hinzugegeben, bevor die Platte mittels Folienverschluss versiegelt wurde. PCR und Messungen wurden in einem 7900HT Fast Real-Time PCR System durchgeführt.

### **qPCR-Bedingungen Multiplex-PCR 1**

<b>PCR-Stufe</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>	<b>Zyklen</b>
Initiale Denaturierung	95°C	15 min	
Denaturierung	94°C	30 sec	40 x
Anlagerung	64,5°C	1 min	
Verlängerung	72°C	40sec	

### **Schmelzkurvenanalyse**

### qPCR-Bedingungen Multiplex-PCR 2

PCR-Stufe	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	15 min	
Denaturierung	94°C	30 sec	40 x
Anlagerung	58,1°C	1 min	
Verlängerung	72°C	40sec	

### Schmelzkurvenanalyse

Nach abgeschlossener qPCR wurden die Daten mittels des Programms SDS 2.4 verarbeitet. Diejenigen Einzelergebnisse, die auf Grund stark abweichender Amplifikationskurven oder auf Grund der Schmelzkurvenanalyse als fehlgeschlagen gewertet wurden, wurden aus der Auswertung entfernt, um eine Verfälschung der Gesamtergebnisse zu vermeiden. Es wurde dann jeweils der Schwellenwert-Zyklus (cycle threshold,  $C_t$ -Wert), also der Zyklus in dem die Amplifikationskurve einen gewählten Schwellenwert übersteigt, bestimmt. Als Schwellenwert (threshold) war ein für alle Quantifizierungen geltender stets innerhalb der exponentiellen Phase liegender Wert von 0,2 festgelegt worden.

Ausgehend von einem als Referenz ausgewählten Sample wurde jeweils die Differenz zwischen  $C_t$  Wert von Sample und Referenz gebildet. Als relatives Maß für die Konzentration des zu messenden Produktes galt dann  $2^{-\Delta C_t}$ .

Wo absolute Konzentrationswerte zu bestimmen waren, wurde neben den Samples auch eine Verdünnungsreihe eines Standards mit bekannter Konzentration mitbestimmt. Dadurch konnten nicht nur relative sondern auch die absoluten Konzentrationen berechnet werden.

#### 2.2.11 DNA-Aufreinigung mittels Gelelektrophorese und Gelextraktion

Durch Gelelektrophorese (siehe 2.2.5) kann ein Gemisch von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge aufgetrennt werden. Anhand eines DNA-Größenstandards (DNA-Ladder) und der bekannten Länge eines heraus zu selektionierenden Fragmentes kann die jeweilige Bande identifiziert werden. Diese wird dann auf einem UV-Transilluminator, welcher es erlaubt, die die Ethidiumbromid-markierten Banden zu identifizieren, ausgeschnitten und der resultierende Gelblock in ein 2-ml-Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Hier wurde mit Hilfe des QiaQuick® Gel Extraction Kits die Gelextraktion durch ein QIACube System automatisiert durchgeführt. Die Bestückung und Initialisierung des Systems geschah nach Herstellerangaben.

### 2.2.12 DNA-Aufreinigung mittels Gelfiltration

Zur Aufreinigung von DNA durch Gelfiltration in vernetztem Dextran-Polymer-Gel wurde Sephadex™ G-50 Superfine eingesetzt. Jeweils 35 mg wurden in die Wells einer 96-Well Filterplatte gegeben und mit 300 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Nach drei Stunden Quellzeit folgte eine Zentrifugation bei 700 g für fünf Minuten. Es wurden dann 150 µl ddH<sub>2</sub>O hinzugeben und 30 Minuten Quellzeit gegeben. Nach erneuter Zentrifugation wurden fünf µl der aufzureinigenden DNA mit ddH<sub>2</sub>O ad 40 µl aufgefüllt und auf die Filtrationsplatte aufgebracht. Unter Verwendung einer sauberen 96-Well Platte wurde wiederum bei 700 g für fünf Minuten zentrifugiert und die aufgereinigte DNA gewonnen.

### 2.2.13 DNA-Aufreinigung mittels Magnetseparation

Zur Aufreinigung von DNA durch Magnetseparation kommen magnetische Partikel zum Einsatz, welche DNA unspezifisch binden können oder, z.B. über Streptavidin-Biotin-Bindungen, entsprechend markierte DNA spezifisch binden können. Die Aufreinigung erfolgt in drei Phasen: In der ersten Phase wird die aufzureinigende DNA an die Trägerpartikel gebunden. Im zweiten Schritt werden mittels von außen an das Reaktionsgefäß gebrachten Magneten die Trägerpartikel mit der gebundenen DNA immobilisiert. Während der dann erfolgenden Schritte bleibt sie so im Gefäß zurück während der Überstand verworfen wird. Meist schließen sich ein oder mehrere Waschschrte an. In der dritten Phase wird die DNA mittels eines Elutionspuffers von den Trägerpartikeln gelöst. Durch den Magneten bleiben die magnetischen Trägerpartikel zurück wenn die aufgereinigte DNA mit dem Überstand in ein neues Gefäß überführt wird.

### 2.2.14 DNA-Aufreinigung mittels *solid phase reverse immobilisation*

Das Verfahren der *solid phase reversible immobilisation* (SPRI) ist eine Methode zur größenselektiven Aufreinigung von DNA (DeAngelis et al. 1995). Dabei kommen paramagnetische Kügelchen (Beads), überzogen mit einem Carboxyl-modifiziertem Polymer, zum Einsatz. Diese können die in geeigneter Puffer-Umgebung durch sogenannte *crowding agents*, hier Polyethylen-Glycol, ausfallende DNA reversibel binden. Dabei kann eine Form der Größenselektion stattfinden, da größere DNA-Fragmente leichter ausfallen als kleinere. Bei steigender Konzentration von *crowding agents* steigt daher die untere *cut-off*-Größe der DNA-Fragmente. Durch einen Elutions-Puffer wird die DNA wieder freigegeben.

Hier wurde das Agencourt AMPure XP Kit verwendet. Zu 100 µl der aufzureinigenden DNA (10-100 ng DNA) wurde die Agencourt AMPure XP Reagenz im Volumenverhältnis 1,8x, 1,5x oder 1,4x (Selektion von DNA-Fragmenten größer als ca. 100 bp) hinzugegeben, beide vermischt und für fünf Minuten inkubiert.

Die Sample-Gefäße wurden dann in einer Tischzentrifuge für maximal fünf Sekunden zentrifugiert (*pulse-spin*-Zentrifugation) und für drei Minuten in einen Magnetrahmen



gestellt. Der Überstand wurde entfernt während die nun mit DNA beladenen Beads durch den Magneten zurückgehalten wurden. Es wurden dann zu den Beads 500 µl frisch vorbereiteter 70% Ethanol hinzugegeben und unter zweimaliger Drehung der Tubes für 30 Sekunden inkubiert bevor der Überstand wieder entfernt wurde. Dieser Waschschrift wurde zweimal durchgeführt. Nachdem so alle Verunreinigungen entfernt waren, folgte eine erneute *pulse-spin*-Zentrifugation, die Gefäße wurden zurück in den Magnetrahmen gestellt und alle Reste des Überstandes entfernt. Bei Raumtemperatur wurden die Beads maximal fünf Minuten luftgetrocknet. Dann wurden die Tubes aus dem Magnetrahmen entfernt, 25 µl des Elutionspuffers hinzupipettiert und durch auf- und abpipettieren sowie mittels Vortex-Gerät gemischt. Nach erneuter *pulse-spin*-Zentrifugation und einminütiger Inkubation im Magnetrahmen wurde der Überstand, das Eluat mit der aufgereinigten DNA, in neue Gefäße übertragen.

### 2.2.15 DNA-Sequenzierung nach Sanger (Kettenabbruch-Synthese)

Die Kettenabbruch-Synthese-Methode der DNA-Sequenzierung, auch Didesoxymethode genannt, ist ein auf der Polymerase-Kettenreaktion basierendes Verfahren, um die Nukleotidfolge eines definierten DNA-Abschnittes zu bestimmen. Statt eines Primerpaares wird ein einzelner Primer verwendet, durch den der Beginn der Sequenzierung bestimmt wird. Neben den Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) befinden sich auch markierte Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) im Reaktionsansatz. Auf Grund der fehlenden 3'-OH-Gruppe kann an der 3'-Position eines ddNTP kein weiteres Nukleotid binden. Wird daher statt eines dNTP ein ddNTP in die replizierte DNA eingebaut, so bricht an dieser Stelle die Elongation ab. Die jeweilige Position innerhalb der DNA-Sequenz, an welcher der Abbruch geschieht, wird vom Zufall bestimmt, sodass das Endprodukt eine Mischung von Fragmenten unterschiedlicher Länge ist. Durch Auftrennung der Produkte mittels Kapillargelelektrophorese und Detektion der markierten ddNTPs jeweils am Ende eines Fragmentes lässt sich die Sequenz bestimmen.

Hier wurde das Big Dye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit verwendet, welches fluoreszenzmarkierte ddNTPs einsetzt. Die Reaktion fand unter folgenden Bedingungen statt:

#### Sequenzierungs-Ansatz

<u>Reagenz</u>	<u>Volumen</u>
Big Dye®	1 µl
Primer (10 µM)	0,5 µl
DMSO	0,25 µl
ddH <sub>2</sub> O	2,25 µl
DNA	1 µl

### Sequenzierungs-Reaktion

PCR-Stufe	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	94°C	2 min	
Denaturierung	96°C	15 sec	25 x
Anlagerung	56,5°C	15 sec	
Verlängerung	60°C	4 min	
Finale Verlängerung	72°C	7 min	

Das Produkt der Sequenzierungs-Reaktion wurde durch Gelfiltration (siehe 2.2.12) aufgereinigt und durch Kapillargelelektrophorese aufgetrennt und ausgelesen. Zur Analyse der resultierenden Daten wurde die Software Sequencing Analysis 5.2 und Staden Package 4.0 eingesetzt.

#### 2.2.16 Genotypisierung mittels Einzelbasenverlängerung

Die Einzelbasenverlängerung (*single base primer extension*) ist ein Verfahren, um Proben auf bekannte Mutationen, die anhand einer einzigen Base erkannt werden können, zu untersuchen. Dazu wird ein Primer erstellt, der exakt vor der polymorphen Position endet. Es findet eine zyklische Reaktion, bestehend aus drei Schritten in Anlehnung an eine PCR (siehe 2.2.1), statt. Anders als bei der gewöhnlichen Polymerase-Kettenreaktion werden hier jedoch statt Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleosidtriphosphaten (ddNTPs) eingesetzt. Wie bei der PCR wird von der bei entsprechend gewählter Annealing-Temperatur spezifischen Bindung von Primer zu Template Gebrauch gemacht. Die Verwendung von ddNTPs führt jedoch dazu, dass nach der ersten Extension des Primers um eine Base keine weitere Extension möglich ist, da durch die fehlende 3'-OH-Gruppe kein weiteres Nukleotid binden kann. Statt Replikaten einer ganzen Sequenz, die in folgenden Zyklen als Template dienen und so eine exponentielle Amplifikation ermöglichen würden, werden daher hier nur kurze Fragmente entsprechend eines Primers plus einer farbmarkierten Base erzeugt, und die Amplifikation ist linear. In einer Kapillarelektrophorese werden diese Fragmente dann anhand der Farbmarkierung ausgelesen. Bei Verwendung von Primern unterschiedlicher Länge werden die erzeugten Fragmente der Länge nach aufgetrennt, wodurch mehrere Positionen gleichzeitig bestimmt werden können.

Es wurden zunächst die Regionen des OCT1-Gens, in denen die zu untersuchenden SNPs lagen, sowie eine Region im Amelogenin-Gen zur Geschlechtsbestimmung als Qualitätskontrolle (Tzvetkov et al. 2010) per Multiplex-PCR amplifiziert (Tabelle 5 und Tabelle 6).

Wo bekannte Polymorphismen im Primerbereich lagen, wurden degenerierte Primer verwendet (Tabelle 6).

Tabelle 5: Amplikons und Primer der Vor-PCR 1

Amplikon	Länge	Primersequenzen		Konzentration im 10x PCR-Primermix [ $\mu\text{M}$ ]
OCT1_1	653	for	5'-CATGCCACCGTGGATGACATTCTG-3'	2
		rev	5'-CTGGCCCCGACTTGTGCTAGCTGT-3'	2
OCT1_3	524	for	5'-GCGCCACCAGCGGGAACCTCTACCT-3'	3
		rev	5'-AACCTCCGCCTCCTGGGTTCAAGCA-3'	3
OCT1_4n	265	for	5'-TCTGGGCTGGTCCATCATGGTTCTC-3'	2
		rev	5'-GCCAGACCTCCCTCAGCCTGAAGAC-3'	2
OCT1_5	333	for	5'-TGGCATCCCACCATGCATGTCTGAC-3'	2
		rev	5'-ACTGGTGCCCCGCAAGCTCCTTGAC-3'	2
Geschlecht (optional)	106	for	5'-CACTGCTGCTTCTCTGGTTGGAGTCA-3'	2
		rev	5'-CACGGGGATGATTTGGTGGTGCAGC-3'	2

Tabelle 6: Amplikons und Primer der Vor-PCR 2

Amplikon	Länge	Primersequenzen		Konzentration im 10x PCR-Primermix [ $\mu\text{M}$ ]
Exon 1	471	for	5'-CGGCCATGAGCATGCTGAGCCATCA-3'	3
		rev	5'-GTCCCAGGAACCTCCRTGTTACAGA-3'	3
Exon 4	258	for	5'-GGGCTCCTGGGCTCCTGCAAGGAAC-3'	2
		rev	5'-CGCCCCCTCCCCGTAGGCAGGAG-3'	2
Exon 5	255	for	5'-CCCCGCTCAGGGCTGAACGTCAGAC-3'	2
		rev	5'-CTGGCAGCCCCAGAYGAATCTGCAC-3'	2
Exon 7	420	for	5'-AGGGCATTCTAAACCCAGTGATTCAT-3'	3
		rev	5'-TTCCAGAGGCTTATCAAAGAGTCAC-3'	3
Exon 8	237	for	5'-ACCCACCATGGCCTCTCACAGTAAC-3'	2
		rev	5'-GGTGGGTTACAGCCATTTCACTG-3'	2

Die einzelne PCR Reaktion wurde in einem Volumen von 11  $\mu\text{l}$  durchgeführt, der Reaktionsansatz bestand aus 10  $\mu\text{l}$  PCR Mastermix und 1  $\mu\text{l}$  gDNA (etwa 10 bis 200 ng gDNA):

**PCR-Mastermix**

Reagenz	Volumen [ $\mu\text{l}$ ]
ddH <sub>2</sub> O	3,4
2x QIAGEN Master Mix	5,5
10x PCR Primer-Mix	1,1

10  $\mu\text{l}$  des Mastermixes wurden mit einer Multipipette in die Wells (Kavitäten) einer 96-Well-Platte verteilt und 1  $\mu\text{l}$  genomische DNA zugegeben. Die Reaktion fand unter den folgenden Bedingungen statt:

**PCR-Reaktion**

PCR-Stufe	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	15 min	
Denaturierung	94°C	30 sec	35 x
Annealing	65°C	1 min 30 sec	
Elongation	72°C	1 min	
Finale Elongation	72°C	10 min	

Die PCR-Reaktion wurde in einem PCR-Gerät mit geheiztem Deckel durchgeführt.

Für die nachfolgenden Reaktionen mussten die in den PCR-Produkten verbleibenden Primer und dNTPs entfernt werden. Dies geschah durch enzymatische Aufreinigung mit der Einzelstrang-Exonuklease ExoI, welche die Einzelstrang-Oligonukleotide der Primer degradiert, und SAP (*shrimp alkaline phosphatase*), welche dNTPs hydrolysiert. Zum gesamten PCR-Produkt (11  $\mu\text{l}$ ) wurden 3  $\mu\text{l}$  des folgenden Mixes zugegeben.

**Aufreinigungsreaktion**

Reagenz	Volumen [ $\mu\text{l}$ ]
SAP (1 U/ $\mu\text{l}$ )	2,0
ExoI (10 U/ $\mu\text{l}$ )	0,3
10X SAP Puffer	0,7

Die Reaktion fand bei 37°C für eine Stunde statt und wurde durch Erhitzen auf 80°C für 15 Minuten gestoppt.

Für die Einzel-Basen-Primerverlängerungsreaktion wurde das SNaPshot® Kit der Firma Applied Biosystems verwendet. Dabei wurde 2 µl des aufgereinigten PCR-Produktes zu 3 µl des folgenden Mastermixes zugegeben.

### SNaPshot-Mastermix

Reagenz	Volumen [µl]
2-fach <i>SNaPshot Reaction Mix</i>	1
10x SNaPshot Primer-Mix	0,5
ddH <sub>2</sub> O	1,5

Die SNaPshot-Primer-Mischung bestand aus einer Anzahl von Polymorphismus-spezifischen Primern mit verschiedener Länge zur Auftrennung in der nachfolgenden Kapillarelektrophorese (Tabellen 7 und 8). Die Konzentrationen der einzelnen Primer in der Primer-Mischung waren nach Vorexperimenten so gewählt, dass die Konzentration der jeweiligen Reaktionsprodukte relativ ausgeglichen ist.

Tabelle 7: Primer-Mischung der Primerverlängerungsreaktion 1 (SNaPshot-Primer-Mix 1)

SNP	Sequenz	Base extension		Konzentration im Primermix
Gender	GGGCTCGTAACCATAGGAAG	G	A	1 µM
S14F	gaTCTGGAGCAGGTTGGGGAGT	C	T	0,5 µM
S189L	gagatcAGAAGGCCATGAGCACGCC	A	G	0,5 µM
R61C	gatcgatcTGGGGTGGCTGAGCTGAGCCAG	C	T	1 µM
Q97K	gatcgatcgatcgTACACAGCTGAGGGCGCTCT	G	T	0,5 µM
P117L	gatcgatcgatcgatcgCACCAACAGGAGCCACCTGC	C	T	1 µM
R206C	gatcgatcgatcgatcgatcGACCAGGCCCTGCAGCAGGC	A	G	0,5 µM
G401S	gatcgatcgatcgatcgatcCATGGCCATGGGGTAGATGCGGC	C	T	1 µM
M420del	gatcgatcgatcgatcgatcgatcGCGGGGGCAGCCTGCCTCGTCAT	G	T	1,5 µM
G465R	gatcgatcgatcgatcgatcgatcgatcAGGGAGGAACACACCATCACTC	C	T	1,5 µM
C88R	gatcgatcgatcgatcgatcgatcgatcgatcgatcgaGTCCACTTCATAGCGCCTGC	A	G	1,5 µM
G220V	gatcgatcgatcgatcgatcgatcgatcgatcgatcgatcCAAGGGCAACTGGATGGCTG	G	C	2,5 µM

Tabelle 8: Primer-Mischung der Primerverlängerungsreaktion 2 (SNaPshot-Primer-Mix 2)

SNP	Sequenz	Base extension		Konzentration im Primermix
Gender	GGGCTCGTAACCATAGGAAG	A	G	2 $\mu$ M
rs9457840	atCCCTATTGACCCTGGAGTCC	T	C	2 $\mu$ M
S29L	gagatcAGATGGGCGCAAAGGCAGCC	G	A	2 $\mu$ M
E284K	gatcgatcgaTAACAGCCACCRAGGGGACT	C	T	2 $\mu$ M
T245M	gatcgatcgatcgTAAGCGCCACCAGCCCCACC	G	A	2 $\mu$ M
G414A_alt_3	gatcgatATGGCCRTGTCAAATTTGTTGGCRG	C	G	6 $\mu$ M
I449T	gatcgatcgatcgatcgatcGCTCAGCATTACCCAGGCAG	A	G	6 $\mu$ M
R488T	gatcgatcgatcgatcgatcgatcCTTCATAGTCTTCAGGCTGA	G	T	2 $\mu$ M
rs58812592_alt	gatcgatcgatcgatcgatcgatcgatcgaCAAACGATTTGATCAGATGG	C	G	6 $\mu$ M
rs76103748	gatcgatcgatcgatcgatcgatcgatcgatcgaCTTGCCCCTCATTTTGTITG	G	C	2 $\mu$ M

Die Reaktion fand unter folgenden Bedingungen statt:

#### SNaPshot-Reaktion

PCR-Stufe	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	96 °C	2min	
Denaturierung	96 °C	10 sec	25 x
Anlagerung	50 °C	5 sec	
Verlängerung	60 °C	30 sec	

Die SNaPshot-Reaktion wurde vor der Kapillargelelektrophorese von den nicht-integrierten dNTPs enzymatisch aufgereinigt. Dafür wurde 0,5  $\mu$ l FastAP und 0,5  $\mu$ l FastAP-Puffer gemischt, zu dem Reaktionsprodukt hinzugegeben und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die alkalische Phosphatase wurde für 15 Minuten bei 75°C hitzeinaktiviert.

#### Sequenzierungsmix

Reagenz	Volumen [ $\mu$ l]
Formamid (Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystems)	10
Molekulargewichtsmarker <i>GeneScan-120LIZ</i> ® (Applied Biosystems)	0,2

1  $\mu$ l des aufgereinigten Reaktionsproduktes wurde zu 10  $\mu$ l Sequenzierungsmix hinzugegeben. Es folgte ein Denaturierungsschritt bei 95°C für fünf Minuten, danach wurde die Reaktion sofort auf Eis gelegt. Mittels Kapillargelelektrophorese wurde die Reaktion dann analysiert. Anhand der Retentionszeit und der detektierten Base konnte zugeordnet werden, welcher der Primer um welche Base verlängert wurde. Da Position und Richtung der Primer sowie die erwartete Base in der Referenzsequenz und in der jeweiligen Variante bekannt waren, konnte so der Genotyp bestimmt werden.

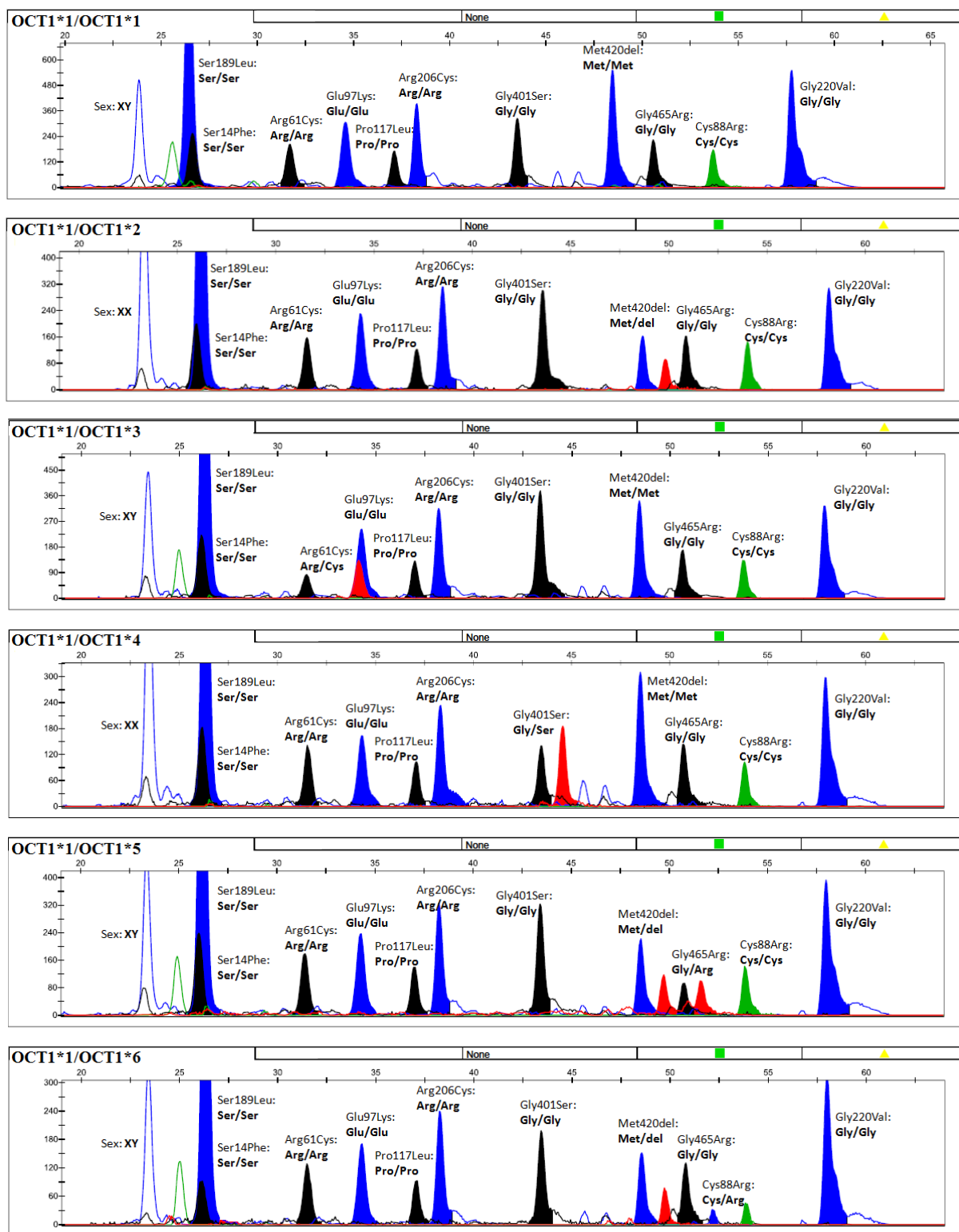


Abbildung 7: Beispiele von Elektropherogrammen nach SNaPshot-Einzel-Basen-Primerverlängerung

Gezeigt sind die Signale der häufigsten OCT1-Genotypen identifiziert in der SNaPshot-Reaktion 1 nach der Analyse mittels Gene Mapper v3.7 Software. Signalkodierung: Blau = G, Schwarz = C, Grün = A, Rot = T. Für die Zuordnung zu OCT1-Haplotypen siehe Kapitel 3.3.

### 2.2.17 Rekonstruktion der Haplotypen

Zur Rekonstruktion von Haplotypen aus den mittels *Single Base Primer Extension* (siehe 2.2.16) gewonnenen Genotypen kam ein statistisches Inferenz-Verfahren implementiert im Programm PHASE 2.1 zum Einsatz (Stephens et al. 2001). Um fehlerhafte Zuordnungen auf Grund von algorithmischen Artefakten auszuschließen, wurden zehn unabhängige Durchläufe mit unterschiedlichen Seed-Zahlen (2, 1536, 2936, 3123, 4957, 5283, 6757, 7992, 8633, 9045) durchgeführt und die Ergebnisse verglichen. Es wurden keine abweichenden Resultate beobachtet.

### 2.2.18 Einschätzung der Fehlerwahrscheinlichkeit auf Grund nicht-repräsentativer Stichproben

Da für einige der untersuchten Populationen nur Proben einer kleinen Anzahl von Individuen zu Verfügung standen, musste die Wahrscheinlichkeit eingeschätzt werden, mit der ein beobachtetes Ergebnis auf einer zufälligen Auswahl nicht-repräsentativer Individuen in der Stichprobe beruht. Zu diesem Zweck wurde die Wahrscheinlichkeit, eine definierte Anzahl von *loss-of-function*-Allelen in der Stichprobe einer Population mit bekannten Allelfrequenzen zu beobachten, wie folgt berechnet:

$$P(n, k, p) = \binom{n}{k} p^k (1 - p)^{(n-k)}$$

Dabei steht  $n$  für die Anzahl der untersuchten Allele,  $k$  für die Anzahl der beobachteten *loss-of-function*-Allele und  $p$  für die Frequenz von *loss-of-function*-Allelen in der Population.

Gegeben eine beobachtete Anzahl von *loss-of-function*-Allelen in einer Population wurde dann unter der Annahme, dass die wahre Frequenz des OCT1-Verlusts der einer Vergleichspopulation entspricht, die Wahrscheinlichkeit berechnet, die beobachtete Anzahl oder mehr (bzw. die beobachtete Anzahl oder weniger) durch eine zufällige Auswahl zu erzielen:

$$\sum_{i=k}^n P(n, p, i) \quad \text{bzw.} \quad \sum_{i=0}^k P(n, p, i)$$

### 2.2.19 Ionen-Halbleiter-DNA-Sequenzierung (Ion Torrent™)

Die Methode der Ionen-Halbleiter-DNA-Sequenzierung (*ion semiconductor sequencing*) fällt in die Kategorie der Hochdurchsatz-Sequenzierung (*next generation sequencing*). Das Verfahren basiert auf der präzisen und zeitlich hochauflösenden Detektion von pH-Änderungen mittels ionen-sensitiven Feldeffekttransistoren (ISFET) und ist unter dem Markennamen Ion Torrent™ bekannt (Rothberg et al. 2011). Während der DNA-Replikation wird bei der Bindung eines Desoxyribonukleosidtriphosphats (dNTP) am 3'-Ende des gebildete DNA-Stranges neben Pyrophosphat (welches z.B. bei der Methode des Pyrosequencing



verwendet wird) auch ein  $H^+$ -Ion freigesetzt (Abbildung 8A). Durch eine quantitative Messung der freigesetzten  $H^+$ -Ionen kann unter den richtigen Bedingungen die Sequenz eines Stücks DNA im Verlauf der Reaktion abgelesen werden (Abbildung 8B).

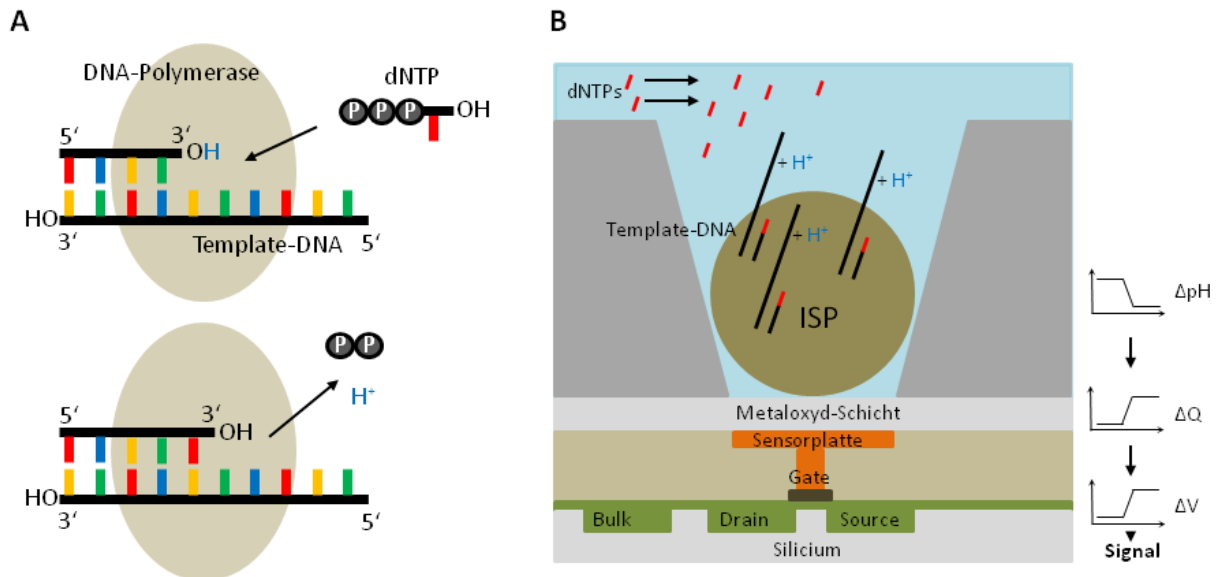


Abbildung 8: Prinzip der Ionen-Halbleiter-Sequenzierung

**A:** In der Elongation wird neben Pyrophosphat auch ein  $H^+$ -Ion freigesetzt. **B:** Die freigesetzten  $H^+$ -Ionen führen zu einer pH-Änderung in der Reaktionskammer, wodurch sich die Ladung an der Metaloxyd-Schicht am Boden der Kammer verändert. Ein Sensorelement steuert das Gatter (Gate) des Feldeffekttransistors an und eine Spannungsänderung über dem Transistor tritt ein, welche als Signal weitergeleitet wird. Abbildung B angefertigt in Anlehnung an Rothberg et al. 2011, S. 349.

In der Ion Torrent™ PGM Implementation sind die ISFETs auf einem CMOS-Chip arrangiert, der je nach Modell zwischen 1,2 und 11,1 Millionen Reaktionskammern (*reaction wells*) hat. Die zu sequenzierenden DNA-Fragmente sind über Adaptoren an Plastik-Kügelchen (Ion Sphere Particles, ISPs) gebunden, von denen die Reaktionskammern jeweils nur eines aufnehmen können. Die ISPs sind klonal mit einer hohen Kopienzahl beladen, damit das Signal gut auslesbar ist. Die Reaktionsumgebung wird dann zyklisch verändert, so dass jeweils nur ein Typ von dNTPs, entweder dATP, dGTP, dCTP oder dTTP, vorhanden ist. Anhand der von den ISFET Sensoren gemessenen pH-Änderung oder deren Abwesenheit wird dann abgelesen, ob (und ggf. wie oft hintereinander) das entsprechende dNTP eingebaut wird.

Nach dem Stand der Technik zur Zeit der Durchführung konnten Sequenzen von bis zu 200 bp Länge sequenziert werden. Da in beiden Richtungen sequenziert wird lag die empfohlene maximale Länge von zu sequenzierenden DNA Fragmenten nach Herstellerangaben bei 260 bp (330 bp abzüglich der Barcodes und Adapter, siehe Library-Vorbereitung).

## Voramplifikation

Es wurden 14 Regionen des OCT1-Gens in 21 PCR-Reaktionen voramplifiziert (Tabelle 9 und Tabelle 13). *Target Regions* größer als 260 bp wurden dabei durch zwei oder mehrere überlappende Amplikons abgedeckt. Bei der Wahl der Primer für die Voramplifikation wurde die Länge der Produkte, das Bindungsprofil sowie die bekannten Polymorphismen in der Primerregion berücksichtigt.

Tabelle 9: PCR-Amplikons für die Resequenzierung

<b>Amplikon</b>	<b>Länge</b>	<b>Tm</b>	<b>GC</b>
<b><u>Multiplex-Reaktion 1</u></b>			
HFN4BS 2	234	83,3	44
proximale Promotor Region 2c	257	82,6	42
Exon 1_2	242	92,2	65,7
Exon 1_4	243	86,2	51
Exon 3	236	89	58,1
Exon 4	258	91,3	63,2
Exon 6	222	89,5	59,5
Exon 7_1	248	86,7	52
Exon 8	237	86,3	51,5
Exon 10	234	87,8	55,1
Exon 11_2	229	83,1	43,7
<b><u>Multiplex-Reaktion 2</u></b>			
HFN4BS 1	186	81,4	40,9
proximale Promotor Region 1	236	85,9	50,4
ECR1	234	84	45,7
Exon 1_1	199	89,2	59,3
Exon 1_3	255	91,3	63,1
Exon 2	240	86,3	51,3
Exon 5	255	86,3	51
Exon 7_2	223	85,7	50,2
Exon 9_1	207	82,8	43,5
Exon 11_1	203	81,2	39,9

Gezeigt sind jeweils die Länge des Amplikons in bp, die Schmelztemperatur in °C und der GC-Gehalt in %.

Diese 21 PCRs wurden in zwei Multiplex-Reaktionen zusammengefasst (Tabellen 10 und 11), wobei die Zuordnung auf den vorhergesagten Primer-Schmelzpunkten und der Vermeidung von konsekutiven Produkten basierte. Letzteres war zwingend erforderlich, da in mehreren Fällen überlappende PCRs vorgesehen waren, um eine vollständige Abdeckung der *Target Regions* zu gewährleisten.

Die Primer-Konzentrationen für jede Einzelreaktion wurden in einem Optimierungsprozess so gewählt, dass die Endkonzentration der verschiedenen Produkte so weit wie möglich ausgewogen war. Eine übermäßig hohe oder zu niedrige Konzentration eines Amplikons in der Vor-PCR wäre später nicht mehr zu korrigieren. Und da die Abdeckung (Coverage) beim Sequenzieren mit Ion Torrent PGM zu großem Teil von der relativen Konzentration im Template, das auf den Chip aufgetragen wird, abhängig ist, würde dies zu ähnlichen Schwankungen in der Sequenzierungstiefe führen. Die Optimierung geschah durch Bestimmung der jeweiligen Konzentrationen der Einzelprodukte im Multiplex-PCR-Produkt mittels quantitativer Echtzeit-PCR Messungen gefolgt von entsprechender Anpassung der Primerkonzentrationen in mehreren Zyklen.

Tabelle 10: Sequenzen und Charakteristik der Primer in Multiplex-PCR 1

Primer	Länge	Tm	GC	Sequenz	Konzentration im Primer Mix [ $\mu$ M]
HFN4BS_f2	24	73,6	50	GCAACCAGTTTGCACAGAGAGAGA	2
HFN4BS_r2	25	71	36	AAGGGTAAAATTTGGCTTTCACCTTG	2
ProxPromotor_f2c	26	70,3	38,5	CCAAATAATACCTGTTCCCTCAAAC	12
ProxPromotor_r2c	24	72,5	45,8	AGCCCGAAGAGAATTGAAGTTCAG	12
Exon1_f2c	23	78,7	56,5	TGGGCATCGTCTTCCTGGGTTTC	1,2
Exon1_r2c	22	81,6	68,2	CGGCAGGTGGCTCCTGTTGGTG	1,2
Exon1_f4	24	78,4	50	TGGCCACGTGCATTCTTCCTTTTC	2
Exon1_r4	24	77,6	58,3	CTCCCCAACCTGCTCCAGAATGTC	2
Exon3_f1	23	74,1	52,2	TGACCCCAGATTTCAACCTCTCC	2
Exon3_r1	23	75,5	52,2	CCTGGCCTCATCCCCATGATAAT	2
Exon4_f1	25	84,1	68	GGGCTCCTGGGCTCCTGCAAGGAAC	1,5
Exon4_r1	23	84	73,9	CGCCCCTTCCCCGTAGGCAGGAG	1,5
Exon6_f1	25	81,1	60	TCCCAGGTGGCTCTGCTCATGACAG	1
Exon6_r1	25	83,1	60	GTGCTTGGGCGAGCGTGCTGATTCT	1
Exon7_f1e	22	71,5	54,5	CGGGAACCTCTACCTGGATTTTC	8
Exon7_r1e	25	70,5	44	TTCCAGAGGCTTATCAAAGAGTCAC	8
Exon8_f1	25	76,7	56	ACCCACCATGGCCTCTCACAGTAAC	1,2
Exon8_r1	24	77,2	54,2	GGTGGGTTACAGCCATTTCACTG	1,2
Exon10_f1	25	72,2	50	TTGGCTGGCTGTGATTATTTCTGTA	2
Exon10_r1	23	75,7	52,2	TTTGGAGGGCGTGTCAGACTCAT	2
Exon11_f2b	22	69,6	50	GGCACCTGAGAGAGATGTTTTG	5
Exon11_r2b	24	72	45,8	ATCGAATGCACAGGTGGAAGATAG	5

Tabelle 11: Sequenzen und Charakteristik der Primer in Multiplex-PCR 2

Primer	Length	Tm	GC	Sequence	Konzentration im Primer Mix [µM]
HFN4BS_f1	25	71,8	44	CCATCGCACTCCTTTTTAAGAAGTC	2
HFN4BS_r1	25	73	44	GCTGGCGAAAGGGTAAAAGTTCTTA	2
ProxPromotor_f1	25	73,9	60	AGAGCCCTGAGGGAGCTACTAGGAG	3
ProxPromotor_r1	25	72,5	40	TTTGCTGTCCAAGTGTGAAACATCT	3
ECR_f1c	24	77	54,2	CCCAGCTCCTCCTCCAAAAGTAA	3
ECR_r1c	25	75,3	48	GGGAGAGTCAAAGCCAGGAAAATG	3
Exon1_f1c	25	85,8	60	CGGCCATGAGCATGCTGAGCCATCA	1,2
Exon1_r1d	25	82,1	64	TCAGCTCAGCCACCCCAGGACTCTG	1,2
Exon1_f3	24	77,6	58,3	AGCCCTGCGGAGGAGCTGAACTATA	3
Exon1_r3	25	74,9	52	GTCCCAGGAACTCCCATGTTACAGA	3
Exon2_f1	25	72,3	52	ATGGAAGGGTGTAGTCCTGACTCAC	1
Exon2_r1	25	72,7	48	CGCCCTTAGAATCTGTTCTCATGAC	1
Exon5_f1	25	84,5	68	CCCCGCTCAGGGCTGAACGTCAGAC	2
Exon5_r1b	25	83,7	64	CTGGCAGCCCCAGACGAATCTGCAC	2
Exon7_f2b	26	74,1	42,3	AGGGCATTCTAAACCCAGTGATTCAT	1,5
Exon7_r2b	20	76,7	65	CCCGGGATTTCGACCAGAGC	1,5
Exon9_f1c	25	66,9	32	TGGAAAAGTGAATCACAGAATTATC	6
Exon9_r1c	25	68,6	36	GCTGCAAAGAAGGAATGATATATG	6
Exon11_f1	25	74	36	TTTGCAACAGTTCCATCATCAACAA	7
Exon11_r1	25	71,2	44	TGCAGAGGATAACTCCATCTTCATC	7

Der Reaktion-Mix für beide Multiplex-PCR-Reaktionen wurde wie folgt angesetzt:

#### **Multiplex-Mastermix**

Reagenz	Volumen [µl]
2-fach QIAGEN Master Mix	5,5
Primer Mix	1,1
Q-Solution	2,2
ddH2O	1,2

Nach Zugabe von 1 µl DNA fand die PCR-Reaktion unter den folgenden Bedingungen statt:

**Multiplex-PCR 1**

PCR-Stufe	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	15 min	
Denaturierung	94°C	30 sec	35 x
Annealing	64,5°C	1 min 30 sec	
Elongation	72°C	1 min	
Finale Elongation	72°C	10 min	

**Multiplex-PCR 2**

PCR-Stufe	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	15 min	
Denaturierung	94°C	30 sec	35 x
Annealing	58,1 °C	1 min 30 sec	
Elongation	72°C	1 min	
Finale Elongation	72°C	10 min	

**Pooling**

Für die Sequenzierung wurden die Amplikons der einzelnen Samples aus beiden Multiplex-Reaktionen wieder zusammengeführt und dann in Pools von jeweils 24 Samples zusammengefasst (Abbildung 9).

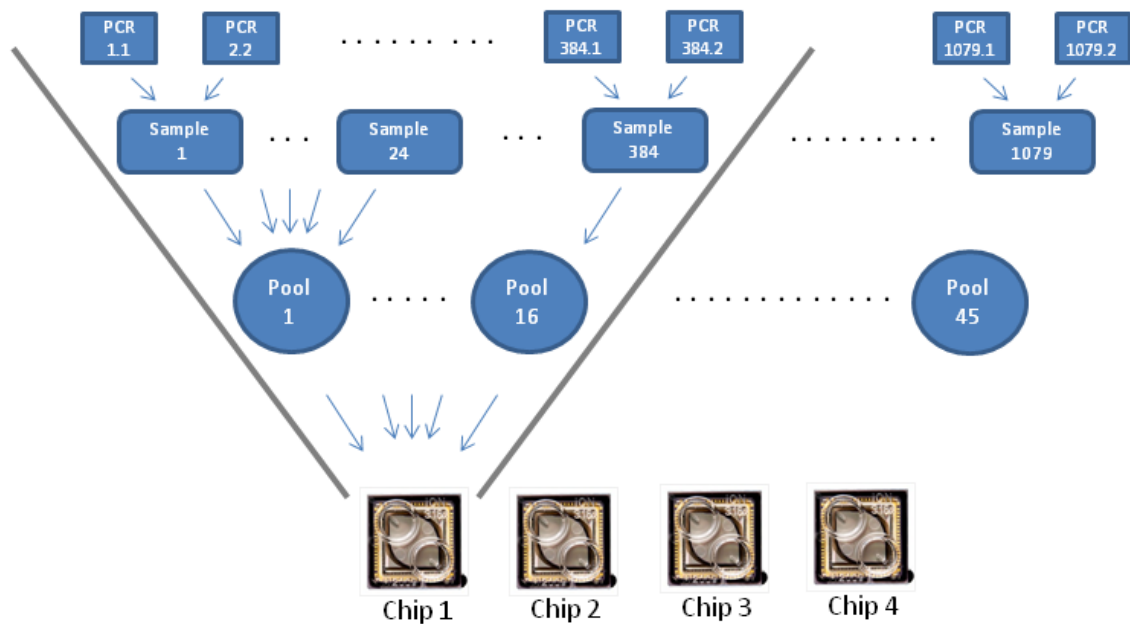


Abbildung 9: Sequenzierungsstrategie

Es wurden jeweils die PCR-Produkte von bis zu 24 Proben (Durchschnitt: 22,7) in einem Pool zusammengefasst und mit dem gleichen Barcode markiert. Pro Sequenzierungs-Chip wurden 16 Pools wiederum zusammengefasst und sequenziert. Pools 46-52 wurden für Wiederholungen verwendet, um sicherzustellen, dass alle zu untersuchenden Samples in ausreichender Abdeckung erfasst wurden.

Es wurde zunächst durch Zugabe von jeweils 10  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O das Gesamtvolumen erhöht, um Verluste durch Messungen gering zu halten und mehrere Pools generieren zu können. Die DNA-Konzentrationen der zusammenzuführenden Reaktionen wurden dann anhand eines Indikator-Produktes (Exon 11\_2 für Multiplex-PCR 1 und Exon 2 für Multiplex-PCR 2) mittels qPCR-Messung bestimmt und gegeneinander normalisiert. Als Indikator war jeweils ein Amplikon gewählt worden, dessen Konzentration sich in der Optimierung als der durchschnittlichen Konzentration aller Amplikons in der Reaktion am nächsten und über mehrere Reaktionen besonders stabil gezeigt hatte.

Die Normalisierung der Samples wurde automatisiert mittels QIAgility Pipettierroboter durchgeführt, wobei jeweils 96 Proben (192 Multiplex-PCR-Reaktionen) gleichzeitig bearbeitet wurden. In der Zusammenführung der Multiplex-PCR-Reaktionen wurde dabei jeweils die DNA-Konzentration der Reaktion auf eine gewählte Zielkonzentration normiert. Dazu wurden minimal 1  $\mu\text{l}$  und maximal 15  $\mu\text{l}$  eingesetzt. Wo auf Grund niedriger DNA-Konzentrationen mehr als 15  $\mu\text{l}$  eingesetzt werden mussten wurde die Voramplifikation als fehlgeschlagen bewertet und wiederholt. Danach wurden jeweils 10  $\mu\text{l}$  der zusammengeführten und normalisierten Reaktionen von 24 Proben zu einem Pool zusammengebracht.

### Vorbereitung der Library

Im Schritt der Library-Vorbereitung wurde aus 16 Pools jeweils eine DNA-Library erstellt, die in Folge verwandt wurde, um das Template für die Sequenzierung zu generieren.

Insbesondere wurden dabei DNA-Adapter an die PCR-Produkte ligiert. Diese Adapter sind notwendig, damit sie an die Trägerpartikel gebunden werden können und damit die Sequenzierungsprimer ihrerseits binden können. Zudem enthalten die für einen Pool verwendeten Adapter jeweils eine kurze spezifische DNA-Sequenz, einen DNA-Barcode. Anhand dieses DNA-Barcodes können die ausgelesenen Sequenzen den einzelnen Pools zugeordnet werden. Es wurden 16 verschiedene DNA-Barcodes, korrespondierend zu 16 Pools pro Library, verwandt (Tabelle 12).

Tabelle 12: Adapter-Sequenzen

Adapter	Sequenz
P1-Adapter	CCACTACGCCTCCGCTTTCCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT
A-Adapter #1	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTAAGGTAACGAT
#2	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAAGGAGAACGAT
#3	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAAGAGGATTCGAT
#4	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTACCAAGATCGAT
#5	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCAGAAGGAACGAT
#6	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTGCAAGTTCGAT
#7	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCGTGATTCGAT
#8	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCCGATAACGAT
#9	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGAGCGGAACGAT
#10	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTGACCGAACGAT
#11	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCCTCGAATCGAT
#12	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAGGTGGTTCGAT
#13	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTAACGGACGAT
#14	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTGGAGTGTTCGAT
#15	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTAGAGGTTCGAT
#16	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTGGATGACGAT

Die A-Adapter enthalten den Barcode, der hier in blau markiert ist.

Die Libraries wurden mit dem IonXpress™ Plus Fragment Library Kit nach Herstellerangaben (Ion Xpress™ Plus gDNA and Amplicon Library Preparation User Guide, #4471989 Rev. C, 03.01.2012) wie folgt erstellt:

Es wurde zunächst ein *End Repair* Schritt durchgeführt, um die in der Vor-PCR amplifizierten DNA-Fragmente mit klebrige nEnden (*sticky ends*, 3' Überhänge) in DNA mit glatten Enden (*blunt ends*) zu überführen. Dies ist eine notwendige Voraussetzung für die weiteren Schritte. Es wurden jeweils 100 µl der DNA-Pools mittels *solid phase reverse*

*immobilization* (siehe Kapitel 2.2.14) unter Verwendung von 1,8x Volumen des SPRI-Reagenz aufgereinigt. Die DNA-Konzentration der aufgereinigten Pools wurde fluorometrisch gemessen und jeweils 100 ng DNA eingesetzt. Die Reaktion wurde unter den folgenden Bedingungen durchgeführt:

### Reaktionsmix

Reagenz	Volumen [ $\mu$ l]
Pool DNA (10-100ng)	79
5X End Repair Puffer	20
End Repair Enzym	1

Der Reaktionsansatz wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein erneuter SPRI-Aufreinigungsschritt (Einsatz von 1,8x Volumen Agencourt-Reagenz).

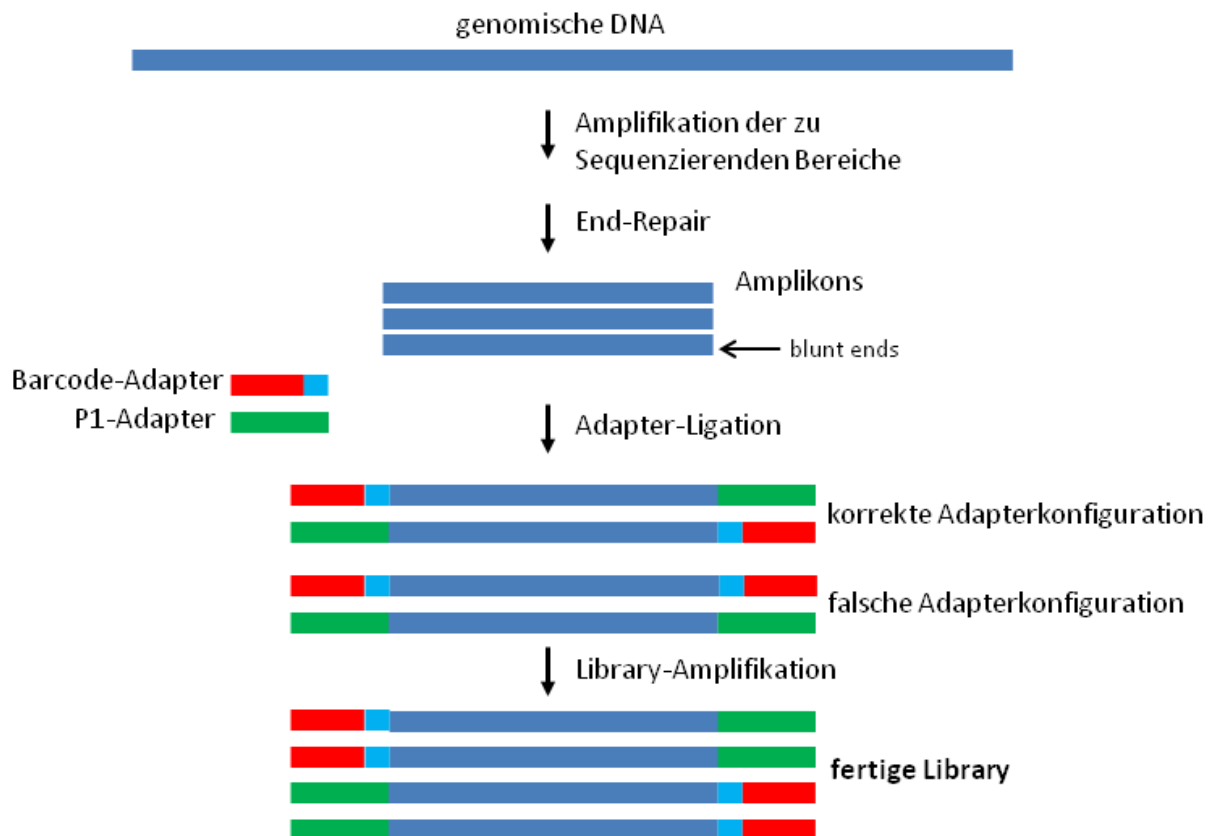


Abbildung 10: Vorbereitung der DNA-Library

Die zu sequenzierenden Bereiche werden herausamplifiziert, die Amplikons werden mit glatten Enden (*blunt ends*) versehen und die Adapter für die Bindung an Trägerpartikel und die Barcode-Markierung anligiert. Ein erneuter Amplifikationsschritt selektioniert für Amplikons mit korrekter Adapter-Kombination in der fertigen Library.

Im nächsten Schritt wurden Adapter an die vorbereiteten Amplikons ligiert: Der Ion-P1-Adapter für die Bindung an das Träger-Partikel und der Ion-A-Adapter, welcher den



DNA-Barcode trägt (Abbildung 10). Da es dem Zufall unterliegt, welcher Adapter an welches Ende eines jeden DNA-Fragmentes ligiert wird, gibt es vier mögliche Kombinationen: P1- und A-Adapter jeweils in beiden Richtungen, P1 auf beiden Seiten und A auf beiden Seiten. Zudem kann es geschehen, dass an ein DNA-Fragment nur einer oder auch keiner der Adapter bindet. Diese inkorrekten Kombinationen werden in einem späteren Schritt herausselektiert.

Die Ligation wurde unter den folgenden Bedingungen durchgeführt:

#### **Reaktionsmix**

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen [<math>\mu</math>l]</b>
DNA	79
10X Ligase Puffer	20
Ion P1 Adapter	2
IonXpress Barcode	2
dNTP Mix	2
Nucleasefreies Wasser	49
DNA Ligase	2
Nick Repair Polymerase	8

#### **Reaktionsbedingungen**

<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>
25°C	15 Minuten
72°C	5 Minuten
4°C	hold

Es folgte ein weiterer SPRI-Aufreinigungsschritt (Einsatz von 1,4x Volumen Agencourt Reagenz). Nach einer erneuten fluorometrischen Messung der DNA-Konzentration wurden jeweils 16 Pools zusammengeführt wobei die Volumina angepasst wurden, so dass die Teilkonzentrationen in der gepoolten Library ausgeglichen waren.

Die Library wurde dann mittels PCR amplifiziert. 20  $\mu$ l (eingestellt auf eine eingesetzte Menge von 100 ng DNA) der unamplifizierten Library versetzt mit 5  $\mu$ l Low TE Puffer wurden in folgender PCR Reaktion eingesetzt:

#### **Reaktionsmix**

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen [<math>\mu</math>l]</b>
Platinum® PCR SuperMix High Fidelity	100
Library Amplification Primer Mix	5
Unamplifizierte Library (100 ng DNA)	25

### Library Amplifikation

PCR-Stufe	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	5 min	
Denaturierung	95°C	15 sec	7 x
Annealing	58°C	15 sec	
Elongation	70°C	1 min	
Aufbewahrung	4°C		

Fragmente ohne Adapter oder mit nur einem ligierten Adapter werden nicht amplifiziert und somit relativ herausselektioniert. Fragmente, welche an beiden Enden den gleichen Adapter tragen, können auf Grund der komplementären Sequenzen an beiden Enden im Verlauf der PCR Haarnadelstrukturen bilden. Diese interferieren mit der Amplifikation. Diejenigen Amplikons, welche die korrekte Kombination von Adaptern (ein P1- und ein A-Adapter) tragen, werden daher besser amplifiziert (Abbildung 10). Trotz dieser Anreicherung von korrekt gebauten Fragmenten verbleibt jedoch ein Restanteil mit inkorrekten Adaptern in der Library.

Die amplifizierte Library wurde nach Elektrophorese auf 2,5% Agarose-Gel via Gelextraktion aufgereinigt. Es folgte eine zweite Aufreinigung mittels SPRI (1,5x Volumen) sowie eine weitere DNA-Konzentrationsmessung mittels Fluorometrie, Mikrofluidik-Gelelektrophorese und/oder qPCR. In zwei Verdünnungsschritten wurde die DNA-Konzentration auf 10 pM eingestellt.

### Template Vorbereitung

Ausgehend von der amplifizierten Library wurde das Template für die IonTorrent™ Sequenzierung vorbereitet. Dazu muss die DNA an Trägerpartikel gebunden und klonal amplifiziert werden und müssen die Template-tragenden Partikel angereichert werden. Es kam das Verfahren der Emulsions-PCR (siehe 2.2.4) unter Verwendung des Ion OneTouch™ Systems und Ion OneTouch™ 200 Template Kit zum Einsatz. Die eingesetzten Reagenzien wurden nach Herstellerangaben aufbewahrt und zur Verwendung vorbereitet.

Bei den Trägerpartikeln (hier sogenannte Ion Sphere™ Particles, ISPs) handelte es sich um Plastik-Kügelchen, welche exakt in die Wells auf dem Sequenzierungs-Chip passten und auf ihrer Oberfläche die P1-Adapter tragenden Fragmente der vorbereiteten Library binden konnten. Es wurde unter strikter Beachtung der Pipettierreihenfolge der folgende Reaktionsansatz hergestellt:

**Reaktionsansatz**

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen [<math>\mu</math>l]</b>
1. Nukleasefreies Wasser	495
2. Ion OneTouch™ Reagent Mix	200
3. Ion OneTouch™ Enzyme Mix	100
4. Ion OneTouch™ Reagent P	100
5. Amplifizierte Library [10 pM]	5

Es wurden in Abweichung von den Herstellerangaben eine 10 pM Verdünnung der Library eingesetzt, also etwa  $3 \times 10^7$  Moleküle in 5  $\mu$ l. Dies hatte sich in Vorversuchen als die optimale Konzentration für die hier erstellten Libraries herausgestellt.

Die Ion Sphere™ Particles wurden für eine Minute im Vortex-Gerät resuspendiert und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. 100  $\mu$ l wurden dann im Reaktionsansatz eingesetzt. Es folgte ein weiterer Vortex-Schritt für fünf Sekunden und ein Zentrifugations-schritt für 2 Sekunden (*spin down*). Sofort im Anschluss wurde der fertige Reaktionsansatz erneut durch Auf- und Abpipettieren gemischt und in ein Reaktionsgefäß für das OneTouch™ Gerät übertragen. Das Gefäß wurde langsam und unter Vermeidung der Bildung von Luftblasen oder einer Vermischung mit dem Reaktionsansatz mit Öl aufgefüllt. Schließlich wurde das Reaktionsgefäß gemäß Herstellerangaben verschlossen, in das OneTouch™ Gerät eingesetzt und das Gerät gestartet.

Nach Ende des automatischen Geräteauflaufes lagen die ISPs als herunterzentrifugierte Pellet in zwei Gefäßen vor. Der Überstand wurde bis auf 50  $\mu$ l abpipettiert ohne die Pellets mit den Template-positiven ISPs zu berühren. Die Pellets wurden dann durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert und die Suspension in ein neues Gefäß zusammengeführt. 1ml Ion OneTouch™ Wash Solution wurde hinzugegeben und die Suspension für 3 Minuten bei 16.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 100  $\mu$ l abpipettiert und die ISPs durch Vortexen resuspendiert.

Melt-Off Solution wurde jeweils frisch vorbereitet:

**Melt-Off Solution**

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen [<math>\mu</math>l]</b>
Nukleasefreies Wasser	865
1 M NaOH	125
10% Tween® in nukleasefreiem Wasser	10

Die Anreicherung der Template tragenden (Template-positiven) ISPs geschah mittels magnetischer Beads mit oberflächengebundenem Streptavidin. Über Streptavidin-Biotin-

Bindungen binden diese an die von ISPs getragenen biotinylierten Templates. Durch magnetischer Separation wurden so diejenigen ISPs, die kein Template trugen, größtenteils abgetrennt. Da Library Fragmente mit inkorrekt kombinierter Adapter nicht an einen ISP binden oder amplifiziert werden können, wurden dabei auch diese hier abgetrennt.

Hier geschah dies automatisiert mittels OneTouch™ ES Gerät und Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1 Beads. 130 µl MyOne™ Beads Wash Solution wurden in einem frischen Gefäß vorbereitet und 13 µl zuvor durch Vortexen resuspendierte MyOne™ Beads hinzugegeben und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Das Gefäß wurde in einen Magnetrahmen gestellt und für zwei Minuten inkubiert. Der Überstand wurde dann entfernt und 130 µl Wash Solution hinzugegeben. Durch Auf- und Abpipettieren wurden die Beads resuspendiert. Die Ladekammern des OneTouch™ ES Gerätes wurden nach Herstellerangaben mit den suspendierten ISPs, den suspendierten MyOne™ Beads, 300 µl Melt-Off Solution sowie Wash Solution beladen und das Gerät gestartet.

Die angereicherten ISPs wurden für zwei Minuten bei 16.000 g zentrifugiert. Nach Vergewisserung, dass keine MyOne™ Beads im Pellet enthalten waren, wurde der Überstand bis auf 10 µl abpipettiert. 200 µl Ion OneTouch™ Wash Solution wurden hinzugegeben und das Pellet durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation für 2 Minuten bei 16.000 g. Wiederum wurde der Überstand bis auf 10 µl abpipettiert und nun das Pellet in 100 µl Wash Solution durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Diese Suspension von angereicherten ISPs wurde weiter zur Sequenzierung verwendet.

### Sequenzierung

IonTorrent™ PGM™ Gerät und Ion 316™ Chip wurden nach Herstellerangaben vorbereitet. Zu den angereicherten ISPs wurden fünf µl Kontroll-ISPs und 150 µl Annealing Buffer hinzugegeben und durch Auf- und Abpipettieren vermischt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 2 Minuten bei 16.000 g. Der Überstand wurde bis auf 15 µl entfernt ohne das Pellet zu berühren. Dann wurden 12 µl Sequencing Primer hinzugegeben für ein Gesamtvolumen von 27 µl und erneut durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Es schloss sich ein Denaturierungsschritt an.

#### Reaktionsbedingungen

<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>
95°C	15 Minuten
37°C	2 Minuten

Drei µl PGM™ 200 Sequencing Polymerase wurden dann hinzugegeben und der Reaktionsmix durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Nach fünfminütiger Inkubation bei

Raumtemperatur folgte die Beladung des Chips gemäß Herstellerangaben (Sequencing Kit Protokoll, Revision A, vom 17.02.2012).

In Kurzform, der Reaktionsmix (30 µl) wurde mit der Pipette aufgenommen und durch Herunterdrehen des Pipettier Volumens langsam und vorsichtig mit einer Rate von etwa 1 µl pro Sekunde über den Ladeport auf den Chip aufgebracht. Das Auftreten von Luftblasen wurde so weit wie möglich vermieden, ggf. durch Wiederaufziehen und Wiederholung des Schrittes. Am anderen Port austretende Flüssigkeit wurde wiederaufgenommen. Der Chip wurde für zwei Minuten in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Dann wurde, bei 45° Lage des Chips, mittels Pipette der Reaktionsmix wiederum bei etwa 1 µl pro Sekunde wieder aufgenommen. Der Chip wurde nun erneut zentrifugiert. Diese Schritte wurden weitere drei Mal mit alternierenden Orientierungen des Chips in der Zentrifuge wiederholt. Der fertig beladene Chip wurde schließlich in das vorbereitete PGM™ Gerät geladen und die Sequenzierung gestartet.

### 2.2.20 Auswertung und Qualitätskontrolle der Sequenzierungs-Ergebnisse

Die Auswertung von Daten aus Sequenzierungsverfahren der zweiten Generation (*next generation sequencing*, NGS) unterscheidet sich von der Auswertung der Daten aus konventioneller Sequenzierung durch mehrere Faktoren. Statt einer einzelnen Sequenz pro verwendetem Sequenzierungsprimer kann ein einzelner Lauf eines NGS-Verfahrens Millionen von Sequenzen produzieren. Dies macht die Verwendung automatisierter Werkzeuge in der Auswertung unumgänglich. Zugleich ist die Rate von Lesefehlern bei der Sequenzierung deutlich höher. So ist bekannt, dass die Fehlerquote des Ion Torrent Verfahrens bei 1,4 - 1,8 pro 100 Basen liegt (Quail et al. 2012; Salipante et al. 2014). Der bedachte Umgang mit möglichen Lesefehlern und daraus resultierenden falsch positiven oder falsch negativen Ergebnissen ist daher von besonderer Wichtigkeit.

Im Kontext der Identifizierung genetischer Varianten können allgemein zwei wichtige Arten von Fehlern differenziert werden. Erstens gibt es falsch negative Ergebnisse, also existierende Varianten, die jedoch nicht detektiert wurden. Der Grund dafür kann in technischen Problemen bei der Vorbereitung der Proben (die z.B. zu einer abweichenden Konzentration der entsprechenden Probe führen), beim Auslesen oder in zu strikten Parametern bei der statistischen Auswertung liegen. Zweitens gibt es falsch positive Ergebnisse, also identifizierte Varianten, die jedoch in Wirklichkeit nicht existieren. Dies kann durch Artefakte, also methodenbedingte technische Ungenauigkeiten, durch Kontamination der Proben, oder durch zu permissive Parameter bei der Auswertung der Rohdaten passieren.

Um die Wahrscheinlichkeit falsch negativer Ergebnisse so weit wie möglich zu reduzieren wurden die Daten der zuvor durchgeführten Genotypisierung auf bereits bekannte Varianten mittels *Single Base Primer Extension* verwendet, um die Ergebnisse der Analysesoftware zu evaluieren und die Auswertungsstrategie zu optimieren. Wenn auch

seltene Varianten (z.B. Cys88Arg) mit einer minimalen Frequenz von nur einem einzelnen Allel pro analysiertem Datensatz detektiert werden können, so können falsch negative Ergebnisse nahezu ausgeschlossen werden.

Zur Erkennung falsch positiver Ergebnisse wurden neu detektierte Varianten von besonderem Interesse manuell nach einer Reihe von Kriterien evaluiert. Die Bewertung geschah dabei nach einem gewichteten Punkteschema. Je mehr Kriterien für eine Variante positiv evaluiert waren und je stärker diese gewichtet waren, desto höher wurde die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei ihr um ein falsch positives Ergebnis und nicht eine wirklich existierende Variante handelte, eingeschätzt.

Kriterium 1: Die erwartete Frequenz für eine Variante, die in einer Probe eines Pools in heterozygoter Form vorhanden ist, lässt sich berechnen als  $f = \frac{1}{2N}$ . Dabei ist N die Anzahl der Proben im Pool. Lag die Frequenz, mit der eine Variante unter den ausgelesenen Sequenzen eines Pools beobachtet wurde, deutlich darunter, so wurde dies als Hinweis angesehen, dass sie möglicherweise auf einem Lesefehler beruhte (+1 Punkt). Das gleiche galt, wenn die absolute Anzahl der ausgelesenen Sequenzen (Reads) mit der Variante sehr gering war (+1 Punkt, jedoch maximal ein Punkt insgesamt für Kriterium 1).

Kriterium 2: Bereiche mit stark unterdurchschnittlicher oder absolut geringer Coverage sind entweder auf Grund ihrer Komposition als problematisch zu sequenzieren einzuschätzen oder weisen auf andere technische Schwierigkeiten hin. Lag eine Variante in einer solchen Region, so wurde die Wahrscheinlichkeit eines Lesefehlers als erhöht angesehen (+1 Punkt).

Kriterium 3: Die Methode der Ionen-Halbleiter-Sequenzierung hat bekannterweise Schwierigkeiten mit Homopolymer-Regionen, also Sequenzabschnitten, in denen die gleiche Base mehrfach hintereinander auftritt. Lag die untersuchte Variante angrenzend an eine Homopolymer-Region, so wurde die Wahrscheinlichkeit für einen Lesefehler als erhöht angesehen (+1 Punkt für Varianten benachbart zu einer homopolymer Region, + 2 Punkte wenn die Variante ein Teil des Homopolymers war).

Kriterium 4: Auf Grund der Verwendung von sowohl forward- als auch reverse-Primern wurde jede Position der sequenzierten Regionen in beide Richtungen ausgelesen. Bei gleicher Konzentration beider Primer war zu erwarten, dass eine beobachtete Variante mit gleicher Frequenz in beiden Leserichtungen zu identifizieren war. Bestand jedoch bei einer Variante eine starke Imbalance in der Leserichtung, waren also z.B. 90% der ausgelesenen Sequenzen mit der Variante in forward-Richtung und nur 10% in reverse-Richtung ausgelesen, so galt die Wahrscheinlichkeit eines Lesefehlers als deutlich erhöht (+2 Punkte).

Kriterium 5: Regionen in unmittelbarer Nähe der Start- oder End-Punkte einer Sequenz oder jenseits des durchschnittlichen qualitätsbedingten *cut-off*-Punktes weisen eine allgemein erhöhte Frequenz von Lesefehlern auf. Varianten, die in solchen Regionen lokalisiert waren, wurden als potentiell durch solche verursacht eingeschätzt (+2 Punkte).

Kriterium 6: Das Auftreten mehrerer unabhängiger Punktmutationen an gleicher Stelle des Genoms und die konsequente Existenz von mehr als zwei Allelen ist extrem selten. Wurden daher an der gleichen Position neben dem Wild-Typ und der Variante noch weitere Allele mit signifikanter Frequenz, so wurde die Wahrscheinlichkeit einer korrekt ausgelesenen Variante als deutlich erniedrigt angesehen (+2 Punkte).

Kriterium 7: Regionen mit überdurchschnittlich vielen detektierten Varianten, Leseabbrüchen oder qualitätsbedingten Endpunkten wurden als problematisch zu sequenzieren eingestuft. Varianten, die in solchen Regionen detektiert wurden, mussten als mit erhöhter Wahrscheinlichkeit durch einen Lesefehler verursacht beurteilt werden (+2 Punkte).

Bei null bis zwei Punkten wurde die untersuchte Variante als wahrscheinlich korrekt ausgelesen eingestuft, bei insgesamt drei oder mehr Punkten wurde sie als fraglich eingestuft.

Zur eigentlichen Auswertung der mittels Ion Torrent gewonnenen Daten kamen die Analyseprogramme NextGENe, Lasergene Genomics Suite SeqMan NGen und Torrent Suite™ Variant Caller zum Einsatz. Eine Evaluation hatte gezeigt, dass die Auswertung mit den Programmen NextGENe und SeqMan NGen in einer hohen Rate von artefaktbedingt falsch-positiven Ergebnissen resultierte. Es konnte aber gezeigt werden, dass die bereits bekannten seltenen Varianten auch in einer Frequenz von nur einem einzelnen Allel pro analysiertem Datensatz detektiert werden konnten. Falsch negative Ergebnisse konnten somit nahezu ausgeschlossen werden. Dagegen berücksichtigte der Torrent Suite™ Variant Caller selbst ähnliche Qualitätskriterien wie die oben genannten und zeigte eine geringe Rate an artefaktbedingte falsch-positiven Ergebnissen, war jedoch nicht immer in der Lage, seltene Varianten zu detektieren, wenn die entsprechende Position nicht als von besonderem Interesse für die Analyse markiert worden war.

Um die Qualität der Auswertung zu maximieren, kam daher eine zweistufige Strategie zum Einsatz (Abbildung 11). Im ersten Schritt wurden die Rohdaten aus den Läufen der Ion Torrent PGM separat mit NextGENe und SeqMan NGen ausgewertet, wobei Parameter niedriger Stringenz angewendet wurden. So konnten alle potentiellen Varianten erfasst werden; eine hohe Rate falsch-positiver Ergebnisse wurde in diesem Schritt in Kauf genommen. Im zweiten Schritt wurden die Positionen aller potentiellen Varianten an die Variant Caller Software übergeben und die Rohdaten unter Berücksichtigung dieser analysiert. Dabei wurden stringente Qualitätskriterien angelegt, um die Rate von falsch-positiven Ergebnissen gering zu halten. Anhand von Proben mit bekannten Varianten wurde so weit wie möglich sichergestellt, dass keine tatsächlich existierenden Varianten fälschlicherweise ausgeschlossen wurden. Auf diese Weise wurde ein finaler Satz von detektierten Varianten generiert, der für die weiteren Analysen verwendet wurde. Nicht-synonyme Varianten mit potentiell Einfluss auf die Transporterfunktion wurden nach den oben genannten Kriterien evaluiert und mittels Kapillarsequenzierung validiert.

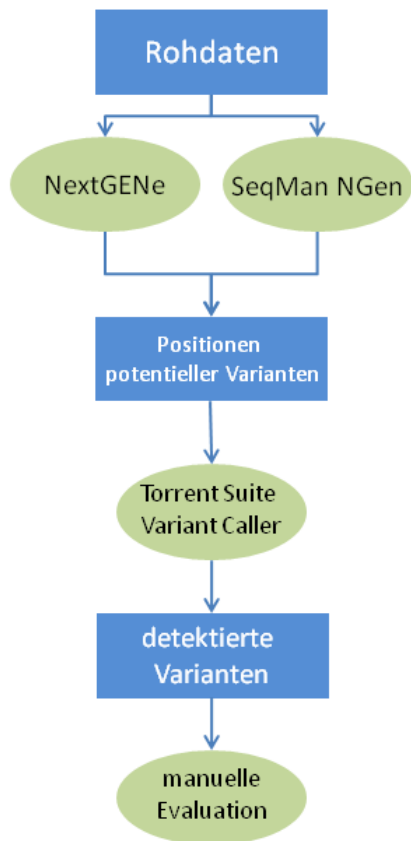


Abbildung 11: Strategie der Analyse der NGS-Daten

Ein mehrstufiges Verfahren kam zum Einsatz, um falsch-positive Ergebnisse zu reduzieren ohne tatsächlich existierende Varianten zu übersehen.



### 3 Ergebnisse

In der Resequenzierung wurden alle genetischen Varianten in den kodierenden Bereichen von OCT1 identifiziert. Die individuellen Genotypen der Individuen des erweiterten HGDP-CEPH-Panels in Bezug auf 21 weiter untersuchte Varianten wurden dann bestimmt und die Genotypen der Individuen des *1000 Genomes Project* hinzugenommen. So konnten die populationsspezifischen Frequenzen der einzelnen Varianten bestimmt werden und die individuellen Haplotypen rekonstruiert werden. Unter Einbezug der funktionellen Analysen von Tina Seitz (Seitz 2016) konnten dann OCT1-*loss-of-function*-Allele identifiziert werden. Schließlich wurden die populationsspezifischen Frequenzen des OCT1-Verlusts ermittelt und populationsgenetische Analysen mit Blick auf den Verlust der OCT1-Aktivität durchgeführt (Abbildung 12).

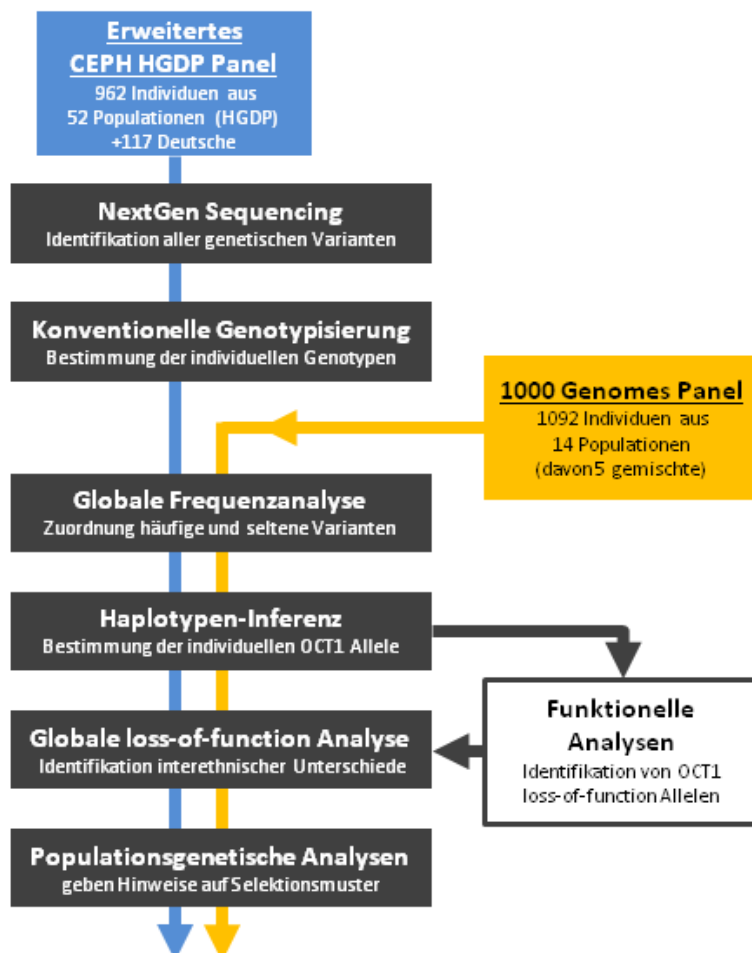


Abbildung 12: Überblick des Projekt-Workflows

### 3.1 Identifikation von genetischen Varianten mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung

Um die genetischen Varianten in den kodierenden Bereichen des OCT1-Gens in 1079 Individuen aus 53 Populationen weltweit zu identifizieren, wurde eine massiv parallele Resequenzierung mittels Ionen-Halbleiter-Verfahren angewandt. Zusätzlich zu den elf Exons des OCT1-Gens mit kodierenden und untranslatierten Bereichen sowie den Intron-Exon Übergängen wurden die proximale Promotorregion und zwei Regionen, welche Bindestellen für wichtige Transkriptionsfaktoren enthalten (siehe 1.3.3), einbezogen (Tabelle 13, Abbildung 14). Der Umfang der sequenzierten Regionen (kodierend, untranslatiert, Intron-Exon-Übergänge, regulatorisch) betrug insgesamt 3574 bp (Tabelle 14).

Tabelle 13: Resequenzierte Regionen

Region	Größe [bp]	Position auf Chromosom 6 (hg19)		Position relativ zum OCT1 Startcodon	
		Start	Stop	Start	Stop
HNF4	303	160541128	160541430	-1840	-1538
Promotor	376	160542486	160542861	-482	-107
Exon1	528	160542862	160543389	-106	421
HNF1	185	160546247	160546431	3279	3463
Exon2	190	160551087	160551276	8119	8308
Exon3	190	160553232	160553421	10264	10453
Exon4	210	160554960	160555169	11992	12201
Exon5	205	160557214	160557418	14246	14450
Exon6	172	160557542	160557713	14574	14745
Exon7	369	160560593	160560961	17625	17993
Exon8	188	160564518	160564705	21550	21737
Exon9	157	160575802	160575958	32834	32990
Exon10	186	160576954	160577139	33986	34171
Exon11	316	160579495	160579810	36527	36842

Um heterozygote Träger genetischer Varianten sicher identifizieren und Auslesefehler weitgehend ausschließen bzw. als solche erkennen zu können, wurde eine Abdeckung (Coverage), d.h. Anzahl separat ausgelesener Sequenzen über einer Region, größer als 30-fach angestrebt. Die vollständigen Daten der Sequenzierung sowie die individuellen Genotypen (siehe 3.2) wurden in der HGDP-CEPH-Datenbank hinterlegt und sind frei verfügbar (Centre d'Etude du Polymorphisme Humain 2015).

Tabelle 14: Zuordnung der resequenzierten Bereiche

Typ der Region	Umfang in bp
Kodierende Bereiche	1665
Untranslatierte Bereiche	252
Intron-Exon-Übergänge	794
Regulatorische Regionen	864
Insgesamt	3575

Es konnten mehr als 7,1 Millionen Sequenzen, welche eindeutig zu Positionen im menschlichen Genom zuordenbar waren, mit einem Gesamtumfang von etwas über einer Milliarde Basenpaaren ausgelesen werden. Die mittlere Abdeckung pro Sample-Pool war 4147-fach. Da in der Vorbereitung der Libraries streng darauf geachtet wurde, dass die Konzentrationen der einzelnen Proben innerhalb eines Pools gegeneinander nivelliert waren, kann von einer weitgehend ausgeglichenen Verteilung der Reads zwischen den Proben eines Pools ausgegangen werden. Die mittlere Abdeckung pro individueller DNA-Probe, berechnet als der Mittelwert der Abdeckungswerte der einzelnen Pools geteilt jeweils durch die Anzahl der Proben, lag bei 189-fach.

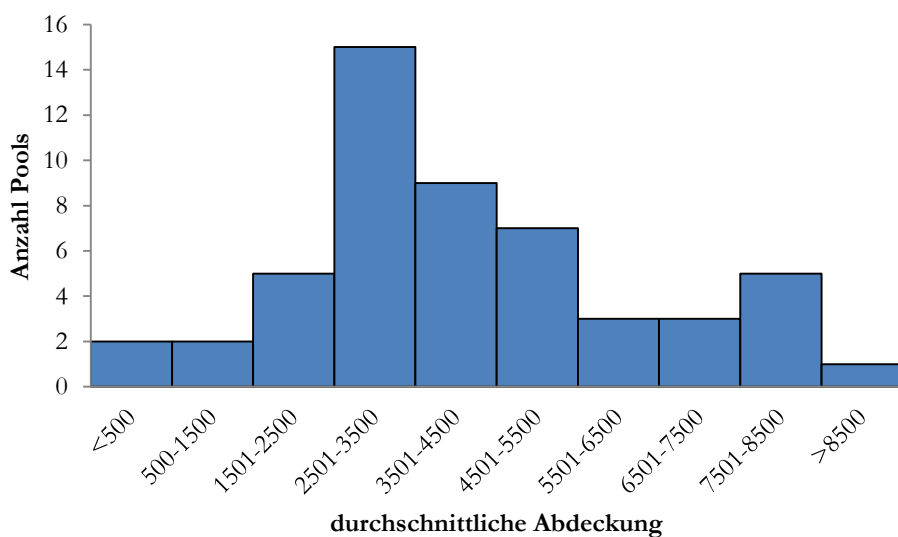


Abbildung 13: Histogramm der Coverage pro Pool

Aufgetragen ist die Anzahl der Pools mit einer durchschnittlichen Coverage pro Pool im jeweiligen Bereich. Unter der Annahme von 24 Proben pro Pool (Durchschnitt: 22,7) entspricht eine Coverage pro Pool von 500 etwa einer 20-fachen Coverage pro individueller Probe.

Ebenfalls berücksichtigt werden müssen Schwankungen in der Coverage zwischen den verschiedenen resequenzierten Regionen. Verschiedene Faktoren, wie z.B. der GC-Anteil einer DNA-Region, können dazu führen, dass DNA-Regionen in der Polymerase-Kettenreaktion weniger effizient repliziert werden als andere. Da die Methode des Ion

Semiconductor Sequencing auf dem Verfahren der PCR beruht, können solche Faktoren zu nur schwer vorhersagbaren Variationen in der Abdeckung führen. Auch Unterschiede in der Konzentration einzelner Amplikons, die trotz der Maßnahmen, welche getroffen wurden, um solche zu vermeiden (siehe 2.2.19), aufgetreten sein mögen, sind eine mögliche Fehlerquelle.

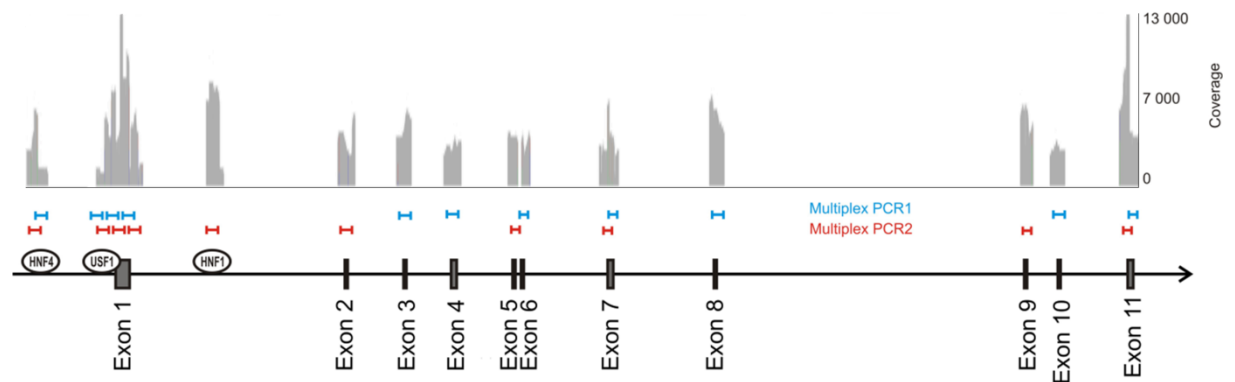


Abbildung 14: Struktur des OCT1-Gens mit resequenzierten Regionen

Neben den 11 Exons wurden der proximale Promotorbereich sowie zwei bekannte Transkriptionsfaktorbindestellen sequenziert. Die betreffenden Region wurden mit Amplikons in für das Ion Torrent Verfahren geeigneter Länge abgedeckt und auf Grund der Überlappung sowie unterschiedlicher optimaler Annealing-Temperaturen auf zwei Multiplex-Reaktionen aufgeteilt. Zusätzlich angezeigt ist die Abdeckungs-Verteilung über die resequenzierten Bereiche eines repräsentativen Pools. Abbildung modifiziert nach Seitz et al. 2015, Additional File 4C.

Innerhalb der kodierenden Bereiche von OCT1 gab es nur geringe negative Abweichungen von der durchschnittlichen Abdeckung (Abbildung 14). In den Bereichen mit der geringsten Abdeckung, dem am weitesten upstream gelegenen Teil der Promotorregion (-482 bis ca. -410 bp) und dem Downstream-Ende der HNF4-Binderegion (ca. -1630 bis -1538 bp), war die Abdeckung auf etwa ein Drittel der durchschnittlichen Abdeckung reduziert. Insgesamt wurde unter Einbeziehung all dieser Faktoren für 93,8% der untersuchten Proben eine Sequenz-Abdeckung der kodierenden Bereiche oberhalb der angestrebten 30-fachen Abdeckung erreicht. Eine Abdeckung der kodierenden Bereiche größer als 100-fach wurde für 85,4% der Proben erreicht.

Es wurden insgesamt 85 genetische Varianten in den resequenzierten Bereichen von OCT1 identifiziert. Davon lagen 44 Varianten innerhalb der kodierenden Bereiche, von denen wiederum 29 in einem Aminosäureaustausch resultieren. Von diesen Aminosäureaustausch-Varianten wurde 14 entweder als bekannte oder durch *in-silico*-Analysen als potentielle *loss-of-function*-Varianten klassifiziert (Abbildung 15).

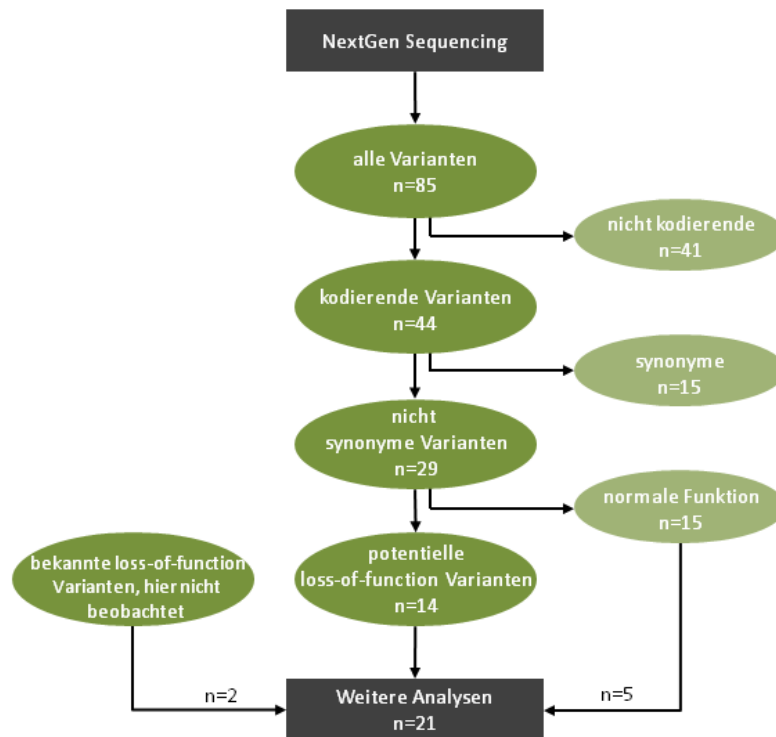


Abbildung 15: Ergebnisse der Hochdurchsatz-Sequenzierung

Unter den 85 insgesamt detektierten Varianten waren neun bekannte *loss-of-function*-Varianten und fünf neu identifizierte potentielle *loss-of-function*-Varianten (nach *in-silico*-Evaluation). Zusammen mit zwei hier nicht beobachteten *loss-of-function*-Varianten und fünf Varianten mit normaler Funktion als Kontrolle wurden diese Varianten in die weiteren Analysen einbezogen.

Neun bekannte OCT1-*loss-of-function*-Varianten wurden hier beobachtet: Ser14Phe, Arg61Cys, Cys88Arg, Pro117Leu, Ser189Leu, Arg206Cys, Gly401Ser, Met420del und Gly465Arg. Alle dieser Varianten verursachen gemäß vorangegangener Studien (siehe Kapitel 1.3.3) einen Verlust der OCT1-Aktivität für mindestens ein Substrat.

Zudem wurden fünf potentielle *loss-of-function*-Varianten in dieser Arbeit zum ersten Mal identifiziert. Diese Varianten waren Ser29Leu, Thr245Met, Glu284Lys, Gly414Ala und Ile449Thr. Die Einschätzung als potentielle *loss-of-function*-Varianten beruhte dabei auf den Resultaten dreier unabhängiger *in-silico*-Analysetools zur Vorhersage des Effekts des Aminosäureaustausches auf die Proteinfunktion (Tabelle 15).

Tabelle 15: Prädiktion des Einflusses auf die Proteinfunktion

Aminosäure austausch	SIFT	PolyPhen-2	PROVEAN
Ser29Leu	schädlich	schädlich	schädlich
Thr245Met	schädlich	schädlich	schädlich
Glu284Lys	schädlich	schädlich	schädlich
Gly414Ala	schädlich	schädlich	schädlich

Ile449Thr	schädlich	möglicherweise schädlich	schädlich
-----------	-----------	-----------------------------	-----------

Vorhersagen des Einflusses der jeweiligen Aminosäureaustausche auf die Funktion von OCT1 durch die Analysetools SIFT (Ng und Henikoff 2001, 2006), PolyPhen-2 (Adzhubei et al. 2010) und PROVEAN (Choi et al. 2012).

Eine Gruppe von 12 weiteren, zuvor nicht beschriebenen Aminosäureaustausch-Varianten wurde zwar detektiert und durch *in-silico*-Analyse als wahrscheinlich die Proteinfunktion beeinträchtigend eingestuft, konnte jedoch in der Validierung mittels Kapillarsequenzierung nicht bestätigt werden (Tabelle 16). Zehn dieser falsch-positiven Ergebnisse waren bereits in der Evaluation nach den in Kapitel 2.2.20 beschriebenen Qualitätskriterien als fraglich eingeschätzt worden, was einem positiv prädiktiver Wert von 71,4% und einem negativ prädiktiver Wert von 100% entspricht. Diese nicht validierten Varianten sind in der obigen Auflistung nicht aufgeführt.

Tabelle 16: Auswertung der manuellen Evaluation von Resequenzierungsdaten

Evaluation / Validierungsstatus	evaluiert "wahrscheinlich"	evaluiert "fraglich"
<b>bestätigt</b>	5	0
<b>nicht bestätigt</b>	2	10

Ein Satz von 17 zuvor nicht beschriebenen Varianten, welche durch Ionen-Halbleiter-Sequenzierung gefunden wurden und in einer Analyse des Einflusses auf die Proteinfunktion als potentiell schädlich eingestuft wurden, wurde nach den in Kapitel 2.2.20 beschriebenen Qualitätskriterien evaluiert und mittels Kapillarsequenzierung validiert. Die manuelle Evaluation zeigte einen positiv prädiktiver Wert von 71,4% und einen negativ prädiktiver Wert von 100%.

Für die folgenden Analysen wurde ein Satz von insgesamt 21 Aminosäureaustausch-Varianten ausgewählt (Abbildung 16): 14 in der Resequenzierung beobachtete Varianten mit erwartetem starkem Effekt auf die OCT1-Funktion, zusammengesetzt aus neun zuvor bekannten *loss-of-function*-Varianten und fünf wahrscheinlichen *loss-of-function*-Varianten (s.o.). Zusätzlich wurden zwei bekannte *loss-of-function*-Varianten, Gln97Lys und Gly220Val, welche in der Resequenzierung nicht beobachtet worden waren, einbezogen.

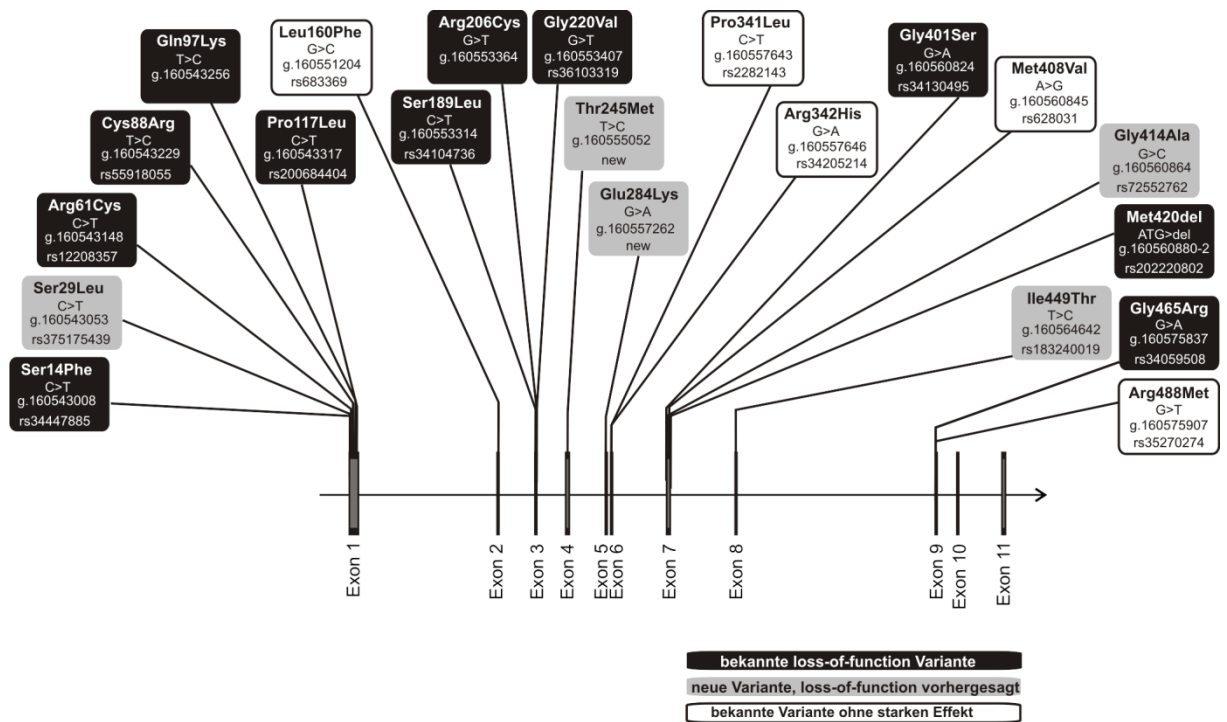


Abbildung 16: Untersuchte Varianten und ihre Lokalisation innerhalb des OCT1-Gen

Zuvor bekannte OCT1-loss-of-function-Varianten sind in Schwarz, die als wahrscheinlich die Proteinfunktion schädigend evaluierten neu identifizierten Varianten in Grau und zuvor beschriebene Varianten ohne starken Effekt auf die OCT1-Aktivität in Weiß angezeigt. Es sind jeweils der resultierende Aminosäureaustausch, das relevante Codon, die Lokalisation auf dem Chromosom 6 nach dem menschlichen Referenz-Genom hg19 (GRCh37), sowie die rs-Nummer in der dbSNP Datenbank (falls vorhanden) angezeigt. Modifiziert nach Seitz et al. 2015, S. 9.

Schließlich wurden die fünf Varianten Leu160Phe, Pro341Leu, Arg342His, Met408Val und Arg488Met mituntersucht (Genotypisierung auf diese Varianten durchgeführt durch Karoline Jobst). Es ist aus der Literatur bekannt, dass diese Varianten die OCT1-Aktivität nicht oder nur geringfügig beeinflussen (Kerb et al. 2002; Shu et al. 2003; Takeuchi et al. 2003; Sakata et al. 2004; Shu et al. 2007). Als häufige Varianten ohne starken Einfluss auf die OCT1-Aktivität wurden sie als Kontrolle in die Populationsgenetischen Analysen aufgenommen. Nicht einbezogen wurden Varianten in den nicht-kodierenden Bereichen, da ihr Effekt auf die Proteinfunktion ohne umfangreiche weiterführende Untersuchungen noch nicht abzuschätzen war.

### 3.2 Genotypisierung auf ausgewählte Varianten

Mit Blick auf die ausgewählten 21 Varianten wurde die gesamte HGDP-CEPH-Kohorte genotypisiert und wurden die betreffenden Genotypen aus den Daten des *1000 Genomes Project* extrahiert. Unter Verwendung der kombinierten Daten wurde eine globale Frequenzanalyse durchgeführt und die Frequenzen und die Verteilung der einzelnen Varianten weltweit sowie in den verschiedenen Weltregionen betrachtet (Abbildung 17).

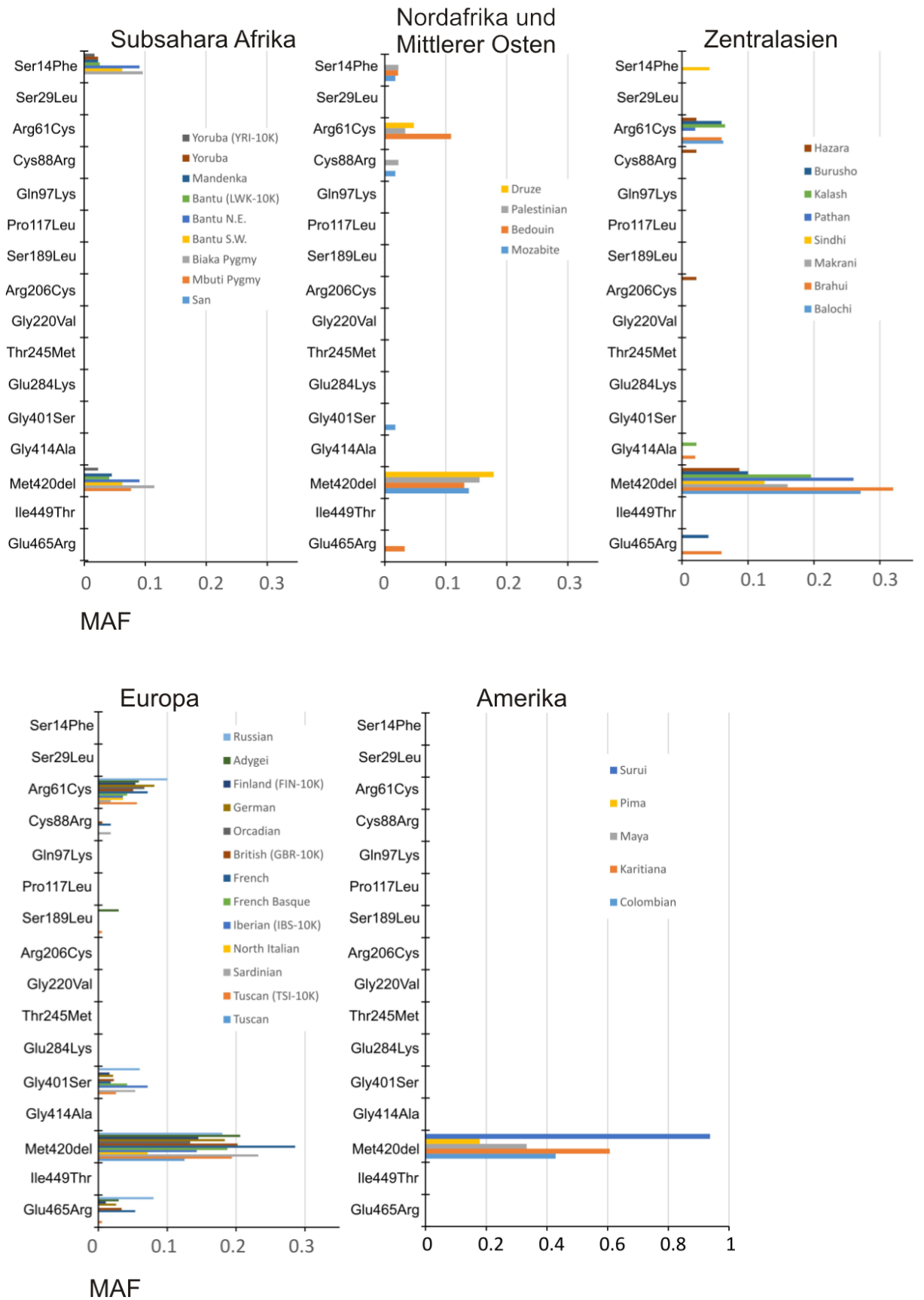


Abbildung 17: Bekannte und vorausgesagte OCT-loss-of-function-Varianten und ihre Verteilung in unterschiedlichen Regionen der Welt



Gezeigt sind die *Minor Allele Frequencies* in 39 Populationen von Subsahara-Afrika, Nordafrika und Mittlerer Osten, Zentralasien, Europa und Amerika. 33 Populationen des HGDP-CEPH-Panels und 6 aus dem 1000 Genome Projekt (markiert mit K). Hier nicht gezeigt ist die Region Ostasien und Ozeanien, wo die untersuchten Varianten nur sehr vereinzelt beobachtet wurden. Es wurden die englischsprachigen Namen der verschiedenen Populationen verwendet wie sie in der Dokumentation des HGDP-CEPH-Panels erscheinen. Abbildung modifiziert nach Seitz et al. 2015, S. 9.

Mit einer weltweiten *Minor Allele Frequency* (MAF) von 13,1% war die Variante Met420del mit Abstand die am häufigsten beobachtete *loss-of-function*-Variante (Abbildung 17, Tabelle 17, Tabelle 18). Als einzige der untersuchten *loss-of-function*-Varianten war sie ubiquitär auf allen Kontinenten der Welt zu finden. Dabei war Met420del auch jeweils innerhalb der einzelnen Weltregionen die Variante mit der höchsten *Minor Allele Frequency*. In der Region Südamerika war sie die einzige beobachtete *loss-of-function*-Variante. Nur in Subsahara-Afrika wurde in den Populationen der Bantu und der Biaka-Pygmäen mit Ser14Phe eine andere Variante mit ähnlicher Frequenz wie Met420del in den Populationen Subsahara-Afrikas beobachtet. Auch in der Region Ostasien, wo in den untersuchten Individuen nur sehr wenige Varianten überhaupt zu beobachten waren, war die Deletion von Methionin420 die am häufigsten gefundene OCT1-*loss-of-function*-Varianten.

Ebenfalls häufig war die Variante Arg61Cys mit einer weltweiten MAF von 3%. Insbesondere in Europa wurde sie mit hoher Frequenz gefunden, aber auch in der Regionen Nordafrika und Mittlerer Osten sowie Zentralasien. Nach Met420del war sie in diesen Regionen die zweithäufigste *loss-of-function*-Variante.

Gly465Arg (MAF 0,9%) wurde vornehmlich in Europa beobachtet, sowie in einzelnen Populationen in Zentralasien, Nordafrika und dem Mittleren Osten. Die Variante Gly401Ser wurde weltweit betrachtet selten gefunden (MAF 0,6 %), wurde aber in Europa mit einer *Minor Allele Frequency* von 2,6 % beobachtet. Zusammen mit der ubiquitären Variante Met420del dominieren diese Varianten das Bild Europas bezüglich der Verteilung von OCT1-*loss-of-function*-Varianten.

Die Variante Ser14Phe (MAF 0,6%) wurde auf dem Afrikanischen Kontinent und gelegentlich im Mittleren Osten und Zentralasien gefunden. Neben Met420del war sie die einzige untersuchte *loss-of-function*-Variante, welche in der Region Subsahara-Afrika beobachtet wurde. In der Region Nordafrika und Mittlerer Osten war Ser14Phe nach Met420del und zusammen mit Arg61Cys eine der drei häufigsten Varianten in dieser Region.

Die Variante Cys88Arg wurde bei insgesamt acht nicht verwandten Individuen aus den Regionen Europa (vier Individuen), Nordafrika und Mittlerer Osten (drei Individuen) und Zentralasien (ein Individuum) beobachtet. Die Variante Pro117Leu wurde bei vier nicht verwandten Individuen beobachtet. Dabei gehörten zwei Individuen der Population der ursprünglich zentralasiatischen Jakuten (HGDP-Bezeichnung Yakut) an, eines der

Population der ostasiatischen Mongolen (Mongola) und einer der Population der Han-Chinesen in Beijing (Han-Beijing).

Die Variante Ser189Leu wurde bei zwei europäischen Individuen sowie einem Individuum aus der gemischten amerikanischen Population in Puerto Rico beobachtet. Die Variante Arg206Cys wurde bei einem einzelnen Individuum aus der Population der zentralasiatischen Hazara beobachtet.

Die neu identifizierte Variante Ser29Leu wurde bei zwei Individuen beobachtet, die neu identifizierten Varianten Thr245Met, Glu284Lys, Gly414Ala und Ile449Thr jeweils bei einem Individuum. Die Träger dieser Varianten entstammten Minderheitenpopulationen in Ostasien (Thr245Met, Glu284Lys, Ile449Thr, Ser29Leu) und Zentralasien (Gly414Ala), welche zuvor nur wenig untersucht waren.

Die Variante Gly220Val wurde nur bei einem einzelnen Individuum des *1000 Genomes Project* beobachtet und kam unter den Individuen des HGDB-CEPH-Panels nicht vor. Die in der Literatur beschriebene Variante Gln97Lys wurde in keiner der beiden Probensammlungen beobachtet.

In der Kontrollgruppe war Met408Val (MAF 29,9%) die häufigste beobachtete Variante und war nahezu ubiquitär in allen Weltregionen zu finden. Die zweithäufigste Variante Leu160Phe (MAF 12,5%) wurde außer in der Region Subsahara-Afrika in allen Weltregionen beobachtet. Pro341Leu (MAF 5,7%), war mit hoher Frequenz in Ostasien zu finden, häufig in Subsahara-Afrika und Zentralasien, selten aber in Europa und der Region Nordafrika und Mittlerer Osten. Arg488Met (MAF 0,09%) wurde in Subsahara-Afrika beobachtet sowie selten in Zentralasien und Europa. Arg342His (MAF 0,05%) wurde vor allem in Afrika und selten im Mittleren Osten und Zentralasien gefunden, nicht jedoch in Europa, Ostasien oder Amerika.

### 3.3 OCT1-Allele

Mittels Haplotypen-Inferenz über den kombinierten Daten aus Genotypisierung und *1000 Genomes Project* wurden insgesamt 30 Haplotypen identifiziert (Tabelle 17). Nach dem Einfluss der konstituierenden Aminosäureaustausche auf die OCT1-Funktion wurden diese eingeteilt in 16 Hauptallele (designiert \*1 bis \*16) und 14 Suballele (bezeichnet mit Großbuchstaben hinter dem übergeordneten Allel, z.B. \*1A, \*1B, etc.):

Tabelle 17: Allele von OCT1

Haplotyp	Ser14Phe	Ser29Leu	Arg61Cys	Cys88Arg	Gln97Lys	Pro117Leu	Phe160Leu	Ser189Leu	Arg206Cys	Gly220Val	Thr245Met	Glu284Lys	Pro341Leu	Arg342His	Gly401Ser	Met408Val	Gly414Ala	Met420del	Ile449Thr	Gly465Arg	Arg488Met	N
OCT1*1 A	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Phe	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	Arg	Gly	Val	Gly	Met	Ile	Gly	Arg	2165
1 B	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Phe	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	Arg	Gly	Met	Gly	Met	Ile	Gly	Arg	736
1 C	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Leu	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	Arg	Gly	Met	Gly	Met	Ile	Gly	Arg	377
1 D	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Phe	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Leu	Arg	Gly	Val	Gly	Met	Ile	Gly	Arg	246
1 E	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Leu	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	Arg	Gly	Val	Gly	Met	Ile	Gly	Arg	7
1 F	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Phe	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	His	Gly	Val	Gly	Met	Ile	Gly	Arg	1
1 G	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Phe	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Leu	Arg	Gly	Met	Gly	Met	Ile	Gly	Arg	1
OCT1*2 A	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Phe	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	Arg	Gly	Val	Gly	del	Ile	Gly	Arg	515
2 B	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Leu	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	Arg	Gly	Val	Gly	del	Ile	Gly	Arg	1
2 C	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Phe	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	Arg	Gly	Val	Ala	del	Ile	Gly	Arg	2
OCT1*3 A	Ser	Ser	Cys	Cys	Gln	Pro	Leu	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	Arg	Gly	Met	Gly	Met	Ile	Gly	Arg	122
3 B	Ser	Ser	Cys	Cys	Gln	Pro	Phe	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	Arg	Gly	Val	Gly	Met	Ile	Gly	Arg	7
OCT1*4 A	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Leu	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	Arg	Ser	Met	Gly	Met	Ile	Gly	Arg	32
4 B	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Phe	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	Arg	Ser	Met	Gly	Met	Ile	Gly	Arg	2
OCT1*5	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Phe	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	Arg	Gly	Val	Gly	del	Ile	Arg	Arg	40
OCT1*6	Ser	Ser	Arg	Arg	Gln	Pro	Phe	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	Arg	Gly	Val	Gly	del	Ile	Gly	Arg	8
OCT1*7 A	Phe	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Phe	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	His	Gly	Val	Gly	Met	Ile	Gly	Arg	18
7 B	Phe	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Phe	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	Arg	Gly	Val	Gly	Met	Ile	Gly	Arg	8
7 C	Phe	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Leu	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	Arg	Gly	Met	Gly	Met	Ile	Gly	Arg	1
OCT1*8 A	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Phe	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	Arg	Gly	Met	Gly	Met	Ile	Gly	Met	19
8 B	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Phe	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	Arg	Gly	Val	Gly	Met	Ile	Gly	Met	18
8 C	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Phe	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	His	Gly	Val	Gly	Met	Ile	Gly	Met	1
OCT1*9	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Leu	Leu	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	Arg	Gly	Met	Gly	Met	Ile	Gly	Arg	4
OCT1*10	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Phe	Leu	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	Arg	Gly	Met	Gly	Met	Ile	Gly	Arg	3
OCT1*11	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Phe	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Pro	Arg	Gly	Met	Gly	Met	Thr	Gly	Arg	2
OCT1*12	Ser	Leu	Arg	Cys	Gln	Pro	Phe	Ser	Arg	Gly	Thr	Glu	Leu	Arg	Gly	Val	Gly	Met	Ile	Gly	Arg	2
OCT1*13	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Phe	Ser	Arg	Gly	Met	Glu	Pro	Arg	Gly	Val	Gly	Met	Ile	Gly	Arg	1
OCT1*14	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Phe	Ser	Cys	Gly	Thr	Glu	Pro	Arg	Gly	Val	Gly	del	Ile	Gly	Arg	1
OCT1*15	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Phe	Ser	Arg	Gly	Thr	Lys	Pro	Arg	Gly	Val	Gly	Met	Ile	Gly	Arg	1
OCT1*16	Ser	Ser	Arg	Cys	Gln	Pro	Phe	Ser	Arg	Val	Thr	Glu	Pro	Arg	Gly	Val	Gly	Met	Ile	Gly	Arg	1

Gezeigt sind die Haplotypen, welche die in der genetischen Analyse beobachteten 16 Hauptallele und 14 Suballele von OCT1 darstellen. Hauptallele definierende Aminosäureaustausche sind markiert in Gelb, Aminosäureaustausche welche relativ zum Hauptallel keine signifikante Veränderung der OCT1-Funktion verursachen in Weiß. Tabelle modifiziert nach Seitz et al. 2015, S. 10.

Hauptallele galten als definiert durch einen Aminosäureaustausch, welcher eine Veränderung der OCT1-Aktivität von mehr als 50% relativ zum Allel OCT1\*1 verursacht. Die Suballele eines Hauptallels unterscheiden sich von diesem durch Aminosäureaustausche, welche die OCT1-Aktivität relativ zum korrespondierenden Hauptallel nicht oder nur wenig (eine Reduktion oder Erhöhung <50%) zusätzlich beeinflussen. Die Beurteilung der Aminosäureaustausche beruhte dabei neben den in der Literatur angegebenen Daten (siehe Kapitel 1.3.3) auf den Ergebnissen einer umfassenden funktionellen Analyse durch Tina Seitz (Seitz 2016).

Während die Allelstruktur in allen hier untersuchten Populationen die gleiche war, zeigten sich substantielle Unterschiede in der Allelfrequenz zwischen den Weltregionen (Tabelle 18). So war neben OCT1\*1 das Allel OCT1\*2 das einzige, welches in allen Weltregionen beobachtet wurde. OCT1\*2 war das einzige *loss-of-function*-Allel, das in den indigenen Populationen Südamerikas zu finden war. Die Allele \*3 bis \*8 waren regionsspezifisch

entsprechend den unterschiedlichen Frequenzen der definierenden Varianten (siehe Kapitel 3.2).

Die Allele \*9 bis \*16 waren auf globaler Ebene sehr selten mit Allelfrequenzen kleiner als 0,2%. In spezifischen einzelnen Populationen traten sie scheinbar mit deutlich höheren Frequenzen auf, etwa OCT1\*12 in der chinesischen She Population. Auf Grund der geringen Anzahl der Proben aus diesen Populationen (OCT1\*12 beobachtet in zwei von zehn Proben aus Population der She, entsprechend einer MAF von 10%) ist die Aussagekraft dieser beobachteten Abweichungen jedoch begrenzt.

Tabelle 18: Allelfrequenzen der OCT1-Allele in den untersuchten Populationen weltweit

Weltregion	Population	Individuen	Chromosomen	*1		*2		*3		*4		*7			*8				*9	*10	*11	*12	*13	*14	*15	*16												
				1A	1B	1C	1D	1E	1F	1G	2A	2B	2C	3A	3B	4A	4B	*5	*6	7A	7B	7C	8A	8B	8C	*9	*10	*11	*12	*13	*14	*15	*16					
Subsahara-Afrika	San	6	12	58,3	33,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
	Mbuti Pygmy	13	26	57,7	11,5	0	7,7	0	0	0	7,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Biaka Pygmy	26	52	65,4	11,5	0	0	0	0	0	11,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9,6	0	0	0	1,9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Bantu S.W.	8	16	68,8	0	0	12,5	0	0	6,3	6,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Bantu N.E.	11	22	27,3	22,7	0	13,6	0	0	0	9,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4,5	4,5	0	4,5	13,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Bantu (LWK-10K)	97	194	57,2	23,2	0	7,7	0	0	0	4,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,1	0,5	0	3,1	2,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Mandenka	22	44	45,5	34,1	0	11,4	0	0	0	4,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,3	0	0	0	2,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Yoruba	22	44	61,4	27,3	0	6,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,3	0	0	0	2,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Yoruba (YRI-10K)	88	176	60,2	21	0	9,1	0	0	0	2,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,7	0	0	2,8	2,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<b>Gesamt/Mittel</b>	<b>293</b>	<b>586</b>	<b>55,7</b>	<b>20,5</b>	<b>0</b>	<b>7,6</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,7</b>	<b>5,1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>3,2</b>	<b>0,6</b>	<b>0</b>	<b>2,9</b>	<b>3,7</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	
<b>Minimum</b>			<b>27,3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>		
<b>Maximum</b>			<b>68,8</b>	<b>34,1</b>	<b>13,6</b>	<b>6,3</b>	<b>11,5</b>	<b>9,6</b>	<b>4,5</b>	<b>15,4</b>	<b>13,6</b>	<b>9,6</b>	<b>4,5</b>	<b>15,4</b>	<b>13,6</b>	<b>9,6</b>	<b>4,5</b>	<b>15,4</b>	<b>13,6</b>	<b>9,6</b>	<b>4,5</b>	<b>15,4</b>	<b>13,6</b>	<b>9,6</b>	<b>4,5</b>	<b>15,4</b>	<b>13,6</b>	<b>9,6</b>	<b>4,5</b>	<b>15,4</b>	<b>13,6</b>	<b>9,6</b>	<b>4,5</b>	<b>15,4</b>	<b>13,6</b>	<b>9,6</b>	<b>4,5</b>	
Nordafrika und Mittlerer Osten	Mozabite	29	58	70,7	6,9	6,9	0	0	0	10,3	0	0	0	0	1,7	0	0	1,7	0	0	1,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Bedouin	46	92	56,5	9,8	2,2	4,3	0	0	0	9,8	0	0	8,7	2,2	0	0	0	0	2,2	0	0	1,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Palestinian	45	90	50	26,7	0	2,2	0	0	0	13,3	0	0	3,3	0	0	0	0	2,2	0	2,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Druze	42	84	60,7	13,1	1,2	0	2,4	0	0	17,9	0	0	3,6	1,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<b>Gesamt</b>	<b>162</b>	<b>324</b>																																			
	<b>Mittel</b>			<b>59,5</b>	<b>14,1</b>	<b>2,6</b>	<b>1,6</b>	<b>0,6</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>12,8</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>3,9</b>	<b>0,8</b>	<b>0,4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1,1</b>	<b>0,4</b>	<b>0</b>	<b>0,3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Minimum</b>			<b>50</b>	<b>6,9</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>9,8</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	
<b>Maximum</b>			<b>70,7</b>	<b>26,7</b>	<b>6,9</b>	<b>4,3</b>	<b>2,4</b>	<b>17,9</b>	<b>8,7</b>	<b>2,2</b>	<b>1,7</b>	<b>2,2</b>	<b>2,2</b>	<b>1,7</b>	<b>2,2</b>	<b>2,2</b>	<b>1,7</b>	<b>2,2</b>	<b>1,7</b>	<b>2,2</b>	<b>1,7</b>	<b>2,2</b>	<b>1,7</b>	<b>2,2</b>	<b>1,7</b>	<b>2,2</b>	<b>1,7</b>	<b>2,2</b>	<b>1,7</b>	<b>2,2</b>	<b>1,7</b>	<b>2,2</b>	<b>1,7</b>	<b>2,2</b>	<b>1,7</b>	<b>2,2</b>	<b>1,7</b>	

Tabelle 18 zeigt die Ergebnisse der Genotypisierung aller untersuchten Individuen. Die 67 untersuchten Populationen sind geordnet nach der Weltregion bzw. in die Kategorie Gemischte Populationen. Für jede Population ist die Anzahl der untersuchten Individuen und die daraus resultierende Anzahl untersuchter Chromosomen gezeigt gefolgt von den Frequenzen der 16 Hauptallele und 14 Suballele von OCT1. Für jede einzelne Region sowie für die weltweite Gesamtheit sind jeweils die mittleren, minimalen und maximalen Frequenzen der einzelnen Allele berechnet worden. Es wurden die in der Dokumentation des HGDP-CEPH-Panels verwendeten englischen Namen der Populationen verwendet.



Tabelle 18: Allelfrequenzen der OCT1-Allele in den untersuchten Populationen weltweit, Fortsetzung

Weltregion	Population	Individuen	Chromosomen	*1		*2			*3		*4		*7			*8			*9	*10	*11	*12	*13	*14	*15	*16						
				1A	1B	1C	1D	1E	1F	1G	2A	2B	2C	3A	3B	4A	4B	5									6	7A	7B	7C	8A	8B
Ostasien und Ozeanien	Dai	10	20	65	20	0	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	She	10	20	45	20	10	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	
	Tujia	10	20	45	20	10	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Yizu	10	20	50	20	25	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Naxi	9	18	44,4	5,6	16,7	27,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5,6	0	0	0	0	0
	Tu	10	20	65	5	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	5	0
	Xibo	9	18	55,6	16,7	27,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Mongola	10	20	50	5	20	10	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0
	Hezhen	9	18	38,9	22,2	0	16,7	22,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Daur	10	20	55	15	15	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Oroqen	9	18	16,7	33,3	44,4	5,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Han	45	90	55,6	14,4	16,7	13,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Han Beijing (CHB-10K)	97	194	63,9	9,8	10,8	13,9	0	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0,5	0	0	0	0
	Han South (CHS-10K)	100	200	58,5	12,5	18	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Lahu	8	16	75	12,5	12,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Miao zu	10	20	60	15	10	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Cambodian	10	20	55	20	5	15	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Japanese	30	60	45	13,3	20	21,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Japanese (JPT-10K)	89	178	65,2	6,7	12,4	15,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Melanesian	14	28	89,3	3,6	7,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Papuan	17	34	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<b>Gesamt</b>		<b>526</b>	<b>1052</b>																													
<b>Mittel</b>				57	13,8	13,9	11,9	1,1	0	0	0,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,3	0	0,3	0,5	0,2	0	0,2	0
<b>Minimum</b>				16,7	0	0	0	0			0	0												0		0	0			0		
<b>Maximum</b>				100	33,3	44,4	27,8	22,2			10	0												5		5,6	10	5		5		





### 3.4 Der Verlust der OCT1-Aktivität im weltweiten Vergleich

Basierend auf den Angaben in der Literatur (siehe Kapitel 1.3.3) sowie einer detaillierten funktionellen Charakterisierung der OCT1-Allele (Seitz 2016), konnten verschiedene Gruppen von Allelen unterschieden werden. Allele mit normaler OCT1-Aktivität (OCT1\*1), Allele mit komplettem Verlust der OCT1-Aktivität (OCT1\*5, \*6, \*12 und \*15), Allele mit starker Reduktion aber nicht komplettem Verlust der OCT1-Aktivität (OCT1\*3, \*4 und \*14), Allele mit substrat-spezifischem Verlust der OCT1-Aktivität (OCT1\*2, \*7, \*10, \*11 und \*13) und Allele resultierend in erhöhtem Uptake mindestens eines Substrates (OCT1\*8 und \*9).

Um eine Weltkarte des Verlusts der OCT1-Aktivität zu generieren wurden das Hauptallel OCT1\*1 und die *gain-of-function*-Allele OCT1\*8 und \*9 als vollständig aktive Allele zusammengefasst. Die verbleibenden Hauptallele \*2 bis \*7 und \*10 bis \*15, welche jeweils für mindestens ein Substrat eine signifikante Reduktion der OCT1-Aktivität zeigten, wurden als inaktive *loss-of-function*-Allele gewertet. Das Allel \*16, das nur bei einem Individuum der gemischten Population ASW-10K des *1000 Genomes Project* beobachtet wurde und nicht eindeutig regional zugeordnet werden konnte, wurde nicht betrachtet.

Individuen wurden als Träger von zwei aktiven OCT1-Allelen, einem oder keinem vollständig aktiven OCT1-Allel kategorisiert und die Frequenz des genotypisch vorhergesagten Verlusts der OCT1-Aktivität weltweit nach Population und Region geordnet untersucht (Abbildung 18).

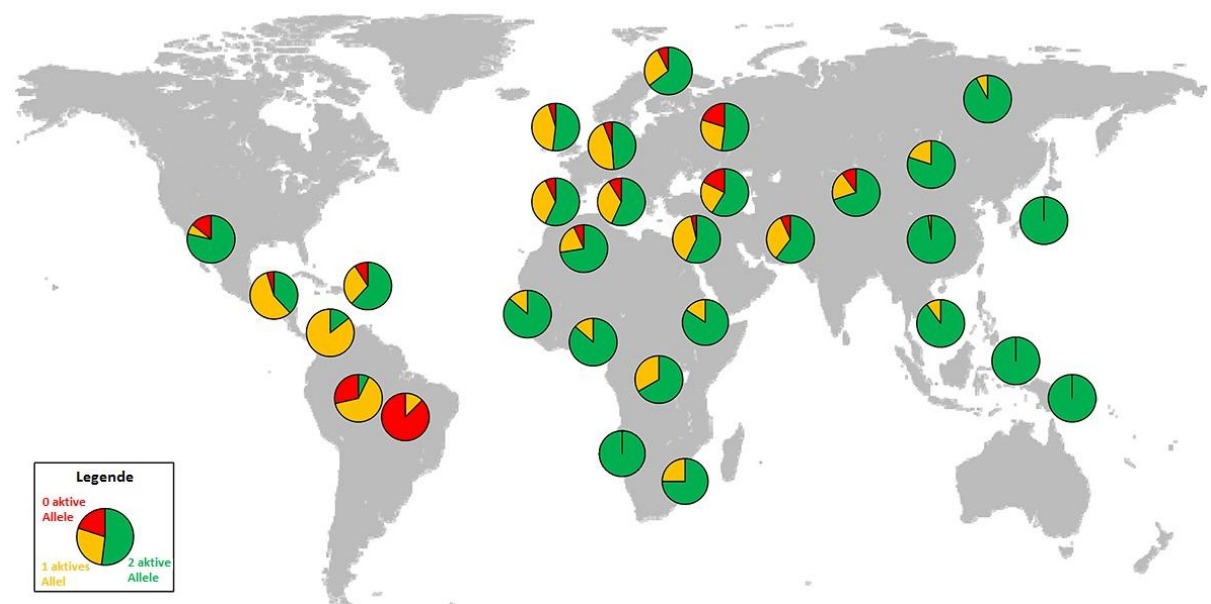


Abbildung 18: Globale Verteilung des genetisch determinierten Verlusts der OCT1-Aktivität

Die Anteile von Trägern zweier (grün), eines (gelb) und keines (rot) vollständig aktiven OCT1-Allels sind abgebildet für verschiedene Regionen weltweit. Abbildung modifiziert nach Seitz et al. 2015, S. 14.

Weltweit wurden starke Variationen in der Frequenz von OCT1-Funktionsverlust beobachtet, sowohl zwischen einzelnen Populationen als auch zwischen den Weltregionen. So war die mittlere Frequenz des Verlusts der OCT1-Aktivität in Afrika und Zentralasien deutlich geringer als in Europa, tendierte in Ostasien gegen Null und war in Südamerika mit Abstand am höchsten (Abbildung 18).

Besonders bemerkbar war die hohe Rate des Verlusts der OCT1-Aktivität in den indigenen Populationen Südamerikas. So wurden in der überwiegenden Mehrzahl der Individuen aus der indigenen Population der Surui-Indianer zwei komplett inaktive OCT1-Allele beobachtet. Von acht untersuchten Individuen trug nur ein einziges Individuum (13%) ein aktives Allel, die verbleibenden sieben (87%) waren komplett ohne aktive OCT1-Allele. Ähnliche Verhältnisse wurden in anderen indigene südamerikanischen Populationen beobachtet. So waren nur 7% der Karitiana-Indianer Träger von zwei aktiven Allelen, 64% Träger von einem und 29% der Individuen besaßen keine aktiven OCT1-Allele.

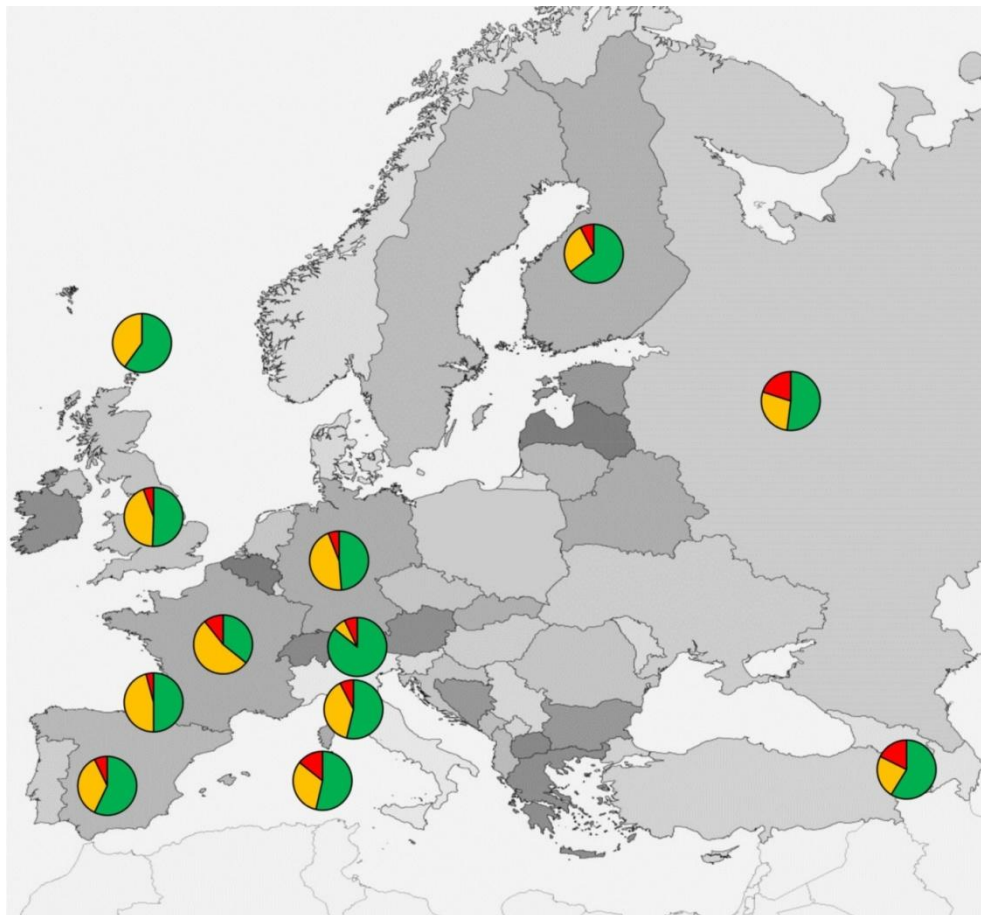


Abbildung 19: Genetisch determinierter Verlust der OCT1-Aktivität in Europa

Abbildung modifiziert nach Seitz et al. 2015, Additional File 14A.

Dagegen waren im Durchschnitt 53% der Europäer Träger von zwei aktiven Allelen, 38% Träger von einem und 8% Träger von keinem aktiven OCT1-Allel. Dies entsprach den in

vorangegangenen Studien ermittelten und in der Literatur beschriebenen Werten (Kerb et al. 2002; Shu et al. 2003; Nies et al. 2009; Tzvetkov et al. 2012). Es wurden insgesamt nur geringfügige Unterschiede in der Frequenz des OCT1-Aktivitätsverlust zwischen den europäischen Populationen festgestellt (Abbildung 19). So konnte eine höhere Frequenz des kompletten Verlusts der OCT1-Aktivität in der russischen Population beobachtet werden und eine etwas niedrigere Frequenz in der norditalienischen Population. Träger eines einzelnen aktiven Allels waren in der norditalienischen Population ebenfalls deutlich seltener als im europäischen Durchschnitt, in der französischen Population dagegen etwas häufiger.

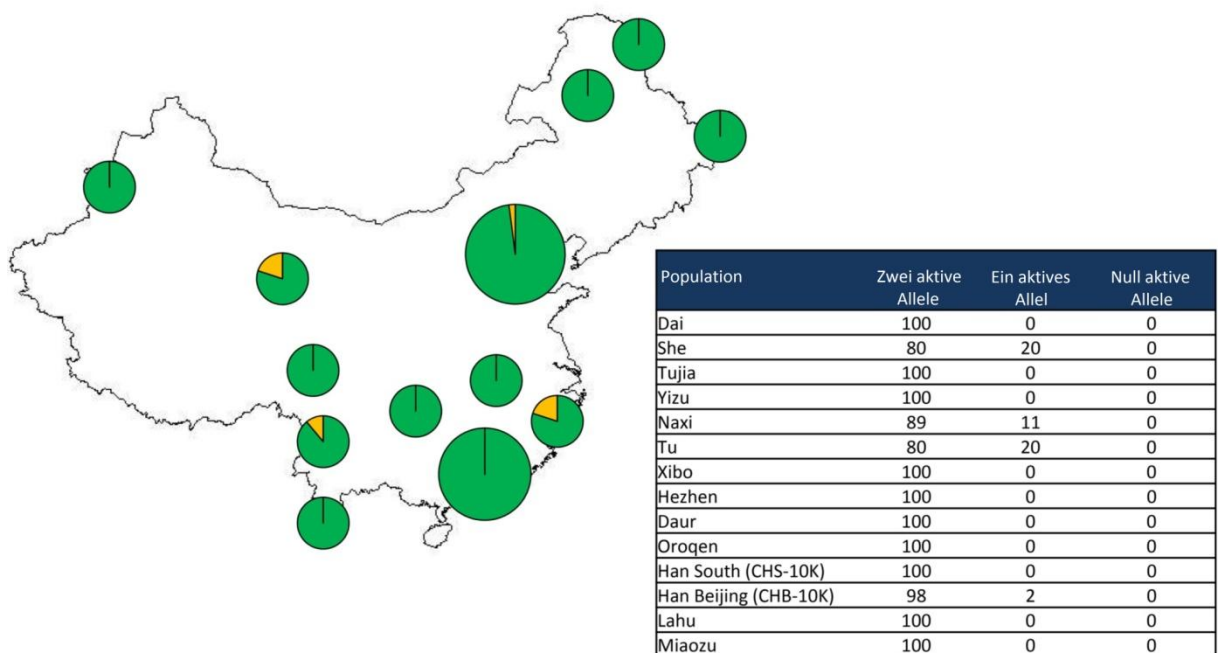


Abbildung 20: Genetisch determinierter Verlust der OCT1-Aktivität in den Populationen Chinas

Abbildung modifiziert nach Seitz et al. 2015, Additional File 14B.

In der Weltregion Ostasien und Ozeanien zeigte sich der Verlust der OCT1-Aktivität als insgesamt sehr selten (Abbildung 20). Weniger als 2% der Individuen aus dieser Region waren Träger von nur einem aktiven Allel und bei keinem der untersuchten Individuen wurden zwei inaktive OCT1-Allele beobachtet. Alle untersuchten Individuen aus der japanischen Population und 98% der Han-Chinesen, der größten chinesischen Population, waren Träger zweier vollständig aktiver Allele. Eine höhere Frequenz des OCT1-Funktionsverlusts zeigte sich in den mongolischen und kambodschanischen Populationen, sowie einzelnen chinesischen Minderheitenpopulationen. Auch in diesen Populationen blieb die Frequenz des Verlusts der OCT1-Aktivität insgesamt deutlich unterhalb derer in den Populationen Europas.

## 4 Diskussion

In der globalen Analyse der OCT1-*loss-of-function*-Varianten zeigte sich eine deutliche Variabilität sowohl in der Gesamtfrequenz als auch in der Zusammensetzung der beobachteten Varianten nicht nur zwischen einzelnen Populationen, sondern insbesondere auch zwischen den verschiedenen Weltregionen (Abbildung 18, Tabelle 18).

### 4.1 Bekannte und neu identifizierte *loss-of-funktion*-Varianten von OCT1

Einige Varianten zeigten eine deutliche Regionsspezifität. So etwa Gly401Ser und Glu465Arg in Europa, Ser14Phe in Afrika (und einzelnen Populationen im Mittleren Osten) und Arg61Cys in Europa und dem Mittleren Osten (sowie Pakistan) (siehe Abbildung 17 und Tabelle 18). Es lässt sich vermuten, dass diese Varianten auf einzelne Mutationsereignisse in der Populationshistorie der jeweiligen Regionen zurückzuführen sind.

Die einzige ubiquitär zu beobachtende Variante war die Deletion von Methionin 420, welche in allen Weltregionen zu finden war. Interessanterweise traten die Varianten Cys88Arg, Arg206Cys und Gly465Arg gemäß den rekonstruierten Haplotypen nie alleine auf, sondern nur in Kombination mit der Variante Met420del. Zusammen mit dem ubiquitären hochfrequenten Auftreten von Met420del im Kontrast zur relativ regionsspezifischen Verteilung der anderen Varianten weist dies darauf hin, dass diese Varianten ursprünglich durch Mutationsereignisse auf Chromosomen, welche bereits die Met420 Deletion trugen, entstanden. Somit wären die durch diese Varianten definierten Haplotypen OCT1\*6, \*5 und \*14 als aus OCT1\*2 hervorgegangen und damit populationshistorisch jünger einzuordnen.

Von den fünf in dieser Arbeit neu identifizierten Varianten mit Einfluss auf die OCT1-Aktivität fanden sich vier in Populationen des ostasiatischen Raums und eine in Zentralasien. Die Varianten Thr245Met und Glu284Lys wurden in der chinesischen Tu-Population identifiziert. Die Tu, auch Chaghan Monguor genannt, sind eine der vielen ethnischen Gruppen innerhalb Chinas. Mit ca. 290.000 Individuen, vorwiegend in den chinesischen Provinzen Qinghai und Gansu, gehören ihr etwa 0,02% der chinesischen Bevölkerung an (National Bureau of Statistics of China 2011). Die Variante Ser29Leu wurde in der She-Population gefunden. Die She sind ebenfalls eine chinesische Minderheit mit ca. 710.000 Individuen, vornehmlich lokalisiert in den chinesischen Provinzen Fujian, Zhejiang, Jingxi, Guangdong und Anhui (National Bureau of Statistics of China 2011). Die Variante Ile449Thr wurde in der chinesischen Naxi- (oder Nakhi-) Population beobachtet. Mit 326.000 zugehörigen Individuen, vorwiegend in den Provinzen Sichuan und Yunnan,

ist sie ebenfalls als chinesische Minderheitenpopulation eingeordnet (National Bureau of Statistics of China 2011). Die Variante Gly414Ala wurde in der Brahui-Population, einer pakistanischen Minderheitenpopulation mit ca. 2,2 Millionen Angehörigen, sowie den Kalash, einer ethnischen Gruppe in Pakistan mit nur ca. 4.100 Zugehörigen, identifiziert. OCT1 war zuvor in keiner dieser Populationen untersucht worden.

Es ist zu bemerken, dass trotz der geringen regionalen Gesamtfrequenz von OCT1-*loss-of-function*-Varianten in der Region Ostasien vier der fünf neu identifizierten Varianten in Populationen dieser Region entdeckt wurden. Interessanterweise wurden in der Population der Tu zwei dieser vier Varianten und in der Population der She die Variante Ser29Leu zweimal beobachtet. In Anbetracht der niedrigen Frequenz von Trägern von *loss-of-function*-Varianten in der Region und der kleinen Anzahl von untersuchten Individuen aus diesen Populationen (jeweils 10 Individuen) stellt dies eine deutliche Häufung dar.

Die ausschließliche Lokalisation der neu identifizierten Varianten in den Regionen Ost- und Zentralasien mag eine einfache Erklärung haben. In vorangegangenen Studien standen meist Europa sowie die europäisch- und afrikanischstämmige amerikanische Bevölkerung im Fokus der Untersuchung (Kerb et al. 2002; Shu et al. 2003; Nies et al. 2009; Tzvetkov et al. 2012). Auch seltene Varianten in diesen Populationen konnten daher bereits zuvor identifiziert werden, weshalb in der Resequenzierung hier keine neuen Varianten in den Regionen Europa oder Afrika beobachtet wurden.

Dagegen waren von den Populationen Ostasiens zuvor nur die japanische, koreanische, vietnamesische, sowie die der Han-Chinesen untersucht worden (Itoda et al. 2004; Kang et al. 2007; Chen et al. 2010) und zentralasiatische Populationen waren zuvor nicht untersucht worden. Die Anzahl der unterscheidbaren Populationen in dieser Weltregion ist jedoch hoch. Viele davon sind Minderheitenpopulationen von teilweise geringer Größe. Unterschiedliche Ursprünge und historische Interaktionen mit anderen Populationen haben zur Entwicklung distinkter eigener Kulturen und Identitäten geführt. Auch auf genetischer Ebene zeigt sich die unterschiedliche Populationshistorie wiedergespiegelt (Li et al. 2008). Es ist daher nicht überraschend, dass in diesen Populationen Varianten beobachtet wurden, welche zuvor nicht gesehen worden waren.

Auf Grund der geringen Anzahl der jeweils untersuchten Individuen ist es schwer, sichere Aussagen über die populationsweite Frequenz und damit die Bedeutung dieser Varianten innerhalb der jeweiligen Minderheitenpopulationen zu treffen. Möglicherweise treten diese weltweit seltenen Varianten in diesen Populationen tatsächlich in der hohen Frequenz auf, mit der sie hier relativ zur Stichprobengröße beobachtet wurden. Wahrscheinlicher aber sind sie auch in diesen Populationen relativ selten. Interessant wäre auch, ob weitere in anderen Weltregionen unbekannt Varianten in diesen Populationen zu finden sind. Diese Fragen sind jedoch letztlich nur durch weiterführende Untersuchungen an diesen Populationen mit größeren Probenzahlen zu klären.

Insgesamt haben diese sehr seltenen Varianten jedoch keinen wesentlichen Einfluss auf das Gesamtbild des Verlusts der OCT1-Aktivität in der Region Ostasien. Bezogen auf die Gesamtheit der hier untersuchten Individuen bleibt die Frequenz dieser Varianten gering. Und obwohl sich in den einzelnen Populationen, in denen sie beobachtet wurden, höhere Frequenzen errechnen, haben auch diese mit Blick auf die geringen Anteile dieser Populationen an der Gesamtbevölkerung nur minimal Einfluss auf die regionale Frequenz des OCT1-Verlusts.

#### 4.1.1 Funktionale Eigenschaften der beobachteten *loss-of-function*-Varianten

Die in dieser Arbeit beobachteten OCT1-Varianten wurden in einer weiterführenden Untersuchung umfassend nach ihren funktionalen Auswirkungen charakterisiert (Seitz 2016). Anders als bei vorangegangene Analysen wurden dabei über die zuvor häufig verwendeten Modellsubstrate MPP<sup>+</sup>, TEA<sup>+</sup> und ASP<sup>+</sup> sowie das Medikament Metformin hinaus auch eine Anzahl weiterer klinisch relevanter OCT1-Substrate in die Untersuchung der Transportfunktion einbezogen.

Von den fünf in dieser Arbeit neu identifizierten Varianten zeigten vier einen signifikanten Einfluss auf die OCT1-Funktion und wurden dementsprechend als definierend für Hauptallele eingeordnet (siehe auch Kapitel 3.3). Die Varianten Ser29Leu (OCT1\*12) und Glu284Lys (OCT1\*15) führten zu einem kompletten Verlust der OCT1-Aktivität. Die Varianten Thr245Met (OCT1\*13) und Ile449Thr (OCT1\*11) führten zu einem substrat-spezifischen Verlust der OCT1-Aktivität.

Die Variante Gly414Ala zeigte sich in der Haplotypen-Inferenz als mit Met420Del gekoppelt und definierte das Suballel OCT1\*2C. Zwischen dem Allel OCT1\*2A und dem Suballel OCT1\*2C wurden keine signifikanten Unterschiede in der OCT1-Aktivität beobachtet.



Insgesamt zeigte neben den Varianten, welche zu einem kompletten oder partiellen Verlust der OCT1-Aktivität führten, ein signifikanter Anteil der untersuchten Aminosäureaustausche einen substratspezifischen Verlust der OCT1-Aktivität. Fünf von 19 kürzlich untersuchten Varianten (26%) bzw. von 12 untersuchten *loss-of-function*-Varianten (42%) zeigten substratspezifische Effekte (Seitz 2016). Zum Vergleich: *Urban et al.* berichteten, dass 14% der nichtsynonymen Varianten in Transportern von Medikamenten substratspezifische Effekte zeigen (Urban et al. 2006). Da *Urban et al.* jedoch nicht für alle untersuchten Transporter den Transport aller relevanten Substrate analysieren konnten, sondern sich in ihrer Studie auf Modellsubstrate beschränken mussten, unterschätzt diese Zahl jedoch wahrscheinlich den tatsächlichen Anteil. Von den Ergebnissen für OCT1 ausgehend ist zu vermuten, dass umfassendere Analysen einen höheren Anteil der Varianten mit substratspezifischen Effekten an den funktionell relevanten Transportervarianten zeigen würden.

Vier der fünf Varianten mit substratspezifischem Effekt sind in den Transmembranhelices lokalisiert (Abbildung 21), von denen bekannt ist, dass sie an der Formation der Substratbindungsdomänen beteiligt sind (Koepsell 2011). Zwar ist von keiner der betroffenen Aminosäuren bisher bekannt, dass sie an der Substratbindung beteiligt sind, jedoch zeigen diese Varianten eine Reduktion des Transports von bis zu 100% für einige Substrate (Seitz 2016). Diese Ergebnisse zeigen, dass vorherige Daten zu substratspezifischen Effekten von OCT1-Varianten mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht durch Artefakte in Klonierung oder Transporter-Assays verursacht wurden, und stützen die Hypothese mehrerer Bindungsdomänen, welche sich für die verschiedenen Substrate deutlich unterscheiden.

Mit Blick auf zukünftige Studien ist die Konsequenz des hohen Anteils von Varianten mit substratspezifischen Effekten, dass die Charakterisierung neu identifizierter Aminosäureaustauschvarianten anhand von nur einem oder zwei Substraten nicht als ausreichend angesehen werden kann. Eine Variante, die für ein Substrat nicht zu einer Veränderung der Transportaktivität führt, kann für ein anderes Substrat zur kompletten Inaktivität führen. Auch die sogenannten Modellsubstrate MPP<sup>+</sup>, TEA<sup>+</sup> und ASP<sup>+</sup> haben nach den Daten von Tina Seitz nur eine geringe Fähigkeit, die Effekte von nichtsynonymen Varianten auf den Transport klinisch relevanter Medikamente vorherzusagen. Bis die Substratbindungsmechanismen von OCT1 ausreichend aufgeklärt sind sollte daher die funktionale Charakterisierung ggf. neu identifizierter Varianten idealerweise alle relevanten OCT1-Substrate umfassen und der Effekt von OCT1-Varianten mit substratspezifischen Effekt auf den Transport neu identifizierter OCT1-Substrate einzeln experimentell bestimmt werden.

## 4.2 Die weltweite genetische Variabilität von OCT1

Die in dieser Arbeit durchgeführten populationsgenetischen Untersuchungen konnten deutliche Unterschiede in der Frequenz des genetisch determinierten Verlusts der OCT1-



Aktivität zwischen Populationen weltweit zeigen. Eine Analyse der molekularen Varianz belegt die starke Variabilität zwischen den Regionen der Welt auf Ebene der Haplotypen (10,5%, Tabelle 19) und noch stärker ausgeprägt auf der Ebene des Phänotyps (18,7%, Tabelle 19). Die Variabilität von OCT1 zeigte sich damit als deutlich höher als die des ebenfalls genetisch hoch variablen Arzneimittel-metabolisierenden Enzyms CYP2D6 (phänotypische Varianz von 6,5% zwischen den Weltregionen (Sistonen et al. 2007). Auch zwischen den Populationen einzelner Regionen konnten deutliche Unterschiede beobachtet werden. Dabei sind diejenigen, welche von den umgebenden Populationen ihrer Region bzw. dem Regionsdurchschnitt abweichen, potentiell von besonderem Interesse.

Tabelle 19: Globale Analyse der molekularen Varianz im OCT1-Gen

Region	Anzahl der Regionen	Anzahl der Populationen	Haplotypen			Phänotypen		
			Innerhalb der Populationen	Zwischen den Populationen	Zwischen Regionen	Innerhalb der Populationen	Zwischen den Populationen	Zwischen Regionen
Weltweit	1	62	89,2	10,8		79,9	20,1	
Weltweit	6	62	87,4	2,1	10,5	76,9	4,4	18,7
Subsahara-Afrika	1	9	97,6	2,4		91,7	8,3	
Nordafrika und Mittlerer Osten	1	4	99,9	0,1		99,5	0,5	
Europa	1	13	100,0	0,0		98,7	1,3	
Zentralasien	1	10	96,2	3,8		91,5	8,5	
Ostasien und Ozeanien	1	21	94,9	5,1		89,5	10,5	
Amerika	1	5	75,6	24,4		63,7	36,3	

Die molekulare Varianz von 62 Populationen aus 6 Weltregionen wurde auf Ebene der Haplotypen sowie auf Ebene der Phänotypen in drei Stufen untersucht: Innerhalb der Populationen, zwischen den Populationen jeweils einer Region und zwischen den Weltregionen. Es kam das Programm Arlequin v3.5.1.2 (Excoffier et al. 2005) zum Einsatz. Analyse durchgeführt von Nawar Dalila, Tabelle modifiziert nach Seitz et al. 2015, S. 14.

Die weltweit höchste Variabilität zwischen den Populationen wurde in der Region Amerika beobachtet (36,3% Varianz auf der Ebene des Phänotyps, verglichen mit 1,3% in den europäischen Populationen, siehe Tabelle 19). Auch die Frequenz des OCT1-Verlusts, ausgedrückt als die Gesamtfrequenz aller OCT1-*loss-of-function*-Allele ( $MAF_{LOF-gesamt}$ ), lag hier mit 36,1% weltweit am höchsten. Die Region Südamerika zeigte zudem die weltweit höchste Frequenz des kompletten Verlusts der OCT1-Aktivität (17,5% im regionalen Durchschnitt).

Die höchsten populationsbezogenen Frequenzen, weit über dem regionalen Durchschnitt und die höchsten in dieser Arbeit beobachteten, wurden in den indigenen südamerikanischen Populationen der Surui ( $MAF_{LOF-gesamt}$  93,8%) und Karitiana ( $MAF_{LOF-gesamt}$  93,8%) beobachtet.

gesamt 60,7%) beobachtet. Dabei zeigten 87,5% der Surui und 28,6% der Karitiana einen kompletten Verlust der OCT1-Aktivität. Zwar beruhen die Daten dieser Populationen auf der Analyse von nur acht bzw. vierzehn Individuen, die Wahrscheinlichkeit, dass diese Beobachtung an einer zufälligen Auswahl nicht repräsentativer Individuen liegt, ist jedoch sehr gering (siehe Tabelle 20). Zudem wurde auch in der gemischten Population der Mexikaner (66 untersuchte Individuen im *1000 Genomes Project*) eine sehr hohe Frequenz des kompletten OCT1-Verlusts (22,7%) beobachtet.

Deutlich abweichend von den bereits genannten Populationen sind die der Puerto Ricaner ( $MAF_{LOF-gesamt}$  von 23,6%) sowie die Population der Pima ( $MAF_{LOF-gesamt}$  von 17,9%). Die Frequenzen des kompletten und inkompletten OCT1-Verlusts unter den Puerto Ricanern waren mit den europäischen zu vergleichen, während unter den nordamerikanischen Pima mit 78,6% die überwiegende Mehrheit der Individuen Träger zweier vollständig aktive OCT1-Allele waren.

Angesichts der in der Weltregion Amerika beobachteten deutlichen Abweichungen in der Frequenz des OCT1-Verlusts von den zuvor untersuchten europäisch-, afrikanisch- oder asiatisch-stämmigen Populationen sowie der hohen intraregionalen Variabilität zwischen den Populationen mag diese Region Hinweise auf die Gründe der weltweiten genetischen Variabilität von OCT1 geben. Weitergehende Untersuchungen einer größeren Anzahl von Individuen aus den indigenen Populationen dieser Region wären ebenfalls von Interesse.

Tabelle 20: Wahrscheinlichkeiten für die zufällige Genese abweichender Frequenzen in einigen Populationen

betrachtete Population			Vergleichspopulation			Wahrscheinlichkeit
Name	Allele (Individuen)	MAF <sub>LOF</sub>	Name	Allele (Individuen)	MAF <sub>LOF</sub>	
Surui	16 (8)	93,8%	Region Amerika	490 (245)	36,1%	<b>2,5 x 10<sup>-6</sup></b>
			Region Europa	1310 (655)	27,0%	<b>3,6 x 10<sup>-8</sup></b>
			Brahui	50 (25)	38,0%	<b>4,9 x 10<sup>-6</sup></b>
Karitiana	28 (14)	60,7%	Region Amerika	490 (245)	36,1%	<b>0,007</b>
			Region Europa	1310 (655)	27,0%	<b>1,9 x 10<sup>-4</sup></b>
			Brahui	50 (25)	38,0%	<b>0,008</b>
Pima	28 (14)	17,9%	Region Amerika	490 (245)	36,1%	<b>0,03</b>
			Region Europa	1310 (655)	27,0%	<b>0,247</b>
Han	284 (242)	0,4%	Region Ostasien	1072 (536)	1,3%	<b>0,048</b>
Japanese	238 (119)	0,0%	Region Ostasien	1072 (536)	1,3%	<b>0,043</b>
			Han	284 (242)	0,4%	<b>0,373</b>
Uygur	20 (10)	20,0%	Region Ostasien	1072 (536)	1,3%	<b>1,2 x 10<sup>-4</sup></b>
			Han	284 (242)	0,4%	<b>1,3 x 10<sup>-6</sup></b>
Mongola	20 (10)	10,0%	Region Ostasien	1072 (536)	1,3%	<b>0,027</b>
			Han	284 (242)	0,4%	<b>0,003</b>
She	20 (10)	10,0%	Region Ostasien	1072 (536)	1,3%	<b>0,027</b>
			Han	284 (242)	0,4%	<b>0,003</b>
Tu	20 (10)	10,0%	Region Ostasien	1072 (536)	1,3%	<b>0,027</b>
			Han	284 (242)	0,4%	<b>0,003</b>
Naxi	18 (9)	5,6%	Region Ostasien	1072 (536)	1,3%	<b>0,21</b>
			Han	284 (242)	0,4%	<b>0,069</b>
Adygei	34 (17)	29,4%	Region Europa	1310 (655)	27,0%	<b>0,44</b>
Russian	50 (25)	34,0%	Region Europa	1310 (655)	27,0%	<b>0,17</b>
North Italian	28 (14)	10,7%	Region Europa	1310 (655)	27,0%	<b>0,034</b>
French	56 (28)	37,5%	Region Europa	1310 (655)	27,0%	<b>0,056</b>
Byaka Pygmy	52 (26)	11,5%	Region Subsahara-Afrika	586 (293)	4,3%	<b>0,023</b>
African American	122 (61)	11,5%	Region Subsahara-Afrika	586 (293)	4,3%	<b>7,4 x 10<sup>-4</sup></b>
Brahui	50 (25)	38,0%	Region Zentralasien	438 (219)	20,5%	<b>0,003</b>
Balochi	48 (24)	33,3%	Region Zentralasien	438 (219)	20,5%	<b>0,027</b>
Yakut	50 (25)	4,0%	Region Zentralasien	438 (219)	20,5%	<b>9,7 x 10<sup>-4</sup></b>

Gezeigt sind jeweils die Anzahl analysierter Allele (bzw. Individuen) und die Wahrscheinlichkeit, dass die beobachteten Differenzen gegenüber der Vergleichspopulation, durch eine zufällige Auswahl nichtrepräsentativer Stichproben bedingt ist (siehe Kapitel 2.2.18).

Die zweithöchste Varianz auf Ebene des Phänotyps wurde in der Region Ostasien und Ozeanien beobachtet (10,5%, Tabelle 19). In dieser Region zeigte sich der Verlust der OCT1-Aktivität mit einer  $MAF_{LOF-gesamt}$  von 1,3% insgesamt als sehr selten. Nur 2,4% der untersuchten Individuen waren Träger eines inaktiven OCT1-Allels und von 536 hier betrachteten Individuen aus ostasiatischen Populationen zeigte nur ein einziges einen kompletten Verlust der OCT1-Aktivität.

In der Population der Han-Chinesen lag die Frequenz von Trägern eines inaktiven OCT1-Allels mit 0,8% noch unter dem Durchschnitt der hier untersuchten Individuen. Da diese Population jedoch mit >1,2 Milliarden Angehörigen mehr als 90% der chinesischen Bevölkerung und etwa 75% der Gesamtbevölkerung der Region Ostasien ausmacht (Central Intelligence Agency 2014) ist davon auszugehen, dass die Frequenzen in der Gesamtbevölkerung der Region Ostasien ebenfalls noch unter dem Durchschnitt der hier betrachteten Individuen liegen. In der japanischen Population wurden in dieser Arbeit unter 110 untersuchten Individuen keine Träger von OCT1-*loss-of-function*-Allelen beobachtet. Dies steht im Einklang mit und bestätigt vorangegangene Studien, welche in der japanischen Population als einzige *loss-of-function*-Variante Pro117Leu mit einer Frequenz von unter 1% beobachtet hatten (Saito et al. 2002; Itoda et al. 2004). Ob sich die Populationen der Han und der Japaner in der Frequenz des genetisch determinierten Verlustes der OCT1-Aktivität tatsächlich unterscheiden ist auf Grund der Seltenheit von *loss-of-function*-Varianten in diesen Populationen nur schwer zu sagen. Klar ist aber, dass in beiden Populationen *loss-of-function*-Varianten von OCT1 nur in sehr niedriger Frequenz auftreten. Ob neben den bekannten und hier beobachteten Varianten noch andere sehr seltene Varianten in diesen Populationen auftreten, kann nur durch Untersuchungen einer entsprechend großen Anzahl von Individuen letztendlich aufgeklärt werden.

Doch einige kleinere Populationen zeigten erhöhte Frequenzen des OCT1-Verlust verglichen mit den Han-Chinesen oder dem Regiondurchschnitt. Die Populationen der She, Tu, Naxi, Uiguren (HGDP-Bezeichnung Uygur) und Mongolen wichen nach oben vom regionalen Durchschnitt ab. Von sieben untersuchten uigurischen Individuen zeigte eines einen kompletten Verlust der OCT1-Aktivität und zwei waren Träger von einem inaktivem OCT1-Allel. Unter den jeweils acht untersuchten Individuen der She, Tu und Mongola Populationen wurden jeweils zwei Träger eines inaktiven OCT1-Allels beobachtet, in der Population der Naxi einer. Es erscheint hochwahrscheinlich, dass die Frequenz in der Population der Uiguren in der Tat wie hier beobachtet von den anderen Populationen der Region abweicht (Tabelle 20). Eine sichere Beurteilung der She, Tu und der mongolischen Populationen würde allerdings eine größere Zahl von analysierten Individuen erfordern.

Insgesamt wurde in den Populationen der Region Ostasien eine deutliche Abweichung vom weltweiten Muster des genetisch determinierten Verlusts der OCT1-Aktivität beobachtet. Quantifiziert als Fixations-Indizes zeigte sich dies als eine deutliche Divergenz

zwischen den ostasiatischen Populationen insgesamt und den Populationen der Regionen Südamerika, Nordafrika und Mittlerer Osten, Zentralasien und Europa (siehe Abb. 23B). Auch auf der Ebene individueller Populationen lassen sich starke Divergenzen zwischen den ostasiatischen Populationen, insbesondere denen der Han-Chinesen und Japaner, und der Mehrzahl der südamerikanischen, afrikanischen, europäischen und zentralasiatischen Populationen feststellen (Abbildung 23 A). Diese auf OCT1 bezogenen Divergenzen waren im Vergleich teilweise deutlich ausgeprägter als die auf genomweiter Ebene beobachteten (Cavalli-Sforza et al. 1994; Nelis et al. 2009). Während etwa Nelis et al. anhand von SNP-Untersuchungen zwischen ostasiatischen und europäischen Populationen paarweise  $F_{ST}$ -Werte von 0,110 bis 0,111 bestimmten wurden hier  $F_{ST}$ -Werte von 0,25 bis 0,47 beobachtet.

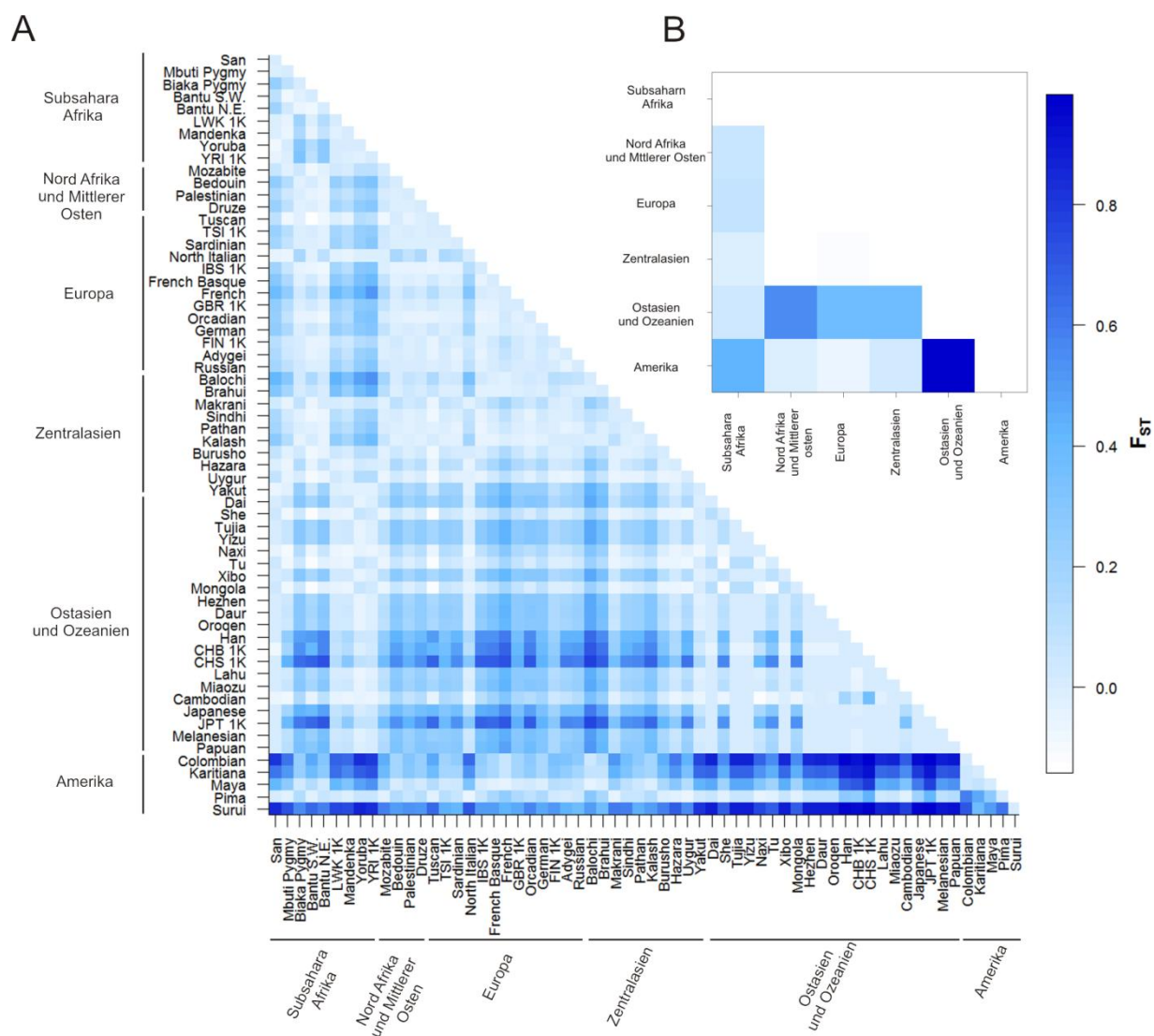


Abbildung 22: Vergleich der Divergenz zwischen den untersuchten Populationen (A) sowie zwischen den Weltregionen (B)

Die Divergenzen sind dargestellt als paarweise Fixations-Indizes ( $F_{ST}$ ). Die Farbe Dunkelblau bezeichnet eine hohe Divergenz (hohe  $F_{ST}$ -Werte) zwischen Populationen bzw. Weltregionen. Analysiert wurden 62 Populationen aus HGDP-CEPH-Panel und *1000 Genomes Project* (markiert mit 1K); die englischsprachigen

Bezeichnungen der Populationen wurden hier beibehalten. Analyse durchgeführt von Nawar Dalila, Abbildung modifiziert nach Seitz et al. 2015, S. 15.

In Europa wurde mit 1,3% die mit Ausnahme der Region Nordafrika und Mittlerer Osten (0,5% bei nur vier Populationen) geringste Varianz im OCT1-Gen auf Ebene des Phänotyps beobachtet (Tabelle 19). Die Frequenzen des Verlusts der OCT1-Aktivität in den Populationen der Region entsprachen im Durchschnitt ( $MAF_{LOF\text{-gesamt}}$  27%, 7,9% kompletter Verlust, 38,1% Träger eines inaktiven Allels) den in vorherigen Studien berichteten. Zwischen den europäischen Populationen wurden meist nur geringfügige Unterschiede beobachtet.

Die höchste Frequenz des OCT1-Verlusts in Europa war in der französischen Population zu finden (37,5% vs. 27% europäischer Durchschnitt). In Russland lag die Gesamtfrequenz von OCT1-*loss-of-function*-Allelen zwar weniger weit über dem regionalen Durchschnitt ( $MAF_{LOF\text{-gesamt}}$  32,1% vs. 27%), jedoch lag die Frequenz des kompletten Verlusts der OCT1-Aktivität sowohl unter den zu den indo-europäischen Völkern gezählten Russen (20% kompletter Verlust der OCT1-Aktivität) als auch unter den zu den kaukasischen Völkern gerechneten Adygejern (17%) deutlich über dem europäischen Durchschnitt. Die Frequenzen des partiellen Verlusts (heterozygote Träger eines LOF Allels) lagen dagegen unter Durchschnitt. Diese überraschende Beobachtung, insbesondere die scheinbare Abweichung vom Hardy-Weinberg-Equilibrium, mögen jedoch durch eine zufällige Auswahl nicht-repräsentativer Proben begründet sein (Tabelle 20).

In der Norditalienischen Bevölkerung lag die Frequenz des OCT1-Verlusts unter dem europäischen Durchschnitt ( $MAF_{LOF\text{-gesamt}}$  10,7% vs. 27%). Auch das Muster der Divergenz (paarweise Fixations-Indizes, Abbildung 22) dieser Population von den anderen hier betrachteten entspricht eher dem einiger afrikanischer Populationen als den europäischen. Auch hier mag eine weitere Untersuchung größerer Zahlen von Individuen interessant sein. Im Gegensatz dazu wichen die anderen untersuchten italienischen Populationen nicht wesentlich von den anderen Populationen Europas ab. Insgesamt bestätigen diese Ergebnisse vorangegangene Studien des OCT1-Verlusts in einzelnen europäischen Populationen und erweitern sie auf die 14 hier betrachteten Einzelpopulationen.

In der Region Subsahara-Afrika wurde mit einer molekularen Varianz von 8,3% auf Ebene des Phänotyps eine mittlere Variabilität von OCT1 beobachtet. Im Vergleich der Weltregionen zeigten nur die Regionen Europa und Nordafrika und Mittlerer Osten geringere Werte. Dabei war der genetisch determinierte Verlust der OCT1-Aktivität in Subsahara-Afrika insgesamt selten ( $MAF_{LOF\text{-gesamt}}$  4,3%). Individuen mit komplettem Verlust der OCT1-Aktivität wurden in dieser Region überhaupt nicht beobachtet.

Abweichend von den anderen Populationen der Region zeigten sich die Byaka-Pygmäen mit einer deutlich höheren Frequenz des OCT1-Verlusts (11,5%). Die Divergenzmuster der Pygmäen-Populationen (Byaka und Mbuti) sowie der Bantu, in denen die beobachtete

Frequenz des OCT1-Verlusts ebenfalls über dem Durchschnitt lag, ähneln denen der europäischen Populationen. Deutliche Unterschiede zu den Populationen der Region Subsahara-Afrika zeigte auch die Population der afrikanisch-stämmige Amerikaner (African Americans, hier Individuen aus den Südwest-USA) mit einer Frequenz des OCT1-Verlusts von 11,5%. Diese Unterschiede sind mit großer Wahrscheinlichkeit nicht auf Zufall zurückzuführen (Tabelle 20). Die beobachtete Frequenz lag dagegen unterhalb derer in der nordafrikanischen Population der Mozabiten (15,5%), jedoch ist diese Abweichung nicht so stark als dass sie nicht auf Zufallseffekte bei der Probenauswahl zurückzuführen sein kann.

In der Region Zentralasien wurden ähnliche Frequenzen des OCT1-Verlusts wie in der Region Nordafrika und Mittlerer Osten beobachtet (20,5% und 20,7%), jedoch eine deutlich höhere Varianz auf Ebene des Phänotyps (8,5% vs. 0,5%). Damit entspricht die Variabilität in Zentralasien in etwa der Subsahara-Afrikas. Bei nur vier der Region Nordafrika und Mittlerer Osten zugeordneten Populationen, drei davon aus Israel, mag die geringe molekulare Varianz dieser Region dagegen ein Artefakt der Populationszusammensetzung des HGDP-CEPH-Panels sein.

Die höchsten Frequenzen des OCT1-Verlusts wurden in den Populationen der Brahui ( $MAF_{LOF-gesamt}$  38%) und Belutschen (HGDP-Bezeichnung Balochi,  $MAF_{LOF-gesamt}$  33,3%) beobachtet, welche deutlich über dem regionalen Durchschnitt lagen. Die Frequenz des OCT Verlusts unter den Brahui war die höchste hier beobachtete außerhalb Südamerikas. Mit einiger Wahrscheinlichkeit spiegeln diese Werte tatsächliche abweichende Frequenzen in diesen Populationen wider (Tabelle 20). Die Population der sibirischen Jakuten dagegen wich mit einer  $MAF_{LOF-Gesamt}$  von 4% nach unten von der regionalen Durchschnittsfrequenz des OCT1-Verlusts ab. Auch hier erscheint es hoch wahrscheinlich, dass diese Beobachtung eine tatsächlich existierende starke Abweichung von der durchschnittlichen Frequenz des OCT1-Verlusts in der Region Zentralasien repräsentiert (Tabelle 20). Die Divergenzen in der Frequenz des OCT1-Verlusts zwischen einzelnen Populationen dieser Region sind die stärksten außerhalb der Region Südamerika beobachteten. Eine genauere Betrachtung der Populationen dieser Region mag daher von Interesse sein.

In der weltweiten Übersicht variierte die beobachtete Nukleotiddiversität zwischen  $3,6 \times 10^{-4}$  und  $7,9 \times 10^{-4}$  zwischen den Weltregionen (Tabelle 21). Im weltweiten Durchschnitt lag sie mit  $5,88 \times 10^{-4}$  sehr nahe am zuvor berichteten Wert von  $5,11 \times 10^{-4}$  (Leabman et al. 2003; Urban et al. 2006). Eine separate Analyse der Nukleotiddiversität für Aminosäureaustausche, welche einen Verlust der OCT1-Aktivität verursachen ( $\pi_{LOF}$ ), und Aminosäureaustausche, welche keinen Verlust der OCT1-Aktivität verursachen ( $\pi_{non-LOF}$ ), zeigte starke, mehr als 10-fache Variationen in  $\pi_{LOF}$  zwischen den verschiedenen Weltregionen (Tabelle 21).

Tabelle 21: Populationsgenetische statistische Eigenschaften des OCT1-Gens für die verschiedenen Weltregionen

Weltregion	$\pi$ ( $\times 10^{-4}$ )			$\frac{\pi_{\text{LOF}}}{\pi_{\text{non-LOF}}}$	$\theta$ ( $\times 10^{-4}$ )			Tajima's D		
	gesamt	LOF	non-LOF		gesamt	LOF	non-LOF	gesamt	LOF	non-LOF
Subsahara-Afrika	4,91	0,85	4,06	0,21	5,19	1,73	3,46	-0,096	-0,601	0,271
Nordafrika und Mittlerer Osten	5,73	2,59	3,15	0,82	9,45	5,67	3,78	-0,869	-1,040	-0,280
Europa	7,93	3,06	4,87	0,63	8,52	4,65	3,87	-0,140	-0,568	0,400
Zentralasien	7,60	2,36	5,24	0,45	11,73	5,42	6,32	-0,803	-1,042	-0,330
Ostasien und Ozeanien	5,48	0,16	5,32	0,03	7,99	4,79	3,20	-0,621	-1,638**	0,976
Amerika	3,63	2,76	0,87	3,18	4,25	1,06	3,18	-0,268	1,675	-1,204

Es wurden die folgenden populationsgenetischen Eigenschaften bestimmt: Die durchschnittliche Nukleotiddiversität  $\pi$ , die erwartete Nukleotiddiversität  $\theta$  und Tajima's D als Test der Neutralität (Tajima 1989). Als LOF bezeichnet sind Aminosäureaustausche resultierend in Funktionsverlust. Eingeschlossen sind alle Varianten, die eine Reduktion der OCT1-Aktivität von mehr als 50% für mindestens ein Substrat verursachen (Ser14Phe, Ser29Leu, Arg61Cys, Cys88Arg, Ser189Leu, Arg206Cys, Thr245Met, Glu284Lys, Gly401Ser, Met420del, Ile449Thr und Gly465Arg). Als non-LOF sind bezeichnet Aminosäureaustausche ohne Funktionsverlust. Eingeschlossen sind alle Varianten, welche die OCT1-Aktivität nicht beeinflussen oder erhöhen (Pro117Leu, Phe160Leu, Pro341Leu, Arg342His, Met408Val, Gly414Ala und Arg488Met). \*\*:  $P < 0.01$ . Analyse durchgeführt von Nawar Dalila, Tabelle modifiziert nach Seitz et al. 2015, S. 16.

Die hier beobachtete durchschnittliche nicht-synonyme Heterozygotie von OCT1 (Tabelle 21) war vergleichbar mit vorangegangenen Berichten (Leabman et al. 2003; Urban et al. 2006). Im Kontext anderer Transporter organischer Kationen der SLC22 Familie war die nicht-synonyme Heterozygotie von OCT1 vergleichbar mit der von OCTN1 und substantiell höher als die von OCT2, OCT3 und OCTN2 (Leabman et al. 2003; Urban et al. 2006). Im Vergleich zur breiteren Gruppe der pharmakologisch relevanten Membrantransporter war die durchschnittliche nicht-synonyme Heterozygotie von OCT1 niedriger als die von VMAT1, CNT1, PEPT2 aber substantiell höher als die der Dopamin- und Serotonin-Wiederaufnahmetransporter DAT und SERT (Urban et al. 2006). Jedoch ist fraglich, inwieweit von der nicht-synonymen Heterozygotie auf den funktionellen Phänotyp geschlossen werden kann. Gemäß den Ergebnissen der funktionellen Analysen von OCT1-Varianten beeinflussen fünf der nicht-synonymen Varianten (26% der untersuchten Varianten) nicht substantiell die OCT1-Funktion (Seitz 2016). Diese Varianten waren zu den am häufigsten auftretenden Varianten zu zählen und trugen substantiell zur durchschnittlichen Heterozygotie bei. Von den verbleibenden nicht-synonymen Varianten verursachten 12 (63%) eine Reduktion der OCT1-Aktivität, fünf davon (26%) jedoch nur für einen Teil der untersuchten Substrate (substratspezifischer Effekt), und weitere zwei eine Zunahme der OCT1-Funktion. Es kann also nicht automatisch davon ausgegangen werden, dass alle nicht-synonymen Varianten der oben genannten Membrantransporter auch die Proteinfunktion beeinflussen. Breitere, substratweite funktionelle Untersuchungen



der nicht-synonymen Varianten mögen daher nötig sein, um Unterschiede zwischen funktioneller und nicht-funktioneller Variabilität aufzuklären, bessere Vergleiche zu ermöglichen und präzisere Informationen bezüglich der Neutralität dieser Varianten zu gewinnen.

### 4.3 Mögliche Ursachen für die beobachtete Variabilität in der Frequenz des OCT1-Funktionsverlusts

Die Frequenz von OCT1-*loss-of-function*-Varianten und konsequent des genetisch determinierten Verlusts der OCT1-Aktivität zeigte sich in dieser Arbeit als hochvariabel zwischen den Weltregionen. Als mögliche Gründe für diese beobachtete Variabilität kommen sowohl Gendrift als auch natürliche Selektion in Frage.

Natürliche Selektion beschreibt die Veränderung von Allelfrequenzen innerhalb einer Population auf Grund von Unterschieden zwischen Individuen in der Wahrscheinlichkeit, ihre Erbanlagen an die nachfolgende Generation weiterzugeben. Interindividuell variierende Merkmale bewirken Unterschiede in körperlichen Fähigkeiten, der Resistenz gegen Krankheiten oder Gifte, der Lebenserwartung, der Zahl der Nachkommen, etc. Dies hat zur Folge, dass Individuen mit günstigen Merkmalen statistisch mehr erfolgreiche Nachkommen und damit einen größeren Fortpflanzungserfolg haben, sie besitzen eine größere (reproduktive) Fitness. Subsequent wird der Anteil der Erbanlagen der fitten Individuen in der Folgegeneration größer sein. Über mehrere Generationen kommt es zu einer gerichteten Verschiebung der Allelfrequenzen der vorteilhaften Merkmale in der Population. Dabei ist die Fitness, die Anpasstheit oder Eignung, stets im Kontext der Umwelt zu sehen. Umweltfaktoren in verschiedenen Umgebungen können unterschiedliche Merkmale und unterschiedliche Merkmalsausprägungen vorteilhaft werden lassen und erweisen sich in diesem Kontext von Umgebung, Population und Merkmal damit als Selektionsfaktoren. Der Einfluss eines Selektionsfaktors auf die Population, der die Allelfrequenz eines Merkmals in positiver oder negativer Weise verändert, wird als Selektionsdruck bezeichnet.

Gendrift, auch Alleldrift oder Sewall-Wright-Effekt genannt, beschreibt eine Veränderung von Allelfrequenzen innerhalb einer Population, welche im Gegensatz zur natürlichen Selektion rein zufallsbedingt ist. Wie alle stochastischen Prozesse ist auch die Weitergabe von Allelen an die nächste Generation zufallsbedingten Schwankungen unterworfen, wodurch sich Allelfrequenzen von Generation zu Generation unterscheiden können. Gemäß der neutralen Theorie der Molekularen Evolution ist insbesondere bei genetischen Veränderungen ohne direkten Einfluss auf die reproduktive Fitness der Einfluss von Zufallseffekten auf die stochastischen Prozesse der Vererbung der bestimmende Faktor. Doch auch bei Merkmalen, welche Selektionsdrücken unterliegen, kann Gendrift von Bedeutung sein. In großen Populationen ist der Effekt gering da signifikante Änderungen statistisch unwahrscheinlich wären; hier dominieren die Effekte von natürlicher Selektion.

In kleinen Populationen jedoch können sich Allelfrequenzen auf Grund zufälliger Ereignisse deutlich ändern, bis hin zum Verschwinden oder der Fixierung eines Allels auch entgegen von Selektionsdrücken. Typische Ursachen für Gendrift sind der Gründereffekt und der Flaschenhalseffekt.

Als Gründereffekt (auch Founder-Effekt) bezeichnet man die Gendrift, welche auftritt wenn eine neue Population durch eine kleine Anzahl Individuen aus einer größeren Stammpopulation begründet wird. Die Zusammensetzung der Gründerpopulation kann deutlich von einer repräsentativen Auswahl der Ursprungspopulation abweichen. Die entstehende neue Population mag daher dann deutliche Abweichungen von den Allelfrequenzen der Stammpopulation sowie einen Verlust an genetischer Variabilität zeigen. Ein genetischer Flaschenhalseffekt („Bottleneck“) bezeichnet den Effekt einer starken Größenreduktion einer Population durch Naturereignisse oder auch menschliche Handlungen. Die überlebende Population mag von einer repräsentativen Auswahl der Ursprungspopulation deutlich abweichen. Wiederum mögen ein Verlust der genetischen Variabilität und die Abweichung von den Allelfrequenzen der Stammpopulation die Folge sein, auch ohne einen durch das Ereignis ausgeübten Selektionsdruck. Typische Ereignisse, die einen Flaschenhalseffekt verursachen können, sind etwa Epidemien, Hungersnöte und Naturkatastrophen.

#### **4.3.1 Gendrift und historische Werdegänge von Populationen als mögliche Ursachen für die beobachtete Variabilität in der Frequenz von OCT1-Funktionsverlust**

Gemäß dem weitgehend akzeptierten *out-of-Africa*-Modell liegt der Ursprung des anatomisch modernen Menschen in Afrika, wo sich vor 100 bis 200.000 Jahren die Subspezies *Homo sapiens sapiens* entwickelte (Stringer und Andrews 1988; Ingman et al. 2000; Stringer 2002; Cavalli-Sforza und Feldman 2003; Tishkoff und Kidd 2004; Relethford 2008; Tattersall 2009). Ausgehend von einer kleinen ursprünglichen Population breitete sich der anatomisch moderne Mensch zunächst innerhalb Afrikas aus und dann beginnend vor 55 bis 130.000 Jahren von dort aus weltweit (Abbildung 23). Im Zuge der Expansion wurden andere Subspezies wie *H. erectus* oder *H. neanderthaliensis* verdrängt oder vermischten sich mit den sich ausbreitenden anatomisch modernen Menschen.

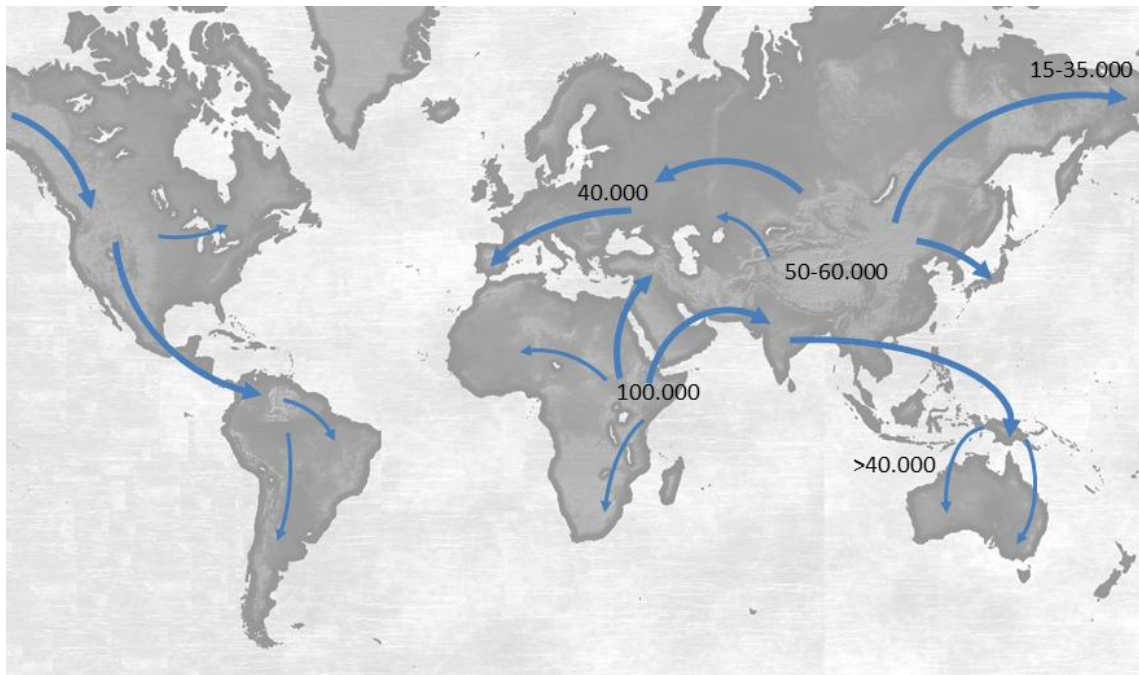


Abbildung 23: Die Ausbreitung des modernen Menschen über die Welt

Von Ostafrika breitete sich *Homo sapiens* vor 100-200.000 Jahren erst über Afrika und dann wahrscheinlich über eine nördliche und eine südliche Route vor 40-60.000 Jahren von Ostafrika nach Asien. Von dort wurden erst Ozeanien, dann vor etwa 40.000 Jahren Europa und schließlich vor 15-35.000 Jahren über die Beringbrücke Amerika besiedelt. Ausbreitungswege und Zeitangaben nach Cavalli-Sforza und Feldman 2003; Lopez et al. 2015.

Die Ausbreitung des modernen Menschen über die Welt geschah so über einen populationshistorisch langen Zeitraum hinweg, am ehesten durch eine Sukzession von kleinen Schritten der Migration und Expansion (Excoffier 2002; Goldstein und Chikhi 2002; Prugnolle et al. 2005a; Liu et al. 2006). Dabei war in jedem Schritt nur ein kleiner Teil der bestehenden Population an der Ausbreitungsfront beteiligt an der Expansion in eine neue Region. In den innerhalb dieses Prozesses entstehenden kleinen und isolierten Populationen können durch Gendrift die Allelfrequenzen einzelner Merkmale deutlich von denen umgebender Populationen abweichen. Besteht, z.B. auf Grund von Distanz oder anderen geographischen Faktoren, kein Austausch mit anderen Populationen, so können durch Gendrift Allele sogar vollständig fixiert oder eliminiert werden. Ereignisse wie Epidemien, Hungersnöte und Naturkatastrophen können einzelne Populationen im Sinne von genetischen Flaschenhalseffekten betreffen während andere verschont bleiben. Die Vermischung mit anderen Populationen, Kriege oder Migrationen eines Großteils einer Population sind andere Möglichkeiten, warum einzelne Populationen Abweichungen von anderen Populationen einer Region zeigen können.

In der Tat zeigen populationsgenetische Untersuchungen auf genomweiter Ebene ein Ansteigen der genetischen Differenzierung zwischen Populationen, welche linear mit der geographischen Distanz ansteigt (Relethford 2004; Serre und Pääbo 2004; Manica et al. 2005; Ramachandran et al. 2005). Die genetische Diversität von Populationen dagegen

sinkt mit steigender geographischer Distanz zu Ostafrika als wahrscheinlichem Ursprung des modernen Menschen (Prugnolle et al. 2005a; Prugnolle et al. 2005b), jedoch möglicherweise nicht in linearer Weise (Liu et al. 2006). Diese Beobachtungen sind konsistent mit einem Modell, in dem serielle Gründereffekte im Verlauf der Ausbreitung über die Welt ausgehend von Ostafrika eine graduelle Zunahme von genetischer Drift und eine Abnahme der genetischen Diversität bedingten (Ramachandran et al. 2005; Deshpande et al. 2009; Li et al. 2008).

Auch die Frequenz des OCT1-Verlusts lässt sich in Bezug zur geographischen Distanz zu Ostafrika als Maß für die Migrationsdistanz im Laufe der Populationsgeschichte setzen. Die Korrelation ist nur begrenzt positiv ( $r=0.28$ ,  $P<0.05$ , Abbildung 24), wird jedoch deutlich stärker wenn die Populationen der Region Ostasien und Ozeanien von der Analyse ausgeschlossen werden ( $r=0.640$ ,  $P<10^{-4}$ , Abbildung 24). Gendrift im Verlauf der Ausbreitung menschlicher Populationen über die Welt mag demnach einen großen Teil der beobachteten interregionalen Unterschiede in der Frequenz des Verlusts der OCT1-Aktivität erklären.

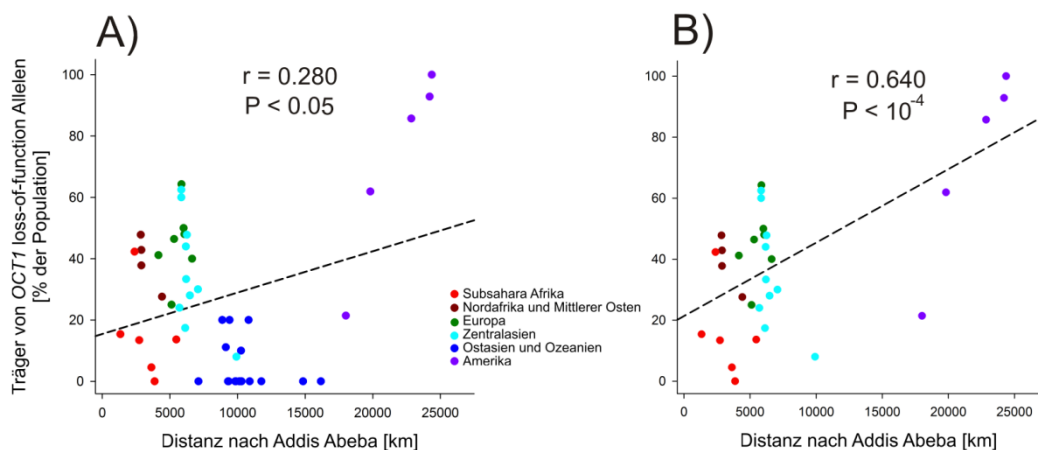


Abbildung 24: Korrelationsanalysen zwischen dem Verlust der OCT1-Aktivität und der geographischen Distanz zu Addis Abeba, Äthiopien

Gezeigt sind alle HGP-CEPH-Populationen (a) und Populationen außer denen der Region Ostasien und Ozeanien (b). Die Distanzen zu Addis Abeba sind gemäß den zuvor publizierten (Li et al. 2008). Gezeigt sind Pearson's Korrelationskoeffizienten. Die Anzahl der untersuchten Populationen war 50 in (a) und 32 in (b). Analyse durchgeführt von Nawar Dalila, Abbildung modifiziert nach Seitz et al. 2015, S. 15.

Unter den *Homo sapiens* Populationen haben die indigenen Populationen Amerikas eine der längsten Migrationsdistanzen hinter sich (Liu et al. 2006; Cavalli-Sforza und Feldman 2003; Lopez et al. 2015). Die Beobachtung von teilweise sehr deutlichen Unterschieden zu anderen Populationen stimmt überein mit dem Modell der seriellen Gründereffekte, welches auf Grund dieser Populationsgeschichte ein hohes Maß an genetischer Drift erwarten lässt. Die weltweite Korrelation der Frequenz des OCT1-Funktionsverlusts mit der Migrationsdistanz (Abbildung 24) sowie die graduelle Zunahme von Nordamerika (Pima) nach Mittelamerika (Maya) und Südamerika (Karitiana, Surui) (Abbildung 18) mit

der Ausbreitung über den amerikanischen Kontinent ausgehend von Sibirien über die Beringbrücke ((Wang et al. 2007)) stützen dies als mögliche Erklärung.

Sowohl bei den Surui als auch bei den Karitiana handelt es sich um sehr kleine (wenige hundert bis tausende Angehörige), isolierte und vorwiegend endogame Populationen, welche ein hohes Maß an Konsanguinität zeigen (Calafell et al. 1999; Leutenegger et al. 2011). Diese Konstellation begünstigt ebenfalls das Auftreten von genetischer Drift. Schließlich sind mehrere Ereignisse in jüngerer Zeit bekannt, welche auf die Population der Surui als genetische Bottleneck Events eingewirkt haben mögen. So waren sie im 19. und in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts auf Grund von Konflikten mit anderen indigenen und nicht-indigenen Gruppen im Kontext des Kautschukbooms, des Kassiterit-Abbaus und dem Ausbau von Eisenbahn- und Telegraphenlinien mehrfach zur Migration gezwungen (Mindlin 2003). Ab 1969 kamen sie durch den ersten prolongierten Kontakt mit brasilianischen Siedlern auch in Kontakt mit Krankheiten, gegen die keine Immunität bestand. Innerhalb eines kurzen Zeitraumes starben in Folge dessen mehr als zwei Drittel der Surui Population (Lourenco et al. 2008). Auch die Karitiana mussten im frühen 20. Jahrhundert wahrscheinlich aus ähnlichen Gründen mehrfach umsiedeln und erfuhren nach dem Kontakt mit weißen Siedlern einen drastischen Bevölkerungseinbruch auf Grund von Krankheiten (Storto 2005). Die extrem hohe Frequenz des Verlusts der OCT1-Aktivität in den Populationen der südamerikanischen Surui und Karitiana ist also wahrscheinlich zu einem großen Teil durch eine Kombination von Gendrift-Effekte zu erklären.

Ein weiterer Faktor mag eine Abstammung von bzw. die Vermischung mit unterschiedlichen Gründerpopulationen sein. So gibt es Hinweise, dass die indigenen Populationen des Amazonas-Gebietes abweichend von den indigenen Populationen Nord- und Mittelamerikas zum Teil zurückgehen auf eine Population, die genetisch wie morphologisch Merkmale zeigte, welche nahe mit denen der indigenen Populationen Australiens, Melanesiens und der Inseln Südostasiens übereinstimmen (Skoglund et al. 2015). Möglicherweise handelte es sich dabei um eine frühere Ausbreitungswelle, welche von einer späteren über die Beringbrücke aus Nordostasien kommenden Migrationspopulation weitgehend verdrängt wurde. Gerade in den Surui und Karitiana scheint diese Abstammung auf genetischer Ebene einen deutlichen Einfluss zu haben (Skoglund et al. 2015). In Bezug auf den Verlust von OCT1 zeigte sich hier jedoch keine Übereinstimmung mit den Ozeanischen Populationen. Eine abweichende Abstammung ist daher wahrscheinlich nicht der entscheidende kausale Faktor für die beobachtete hohe Frequenz des OCT1-Verlusts in den Surui und Karitiana.

Deutliche Unterschiede wurden auch zwischen den indigenen Minderheitenpopulationen und den Mehrheitspopulationen der Mexikaner, Kolumbianer und Puerto Ricaner beobachtet. Diese gemischten Populationen gehen zurück auf Vermengung der vorwiegend europäischen Kolonisten, verschiedener indigenen Populationen und der Afrikaner, die

ursprünglich als Sklaven das Land erreichten. In der Tat entsprechen die Frequenzen des OCT1-Verlusts in diesen Populationen recht exakt dem nach jeweiligem Populationsanteil gewichteten Mittelwert zwischen europäischen, afrikanischen und indigenen südamerikanischen Populationen. Eine Stratifikation nach der Zusammensetzung der Herkunft und entsprechende Unterschiede in Abhängigkeit von der Distribution (städtische Bevölkerung, ländliche Bevölkerung, unterschiedliche Landesteile) erscheinen wahrscheinlich. Die hier beobachteten intraregionalen Unterschiede zwischen den Populationen in Südamerika sind also zusätzlich auch durch die unterschiedlichen Populationsstrukturen begründet.

Bei den vom Regionsdurchschnitt in der Region Ostasien und Ozeanien abweichenden Populationen der She, Tu und Naxi handelt es sich um Minderheitenpopulationen mit distinkten eigenen Kulturen und Sprachen. Genetische Drift erscheint daher ein plausibler Faktor in der genetischen Divergenz dieser Populationen. Zudem geben auch Ursprünge und Historie einiger dieser Populationen Hinweise auf mögliche Gründe für die beobachteten Abweichungen. So wurden für die Ursprünge der Tu-Population Verbindungen zu eurasischen Nomaden, den proto-Mongolische Xianbei oder mongolische Soldaten aus der Zeit der mongolischen Eroberungen diskutiert (Hu 2010). Jüngere Studien identifizierten Hinweise auf eine Vermischung der Tu mit einer Volksgruppe, die genetisch den heutigen Europäern am nächsten steht, möglicherweise Händlern, welche die Seidenstraße bereisten, zwischen 1080 und 1330 (Patterson et al. 2012; Hellenthal et al. 2014). Die Naxi gehen wahrscheinlich zurück auf die Proto-Qiang, den Vorläufern der modernen Tibetischen Population, welche auf genetischer Ebene Einflüsse auch aus den Regionen Zentralasien und Sibirien zeigen (Yu 2010; Lu et al. 2016). Genetische Untersuchungen an der Population der Naxi zeigten neben diesen auch europäische Einflüsse (Hellenthal et al. 2014).

Für die Abweichung der größeren Populationen der Mongolen und Uiguren (ca. 6 Millionen bzw. 10-15 Millionen Angehörige in Ostasien, aber regionsweit dennoch als Minderheit anzusehen) mag Gendrift ein Faktor sein. Mit größerer Sicherheit aber können Vermischungen mit anderen Populationen in jüngerer Vergangenheit als Mitursache belegt werden. So expandierte das mongolische Reich zwischen 1206 und 1368 von den Steppen Zentralasiens nach Süd- und Ostasien und sogar bis nach Europa und dominierte die Region für mehrere Generationen als größtes zusammenhängendes Reich der Geschichte (Atwood 2004). Auch auf genetischer Ebene bedingten die mongolischen Eroberungen einen detektierbaren Einfluss auf die betroffenen Populationen (Zerjal et al. 2003). Umgekehrt zeigt auch die heutige mongolische Population genetische Einflüsse von ostasiatischen (Han) und nordasiatischen (Oroqen, Daur, Hezhen) Populationen, sowie aus Sibirien, Zentralasien und in kleinerem Ausmaß auch Europa welche in die Zeit zwischen 1194 und 1446 datiert werden – korrespondierend mit der Ausbreitung und Zeit des mongolischen Reiches (Hellenthal et al. 2014). Die erleichterten Bedingungen für Reisen und Handel unter der *Pax Mongolica* des mongolischen Reiches mögen zudem den

Austausch zwischen anderen Populationen der Region gefördert haben. Die zu den Turkvölkern gezählten Uiguren gehen wahrscheinlich zurück auf die Verbindung von mongolischen und türkischen Steppenvölkern. Auf genetischer Ebene ist eine gemischte ostasiatische und europäische Abstammung ersichtlich, wobei die Anteile noch kontrovers diskutiert werden (Xu et al. 2008; Xu und Jin 2008; Li et al. 2009; Hellenthal et al. 2014). Der unstrittige genetische Einfluss europäischer Populationen mag erklären, warum die Uiguren eine deutlich über dem ostasiatischen Durchschnitt liegende Frequenz des OCT1-Verlusts zeigen.

Fraglich bleibt aber, ob die durchweg extrem niedrige Frequenz des Verlusts der OCT1-Aktivität in allen verbleibenden untersuchten Populationen der Region Ostasien und Ozeanien (14 von 19) durch Gendrift-Effekte allein zu erklären ist.

Genetische Drift mag für die beobachteten höheren Frequenzen des OCT1-Verlusts unter den zu den indo-europäischen Völkern gezählten Russen und den zu den kaukasischen Völkern gerechneten Adygejern verantwortlich sein. Im Falle der Adygejer mögen Beimischungen von Populationen aus der Regionen Zentralasien und Mittlerer Osten ein Faktor sein, doch ist das Ausmaß des genetischen Austauschs gering (Hellenthal et al. 2014). Es bleibt jedoch unklar wodurch, sollte es nicht durch Zufallseffekte in der Stichprobe bedingt sein, ein vom Equilibrium abweichendes Verhältnis von homozygoten (bzw. komplex-heterozygoten) und heterozygoten Trägern von OCT1-*loss-of-function*-Varianten, verursacht sein mag. Für die unter dem regionalen Durchschnitt liegenden Frequenzen des OCT1-Verlusts in der norditalienischen Bevölkerung mögen Beimischungen von Populationen aus der Region Nordafrika und Mittlerer Osten zwischen 766 v. Chr. und 550 n. Chr. ein Faktor sein, für welche Hellenthal et al. Hinweise auf genetischer Ebene fanden (Hellenthal et al. 2014). Es können Vermutungen angestellt werden, ob Faktoren wie geringere geographische Distanzen und kulturelle Gemeinsamkeiten zu einem höheren Ausmaß von genetischem Austausch zwischen den Populationen Europas als in anderen Weltregionen geführt haben mögen. Sei dies der Fall, so könnte es mit ein Grund für die beobachtete geringere Variabilität von OCT1 in Europa sein. Jedoch ist dies anhand der vorliegenden genetischen Daten nicht zu beweisen.

In Afrika liegt nach dem *out-of-Africa*-Modell der Ursprung der modernen Menschheit, von wo aus sie sich im Verlauf der letzten 100.000 Jahre über die Erde ausbreitete. Die afrikanischen Populationen sind demnach am wenigsten von den seriellen Gründereffekten im Rahmen dieser Ausbreitung betroffen, was sich auch in der Frequenz des OCT1-Verlusts widerspiegelt (Abbildung 18). Es kann vermutet werden, dass die deutlich nach oben abweichende Frequenz des OCT1-Verlusts in den Populationen der Byaka- und Mbuti-Pygmäen mit der frühen Abspaltung der Pygmäen-Populationen von den anderen Populationen Afrikas zusammenhängt (Patin et al. 2009; Tishkoff et al. 2009). Es erscheint plausibel, dass Gendrift im Verlauf der Geschichte dieser relativ kleinen und isolierten Populationen, die ihren traditionellen Lebensstil als Jäger und Sammler beibehalten haben,

für diese Unterschiede verantwortlich sein mag. Die Unterschiede zwischen den kenyanischen und den südwestafrikanischen Bantu sind wahrscheinlich auf den genetischen Einfluss der südafrikanischen San-Population auf letztere im Rahmen der Ausbreitung von Bantu-sprechenden Populationen nach Südafrika zurückzuführen (Hellenthal et al. 2014).

Die Differenzen zwischen der Population der afrikanisch-stämmige Amerikaner und den afrikanischen Populationen sind in Anbetracht der heterogenen Ursprünge ersterer und der Vermischung mit anderen Populationen wenig überraschend. Eine Einschätzung anhand der Daten der entsprechenden Ursprungspopulationen würde eine individuelle Aufschlüsselung der afrikanischstämmigen Amerikaner nach der Herkunft ihrer Vorfahren erfordern und auch dann ist unklar, wie aussagekräftig dies wäre. Die afrikanischstämmigen Amerikaner müssen daher zunächst in Bezug auf den Verlust der OCT1-Aktivität als separate, heterogene Population der Weltregion Nordamerika betrachtet werden.

Die starken Divergenzen zwischen einzelnen Populationen in der Region Zentralasien, die stärksten außerhalb der Region Südamerika beobachteten, mögen durch die sehr unterschiedlichen Herkünfte und komplexen geschichtlichen Werdegänge dieser Populationen bedingt sein. Die Brahui, welche die höchste Frequenz des OCT1-Verlusts zeigten, gehören nicht zu den indo-europäischen Völkern, welche in der Region die Mehrheit ausmachen. Sie werden zu den dravidischen Völkern gezählt, welche zurückgehend auf agrikulturelle Siedler aus der Region des heutigen Nahen Ostens den indischen Subkontinent bevölkerten und die Indus-Kultur (2800-1800 v. Chr.) bildeten (Mallory 1989; Cavalli-Sforza et al. 1994). Mit dem Niedergang der Indus-Kultur und den indo-europäischen Migrationen dominierten die indo-europäische Völker die Region. Die Population der Brahui sowie ein deutlicher sprachlicher und kultureller Einfluss verbleiben als Vermächtnis der dravidischen Völker in der Region (Minahan 2012). Genetische Untersuchungen zeigten auch in Bezug auf andere Marker Abweichungen der Brahui von anderen Populationen der Region (Qamar et al. 2002). Die Balochi, welche ebenfalls eine abweichend hohe Frequenz des OCT1-Verlusts zeigten, sind, obwohl zu den indo-europäischen Völkern gezählt, sprachlich wie genetisch nahe verwandt mit den Brahui (Minahan 2012; Hellenthal et al. 2014). Ob diese hier beobachteten Unterschiede auf eine höhere Frequenz des OCT1-Verlusts in den dravidischen Populationen zurückzuführen ist oder ob Gendrift innerhalb der Brahui als isolierter Population wahrscheinlicher ist, bleibt durch weitere Untersuchungen in Populationen, die zu den dravidischen Völkern gezählt werden, aufzuklären. Für die Population der pakistanischen Hazara wird eine Abstammung von Soldaten Genghis Khans diskutiert und genetische Untersuchungen bestätigten deutliche Unterschiede auf genetischer Ebene von anderen Population der Region und eine enge Verbindung zur mongolischen Population (Bellew 1979; Qamar et al. 2002; Zerjal et al. 2003; Li et al. 2008; Hellenthal et al. 2014). Dies mag erklären warum auch die hier beobachtete Frequenz des OCT1-Verlusts vom regionalen Durchschnitt abweicht und stattdessen mit der in der mongolischen Population übereinstimmt.



Die Populationsgeschichte der sibirischen Jakuten gibt mehrere Hinweise auf mögliche Ereignisse, welche zur sehr geringen Frequenz des OCT1-Verlusts in dieser Population beigetragen haben mögen. Dies ist insbesondere interessant, da diese Population auf genomweiter Ebene sowohl europäische als auch amerikanische Anteile in ihrer Abstammung zeigt (Li et al. 2008), trotz dieser Einflüsse von Populationen mit deutlich höheren Frequenzen des OCT1-Verlusts jedoch die hier beobachtete sehr geringe Frequenz des OCT1-Verlusts aufweist. So gehen die Yakut zurück auf Teile der Kurykan Population, welche im 7. Jahrhundert vom Jenissei-Fluss in die Region des Baikal-Sees migrierten (Kharkov et al. 2008; Keyser et al. 2015). Im 13. Jahrhundert waren die Yakut durch Flucht vor mongolischen Invasoren erneut zur Migration gezwungen, und im 17. Jahrhundert kam es in Rebellionen gegen die Gewaltherrschaft russischer Besetzung und den folgenden Vergeltungen zu einem Verlust von 70% der Bevölkerung (Shenfield 1999). Gendrift im Rahmen dieser Ereignisse mag die deutliche Abweichung der Yakut von anderen Populationen der Region erklären.

Insgesamt erscheint es wahrscheinlich, dass ein Großteil der beobachteten weltweiten Variabilität von OCT1 auf Gendrift im Verlauf der Ausbreitung über die Welt und weiteren Populationsgeschichte sowie der Vermischung von unterschiedlichen Populationen beruht. Eine Ausnahme stellen jedoch die ostasiatischen Populationen dar, wo es Hinweise gibt, dass Selektionsprozesse involviert sein mögen.

#### **4.3.2 Selektionsdrücke als mögliche Ursache für die interregionale Variabilität des OCT1-Funktionsverlustes**

Mit der Nahrung werden stets auch Fremdstoffe aufgenommen, welchen keinen Nahrungswert haben, jedoch schädliche Auswirkungen auf den Organismus haben können. Solche toxischen Xenobiotika müssen entgiftet oder abgebaut sowie ausgeschieden werden, um zu verhindern, dass dem Körper Schaden zugefügt wird. Unter dem Selektionsdruck toxischer Xenobiotika entwickelte sich zu diesem Zweck im Laufe der Evolution ein komplexes System von metabolisierenden Enzymen, Transportern und Ausscheidungswegen (Gonzalez und Nebert 1990; Nebert 1997). Mit der Divergenz der ethnischen Gruppen von *Homo sapiens* innerhalb der letzten 100.000 Jahre wurden die verschiedenen Populationen unterschiedlichen Umgebungen und damit unterschiedlichen Selektionsdrücken ausgesetzt. Über diese Zeiträume, und damit eine ausreichende Anzahl von Generationen, mögen die resultierenden regional und kulturell bedingten Unterschiede in der Ernährung und Exposition gegenüber umweltbedingter Faktoren zwischen den Populationen zu den heute zu beobachtenden deutlichen interregionalen Unterschieden beigetragen haben.

Ein bekanntes Beispiel für so bedingte Unterschiede ist die genetische Variante im  $\beta$ -Globin-Gen, welche für die autosomal rezessive Erbkrankheit der Sichelzellenanämie verantwortlich ist. Ihre Frequenz ist in den Malaria-Endemiegebieten deutlich höher als in

anderen Regionen (Allison 1954b). Grund dafür ist, dass heterozygote Träger dieser Variante meist nur von geringfügigen Symptomen betroffen sind jedoch als Konsequenz der Eigenschaften des veränderten Hämoglobins eine signifikante Resistenz gegenüber Malaria zeigen (Allison 1954a). In diesen Regionen bedingt diese Variante, obwohl die homozygote Träger an der Vollaussprägung der Krankheit leiden, daher statistisch einen Selektionsvorteil. Als Beispiel aus dem Gebiet der Pharmakogenetik mag das Arzneimittel-metabolisierenden Enzym CYP2D6 dienen. So schlagen Ingelman-Sundberg et al. vor, dass die hohe Frequenz des ultraschnellen Metabolisierer (*ultrarapid metabolizer*) Phänotyps von CYP2D6 in der äthiopischen Population darauf zurückzuführen ist, dass die erhöhte CYP2D6 Aktivität eine bessere Detoxifizierung von Alkaloid-Bestandteilen in der äthiopischen Ernährung erlaubte, was insbesondere in Zeiten des Mangels ein deutlicher Selektionsvorteil war (Aklillu et al. 2002; Ingelman-Sundberg 2005). Auch Unterschiede in der Frequenz von CYP2D6 Varianten mit substratspezifischem Effekt auf die Enzymfunktion zwischen den Weltregionen mögen auf Unterschiede in der Nahrungszusammensetzung und dadurch bedingte Selektionsdrücke zurückzuführen sein. Im Sinne von balancierten Polymorphismus mögen *loss-of-function*-Varianten von Enzymen wie CYP2D6, NAT2 und G6PD nicht nur Nachteile sondern in manchen Kontexten auch Vorteile bedingen, weshalb diese Varianten im Verlauf der Evolution mit einer gewissen Frequenz beibehalten wurden (Nebert 1997).

Auch im Falle von OCT1, welcher ebenfalls in einer wichtigen Position im Arzneimittel-Metabolismus involviert ist, mögen toxische Xenobiotika einen Selektionsdruck bedingen. Es existiert eine Vielzahl von mit der Nahrung aufgenommenen oder durch körpereigene Prozesse aus Lebensmittelbestandteilen entstehenden toxischen organischen Kationen oder hydrophilen schwachen organische Basen, welche für die hepatische Aufnahme potentiell von OCT1 abhängig sind. Die folgenden Beispiele von Tyramin und Monocrotalin veranschaulichen das Konzept.

Toxische Transportersubstrate, welche in der Leber entgiftet werden, können einen Selektionsdruck gegen OCT1-*loss-of-function*-Varianten bedingen. Eine reduzierte oder fehlende OCT1-Aktivität führt zu einer geringeren Aufnahme in die Leber und damit zu einer verringerten Entgiftung und höheren Belastung des Körpers. Vollständig aktives OCT1 hat unter diesen Bedingungen also eine schützende Wirkung.

Tyramin ist ein biogenes Amin, das beim Abbau von Eiweißen durch die Decarboxylierung der Aminosäure Tyrosin entsteht. Es tritt natürlicherweise in diversen Pflanzen auf (Smith 1977) und wird von Bakterien wie *Carnobacterium sp.* und *Lactobacillus sp.* im Rahmen inkompletter Fermentation produziert (Masson et al. 1996). In Nahrungsmitteln, deren Herstellungsprozess Gärung, Fermentation, Räuchern oder Alterung involviert, kann Tyramin als Begleitstoff in beträchtlicher Menge enthalten sein (Pechanek et al. 1983). Viele Käsesorten, alkoholische Getränke, insbesondere Rotweine, sowie Produkte wie Schokolade, Joghurt, Sauerkraut und verschiedene Fleischprodukte beinhalten signifikante

Mengen von Tyramin. In Bananen, Avocados, Ananas, verschiedenen Nüssen und einer Reihe von Bohnensorten ist es natürlicherweise enthalten.

Tyramin ist strukturverwandt mit dem Neurotransmitter Dopamin, kann jedoch wie auch Dopamin selbst die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren. Peripher wirkt es indirekt sympathomimetisch als Katecholamin *releasing agent*. Normalerweise wird oral aufgenommenes Tyramin durch Monoaminoxidasen (MAO), die stark in der menschlichen Leber aber auch in anderen Organen exprimiert werden, abgebaut (Grimsby et al. 1990). Geschieht dies nicht, z.B. unter Medikation mit MAO-Hemmern, welche die Monoaminoxidasen irreversibel inhibieren, so kann es zu erhöhten Blutdrücken bis hin zur hypertensiven Krise, erhöhtem Puls oder Kopfschmerzen kommen (Blackwell 1963). Ein Zusammenhang mit einem erhöhten Auftreten von Migräne wird diskutiert (Ghose et al. 1977; D'Andrea et al. 2007). Tyramin ist ein Substrat des menschlichen OCT1 und der Verlust der OCT1-Aktivität führt dazu, dass der OCT1-medierte Transport von Tyramin in Hepatozyten unterbleibt (Schömig et al. 2006; Seitz 2016). In Individuen mit teilweise oder komplettem Verlust der OCT1-Aktivität mögen daher wie auch bei der Anwendung von MAO-Hemmern höhere Tyramin-Spiegel als normal auftreten. In der Folge wären sie ebenfalls von einer relevanten sympathomimetischen Wirkung von Tyramin und den damit einhergehenden Risiken betroffen. Dies könnte auf Populationsebene einen Selektionsdruck für das Beibehalten von OCT1 in Populationen mit signifikantem Konsum tyraminreicher Nahrungsmittel bedingen.

Jedoch ist es unwahrscheinlich, dass Tyramin selbst die Ursache eines solchen Selektionsdrucks ist. Die Effekte der Tyraminvergiftung sind allgemein nicht letal, insbesondere bei jungen, sonst gesunden, Menschen. Auch gibt es aktuell keine Belege dafür, dass eine Korrelation zwischen einer niedrigen Frequenz des OCT1-Verlusts in einer Population und einer besonders tyraminreichen Ernährung besteht.

Hepatotoxische Transportersubstrate können einen Selektionsdruck für den Verlust der OCT1-Aktivität bedingen. Eine reduzierte oder fehlende OCT1-Aktivität führt zu einer geringeren Aufnahme von solchen toxischen Substanzen in die Leber. OCT1-*loss-of-function*-Varianten können unter diesen Bedingungen also eine schützende Wirkung haben.

Ein Beispiel für diese Kategorie von Stoffen ist Monocrotalin. Monocrotalin ist ein Pyrrolizidinalkaloid, das von Pflanzen der Gattung *Crotalaria* aus der Familie der Hülsenfrüchtler wahrscheinlich zur Abwehr von Herbivoren gebildet wird. Durch Kontamination von Nahrungsmitteln oder Getränken kann es zur Aufnahme durch den Menschen kommen (Bundesinstitut für Risikobewertung 2013, 2016). In der Leber kommt es dann im Rahmen der Biotransformation zur Bildung von stark hepatotoxischen Produkten (Fu et al. 2004) wie instabilen Dehydropyrrolizidine, welche Addukte mit DNA und zellulären Proteinen bilden. Es kommt zu einer Schädigung der Leber, je nach Ausmaß und Dauer der Vergiftung bis hin zum Leberversagen. Auch Lebertumore oder eine Venöse-Okklusive-Lebererkrankung (VOD) können resultieren. Die Folgen der

chronischen Vergiftung mit Pyrrolizidinalkaloiden werden als Pyrrolizidin-Alkaloidose, auch als 'Pictow disease' oder 'Winton disease' bekannt, zusammengefasst. Die Aufnahme von Monocrotalin in die Leber ist abhängig von OCT1 (Tu et al. 2013). Der Verlust des Monocrotalin-Transports in Hepatozyten auf Grund von OCT1-*loss-of-function*-Polymorphismen mag eine vor Hepatotoxizität schützende Wirkung haben.

Das Beispiel von Monocrotalin illustriert, dass der Verlust der OCT1-Aktivität eine schützende Wirkung vor aufgenommenen hepatotoxischen Substanzen haben kann und somit ein Selektionsdruck für den Verlust der OCT1-Aktivität plausibel ist. Zwar wurde keine Korrelation zwischen der globalen Verteilung der mit Blick auf die Monocrotalin-Toxizität wichtigsten (Crotalaria) Spezies *Crotalaria spectabilis* und *Crotalaria retusa* und der regionalen Frequenz des OCT1-Aktivitätsverlust beobachtet (Centre for Agriculture and Biosciences International 2015a, 2015b). Monocrotalin selbst ist daher wahrscheinlich nicht kausal für einen solchen Selektionsdruck verantwortlich. Jedoch sind allein an Pyrrolizidinalkaloiden mehr als 660 bekannt, etwa die Hälfte davon Hepatotoxizität zeigend, und in mehr als 6000 verschiedenen Pflanzen identifiziert worden (Fu et al. 2004). Kürzlich erst wurde von mehreren weiteren hepatotoxischen Alkaloiden berichtet, dass sie OCT1-Substrate sind (Li et al. 2014; Tu et al. 2014).

Auch andere Gründe für einen positiven Effekt des OCT1-Funktionsverlustes auf die Fitness sind denkbar. So zeigt sich gemäß jüngeren Berichten eine OCT1 Defizienz in Mäusen als schützend vor hepatischer Steatose (Chen et al. 2014a; Chen et al. 2015). In welchem Ausmaß der gleiche Effekt in Menschen existiert ist jedoch noch unklar.

In der hier durchgeführten weltweiten Analyse des Verlusts der OCT1-Aktivität zeigten sich Hinweise, dass ein Teil der genetischen Variabilität von OCT1 durch Selektionsprozesse bedingt sein mag. So wurde die stärkste Divergenz in der Frequenz des OCT1-Aktivitätsverlustes zwischen den indigenen Populationen Südamerikas und den Populationen Ostasiens beobachtet (Abbildung 22). Die indigenen Südamerikaner und die ostasiatischen Populationen teilen jedoch einen gemeinsamen Ahnen in populationshistorisch naher Vergangenheit und zeigen eine niedrige genetische Divergenz auf genomweiter Ebene (Li et al. 2008). Ein Selektionsdruck, entweder für das Beibehalten der OCT1-Aktivität in Ostasien oder für den Verlust der OCT1-Aktivität in Südamerika, könnte diese Konstellation erklären. Dass die auf OCT1 bezogenen Divergenzen gegenüber anderen Weltregionen teilweise deutlich stärker ausgeprägt waren als die auf genomweiter Ebene beobachteten (siehe Kapitel 4.2), stützt ebenfalls die Existenz von Faktoren spezifisch für OCT1 in dieser Region.

Um die Neutralität des Verlusts der OCT1-Aktivität im Sinne der neutralen Theorie der molekularen Evolution zu überprüfen, wurden klassische populationsgenetische Analysen herangezogen. So wurden die regionsspezifischen Variationen in der Nukleotiddiversität ( $\pi$ ) der Aminosäureaustausche innerhalb des OCT1-Gens verglichen mit der erwarteten

durchschnittlichen Heterozygotie ( $\theta$ ) (Cavalli-Sforza 1966; Lewontin und Krakauer 1973; Weir 1996).

Die Nukleotiddiversität in Ostasien und Ozeanien lag signifikant geringer als die erwartete ( $\pi_{\text{LOF}}$  von  $0,16 \times 10^{-4}$  vs.  $\theta$  von  $4,8 \times 10^{-4}$ ) und war weltweit mit Abstand die geringste beobachtete (Tabelle 21). Auch das Verhältnis von  $\pi_{\text{LOF}}$  zu  $\pi_{\text{non-LOF}}$  war in dieser Region sehr niedrig und im Vergleich zu anderen Weltregionen 10fach geringer (0,03 im Vergleich zu einem weltweiten Durchschnitt von 0,89, siehe Tabelle 21). Während also die Nukleotiddiversität für Varianten ohne Einfluss auf die Proteinfunktion nicht wesentlich von der erwarteten bzw. vom weltweiten Durchschnitt abweicht, zeigt sich in dieser Region nicht nur die Frequenz des OCT1-Verlusts sondern auch die Variabilität der verursachenden genetischen Varianten als auffällig gering. Tajimas D als Test für die Neutralität von *loss-of-function*-Varianten in dieser Region zeigte eine signifikante Abweichung (Tajimas D  $-1,64$ ,  $P < 0,01$ , Tabelle 21). Diese Konstellation ist ein deutlicher Hinweis auf eine Deviation von der neutralen Theorie der molekularen Evolution in dieser Region im Sinne einer negativen (reinigenden) Selektion für Varianten, die den Verlust der OCT1-Funktion bedingen.

Weiterhin gibt es Indizien, dass normale Migration die beobachteten niedrigen Frequenzen des OCT1-Verlusts in den Populationen Ostasiens und Ozeaniens nicht erklären kann. So wurde eine Korrelation moderater Signifikanz zwischen dem Verlust der OCT1-Aktivität und der Migrationsdistanz einer Population beobachtet (Abbildung 24 A). Diese Korrelation war deutlich stärker wenn die Ostasiatischen Populationen von der Analyse ausgenommen wurden (Abbildung 24 B). Zusätzlich wurde eine signifikante Korrelation zwischen dem Aktivitätsverlust von OCT1 und OATP1B1 festgestellt ( $r=0.531$ ,  $P < 10^{-4}$ , Abbildung 25).

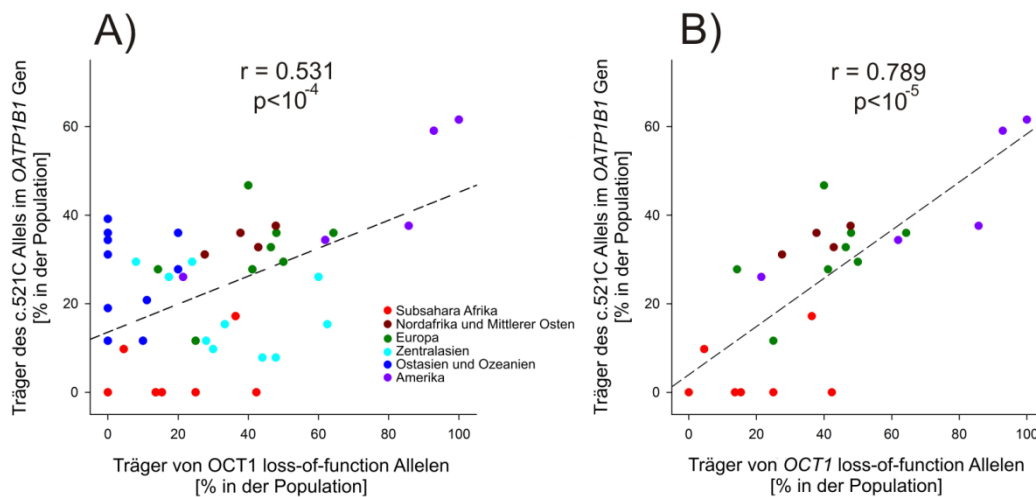


Abbildung 25: Korrelationsanalysen zwischen der Frequenz des Verlusts der OCT1-Aktivität und OATP1B1-Aktivität in HGDP-CEPH-Populationen

Gezeigt sind alle Populationen (A) und Populationen außer denen der Region Ostasien und Ozeanien (B). Verlust der OAT1B1 Aktivität ist repräsentiert als die Präsenz des C-Allels des c.521 T>C Polymorphismus. Die Träger des C-Allels wurden geschätzt nach den Populationsdaten nach (Pasanen et al. 2008) unter der Annahme einer Hardy-Weinberg-Verteilung der Genotypen innerhalb der Populationen. Gezeigt sind Pearson's Korrelationskoeffizienten. Die Zahl der untersuchten Populationen war 52 (A) und 24 (B). Analyse durchgeführt durch Nawar Dalila, Abbildung modifiziert nach Seitz et al. 2015, S. 15.

Ähnlich wie OCT1 ist OATP1B1 ein Transporter der sinusoidalen Hepatozytenmembran, der jedoch nicht organische Kationen, sondern Anionen transportiert. Bekannte Substrate von OATP1B1 sind verschiedene Gallensäuren und Schilddrüsenhormone, eine große Anzahl von Medikamenten und mehrere hepatotoxische Xenobiotika (Niemi et al. 2011). Es kann vermutet werden, dass ob dieser Gemeinsamkeiten beide Transporter in gleicher Weise von Gendrift im Verlauf der Ausbreitung über die Welt betroffen waren. Auch diese Korrelation war jedoch deutlich stärker, wenn die ostasiatischen Populationen aus der Analyse ausgeschlossen waren ( $r=0.789$ ,  $P<10^{-5}$ , Abbildung 25), was als ein weiteres Indiz angesehen werden kann, dass in dieser Region zusätzliche Faktoren involviert sind.

Zusammengenommen weisen diese Daten darauf hin, dass ein Selektionsdruck für das Beibehalten der OCT1-Aktivität in Ostasien der entscheidende Grund für die starke Divergenz in der OCT1-Aktivität zwischen Ostasien und anderen Weltregionen, insbesondere Südamerika, sein mag.

In der Region Südamerika dagegen lag die Nukleotid-Diversität deutlich über der erwarteten (siehe Tabelle 21), insbesondere da nach seriellen Gründereffekten und *bottleneck events* von einer geringeren Diversität auszugehen wäre (Ramachandran et al. 2005; Deshpande et al. 2009). Auch war das Verhältnis von  $\pi_{\text{LOF}}$  zu  $\pi_{\text{non-LOF}}$  sehr hoch (3,18 im Vergleich zum Durchschnitt von 0,89, Tabelle 21). Tajimas D für diese Region zeigte mit 1,68 einen hohen und im Gegensatz zu den anderen Weltregionen positiven Wert, das Signifikanzniveau wurde jedoch hier nicht erreicht. Eine Abweichung von der neutralen Theorie der molekularen Evolution im Sinne eines Selektionsdrucks für den Verlust der

OCT1-Aktivität kann demnach hier nicht sicher belegt werden. Es erscheint jedoch möglich, dass neben Gendrift auch Selektionsdrücke in dieser Region eine Rolle spielen. Die traditionelle Lebensweise der indigenen Populationen ist eng mit dem Regenwald der Region verknüpft. In Anbetracht der Vielfalt der toxischen Alkaloide und anderen Substanzen von potentieller Bedeutung in Flora und Fauna des Amazonas-Regenwaldes, deren Wirkungen vielfach noch nicht vollständig aufgeklärt sind, erscheint es plausibel, dass Xenobiotika hier Selektionsdrücke bedingen mögen. In Abwesenheit einer genaueren Investigation potentiell toxischer OCT1-Substrate und auf Grund der kleinen Anzahl von untersuchten Individuen aus diesen Populationen ist dies anhand der vorliegenden Daten jedoch nicht zu beweisen.

Die in Subsahara-Afrika auf Grund des Fehlens bzw. geringeren Ausmaßes von seriellen Gründereffekten zu erwartende allgemein höhere Nukleotiddiversität (Ramachandran et al. 2005; Deshpande et al. 2009; Tishkoff et al. 2009) im Vergleich zu anderen Weltpopulationen wurde hier in Bezug auf den Verlust der OCT1-Aktivität nicht beobachtet. Eine Abweichung von der Neutralität in dieser Region wäre eine mögliche Erklärung, für die jedoch klare Belege fehlen (Tajima's  $D = -0,6$ , Signifikanzniveau nicht erreicht, siehe Tabelle 21). Im Kontext der Pygmäen-Populationen wurden in der Vergangenheit evolutionäre Anpassungen an Umgebungsfaktoren in ihren klassischen Lebensräumen im zentralafrikanischen Regenwald, wo sie traditionell als Jäger und Sammler leben, als Grund für abweichende Merkmale wie etwa die geringe Körpergröße diskutiert (Perry und Dominy 2009). Auch in Bezug auf die im regionalen Vergleich deutlich höheren Frequenzen des OCT1-Verlusts in den hier untersuchten Populationen kann über einen Zusammenhang mit Selektionsfaktoren spekuliert werden. Klare Hinweise darauf gibt es in der begrenzten Datenlage hier jedoch nicht.

Ein möglicher Grund für die beobachteten Unterschiede in der weltweiten Variabilität von OCT1 und CYP2D6 mag die breitere Bedeutung von CYP2D6 für die Entgiftungsfunktionen des Organismus sein. CYP2D6 nimmt eine zentrale Rolle im Metabolismus einer großen Anzahl von Xenobiotika, darunter auch viele toxischer Substanzen und Medikamente (Ingelman-Sundberg 2005), ein. *Loss-of-function*-Varianten von CYP2D6 mögen daher mit größerer Frequenz von Nachteil für das tragende Individuum sein als *loss-of-function*-Varianten von OCT1. In diesem Fall würden Selektionsdrücke einen limitierenden Faktor für die weltweite Variabilität von CYP2D6 darstellen. Allerdings mag auch bereits die zuvor diskutierte Kombination von seriellen Gründereffekten und Bottleneck Events in den Populationen Südamerikas und einer reinigenden Selektion in der Region Ostasien, welche zu hohen interregionalen Differenzen in der Allelfrequenz von OCT1-*loss-of-function*-Varianten führt, die deutlich höhere Variabilität von OCT1 ausreichend erklären.

#### 4.4 Potentielle therapeutische Konsequenzen des Verlusts der OCT1-Aktivität

Die beobachtete starke Variabilität des Verlusts der OCT1-Aktivität mag populationspezifische Unterschiede in Pharmakokinetik und therapeutischer Effektivität einiger häufig verwendeter Medikamente bedingen. Für eine Anzahl von Medikamenten, darunter Morphin, Tramadol, Tropisetron und Metformin, existieren klinische Daten, dass ihre Pharmakokinetik oder die Entfaltung ihres pharmakologischen Effektes von OCT1 abhängig ist (Shu et al. 2007; Tzvetkov et al. 2011; Tzvetkov et al. 2012; Tzvetkov et al. 2013). Variationen in der Pharmakokinetik und Effektivität dieser Medikamente korrelieren mit dem genetisch determinierten Verlust der OCT1-Aktivität (Shu et al. 2007; Tzvetkov et al. 2011; Tzvetkov et al. 2012; Tzvetkov et al. 2013; Fukuda et al. 2013). Die Mehrzahl dieser Studien wurde an Europäer oder US-Amerikanern durchgeführt. Die Daten dieser Arbeit sollen es ermöglichen, die Ergebnisse auf andere Populationen weltweit zu extrapolieren.

Populationsspezifische Unterschiede in der Pharmakokinetik dieser Medikamente mögen auch Konsequenzen für die medikamentöse Therapie in der Klinik haben. Die empfohlene Dosierung von Medikamenten, welche durch OCT1 transportiert werden und in der Leber abgebaut werden, beruht häufig auf klinischen Studien in Europa und den USA. In Populationen mit einer geringeren Frequenz des OCT1-Verlusts wird diese Dosierung zu durchschnittlich niedrigeren Plasmakonzentrationen führen, was eine höhere Inzidenz von Unterdosierungen zur Folge haben mag. Dagegen sind in einer Population mit einer deutlich höheren Frequenz des OCT1-Aktivitätsverlusts höhere durchschnittliche Plasmakonzentration der entsprechenden Medikamente bei gleicher Dosierung zu erwarten. Eine höhere Inzidenz von Überdosierungen wäre die zu erwartende Folge.

Während auf Grund der geringen Varianz auf Ebene des Phänotyps in den europäischen Populationen in der Region Europa kaum populationsspezifische Unterschiede in der Reaktion auf durch OCT1 transportierte Xenobiotika zu erwarten sind trifft dies in anderen Weltregionen und auch im Weltüberblick nicht zu. So zeigen die Populationen Südamerikas nicht nur sehr hohe Frequenzen des OCT1-Verlusts sondern auch eine starke Variabilität zwischen den Populationen dieser Region. In den ostasiatischen Populationen dagegen ist der Verlust der OCT1-Aktivität nahezu komplett abwesend, wobei jedoch einzelne Populationen gesondert betrachtet werden müssen. Die Populationen der Region Subsahara-Afrika zeigen allgemein niedrige Frequenzen des OCT1-Verlusts, jedoch teilweise deutliche Unterschiede zwischen einzelnen Populationen. Während in der Region Zentralasien die durchschnittliche Frequenz des OCT1-Verlusts im mittleren Bereich liegt zeigen sich auch hier in einigen Populationen deutlich Abweichungen vom regionalen Mittel. Entsprechend der Frequenz des OCT1-Verlusts wird auch die Frequenz von Über- bzw. Unterdosierungen besagter Medikamente sich unterscheiden.



In der klinischen Diagnostik, Entscheidungsfindung und Therapie müssen solche populationsspezifische Unterschiede, seien sie genetisch oder anderweitig bedingt, beachtet werden. Ist bekannt, dass in einer gegebenen Population eine konventionelle Dosis eines Medikamentes mit erhöhter Wahrscheinlichkeit in einer Überdosierung resultiert, so kann dies neben der klinischen Situation und dem Risikoprofil des Medikamentes in die Entscheidung über eine geplante Therapie einfließen. Auch in Abwesenheit der genetischen Daten des Patienten können so pharmakogenetische Erkenntnisse zu einem gewissen Grad verwandt werden. Zudem erlaubt die populationsspezifisch angepasste Risikoeinschätzung eine bessere Therapiekontrolle und ggf. eine schnellere Reaktion bei tatsächlichem Eintreten einer klinisch relevanten Überdosierung. Auch wenn die klinischen Auswirkungen einer Unterdosierung oft weniger bedrohlich sein mögen, so ist mit Blick auf die optimale Versorgung des Patienten eine erwartete höhere Wahrscheinlichkeit einer Unterdosierung bei Angehörigen einer bestimmten Populationen oder bei bekanntem OCT1-Aktivitätsstatus ebenfalls ein Faktor, der in die klinische Entscheidungsfindung und Therapiekontrolle einfließen sollte.

Im Falle der Opioid-Analgetika Tramadol und Morphin, kann eine nicht ausreichende Dosierung durch inadäquate Schmerzkontrolle einen deutlichen Einfluss auf das Befinden des Patienten haben. Da jedoch eine inadäquate Schmerzkontrolle durch zu geringe Wirkung dieser Medikamente klinisch schnell auffällt und bei längerer Therapie die individuelle Einstellung im Allgemeinen ohnehin das Produkt eines Optimierungsprozesses ist, ist die Unterdosierung ein kontrollierbares Problem.

Die Überdosierung von Opioiden, insbesondere eines hochpotenten Opioids wie Morphin, dagegen kann zur Opioidintoxikation mit den klinischen Folgen von Bewusstseinsstörung und Atemdepression bis hin zum Koma und zum Tode führen. Nach Zahlen des amerikanischen National Center for Health Statistics waren Intoxikationen verursacht durch Opioidanalgetika im Jahr 2011 verantwortlich für ca. 11.700 Todesfälle in den USA, entsprechend 5,4 pro 100.000 und einem Anteil von mehr als 40% an der Gesamtzahl der Todesfälle durch Medikamenten-Intoxikation (Chen et al. 2014b). Auch von dem weniger potenten Tramadol wurden vor kurzem berichtet, dass es entgegen vorheriger Annahmen auch in konventioneller Dosierung bei Kindern eine relevante Atemsuppression verursachen kann wenn eine entsprechende genetische Disposition besteht (Orliaguet et al. 2015). Tramadol ist eine Prodrug, welche in der Leber durch CYP2D6 zur aktiven Form O-Desmethyltramadol metabolisiert wird. In dem von Orliaguet et al. beschriebenen Fall wurde ein CYP2D6 Status als *ultrarapid metabolizer* als wahrscheinliche Ursache ausgemacht; der OCT1-Funktionsstatus wurde nicht diskutiert. Unter Berücksichtigung des klaren Einflusses der OCT1-Funktion auf die Pharmakokinetik von Tramadol (Tzvetkov et al. 2011) ist jedoch anzunehmen, dass der OCT1-Funktionsstatus eines Patienten ebenfalls Teil des Gesamtbildes der genetischen Disposition zu solch gefährlichen unerwünschten Arzneimittelwirkungen von Tramadol ist. Eine Konstellation, bei der ein Patient sowohl als *ultrarapid CYP2D6 metabolizer* einzuordnen ist als auch einen kompletten Verlust der OCT1-

Aktivität aufweist, sollte nicht nur bei Kindern zu großer Vorsicht anhalten und möglicherweise als Kontraindikation gewertet werden.

Ein weiteres seit kurzem diskutiertes Risiko in der Therapie mit Tramadol ist ein erhöhtes Auftreten von Hypoglykämien nach Beginn der Therapie (Fournier et al. 2015). Allerdings gibt es hier noch keine klinischen Daten zur genetischen Prädisposition. Die beobachtete höhere durchschnittliche Plasmakonzentration von O-Desmethyltramadol bei gesunden Probanden mit Verlust der OCT1-Aktivität (Tzvetkov et al. 2011) lässt jedoch auch hier ein erhöhtes Risiko vermuten.

Es ist zu erwarten, dass auf Grund der populationsspezifischen Unterschiede in der Frequenz des OCT1-Verlusts sich auch die Rate des Auftretens von Überdosierungen und Nebenwirkungen von Morphin und Tramadol je nach Population unterscheiden wird. Populationen mit hoher Frequenz des OCT1-Verlusts wie etwa die südamerikanischen Populationen und die zentralasiatischen Brahui und Balochi mögen eine höhere Inzidenz von klinisch relevante Überdosierungen von Opioid-Analgetika zeigen als die Populationen europäischer Abstammung und diese wiederum eine höhere Inzidenz als Populationen asiatischer oder afrikanischer Abstammung. Diese Populationen wären dagegen häufiger von Unterdosierungen betroffen.

In der Tat berichteten Sadhasivam et al. von einer schlechteren Schmerzkontrolle durch Morphin und geringeren Morphin-Plasmakonzentrationen bei den Kindern von Nordamerikanern afrikanischer Herkunft verglichen mit Kindern von Nordamerikanern europäischer Herkunft (Sadhasivam et al. 2012b; Sadhasivam et al. 2012a). Kinder europäischer Abstammung dagegen zeigten eine höhere Rate von Opioid-Nebenwirkungen. Diese Beobachtungen wurden auf die höhere Frequenz von OCT1-Aktivitätsverlust in Kaukasiern gegenüber Afrikanern zurückgeführt ((Fukuda et al. 2013; Venkatasubramanian et al. 2014). Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen diese Hypothese. Die populationsgenetische Analyse zeigte, dass nur 11,5% der Amerikaner afrikanischer Abstammung und nur 4,2% der Population der Region Subsahara-Afrika Allele tragen, die eine Reduktion der durch OCT1 vermittelten Aufnahme von Morphin verursachen, im Kontrast zu 27% in Europa (Tabelle 18 und Abbildung 18). In der Region Ostasien und Ozeanien sind weniger als 1% der Population Träger solcher Allele. Eine kürzlich durchgeführte Studie bestätigte diesen Zusammenhang weiter und zeigte, dass auch bei erwachsenen Patienten der OCT1-Funktionsstatus signifikant die benötigte Tramadol-Dosis zur postoperativen Schmerzkontrolle beeinflusst (Stamer et al. 2016).

Auch für einen Zusammenhang mit der Rate schwerer Opioid-Nebenwirkungen mag es bereits erste Hinweise geben. So zeigen die Daten des amerikanischen *National Center for Health Statistics* eine deutlich höhere Rate von Todesfällen auf Grund von Opioid-Intoxikationen unter Amerikanern europäischer Abstammung verglichen mit Amerikanern afrikanischer Abstammung (Abbildung 26, (Warner et al. 2011; Chen et al. 2014b). Amerikaner asiatischer Abstammung sind von Todesfällen durch Medikamenten-

Intoxikation allgemein mit Abstand am seltensten betroffen (Abbildung 26). Am höchsten liegt die Rate von Todesfällen durch Medikamenten-Intoxikation in den indigenen amerikanischen Populationen. Da hier außer den mexikanischen Pima keine der nordamerikanischen indigenen Populationen untersucht werden konnte, fehlen jedoch die Daten, um dies in Bezug zu setzen. Es wäre interessant zu untersuchen, ob in den indigenen Populationen Nordamerikas in der Tat auch höhere Frequenzen des OCT1-Verlusts beobachtet werden können.

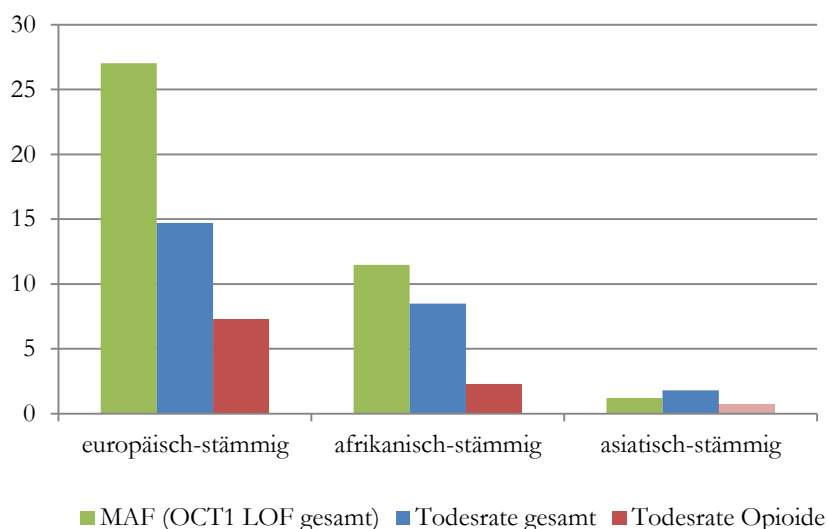


Abbildung 26: Frequenz des OCT1-Verlusts und Todesfälle durch Intoxikation nach Populationen im Jahr 2008

Dargestellt ist die Summe der Allelfrequenzen aller *loss-of-function*-Allele in Prozent sowie die Todesrate pro 100.000 durch oder unter Beteiligung von Medikamenten-Intoxikation allgemein sowie Opioid-Intoxikation im Speziellen. Die Todesraten sind (Warner et al. 2011) entnommen und beziehen sich auf die entsprechenden Populationen in der Nordamerikanischen Bevölkerung. Die Todesrate durch Opioid-Intoxikation in der asiatisch-stämmigen Population konnte auf Grund fehlender Daten nur approximiert werden unter der Annahme, dass der Anteil an der Gesamtzahl der Todesfälle durch Medikamenten-Intoxikation dem bevölkerungsweiten Durchschnitt entspricht. Da bei den Todesraten der lateinamerikanischen Population auf Grund inkonsistenter Zuordnung auf Totenscheinen und in Zensusdaten eine Unsicherheit besteht und auf Grund des heterogenen Ursprungs keine sichere Zuordnung zu einer Vergleichspopulation möglich war, ist diese hier nicht dargestellt.

Für welchen Anteil der beobachteten Unterschiede die populationsspezifische Frequenz des Verlusts der OCT1-Aktivität verantwortlich ist, bleibt aber noch im Einzelnen aufzuklären. Andere (pharmakogenetische) Faktoren auf Populationsebene, etwa die Distribution des Funktionsstatus Arzneimittel-metabolisierender Enzyme werden wahrscheinlich ebenfalls eine, teils möglicherweise noch größere, Rolle spielen.

Zumindest aber zeigen diese Daten, dass populationsspezifische Risikofaktoren in der Therapie mit Opioiden durchaus ernst zu nehmen sind. Seit 1999 ist die Inzidenz von Todesfällen unter Beteiligung von Opioiden um mehr als 300% angestiegen und Opioid-Intoxikationen machen gegenwärtig mehr als 40% aller tödlichen Medikamenten-

Intoxikationen aus (Chen et al. 2014b). Ein besserer Umgang mit solchen Risikofaktoren, für welche der Verlust der OCT1-Aktivität ein definitiver Kandidat ist, mag helfen, dieser Besorgnis erregenden Tendenz entgegenzuwirken.

Eine Unterdosierung des Antiemetikums Tropisetron kann durch mangelhafte Kontrolle von zytostatikainduziertem Erbrechen einen deutlichen Einfluss auf das Befinden des Patienten haben. Hier konnten Tzvetkov et al. bereits eine klare Korrelation zwischen dem OCT1-Funktionsstatus und der klinischen Effektivität gemessen an der Inzidenz von Übelkeit und Erbrechen unter Chemotherapie zeigen (Tzvetkov et al. 2012). Kommt es einer effektiven Überdosierung von Tropisetron so ist mit einer höheren Inzidenz der bekannten Nebenwirkungen Kopfschmerzen, gastrointestinale Beschwerden und Blutdruckschwankungen zu rechnen. Im Allgemeinen sind diese Nebenwirkungen jedoch selten als bedrohlich einzuschätzen. Es ist zu erwarten, dass Populationen mit hoher Frequenz des OCT1-Verlusts wie etwa die südamerikanischen Populationen und die zentralasiatischen Brahui und Belutschen (HGDP-Bezeichnung Balochi) häufiger von einer nicht ausreichenden antiemetischen Therapie durch konventionell dosiertes Tropisetron betroffen sind als Patienten europäischer Abstammung, während Patienten afrikanischer oder ostasiatischer Abstammung weniger häufig betroffen sind.

In Gegensatz zu den zuvor genannten Medikamenten ist der Leber nicht das Hauptmetabolisierungsorgan sondern der Wirkort für das Antidiabetikum Metformin. Daher wäre bei Verlust der OCT1-Aktivität und damit deutlich verringertem Transport von Metformin in die Hepatozyten bei gleicher Dosis ein geringerer Effekt zu erwarten, also eine effektive Unterdosierung. Da es klinische Praxis ist, bei Beginn der Therapie die Dosis über einen Zeitraum von mehreren Wochen einzustellen und die Effektivität der Therapie nach Laborkontrollen von Blutzuckerspiegel und HbA<sub>1c</sub> im Verlauf von Monaten zu beurteilen und anzupassen, wäre eine initiale Unterdosierung aber komplikationslos.

Jedoch lässt sich vermuten, dass ein Träger zweier komplett inaktiver OCT1-Allele trotz Erreichen der Maximaldosierung nicht die volle Wirkung von Metformin erfährt. Angesichts der hohen Prävalenz von Diabetes Mellitus Typ 2 und der Rolle von Metformin in der Therapie dieser Erkrankung liegt die Bedeutung auf der Hand. Ein klarer und reproduzierbarer Einfluss von OCT1-*loss-of-function*-Varianten auf die klinische Effektivität von Metformin konnte allerdings bisher nicht eindeutig belegt werden (Zhou et al. 2009). Gastrointestinale Nebenwirkungen treten bei reduzierter OCT1-Aktivität mit erhöhter Inzidenz auf (Dujic et al. 2015; Tarasova et al. 2012). Demnach ist zu erwarten, dass in den indigenen südamerikanischen Populationen die Rate der gastrointestinalen Nebenwirkungen von Metformin deutlich höher ist als in der europäischen Bevölkerung und niedriger in den afrikanischen und ostasiatischen Populationen.

Gefährlicher ist die seltene Komplikation einer Laktatazidose. Als ursächlich in der Genese der Metformin-assoziierten Laktatazidose wird ein reduzierter hepatischer Laktatabbau in Folge der Metforminwirkung auf die Atmungskette angesehen. Es ließe sich daher

vermuten, dass Träger zwei inaktiver OCT1-Allele auf Grund geringerer hepatischer Metforminwirkung weniger häufig davon betroffen sind. Es fehlen jedoch klinische Daten. Da der genaue Wirkmechanismus von Metformin und die pathogenetischen Faktoren der Metformin-induzierte Azidose noch nicht vollständig aufgeklärt sind, bleiben auch die Auswirkungen des Verlusts der OCT1-Aktivität nicht leicht abzuschätzen.

Um diese Hypothesen zu den klinischen Auswirkungen des OCT1-Funktionsverlustes zu bestätigen und die populationsspezifischen Unterschiede in beabsichtigten und unerwünschten Wirkungen von Medikamenten, welche OCT1-Substrate sind, besser zu verstehen sind weitere gezielte klinische Studien notwendig.

Trotz dieser Einschränkung liefert diese Arbeit erste Indikationen, dass spezifische Populationen wie z.B. die Surui-Indianer oder die Han-Chinesen deutliche Unterschiede in der Effektivität und im Risikoprofil von Arzneimitteltherapien im Vergleich zu anderen Populationen aufweisen können. Die Populationen, in denen bisherige klinische Studien durchgeführt worden sind, und die in ihnen ermittelten Risikoprofile mögen daher nicht notwendigerweise repräsentativ und für alle klinisch notwendigen Einschätzungen verwendbar sein. Populationsspezifische Risikofaktoren, wie die Frequenz des Verlusts der OCT1-Aktivität einer sein mag, zu identifizieren mag helfen, die Risiken einer Therapie besser kalkulieren zu können.

Gegebenenfalls mag es basierend auf den Ergebnissen weiterführender Studien sinnvoll sein, populationspezifische Dosisanpassungen oder Therapieempfehlungen zu formulieren. Insbesondere in stark variablen Populationen wie etwa den Europäischen mag im Sinne der personalisierten Medizin eine individuelle Erhebung des OCT1-Funktionsstatus als Teil der pharmakogenetischen Disposition von Nutzen sein, um Therapierisiken einschätzen und gegebenenfalls individuelle Dosisanpassungen vornehmen zu können.

#### 4.5 Limitation dieser Studie

Eine der Limitationen diese Studie ist, dass auf Grund der Zusammensetzung des CEPH HGDP Probensatzes in einigen Populationen nur eine geringe Anzahl an Individuen untersucht werden konnten. Die tatsächliche Frequenz von OCT1-*loss-of-function*-Varianten in der Gesamtheit einer dieser Populationen mag von der hier beobachteten abweichen. So müssen unsere Daten mit Bezug auf die extrem hohe Frequenz des Verlusts der OCT1-Aktivität in den Populationen der Surui und Karitiana trotz der sehr geringen Wahrscheinlichkeit, dass sie auf Zufallseffekten beruhen, als vorläufige Ergebnisse betrachtet werden, welche weitere Validierung erfordern. Auch kann für die untersuchten Populationen mit geringer Probenanzahl nicht ausgeschlossen werden, dass noch weitere sehr seltene *loss-of-function*-Varianten existieren, welche hier nicht beobachtet wurden, aber in der größeren Population existieren.

Für die in der Resequenzierung beobachtete sehr seltene Variante Trp280Arg war zum Ende der experimentellen Arbeit eine Validierung noch ausstehend. Sollte sich ihre Existenz bestätigen so verbleibt auch diese als Objekt für zukünftige Untersuchungen. Auch in diesem Fall wird sich jedoch das Gesamtbild des Verlusts der OCT1-Aktivität auf Grund der Seltenheit dieser Variante nicht maßgeblich verändern.

Jenseits des Umfangs dieser Arbeit war die Untersuchung nicht-kodierender Varianten. In dieser Studie wurden 1910bp aus den nicht-kodierenden Regionen des OCT1-Gens resequenziert und dabei 41 SNPs identifiziert. Nicht-kodierenden Varianten können den Spleißvorgang oder die Bindungslokalisationen von Transkriptionsfaktoren beeinflussen und so einen signifikanten Einfluss auf die transkriptionelle Regulation und dadurch auf die Expression und die resultierte Aktivität des Genprodukts haben. Eine diesbezügliche weitere funktionelle Charakterisierung an identifizierten Kandidaten-Varianten verbleibt für zukünftige Arbeiten. Weiterhin wurden in dieser Studie nur eine begrenzte Zahl nicht-kodierende Regionen im OCT1-Gen resequenziert. Zukünftige Untersuchungen sollten klären, ob weitere potentiell relevante Varianten auch in diesen Regionen vorhanden sind. Allerdings haben kodierende Varianten in der Regel einen deutlich stärkeren Effekt als Varianten, welche die Transkription beeinflussen. Die Effekte eines Aminosäureaustausches mit der Konsequenz des Verlusts der OCT1-Aktivität, z.B. durch fehlerhafte Membranlokalisierung, können zudem durch Varianten, welche die Transkription beeinflussen, nicht aufgehoben werden. Die Analyse dieser Regionen und darin gelegener potentieller Varianten mag daher das Gesamtbild des Verlusts der OCT1-Aktivität zwar ergänzen. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass sie es dramatisch verändern wird.

Schließlich verbleiben Fragen, die nur durch weitere Untersuchungen vollends aufzuklären sind. Sowohl die Frage des tatsächlich verantwortlichen Agens des Selektionsdruck, welcher in der Region Ostasien postuliert wurde, als auch die verbleibenden Fragen zu den konkreten klinischen Auswirkungen des Verlusts der OCT1-Aktivität auf individueller wie auf Populationsebene erfordern weitere klinische bzw. toxikologische Studien.

## 4.6 Konklusion und Ausblick

In dieser Arbeit wurde eine weltweite Übersicht der populationsspezifischen Frequenz des OCT1-Aktivitätsverlusts aufgestellt und wurden starke interregionale Variationen beobachtet. Herausstechend war insbesondere die extrem hohe Frequenz des Verlusts der OCT1-Aktivität in indigenen Populationen Südamerikas. Als mögliche Ursachen kommen am wahrscheinlichsten serielle Gründereffekte im Rahmen der Migrationsgeschichte und/oder *bottleneck events* in jüngerer Vergangenheit in Frage, doch auch ein Selektionsdruck z.B. durch hepatotoxische Pflanzenalkaloide ist nicht auszuschließen. Die nahezu komplette Abwesenheit von *loss-of-function*-Varianten in den Populationen Ostasiens und Ozeaniens, welche eine deutliche Abweichung vom weltweiten Muster des OCT1-Verlustes darstellt, weist auf eine evolutionäre Selektion für den Beibehalt der OCT1-Aktivität in

dieser Weltregion hin. Toxische Xenobiotika, welche OCT1-Substrate sind und deren schnelle Detoxifikation in der Leber eine Schädigung verhindert, sind ein möglicher Selektionsfaktor. Jedoch bleibt das eigentliche Agens des vermuteten Selektionsdruckes unbekannt.

Die beobachteten interregionalen Unterschiede in der Frequenz des OCT1-Aktivitätsverlusts sind potentiell von Bedeutung in der klinischen Praxis der Pharmakotherapie. Arzneimittel wie Morphin, Tramadol, Tropisetron und Metformin sind bekannte OCT1-Substrate und der Verlust der OCT1-Aktivität beeinflusst deutlich die Pharmakokinetik dieser Medikamente. Die populationsspezifischen Frequenzen des Verlusts der OCT1-Aktivität sollten daher beachtet werden bei der Übertragung von Dosisempfehlungen auf andere Weltpopulationen. Insbesondere in Kombination mit anderen pharmakokinetischen Faktoren wie z.B. CYP2D6 *ultrarapid metabolizer* Status mag der Verlust der OCT1-Aktivität gefährliche Überdosierungen begünstigen. Im Rahmen des Konzepts der personalisierten Medizin sollte der OCT1-Funktionsstatus daher als nicht unwichtiger Teil des Gesamtbildes der pharmakogenetischen Disposition angesehen werden und sollte in einem hypothetischen pharmakogenetischen Panel nicht fehlen.

Es konnten auch insgesamt fünf bisher unbekannte Aminosäureaustausch-Varianten identifiziert werden. Die Träger dieser Varianten entstammten Minderheitenpopulationen aus dem ost- und zentralasiatischen Raum, welche bisher in Bezug auf OCT1 nicht untersucht worden waren. Für vier dieser Varianten, Ser29Leu, Thr245Met, Glu284Lys und Ile449Thr, wurde in von dieser Arbeit ausgehenden weiterführenden Untersuchungen gezeigt, dass sie zum kompletten Verlust oder zu einer signifikanten Reduktion der OCT1-Aktivität führen. Die gewonnenen Daten in den nicht-kodierenden und regulatorischen Bereichen des OCT1-Gens mögen in zukünftigen Arbeiten zur Identifikation weiterer bisher unbekannter Varianten mit Einfluss auf die OCT1-Aktivität führen.

Diese Ergebnisse legen mehrere Bereiche nahe, in denen weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden sollten. Aus mehreren Populationen, darunter auch die besonders interessanten indigenen südamerikanischen Populationen und ostasiatischen Minderheitenpopulationen, konnte auf Grund der Zusammensetzung des HGDP-CEPH-Panels nur eine kleine Anzahl von Individuen untersucht werden. Hier wäre es interessant zu überprüfen, ob die beobachteten Frequenzen des Verlusts der OCT1-Aktivität sich in einer größeren Stichprobe bestätigen lassen und ob in diesen Populationen weitere seltene *loss-of-function*-Varianten existieren, welche hier nicht detektiert werden konnten. Eine Untersuchung der indigenen nordamerikanischen und australischen Populationen wäre ebenfalls eine sinnvolle Ergänzung der hier gewonnenen Ergebnisse. Auch die Analyse der hier sequenzierten aber nicht in die Analyse einbezogenen nicht-kodierenden regulatorischen oder Exon-flankierenden Bereiche von OCT1 oder in neuen Studien eine systematische Untersuchung des gesamten OCT1-Genbereiches mag weitere Erkenntnisse liefern.

Die Identifikation und Charakterisierung von OCT1-Substraten ist systematisch voranzutreiben. Dabei sind klinisch relevante Medikamente, insbesondere die Gruppe der Opioid-Analgetika, sowie toxische Xenobiotika natürlichen Ursprungs, wie z.B. Pflanzenalkaloide, von besonderem Interesse. Eine vollständige Aufklärung der toxischen OCT1-Substrate mag es ermöglichen, das verantwortliche Agens für den Selektionsdruck, auf den in den Daten der Region Ostasien Hinweise gefunden wurden, ausfindig zu machen. Dies würde zusätzlich jedoch auch ausreichende Daten zu regions- und populationsspezifischen Ernährungsgewohnheiten, der regionsspezifischen Distribution von Pflanzen, welche toxische OCT1-Substrate beinhalten, sowie den Kontaminationswegen, durch welche diese Substanzen indirekt in die Nahrung gelangen können, erfordern.

Um die klinischen Auswirkungen des Verlusts der OCT1-Aktivität auf individueller wie auch auf Populations-Ebene vollständig aufzuklären, sind weitere klinische Studien erforderlich. Dabei ist vor allem an weitere Studien der klinischen Effektivität sowie Inzidenz von Unterdosierungen, Überdosierungen und Nebenwirkungen in verschiedenen Populationen sowie individuell in Abhängigkeit vom OCT1-Funktionsstatus zu denken. Dabei sollten mindestens europäisch-, afrikanisch- und asiatisch-stämmige Populationen, besser aber noch mehr und schärfer definierte Populationen, einbezogen und andere Einflussfaktoren wie etwa der CYP2D6 Status beachtet werden. Von besonderem Interesse mag es sein, zu untersuchen in welchem Ausmaß die Frequenz des OCT1-Verlusts tatsächlich einen populationsspezifischen Risikofaktor für durch Opioid-Analgetika verursachte akzidentelle Todesfälle darstellt.



## 5 Zusammenfassung

Der Transporter für organische Kationen OCT1 ist einer der am stärksten exprimierten Membrantransporter in der Leber und vermittelt die Aufnahme von kationischen und schwach basischen Medikamenten oder anderen Xenobiotika in die Hepatozyten. Das OCT1-Gen *SLC22A1* ist hoch polymorph mit einer Anzahl bekannter *loss-of-function*-Varianten, welche die Transportaktivität reduzieren oder komplett ausfallen lassen. Neun Prozent der europäischen Bevölkerung sind homozygote oder kombiniert heterozygote Träger solcher Varianten und damit betroffen von einer sehr niedrigen oder vollständig fehlenden OCT1-Aktivität. Weitere 38% sind heterozygote Träger und zeigen eine Reduktion der OCT1-Aktivität. Medikamente wie Morphin, Tramadol, Tropisetron und Metformin liegen unter physiologischen Bedingungen als Kationen oder hydrophile schwache Basen vor, und sind für die Aufnahme in Hepatozyten von OCT1 abhängig. OCT1-*loss-of-function*-Varianten beeinflussen deutlich die Pharmakokinetik und Wirkung dieser Medikamente.

In dieser Arbeit wurde die weltweite genetische Variabilität von OCT1 mit Blick auf Frequenzen und Verteilung von OCT1 Polymorphismen sowie den resultierenden Verlust der OCT1-Aktivität charakterisiert. Die Ergebnisse wurden in einer Weltkarte des genetisch bedingten OCT1-Verlusts zusammengefasst.

Dazu wurde eine umfangreiche populationsgenetische Analyse durchgeführt, in welche die Daten von insgesamt 2171 nicht untereinander verwandten Individuen aus 67 Populationen weltweit einfließen. Proben von 1079 Individuen aus 53 Populationen wurden mittels massiv paralleler Sequenzierung auf Aminosäureaustausche in den kodierenden Bereiche des OCT1-Gens untersucht und mittels *Single Base Primer Extension* genotypisiert. Die genetischen Daten von weiteren 1092 Individuen aus 14 Populationen wurden aus der Datenbank des *1000 Genomes Project* entnommen.

Es wurden insgesamt 14 Aminosäureaustausch-Varianten beobachtet, welche den Verlust der OCT1-Aktivität bedingen: Die bekannten *loss-of-function*-Varianten Ser14Phe, Arg61Cys, Cys88Arg, Pro117Leu, Ser189Leu, Arg206Cys, Gly220Val, Gly401Ser, Met420del und Gly465Arg sowie vier neu identifizierte *loss-of-function*-Varianten, Ser29Leu, Thr245Met, Glu284Lys und Ile449Thr. Mit einer weltweiten *Minor Allele Frequency* von 13,1% war die Variante Met420del mit Abstand die am häufigsten beobachtete *loss-of-function*-Variante und ubiquitär auf allen Kontinenten zu finden. Arg61Cys (MAF 3%) war die zweithäufigste Variante und wurde insbesondere in Europa, aber auch in Zentralasien und der Region Nordafrika und Mittlerer Osten beobachtet. Vornehmlich in Europa zu finden waren die Varianten Gly465Arg (MAF 0,9%) und Gly401Ser (MAF 0,8%), während Ser14Phe (MAF 0,6%) vor allem in Afrika beobachtet wurde. Die verbleibenden Varianten wurden jeweils nur bei einer kleinen Anzahl von Individuen beobachtet und waren stark regionspezifisch.

Deutliche Unterschiede zwischen den Populationen der verschiedenen Weltregionen in der Frequenz des Verlusts der OCT1-Aktivität wurden beobachtet. Während in der Region Ostasien und Ozeanien 98,7% der Individuen vollständig aktives OCT1 besaßen, waren bis zu 87,5% der Individuen der indigenen Populationen Südamerikas ganz ohne funktionale OCT1-Allele. In der europäischen Bevölkerung entsprachen die beobachteten Frequenzen mit nur geringen Schwankungen den zuvor ermittelten Werten. In den afrikanischen Populationen war die Frequenz von *loss-of-function*-Varianten gering, und Individuen mit komplettem Verlust der OCT1-Aktivität wurden in Subsahara-Afrika überhaupt nicht beobachtet. Diese Beobachtungen sind, abgesehen von der Region Ostasien und Ozeanien, gut vereinbar mit einer Genese durch Gendrift. Ein Großteil der weltweiten Variabilität von OCT1 mag auf serielle Gründereffekte im Rahmen der Ausbreitung des modernen Menschen, ausgehend von Westafrika, zurückzuführen sein. Dagegen lieferten populationsgenetische Analysen Hinweise auf einen Selektionsdruck für das Beibehalten der OCT1-Aktivität in Ostasien und Ozeanien.

Diese Ergebnisse können helfen, die Therapie mit Arzneimitteln, welche dem Transport durch OCT1 unterliegen, für spezifische Populationen pharmakogenetisch zu optimieren. Darüber hinaus liefern sie Hinweise auf die Gründe für die genetische Variabilität von OCT1 und mögen helfen, die physiologische Rolle von OCT1 im Menschen weiter aufzuklären.

## 6 Anhang

Tabelle 22: Übersicht aller hier identifizierten OCT1-Varianten

Position auf Chromosom 6	Art	Referenz	Variante	Typ der Variante	Aminosäureaustausch	Hier weiter untersucht	In #/52 Pools	Ø MAF	Min MAF	Max MAF	Kommentar
160543008	SNP	C	T	kodierend, nicht-synonym	<b>Ser14Phe</b>	ja	12	5,2	2,0	7,2	beeinflusst die OCT1-Funktion (Shu et al. 2003; Seitz et al. 2015)
160543034	SNP	C	G	kodierend, nicht-synonym	<b>Leu23Val</b>	nein	2	2,6	2,4	3,0	gemäß Vorhersage kein Einfluss auf die OCT1-Funktion
160543053	SNP	C	T	kodierend, nicht-synonym	<b>Ser29Leu</b>	ja	3	4,9	1,8	8,3	neu identifiziert, gemäß Vorhersage negativer Einfluss auf die OCT1-Funktion
160543148	SNP	C	T	kodierend, nicht-synonym	<b>Arg61Cys</b>	ja	27	6,7	11,2	9,9	negativer Einfluss auf die OCT1-Funktion (Kerb et al. 2002; Shu et al. 2003; Shu et al. 2007; Tzvetkov et al. 2013)
160543206	SNP	C	T	kodierend, nicht-synonym	<b>Ala80Val</b>	nein	3	3,3	2,1	4,1	gemäß Vorhersage kein Einfluss auf die OCT1-Funktion
160543229	SNP	T	C	kodierend, nicht-synonym	<b>Cys88Arg</b>	ja	4	2,6	1,7	3,7	negativer Einfluss auf die OCT1-Funktion (Kerb et al. 2002; Tzvetkov et al. 2013)
160543317	SNP	C	T	kodierend, nicht-synonym	<b>Pro117Leu</b>	ja	10	32,4	28,5	35,0	negativer Einfluss auf die OCT1-Funktion (Chen et al. 2010)
160551204	SNP	C	G	kodierend, nicht-synonym	<b>Leu160Phe</b>	ja	51	98,6	87,7	100	kein Einfluss auf die OCT1-Funktion (Shu et al. 2003; Shu et al. 2007; Herraез et al. 2013)
160551205	SNP	T	C	kodierend, nicht-synonym	<b>Phe161Leu</b>	nein	15	3,8	3,1	6,0	gemäß Vorhersage kein Einfluss auf die OCT1-Funktion
160551217	SNP	G	T	kodierend, nicht-synonym	<b>Gly165Cys</b>	nein	5	2,9	1,8	4,8	gemäß Vorhersage kein Einfluss auf die OCT1-Funktion
160553308	SNP	C	T	kodierend, nicht-synonym	<b>Ala187Val</b>	nein	1	2,5	2,1	2,8	gemäß Vorhersage kein Einfluss auf die OCT1-Funktion
160553314	SNP	C	T	kodierend, nicht-synonym	<b>Ser189Leu</b>	ja	3	3,6	1,7	7,4	negativer Einfluss auf die OCT1-Funktion (Herraез et al. 2013)
160553364	SNP	C	T	kodierend, nicht-synonym	<b>Arg206Cys</b>	ja	1	2,0	2,0	2,0	negativer Einfluss auf die OCT1-Funktion (Chen et al. 2010)
160555052	SNP	C	T	kodierend, nicht-synonym	<b>Thr245Met</b>	ja	1	4,2	3,6	4,7	neu identifiziert, gemäß Vorhersage negativer Einfluss auf die OCT1-Funktion

160555137	SNP	C	A	kodierend, nicht-synonym	<b>Phe273Leu</b>	nein	3	2,2	1,9	2,8	gemäß Vorhersage kein Einfluss auf die OCT1-Funktion
160557262	SNP	G	A	kodierend, nicht-synonym	<b>Glu284Lys</b>	ja	1	1,9	1,8	2,0	neu identifiziert, gemäß Vorhersage negativer Einfluss auf die OCT1-Funktion
160557643	SNP	C	T	kodierend, nicht-synonym	<b>Pro341Leu</b>	ja	37	9,7	1,7	9,5	geringer Einfluss auf die OCT1-Funktion(Shu et al. 2003; Sakata et al. 2004; Takeuchi et al. 2003)
160557646	SNP	G	A	kodierend, nicht-synonym	<b>Arg342His</b>	ja	11	6,3	1,8	9,0	kein Einfluss auf die OCT1-Funktion (Shu et al. 2003; Shu et al. 2007)
160560824	SNP	G	A	kodierend, nicht-synonym	<b>Gly401Ser</b>	ja	10	3,1	1,6	8,5	negativer Einfluss auf die OCT1-Funktion (Kerb et al. 2002; Shu et al. 2007; Tzvetkov et al. 2013)
160560830	SNP	A	G	kodierend, nicht-synonym	<b>Ile403Val</b>	nein	5	3,5	1,8	6,6	gemäß Vorhersage kein Einfluss auf die OCT1-Funktion
160560845	SNP	A	G	kodierend, nicht-synonym	<b>Met408Val</b>	ja	52	96,7	72,9	100	kein Einfluss auf die OCT1-Funktion (Shu et al. 2003; Shu et al. 2007)
160560864	SNP	G	C	kodierend, nicht-synonym	<b>Gly414Ala</b>	ja	1	2,4	2,4	2,4	neu identifiziert, gemäß Vorhersage negativer Einfluss auf die OCT1-Funktion
160560878	SNP	G	A	kodierend, nicht-synonym	<b>Val419Ile</b>	nein	2	3,8	1,6	5,3	gemäß Vorhersage kein Einfluss auf die OCT1-Funktion
160560880	ins/ del	ATG	del	kodierend, nicht-synonym	<b>Met420del</b>	ja	43	18,8	2,6	74,6	negativer Einfluss auf die OCT1-Funktion (Kerb et al. 2002; Shu et al. 2003; Shu et al. 2007; Tzvetkov et al. 2013)
160564642	SNP	T	C	kodierend, nicht-synonym	<b>Ile449Thr</b>	ja	1	5,8	5,2	6,5	neu identifiziert, gemäß Vorhersage negativer Einfluss auf die OCT1-Funktion
160564677	SNP	G	A	kodierend, nicht-synonym	<b>Val461Ile</b>	nein	1	1,9	1,9	1,9	gemäß Vorhersage kein Einfluss auf die OCT1-Funktion
160575837	SNP	G	A	kodierend, nicht-synonym	<b>Gly465Arg</b>	ja	13	3,7	2,0	6,3	negativer Einfluss auf die OCT1-Funktion (Kerb et al. 2002; Shu et al. 2003; Shu et al. 2007; Tzvetkov et al. 2013)
160575907	SNP	G	T	kodierend, nicht-synonym	<b>Arg488Met</b>	ja	6	5,8	10,3	7,7	kein Einfluss auf die OCT1-Funktion (Shu et al. 2003; Shu et al. 2007)
160577063	SNP	G	T	kodierend, nicht-synonym	<b>Val519Phe</b>	nein	3	4,1	3,3	4,6	gemäß Vorhersage kein Einfluss auf die OCT1-Funktion
160543096	SNP	T	C	kodierend, synonym	<b>Gly43Gly</b>	nein	2	2,8	2,1	3,6	.
160543123	SNP	T	C	kodierend, synonym	<b>Ser52Ser</b>	nein	51	34,7	25,4	44,9	.

160553306	SNP	C	T	kodierend, synonym	<b>Asn186asn</b>	nein	8	3,2	2,1	4,7	.
160553309	SNP	G	A	kodierend, synonym	<b>Ala187Ala</b>	nein	1	1,9	1,9	1,9	.
160553345	SNP	C	T	kodierend, synonym	<b>Tyr199Tyr</b>	nein	1	2,5	2,5	2,5	.
160553366	SNP	C	T	kodierend, synonym	<b>Arg206Arg</b>	nein	1	2,4	2,4	2,4	.
160555029	SNP	G	A	kodierend, synonym	<b>Ala237Ala</b>	nein	1	4,5	4,4	4,6	.
160560742	SNP	G	A	kodierend, synonym	<b>Gly373Gly</b>	nein	1	2,7	2,7	2,7	.
160560787	SNP	G	A	kodierend, synonym	<b>Pro388Pro</b>	nein	1	6,2	6,2	6,2	.
160577011	SNP	G	A	kodierend, synonym	<b>Val501Val</b>	nein	28	8,1	1,6	7,9	.
160577020	SNP	G	A	kodierend, synonym	<b>Leu504Leu</b>	nein	3	2,3	1,7	3,4	.
160577065	SNP	C	T	kodierend, synonym	<b>Val519Val</b>	nein	1	3,5	3,3	3,7	.
160577092	SNP	C	T	kodierend, synonym	<b>Ala528Ala</b>	nein	1	3,8	3,5	4,1	.
160579596	SNP	A	C	kodierend, synonym	<b>Ser549Ser</b>	nein	11	8,5	1,7	7,3	.
160579605	SNP	G	A	kodierend, synonym	<b>Ser552Ser</b>	nein	1	3,4	3,2	3,6	.
160542819	SNP	T	C	nicht kodierend	.	nein	6	7,1	15,8	8,1	.
160542870	SNP	C	T	nicht kodierend	.	nein	1	1,9	1,9	1,9	.
160542908	SNP	G	A	nicht kodierend	.	nein	3	3,7	2,5	5,7	.
160543399	SNP	T	C	nicht kodierend	.	nein	43	61,5	52,0	71,4	.
160551082	SNP	C	T	nicht kodierend	.	nein	52	69,8	66,7	74,1	.
160551093	SNP	T	G	nicht kodierend	.	nein	48	24,7	10,8	9,8	.
160551099	SNP	G	A	nicht kodierend	.	nein	1	3,7	3,7	3,7	.

160551101	SNP	T	C	nicht kodierend	.	nein	16	4,7	1,9	6,5	.
160553238	SNP	C	T	nicht kodierend	.	nein	1	36,0	36,0	36,0	.
160557408	SNP	G	C	nicht kodierend	.	nein	9	4,1	2,3	6,7	.
160557429	SNP	G	A	nicht kodierend	.	nein	48	43,8	34,2	57,3	.
160557538	SNP	A	T	nicht kodierend	.	nein	52	53,8	50,0	57,4	.
160557543	SNP	G	A	nicht kodierend	.	nein	2	4,2	3,7	4,4	.
160557569	SNP	C	T	nicht kodierend	.	nein	46	11,7	1,9	9,8	.
160557704	SNP	C	T	nicht kodierend	.	nein	9	3,3	2,2	4,6	.
160557724	SNP	C	T	nicht kodierend	.	nein	50	28,7	25,2	34,3	.
160557728	SNP	C	T	nicht kodierend	.	nein	52	35,5	30,8	39,5	.
160560633	SNP	T	C	nicht kodierend	.	nein	1	2,7	2,7	2,7	.
160560636	SNP	C	T	nicht kodierend	.	nein	30	7,7	10,1	10,0	.
160560680	SNP	C	G	nicht kodierend	.	nein	1	3,3	1,9	4,8	.
160560933	SNP	C	T	nicht kodierend	.	nein	44	8,4	1,7	9,8	.
160560940	SNP	A	G	nicht kodierend	.	nein	1	4,7	4,2	5,2	.
160560943	SNP	G	A	nicht kodierend	.	nein	2	2,1	1,8	2,3	.
160564522	SNP	G	A	nicht kodierend	.	nein	2	2,2	2,0	2,5	.
160575802	SNP	G	C	nicht kodierend	.	nein	2	2,8	2,1	3,4	.
160575805	SNP	T	C	nicht kodierend	.	nein	1	3,7	3,0	4,4	.
160575957	SNP	A	C	nicht kodierend	.	nein	5	7,1	12,8	9,0	.
160575962	SNP	A	G	nicht kodierend	.	nein	48	29,9	25,3	33,2	.
160575979	SNP	G	T	nicht kodierend	.	nein	48	17,3	12,9	26,4	.
160576969	SNP	G	A	nicht kodierend	.	nein	12	2,6	1,8	5,4	.
160577003	SNP	G	A	nicht kodierend	.	nein	1	3,7	3,7	3,7	.
160577131	SNP	C	T	nicht kodierend	.	nein	2	4,6	4,5	4,8	.
160579491	SNP	A	C	nicht kodierend	.	nein	48	39,5	35,1	43,2	.
160579493	SNP	A	C	nicht kodierend	.	nein	1	1,6	1,6	1,6	.
160579527	SNP	C	T	nicht kodierend	.	nein	45	32,4	11,9	8,2	.
160579629	SNP	G	A	nicht kodierend	.	nein	4	3,4	1,8	5,9	.
160579637	SNP	C	T	nicht kodierend	.	nein	1	1,7	1,7	1,7	.
160579660	SNP	G	A	nicht kodierend	.	nein	1	1,6	1,6	1,6	.

160579704	SNP	T	A	nicht kodierend	.	nein	1	2,0	2,0	2,0	.
160579757	SNP	G	C	nicht kodierend	.	nein	5	6,6	2,7	10,0	.
160579826	SNP	G	A	nicht kodierend	.	nein	50	6,2	3,5	9,5	.



## 7 Literaturverzeichnis

- Abramson J, Smirnova I, Kasho V, Verner G, Kaback HR, Iwata S (2003): Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science* 301, 610–615
- Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR (2010): A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 7, 248–249
- Ahlin G, Karlsson J, Pedersen JM, Gustavsson L, Larsson R, Matsson P, Norinder U, Bergstrom CAS, Artursson P (2008): Structural requirements for drug inhibition of the liver specific human organic cation transport protein 1. *J Med Chem* 51, 5932–5942
- Ahlin G, Chen L, Lazorova L, Chen Y, Ianculescu AG, Davis RL, Giacomini KM, Artursson P (2011): Genotype-dependent effects of inhibitors of the organic cation transporter, OCT1: predictions of metformin interactions. *Pharmacogenomics J* 11, 400–411
- Aklillu E, Herrlin K, Gustafsson LL, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M (2002): Evidence for environmental influence on CYP2D6-catalysed debrisoquine hydroxylation as demonstrated by phenotyping and genotyping of Ethiopians living in Ethiopia or in Sweden. *Pharmacogenetics* 12, 375–383
- Allison AC (1954a): Protection Afforded by Sickle-cell Trait Against Subtertian Malarial Infection. *Br Med J* 1, 290–294
- Allison AC (1954b): The distribution of the sickle-cell trait in East Africa and elsewhere, and its apparent relationship to the incidence of subtertian malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 48, 312–318
- Andreev E, Brosseau N, Carmona E, Mes-Masson A-M, Ramotar D (2016): The human organic cation transporter OCT1 mediates high affinity uptake of the anticancer drug daunorubicin. *Sci Rep* 6, 20508
- Atwood CP: *Encyclopedia of Mongolia and the Mongol empire* (Facts on File library of world history); Facts On File, New York 2004
- Bailey CJ, Day C (2004): Metformin: its botanical background. *Pract Diab Int* 21, 115–117
- Becker ML, Visser LE, Schaik, R H N van, Hofman A, Uitterlinden AG, Stricker BHC (2009): Genetic variation in the organic cation transporter 1 is associated with metformin response in patients with diabetes mellitus. *Pharmacogenomics J* 9, 242–247
- Becker ML, Le Visser, van Schaik RH, Hofman A, Uitterlinden AG, Stricker BH (2010): Interaction between polymorphisms in the OCT1 and MATE1 transporter and metformin response. *Pharmacogenet Genomics* 20, 38–44

Bellew HW: The races of Afghanistan: being a brief account of the principal nations inhabiting that country. Sang-e-Meel Publications, Lahore Pakistan 1979

Blackwell B (1963): Hypertensive Crisis Due To Monoamine-Oxidase Inhibitors. *Lancet* 282, 849–851

Bourdet DL, Pritchard JB, Thakker DR (2005): Differential Substrate and Inhibitory Activities of Ranitidine and Famotidine toward Human Organic Cation Transporter 1 (hOCT1; SLC22A1), hOCT2 (SLC22A2), and hOCT3 (SLC22A3). *J Pharmacol Exp Ther* 315, 1288–1297

Boxberger KH, Hagenbuch B, Lampe JN (2014): Common drugs inhibit human organic cation transporter 1 (OCT1)-mediated neurotransmitter uptake. *Drug Metab Dispos* 42, 990–995

Brast S, Grabner A, Sucic S, Sitte HH, Hermann E, Pavenstadt 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. *FASEB J* 26, 976–986

Brauch H, Schwab M (2014a): Prediction of tamoxifen outcome by genetic variation of CYP2D6 in post-menopausal women with early breast cancer. *Br J Clin Pharmacol* 77, 695–703

Brauch H, Schwab M (2014b): CYP2D6 genotyping and tamoxifen in the treatment of post-menopausal breast cancer – a reply. *Br J Clin Pharmacol* 78, 433–434

Brockmöller J, Tzvetkov MV (2008): Pharmacogenetics: data, concepts and tools to improve drug discovery and drug treatment. *Eur J Clin Pharmacol* 64, 133–157

Burckhardt G, Wolff NA (2000): Structure of renal organic anion and cation transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 278, F853-F866

Busch AE, Quester S, Ulzheimer JC, Gorboulev V, Akhoundova A, Waldegger S, Lang F, Koepsell H (1996): Monoamine neurotransmitter transport mediated by the polyspecific cation transporter rOCT1. *FEBS Lett* 395, 153–156

Calafell F, Shuster A, Speed WC, Kidd JR, Black FL, Kidd KK (1999): Genealogy reconstruction from short tandem repeat genotypes in an Amazonian population. *Am J Phys Anthropol* 108, 137–146

Cann HM, Toma Cd, Cazes L, Legrand M-F, Morel V, Piouffre L, Bodmer J, Bodmer WF, Bonne-Tamir B, Cambon-Thomsen A et al. (2002): A Human Genome Diversity Cell Line Panel. *Science* 296, 261–262

Cavalli-Sforza LL (1966): Population Structure and Human Evolution. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 164, 362–379

- Cavalli-Sforza LL, Menozzi P, Piazza A: The history and geography of human genes. Princeton University Press, Princeton, N.J., Chichester 1994
- Cavalli-Sforza LL, Feldman MW (2003): The application of molecular genetic approaches to the study of human evolution. *Nat Genet* 33 Suppl, 266–275
- Central Intelligence Agency: The World Factbook: 2014-15, Washington, DC 2014
- Chen L, Takizawa M, Chen E, Schlessinger A, Segenthelar J, Choi JH, Sali A, Kubo M, Nakamura S, Iwamoto Y et al. (2010): Genetic Polymorphisms in Organic Cation Transporter 1 (OCT1) in Chinese and Japanese Populations Exhibit Altered Function. *J Pharmacol Exp Ther* 335, 42–50
- Chen L, Shu Y, Liang X, Chen EC, Yee SW, Zur AA, Li S, Xu L, Keshari KR, Lin MJ et al. (2014a): OCT1 is a high-capacity thiamine transporter that regulates hepatic steatosis and is a target of metformin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 9983–9988
- Chen L, Yee SW, Giacomini KM (2015): OCT1 in hepatic steatosis and thiamine disposition. *Cell Cycle* 14, 283–284
- Chen LH, Hedegaard H, Warner M (2014b): Drug-poisoning Deaths Involving Opioid Analgesics: United States, 1999–2011. *NCHS Data Brief* 166, 1–8
- Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP (2012): Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels. *PLoS One* 7, e46688
- Ciarimboli G, Struwe K, Arndt P, Gorboulev V, Koepsell H, Schlatter E, Hirsch JR (2004): Regulation of the human organic cation transporter hOCT1. *J Cell Physiol* 201, 420–428
- Ciarimboli G, Koepsell H, Jordanova 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. *J Am Soc Nephrol* 16, 1562–1570
- Cutler D, Meara E: Changes in the age distribution of mortality over the 20th century; In: Wise DA (Hrsg.): Perspectives on the Economy of Aging: A National Bureau of Economics Research Conference Report. University of Chicago Press. Cambridge, MA 2004
- D'Andrea G, Nordera GP, Perini F, Allais G, Granella F (2007): Biochemistry of neuromodulation in primary headaches: focus on anomalies of tyrosine metabolism. *Neurol Sci* 28, S94-S96
- DeAngelis MM, Wang DG, Hawkins TL (1995): Solid-phase reversible immobilization for the isolation of PCR products. *Nucleic Acids Res* 23, 4742–4743
- Deshpande O, Batzoglou S, Feldman MW, Cavalli-Sforza LL (2009): A serial founder effect model for human settlement out of Africa. *Proc Biol Sci* 276, 291–300

- Drozdziak M, Groer C, Penski J, Lapczuk J, Ostrowski M, Lai Y, Prasad B, Unadkat JD, Siegmund W, Oswald S (2014): Protein abundance of clinically relevant multidrug transporters along the entire length of the human intestine. *Mol Pharm* 11, 3547–3555
- Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, Lydon NB (1996): Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* 2, 561–566
- Dujic T, Zhou K, Donnelly LA, Tavendale R, Palmer CN, Pearson ER (2015): Association of Organic Cation Transporter 1 With Intolerance to Metformin in Type 2 Diabetes: A GoDARTS Study. *Diabetes* 64, 1786–1793
- Ebbesen J, Buajordet I, Erikssen J, Brørs O, Hilberg T, Svaar H, Sandvik L (2001): Drug-Related Deaths in a Department of Internal Medicine. *Arch Intern Med* 161, 2317
- Einarson TR (1993): Drug-related hospital admissions. *Ann Pharmacother* 27, 832–840
- Excoffier L (2002): Human demographic history: refining the recent African origin model. *Curr Opin Genet Dev* 12, 675–682
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005): Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1, 47
- Faura CC, Collins SL, Moore R, McQuay HJ (1998): Systematic review of factors affecting the ratios of morphine and its major metabolites. *Pain* 74, 43–53
- Fournier J-P, Azoulay L, Yin H, Montastruc J-L, Suissa S (2015): Tramadol Use and the Risk of Hospitalization for Hypoglycemia in Patients With Noncancer Pain. *JAMA Intern Med* 175, 186–193
- Fukuda T, Chidambaran V, Mizuno T, Venkatasubramanian R, Ngamprasertwong P, Olbrecht V, Esslinger HR, Vinks AA, Sadhasivam S (2013): OCT1 genetic variants influence the pharmacokinetics of morphine in children. *Pharmacogenomics* 14, 1141–1151
- Fu PP, Xia Q, Lin G, Chou MW (2004): Pyrrolizidine Alkaloids—Genotoxicity, Metabolism Enzymes, Metabolic Activation, and Mechanisms. *Drug Metab Rev* 36, 1–55
- Ghose K, Coppen A, Carrol D (1977): Intravenous tyramine response in migraine before and during treatment with indoramin. *Br Med J* 1, 1191–1193
- Giacomini KM, Huang S-M (2013): Transporters in drug development and clinical pharmacology. *Clin Pharmacol Ther* 94, 3–9
- Giannoudis A, Wang L, Jorgensen AL, Xinarianos G, Davies A, Pushpakom S, Liloglou T, Zhang J-E, Austin G, Holyoake TL et al. (2013): The hOCT1 SNPs M420del and M408V alter imatinib uptake and M420del modifies clinical outcome in imatinib-treated chronic myeloid leukemia. *Blood* 121, 628–637

- Goetz MP, Rae JM, Suman VJ, Safgren SL, Ames MM, Visscher DW, Reynolds C, Couch FJ, Lingle WL, Flockhart DA et al. (2005): Pharmacogenetics of tamoxifen biotransformation is associated with clinical outcomes of efficacy and hot flashes. *J Clin Oncol* 23, 9312–9318
- Goetz MP, Kamal A, Ames MM (2008): Tamoxifen pharmacogenomics: the role of CYP2D6 as a predictor of drug response. *Clin Pharmacol Ther* 83, 160
- Goldstein DB, Chikhi L (2002): Human migrations and population structure: what we know and why it matters. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 3, 129–152
- Gonzalez FJ, Nebert DW (1990): Evolution of the P450 gene superfamily: animal-plant ‘warfare’, molecular drive and human genetic differences in drug oxidation. *Trends Genet* 6, 182–186
- Gorboulev V, Ulzheimer JC, Akhoundova A, Ulzheimer-Teuber I, Karbach U, Quester S, Baumann C, Lang F, Busch AE, Koepsell H (1997): Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters. *DNA Cell Biol* 16, 871–881
- 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. *Mol Pharmacol* 56, 1254–1261
- 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. *Mol Pharmacol* 67, 1612–1619
- Goudsouzian NG, d’Hollander AA, Viby-Mogensen J (1993): Prolonged neuromuscular block from mivacurium in two patients with cholinesterase deficiency. *Anesth Analg* 77, 183–185
- Grimsby J, Lan NC, Neve R, Chen K, Shih JC (1990): Tissue Distribution of Human Monoamine Oxidase A and B mRNA. *J Neurochem* 55, 1166–1169
- Gründemann D, Gorboulev V, Gambaryan S, Veyhl M, Koepsell H, others (1994): Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. *Nature* 372, 549–551
- Harlfinger S, Fork C, Lazar A, Schömig E, Gründemann D (2005): Are organic cation transporters capable of transporting prostaglandins? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 372, 125–130
- Hellenthal G, Busby GBJ, Band G, Wilson JF, Capelli C, Falush D, Myers S (2014): A Genetic Atlas of Human Admixture History. *Science* 343, 747–751
- Hendrickx R, Johansson JG, Lohmann C, Jenvert R-M, Blomgren A, Börjesson L, Gustavsson L (2013): Identification of Novel Substrates and Structure–Activity Relationship of Cellular Uptake Mediated by Human Organic Cation Transporters 1 and 2. *J Med Chem* 56, 7232–7242

- Herraez E, Lozano E, Macias RI, Vaquero J, Bujanda L, Banales JM, Marin JJ, Briz O (2013): Expression of SLC22A1 variants may affect the response of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma to sorafenib. *Hepatology* 58, 1065–1073
- Hoskins JM, Goldberg RM, Qu P, Ibrahim JG, McLeod HL (2007): UGT1A1\* 28 genotype and irinotecan-induced neutropenia: dose matters. *J Natl Cancer Inst* 99, 1290–1295
- Hu AJ (2010): An overview of the history and culture of the Xianbei ('Monguor'/'Tu'). *Asian Ethnicity* 11, 95–164
- Huang Y, Lemieux MJ, Song J, Auer M, Wang D-N (2003): Structure and Mechanism of the Glycerol-3-Phosphate Transporter from *Escherichia coli*. *Science* 301, 616–620
- Hulot J-S, Bura A, Villard E, Azizi M, Remones V, Goyenvalle C, Aiach M, Lechat P, Gaussem P (2006): Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism is a major determinant of clopidogrel responsiveness in healthy subjects. *Blood* 108, 2244–2247
- Ingelman-Sundberg M (2005): Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J* 5, 6–13
- Ingman M, Kaessmann H, Pääbo S, Gyllensten U (2000): Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature* 408, 708–713
- Innocenti F, Undevia SD, Iyer L, Chen PX, Das S, Kocherginsky M, Karrison T, Janisch L, Ramírez J, Rudin CM et al. (2004): Genetic variants in the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene predict the risk of severe neutropenia of irinotecan. *J Clin Oncol* 22, 1382–1388
- International Narcotics Control Board: Narcotic drugs: Report of the International Narcotics Control Board for 2014. United Nations Publication, New York 2015
- Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, Diamant M, Ferrannini E, Nauck M, Peters AL, Tsapas A, Wender R, Matthews DR (2012): Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes: A Patient-Centered Approach. *Diabetes Care* 35, 1364–1379
- Itoda M, Saito Y, Maekawa K, Hichiya H, Komamura K, Kamakura S, Kitakaze M, Tomoike H, Ueno K, Ozawa S et al. (2004): Seven Novel Single Nucleotide Polymorphisms in the Human SLC22A1 Gene Encoding Organic Cation Transporter 1 (OCT1). *Drug Metab Pharmacokinet* 19, 308–312
- Jung N, Lehmann C, Rubbert A, Knispel M, Hartmann P, van Lunzen J, Stellbrink H-J, Faetkenheuer G, Taubert D (2008): Relevance of the Organic Cation Transporters 1 and 2 for Antiretroviral Drug Therapy in Human Immunodeficiency Virus Infection. *Drug Metab Dispos* 36, 1616–1623

- Kajiwara M, Terada T, Asaka J-i, Aoki M, Katsura T, Ikai I, Inui K-i (2008): Regulation of basal core promoter activity of human organic cation transporter 1 (OCT1/SLC22A1). *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 295, G1211-G1216
- Kalow W (1956): Familial incidence of low pseudocholinesterase level. *Lancet* 268, 576–577
- Kalow W, Gunn (1957): The relation between dose of succinylcholine and duration of apnea in man. *J Pharmacol Exp Ther* 120, 203–214
- Kang H-J, Song I-S, Shin HJ, Kim W-Y, Lee C-H, Shim J-C, Zhou H-H, Lee SS, Shin J-G (2007): Identification and Functional Characterization of Genetic Variants of Human Organic Cation Transporters in a Korean Population. *Drug Metab Dispos* 35, 667–675
- Keller T, Egenberger B, Gorboulev V, Bernhard F, Uzelac Z, Gorbunov D, Wirth C, Koppatz S, Dotsch V, Hunte C et al. (2011): The large extracellular loop of organic cation transporter 1 influences substrate affinity and is pivotal for oligomerization. *J Biol Chem* 286, 37874–37886
- 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
- Keyser C, Hollard C, Gonzalez A, Fausser J-L, Rivals E, Alexeev AN, Riberon A, Crubézy E, Ludes B (2015): The ancient Yakuts: a population genetic enigma. *Phil Trans R Soc B* 370, 20130385
- Kharkov VN, Stepanov VA, Medvedeva OF, Spiridonova MG, Maksimova NR, Nogovitsina AN, Puzyrev VP (2008): The origin of Yakuts: Analysis of the Y-chromosome haplotypes. *Mol Biol* 42, 198–208
- Kimmel SE, French B, Kasner SE, Johnson JA, Anderson JL, Gage BF, Rosenberg YD, Eby CS, Madigan RA, McBane RB et al. (2013): A pharmacogenetic versus a clinical algorithm for warfarin dosing. *N Engl J Med* 369, 2283–2293
- 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. *J Pharmacol Exp Ther* 301, 293–298
- Kirchheiner J, Nickchen K, Bauer M, Wong M-L, Licinio J, Roots I, Brockmoller J (2004): Pharmacogenetics of antidepressants and antipsychotics: the contribution of allelic variations to the phenotype of drug response. *Mol Psychiatry* 9, 442–473
- Koepsell H, Schmitt BM, Gorboulev V (2003): Organic cation transporters. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 150, 36–90

- Koepsell H, Endou H (2004): The SLC22 drug transporter family. *Pflugers Arch* 447, 666–676
- Koepsell H, Lips K, Volk C (2007): Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm Res* 24, 1227–1251
- Koepsell H (2011): Substrate recognition and translocation by polyspecific organic cation transporters. *Biol Chem* 392, 95–101
- Koepsell H, Keller T (2016): Functional Properties of Organic Cation Transporter OCT1, Binding of Substrates and Inhibitors, and Presumed Transport Mechanism
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W et al. (2001): Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860–921
- Leabman MK, Huang CC, DeYoung J, Carlson EJ, Taylor TR, La Cruz Md, Johns SJ, Stryke D, Kawamoto M, Urban TJ et al. (2003): Natural variation in human membrane transporter genes reveals evolutionary and functional constraints. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5896–5901
- Leutenegger A-L, Sahbatou M, Gazal S, Cann H, Genin E (2011): Consanguinity around the world: what do the genomic data of the HGDP-CEPH diversity panel tell us? *Eur J Hum Genet* 19, 583–587
- Lewontin RC, Krakauer J (1973): Distribution of Gene Frequency as a Test of the Theory of the Selective Neutrality of Polymorphisms. *Genetics* 74, 175–195
- Li H, Cho K, Kidd JR, Kidd K (2009): Genetic Landscape of Eurasia and “Admixture” in Uyghurs. *Am J Hum Genet* 85, 934–937
- Li JZ, Absher DM, Tang H, Southwick AM, Casto AM, Ramachandran S, Cann HM, Barsh GS, Feldman M, Cavalli-Sforza LL et al. (2008): Worldwide Human Relationships Inferred from Genome-Wide Patterns of Variation. *Science* 319, 1100–1104
- Li L, Tu M, Yang X, Sun S, Wu X, Zhou H, Zeng S, Jiang H (2014): The Contribution of Human OCT1, OCT3, and CYP3A4 to Nitidine Chloride–Induced Hepatocellular Toxicity. *Drug Metab Dispos* 42, 1227–1234
- Link E, Parish S, Armitage J, Bowman L, Heath S, Matsuda F, Gut I, Lathrop M, Collins R (2008): SLCO1B1 variants and statin-induced myopathy--a genomewide study. *N Engl J Med* 359, 789–799
- Liu H, Prugnolle F, Manica A, Balloux F (2006): A geographically explicit genetic model of worldwide human-settlement history. *Am J Hum Genet* 79, 230–237
- Lockridge O (1990): Genetic variants of human serum cholinesterase influence metabolism of the muscle relaxant succinylcholine. *Pharmacol Ther* 47, 35–60



- Lopez S, van Dorp L, Hellenthal G (2015): Human Dispersal Out of Africa: A Lasting Debate. *Evol Bioinform Online* 11, 57–68
- Lourenco AEP, Santos RV, Orellana JDY, Coimbra CEA, JR (2008): Nutrition transition in Amazonia: obesity and socioeconomic change in the Surui Indians from Brazil. *Am J Hum Biol* 20, 564–571
- Lu D, Lou H, Yuan K, Wang X, Wang Y, Zhang C, Lu Y, Yang X, Deng L, Zhou Y et al. (2016): Ancestral Origins and Genetic History of Tibetan Highlanders. *Am J Hum Genet* 99, 580–594
- Mallory JP: In search of the Indo-Europeans: Language, archaeology and myth. Thames and Hudson, London 1989
- Manica A, Prugnolle F, Balloux F (2005): Geography is a better determinant of human genetic differentiation than ethnicity. *Hum Genet* 118, 366–371
- Manoharan I, Wieseler S, Layer PG, Lockridge O, Boopathy R (2006): Naturally occurring mutation Leu307Pro of human butyrylcholinesterase in the Vysya community of India. *Pharmacogenet Genomics* 16, 461–468
- Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Berka J, Braverman MS, Chen Y-J, Chen Z et al. (2005): Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437, 376–380
- Masson F, Talon R, Montel MC (1996): Histamine and tyramine production by bacteria from meat products. *Int J Food Microbiol* 32, 199–207
- Matthaei J, Kuron D, Faltraco F, Knoch T, Dos Santos Pereira JN, Abu Abed M, Prukop T, Brockmüller J, Tzvetkov MV (2016): OCT1 mediates hepatic uptake of sumatriptan and loss-of-function OCT1 polymorphisms affect sumatriptan pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 99, 633–641
- McDermott W (1978): Medicine: The Public Good and One's Own. *Perspect Biol Med* 21, 167–187
- McElroy S, Richmond J, Lira M, Friedman D, Silber BM, Milos PM, Sachse C, Brockmüller J, Roots I (2000): CYP2D6 genotyping as an alternative to phenotyping for determination of metabolic status in a clinical trial setting. *AAPS J* 2, 1–11
- Mega JL, Simon T, Collet J-P, Anderson JL, Antman EM, Bliden K, Cannon CP, Danchin N, Giusti B, Gurbel P et al. (2010): Reduced-function CYP2C19 genotype and risk of adverse clinical outcomes among patients treated with clopidogrel predominantly for PCI: a meta-analysis. *JAMA* 304, 1821–1830
- Mega JL, Hochholzer W, Frelinger AL, Kluk MJ, Angiolillo DJ, Kereiakes DJ, Isserman S, Rogers WJ, Ruff CT, Contant C et al. (2011): Dosing clopidogrel based on CYP2C19

genotype and the effect on platelet reactivity in patients with stable cardiovascular disease. *JAMA* 306, 2221–2228

Mehrens T, Lelleck S, Cetinkaya I, Knollmann M, Hohage H, Gorboulev V, Boknik P, Koepsell H, Schlatter E (2000): The affinity of the organic cation transporter rOCT1 is increased by protein kinase C-dependent phosphorylation. *J Am Soc Nephrol* 11, 1216–1224

Meyer UA (2004): Pharmacogenetics - five decades of therapeutic lessons from genetic diversity. *Nat Rev Genet* 5, 669–676

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

Minahan JB: *Ethnic Groups of South Asia and the Pacific: An Encyclopedia (Ethnic Groups of the World)*; ABC-CLIO Interactive, Santa Barbara 2012

Motohashi H, Inui K-i: Pharmacological and Toxicological Significance of the Organic Cation Transporters OCT and MATE: Drug Disposition, Interaction and Toxicity; In: Ciarimboli G, Gautron S, Schlatter E (Hrsg.): *Organic Cation Transporters: Integration of Physiology, Pathology, and Pharmacology*. Springer International Publishing. Cham (CH) 2015, 73–92

Motulsky AG (1957): Drug reactions, enzymes, and biochemical genetics. *JAMA* 165, 835–837

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). *Biochem Pharmacol* 70, 1851–1860

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Menzel S, Ruth P: Mutschler *Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie, der klinischen Pharmakologie und Toxikologie*, 10., vollst. überarb. und erw. Auflage; WVG Wiss. Verl.-Ges, Stuttgart 2013

Nagel G, Volk C, Friedrich T, Ulzheimer JC, Bamberg E, Koepsell H (1997): A Reevaluation of Substrate Specificity of the Rat Cation Transporter rOCT1. *J Biol Chem* 272, 31953–31956

Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, Ferrannini E, Holman RR, Sherwin R, Zinman B (2009): Medical Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes: A Consensus Algorithm for the Initiation and Adjustment of Therapy. *Diabetes Care* 32, 193–203

National Bureau of Statistics of China: *Sixth National Population Census of the People's Republic of China 2010*, China Statistics Press 2011

Neubert DW (1997): Polymorphisms in drug-metabolizing enzymes: what is their clinical relevance and why do they exist? *Am J Hum Genet* 60, 265–271

- Nelis M, Esko T, Mägi R, Zimprich F, Zimprich A, Toncheva D, Karachanak S, Piskáčeková T, Balaščík I, Peltonen L et al. (2009): Genetic Structure of Europeans: A View from the North–East. *PLoS One* 4, e5472
- Neuhoff S, Ungell A-L, Zamora I, Artursson P (2003): pH-Dependent Bidirectional Transport of Weakly Basic Drugs Across Caco-2 Monolayers: Implications for Drug–Drug Interactions. *Pharm Res* 20, 1141–1148
- Ng PC, Henikoff S (2001): Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res* 11, 863–874
- Ng PC, Henikoff S (2006): Predicting the effects of amino acid substitutions on protein function. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7, 61–80
- Niemi M (2010): Transporter pharmacogenetics and statin toxicity. *Clin Pharmacol Ther* 87, 130–133
- Niemi M, Pasanen MK, Neuvonen PJ (2011): Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1: a Genetically Polymorphic Transporter of Major Importance for Hepatic Drug Uptake. *Pharmacol Rev* 63, 157–181
- Nies AT, Herrmann E, Brom M, Keppler D (2008): Vectorial transport of the plant alkaloid berberine by double-transfected cells expressing the human organic cation transporter 1 (OCT1, SLC22A1) and the efflux pump MDR1 P-glycoprotein (ABCB1). *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 376, 449–461
- 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, 1227–1240
- Nies AT, Koepsell H, Damme K, Schwab M: Organic cation transporters (OCTs, MATEs), in vitro and in vivo evidence for the importance in drug therapy; In: Fromm MF, Kim RB (Hrsg.): *Drug Transporters (Handbook of Experimental Pharmacology 201)*. Springer. Berlin, Heidelberg 2011, 105–167
- Nies AT, Schaeffeler E, van der Kuip H, Cascorbi I, Bruhn O, Kneba M, Pott C, Hofmann U, Volk C, Hu S et al. (2014): Cellular Uptake of Imatinib into Leukemic Cells Is Independent of Human Organic Cation Transporter 1 (OCT1). *Clin Cancer Res* 20, 985–994
- Nishimura M, Naito S (2005): Tissue-specific mRNA expression profiles of human ATP-binding cassette and solute carrier transporter superfamilies. *Drug Metab Pharmacokinet* 20, 452–477
- Niwa T, Hiroi T, Tsuzuki D, Yamamoto S, Narimatsu S, Fukuda T, Azuma J, Funae Y (2004): Effect of genetic polymorphism on the metabolism of endogenous neuroactive

substances, progesterone and p-tyramine, catalyzed by CYP2D6. *Brain Res Mol Brain Res* 129, 117–123

O'Brien VP, Bokelmann K, Ramírez J, Jobst K, Ratain MJ, Brockmöller J, Tzvetkov MV (2013): Hepatocyte Nuclear Factor 1 Regulates the Expression of the Organic Cation Transporter 1 via Binding to an Evolutionary Conserved Region in Intron 1 of the OCT1 Gene. *J Pharmacol Exp Ther* 347, 181–192

Orliaguet G, Hamza J, Couloigner V, Denoyelle F, Lorient M-A, Broly F, Garabedian EN (2015): A Case of Respiratory Depression in a Child With Ultrarapid CYP2D6 Metabolism After Tramadol. *Pediatrics* 135, e753-e755

Østergaard D, Jensen E, Skovgaard LT, Viby-Mogensen J (1993): Mivacurium-induced neuromuscular blockade in patients with atypical plasma cholinesterase. *Acta Anaesthesiol Scand* 37, 314–318

Pasanen MK, Neuvonen M, Neuvonen PJ, Niemi M (2006): SLCO1B1 polymorphism markedly affects the pharmacokinetics of simvastatin acid. *Pharmacogenet Genomics* 16, 873–879

Pasanen MK, Neuvonen PJ, Niemi M (2008): Global analysis of genetic variation in SLCO1B1. *Pharmacogenomics* 9, 19–33

Patin E, Laval G, Barreiro LB, Salas A, Semino O, Santachiara-Benerecetti S, Kidd KK, Kidd JR, van der Veen L, Hombert J-M et al. (2009): Inferring the Demographic History of African Farmers and Pygmy Hunter–Gatherers Using a Multilocus Resequencing Data Set. *PLoS Genet* 5, e1000448

Patterson N, Moorjani P, Luo Y, Mallick S, Rohland N, Zhan Y, Genschoreck T, Webster T, Reich D (2012): Ancient Admixture in Human History. *Genetics* 192, 1065–1093

Pechanek U, Pfannhauser W, Woidich H (1983): Untersuchung über den Gehalt biogener Amine in vier Gruppen von Lebensmitteln des österreichischen Marktes. *Z Lebensm Unters Forsch* 176, 335–340

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. *Am J Physiol Renal Physiol* 303, F313-20

Perry G, Dominy N (2009): Evolution of the human pygmy phenotype. *Trends Ecol Evol* 24, 218–225

Petrik T: Effects of trans-acting genetic polymorphisms and DNA-methylation on HNF1-mediated transcriptional regulation of OCT1; Bachelorarbeit Molekulare Medizin, Göttingen 2013

- Pirmohamed M, James S, Meakin S, Green C, Scott AK, Walley TJ, Farrar K, Park BK, Breckenridge AM (2004): Adverse drug reactions as cause of admission to hospital: prospective analysis of 18 820 patients. *BMJ* 329, 15–19
- Pirmohamed M, Burnside G, Eriksson N, Jorgensen AL, Toh CH, Nicholson T, Kesteven P, Christersson C, Wahlström B, Stafberg C et al. (2013): A randomized trial of genotype-guided dosing of warfarin. *N Engl J Med* 369, 2294–2303
- Popp C, Gorboulev V, Muller 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 lactose permease. *Mol Pharmacol* 67, 1600–1611
- Porter J, Jick H (1977): Drug-related deaths among medical inpatients. *JAMA* 237, 879–881
- Poulsen L, Arendt-Nielsen L, Brøsen K, Sindrup SH (1996): The hypoalgesic effect of tramadol in relation to CYP2D6. *Clin Pharmacol Ther* 60, 636–644
- Province MA, Goetz MP, Brauch H, Flockhart DA, Hebert JM, Whaley R, Suman VJ, Schroth W, Winter S, Zembutsu H et al. (2014): CYP2D6 genotype and adjuvant tamoxifen: meta-analysis of heterogeneous study populations. *Clin Pharmacol Ther* 95, 216–227
- Prugnolle F, Manica A, Balloux F (2005a): Geography predicts neutral genetic diversity of human populations. *Curr Biol* 15, R159-R160
- Prugnolle F, Manica A, Charpentier M, Guegan JF, Guernier V, Balloux F (2005b): Pathogen-driven selection and worldwide HLA class I diversity. *Curr Biol* 15, 1022–1027
- Qamar R, Ayub Q, Mohyuddin A, Helgason A, Mazhar K, Mansoor A, Zerjal T, Tyler-Smith C, Mehdi SQ (2002): Y-Chromosomal DNA Variation in Pakistan. *Am J Hum Genet* 70, 1107–1124
- Quail MA, Smith M, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR, Bertoni A, Swerdlow HP, Gu Y (2012): A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics* 13, 341
- Raffa RB, Friderichs E, Reimann W, Shank RP, Codd EE, Vaught JL, Jacoby HI, Selve N (1993): Complementary and synergistic antinociceptive interaction between the enantiomers of tramadol. *J Pharmacol Exp Ther* 267, 331–340
- Ramachandran S, Deshpande O, Roseman CC, Rosenberg NA, Feldman MW, Cavalli-Sforza LL (2005): Support from the relationship of genetic and geographic distance in human populations for a serial founder effect originating in Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 15942–15947
- Relethford J (2004): Global Patterns of Isolation by Distance Based on Genetic and Morphological Data. *Hum Biol* 76, 499–513

- Relethford JH (2008): Genetic evidence and the modern human origins debate. *Heredity* 100, 555–563
- Rieder MJ, Reiner AP, Gage BF, Nickerson DA, Eby CS, McLeod HL, Blough DK, Thummel KE, Veenstra DL, Rettie AE (2005): Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N Engl J Med* 352, 2285–2293
- Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, Leamon JH, Johnson K, Milgrew MJ, Edwards M et al. (2011): An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* 475, 348–352
- Saborowski M, Kullak-Ublick GA, Eloranta JJ (2006): The Human Organic Cation Transporter-1 Gene Is Transactivated by Hepatocyte Nuclear Factor-4 $\alpha$ . *J Pharmacol Exp Ther* 317, 778–785
- Sachse C, Brockmöller J, Hildebrand M, Müller K, Roots I (1998): Correctness of prediction of the CYP2D6 phenotype confirmed by genotyping 47 intermediate and poor metabolizers of debrisoquine. *Pharmacogenet Genomics* 8, 181–186
- Sadhasivam S, Krekels EH, Chidambaran V, Esslinger HR, Ngamprasertwong P, Zhang K, Fukuda T, Vinks AA (2012a): Morphine clearance in children: does race or genetics matter? *J Opioid Manag* 8, 217–226
- Sadhasivam S, Chidambaran V, Ngamprasertwong P, Esslinger HR, Prows C, Zhang X, Martin LJ, McAuliffe J (2012b): Race and Unequal Burden of Perioperative Pain and Opioid Related Adverse Effects in Children. *Pediatrics* 129, 832–838
- Saito S, Iida A, Sekine A, Ogawa C, Kawauchi S, Higuchi S, Nakamura Y (2002): Catalog of 238 variations among six human genes encoding solute carriers (hSLCs) in the Japanese population. *J Hum Genet* 47, 576–584
- Sakata T, Anzai N, Shin HJ, Noshiro R, Hirata T, Yokoyama H, Kanai Y, Endou H (2004): Novel single nucleotide polymorphisms of organic cation transporter 1 (SLC22A1) affecting transport functions. *Biochem Biophys Res Commun* 313, 789–793
- Sala-Rabanal M, Li DC, Dake GR, Kurata HT, Inyushin M, Skatchkov SN, Nichols CG (2013): Polyamine transport by the polyspecific organic cation transporters OCT1, OCT2, and OCT3. *Mol Pharm* 10, 1450–1458
- Salipante SJ, Kawashima T, Rosenthal C, Hoogstraat DR, Cummings LA, Sengupta DJ, Harkins TT, Cookson BT, Hoffman NG (2014): Performance Comparison of Illumina and Ion Torrent Next-Generation Sequencing Platforms for 16S rRNA-Based Bacterial Community Profiling. *Appl Environ Microbiol* 80, 7583–7591
- Schaeffeler E, Hellerbrand C, Nies AT, Winter S, Kruck S, Hofmann U, van der Kuip H, Zanger UM, Koepsell H, Schwab M (2011): DNA methylation is associated with downregulation of the organic cation transporter OCT1 (SLC22A1) in human hepatocellular carcinoma. *Genome Med* 3, 82

- Schnurrer JU, Frölich JC (2003): Zur Häufigkeit und Vermeidbarkeit von tödlichen unerwünschten Arzneimittelwirkungen. *Internist* 44, 889–895
- Schömig E, Lazar A, Gründemann D: Extraneuronal Monoamine Transporter and Organic Cation Transporters 1 and 2: A Review of Transport Efficiency; In: Sitte HH, Freissmuth M (Hrsg.): *Neurotransmitter Transporters (Handbook of Experimental Pharmacology 175)*. Springer, Heidelberg Berlin 2006, 151–180
- Schönhöfer PS (1999): Klinik-basierte Erfassung Arzneimittel-bedingter Erkrankungen im Pharmakovigilanz-System (ZKH Bremen). *Arzneimitteltherapie* 17, 83–86
- Schwabe U, Paffrath D: *Arzneiverordnungs-Report 2012*; Springer, Berlin Heidelberg 2012
- Seitz T, Stalman R, Dalila N, Chen J, Pojar S, dos Santos Pereira JN, Krätzner R, Brockmöller J, Tzvetkov MV (2015): Global genetic analyses reveal strong inter-ethnic variability in the loss of activity of the organic cation transporter OCT1. *Genome Med* 7, 56
- Seitz T: Functional characterization of genetic polymorphisms in the organic cation transporter OCT1 with a special focus on the substrate-specific effects of the M420del polymorphism; Dissertation Molekulare Medizin, Göttingen 2016
- Serre D, Pääbo S (2004): Evidence for Gradients of Human Genetic Diversity Within and Among Continents. *Genome Res* 14, 1679–1685
- Shendure J, Porreca GJ, Reppas NB, Lin X, McCutcheon JP, Rosenbaum AM, Wang MD, Zhang K, Mitra RD, Church GM (2005): Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. *Science* 309, 1728–1732
- Shenfield SD: The Circassians: A Forgotten Genocide?; In: Levene M, Roberts P (Hrsg.): *The massacre in history (War and genocide 1)*. Berghahn. New York, Oxford 1999
- Shen H, Li J, Zhang J, Xu C, Jiang Y, Wu Z, Zhao F, Liao L, Chen J, Lin Y et al. (2013): Comprehensive characterization of human genome variation by high coverage whole-genome sequencing of forty four Caucasians. *PLoS One* 8, e59494
- Shikata E, Yamamoto R, Takane H, Shigemasa C, Ikeda T, Otsubo K, Ieiri I (2006): Human organic cation transporter (OCT1 and OCT2) gene polymorphisms and therapeutic effects of metformin. *J Hum Genet* 52, 117–122
- Shu Y, Leabman MK, Feng B, Mangravite LM, Huang CC, Stryke D, Kawamoto M, Johns SJ, DeYoung J, Carlson E et al. (2003): Evolutionary conservation predicts function of variants of the human organic cation transporter, OCT1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5902–5907
- Shu Y, Sheardown SA, Brown C, Owen RP, Zhang S, Castro RA, Ianculescu AG, Yue L, Lo JC, Burchard EG et al. (2007): Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. *J Clin Invest* 117, 1422–1431

- Sistonen J, Sajantila A, Grueso OL, Corander J, Barbujani G, Fuselli S (2007): CYP2D6 worldwide genetic variation shows high frequency of altered activity variants and no continental structure. *Pharmacogenet Genomics* 17, 93–101
- Skoglund P, Mallick S, Bortolini MC, Chennagiri N, Hunemeier T, Petzl-Erler ML, Salzano FM, Patterson N, Reich D (2015): Genetic evidence for two founding populations of the Americas. *Nature* 525, 104–108
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M et al. (2001): Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344, 783–792
- Smith TA (1977): Phenethylamine and related compounds in plants. *Phytochemistry* 16, 9–18
- Stamer UM, Lehnen K, Höthker F, Bayerer B, Wolf S, Hoeft A, Stuber F (2003): Impact of CYP2D6 genotype on postoperative tramadol analgesia. *Pain* 105, 231–238
- Stamer UM, Musshoff F, Stuber F, Brockmoller J, Steffens M, Tzvetkov MV (2016): Loss-of-function polymorphisms in the organic cation transporter OCT1 are associated with reduced postoperative tramadol consumption. *Pain* 157, 2467–2475
- Stephens M, Smith NJ, Donnelly P (2001): A New Statistical Method for Haplotype Reconstruction from Population Data. *Am J Hum Genet* 68, 978–989
- Stratz T, Müller W (2003): Lokalbehandlung rheumatischer Erkrankungen mit dem 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten Tropisetron. *Schmerz* 17, 200–203
- Stringer C (2002): Modern human origins: progress and prospects. *Phil Trans R Soc B* 357, 563–579
- Stringer CB, Andrews P (1988): Genetic and fossil evidence for the origin of modern humans. *Science* 239, 1263–1268
- 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. *Am J Physiol Renal Physiol* 293, F767-F779
- Tajima F (1989): Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics* 123, 585–595
- Takeda M, Khamdang S, Narikawa S, Kimura H, Kobayashi Y, Yamamoto T, Cha SH, Sekine T, Endou H (2002): Human Organic Anion Transporters and Human Organic Cation Transporters Mediate Renal Antiviral Transport. *J Pharmacol Exp Ther* 300, 918–924



- Takeuchi A, Motohashi H, Okuda M, Inui K-i (2003): Decreased Function of Genetic Variants, Pro283Leu and Arg287Gly, in Human Organic Cation Transporter hOCT1. *Drug Metab Pharmacokinet* 18, 409–412
- Tarasova L, Kalnina I, Geldnere K, Bumbure A, Ritenberga R, Nikitina-Zake L, Fridmanis D, Vaivade I, Pirags V, Klovins J (2012): Association of genetic variation in the organic cation transporters OCT1, OCT2 and multidrug and toxin extrusion 1 transporter protein genes with the gastrointestinal side effects and lower BMI in metformin-treated type 2 diabetes patients. *Pharmacogenet Genomics* 22, 659–666
- Tattersall I (2009): Out of Africa: modern human origins special feature: human origins: out of Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 16018–16021
- The 1000 Genomes Project Consortium (2012): An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 491, 56–65
- Theophrastus Paracelsus: Das Buch Paragranum / Septem Defensiones; In: v. Peuckert W-E (Hrsg.): Theophrastus Paracelsus Werke (2). Wissenschaftliche Buchgesellschaft. Darmstadt 1965
- Tishkoff SA, Kidd KK (2004): Implications of biogeography of human populations for 'race' and medicine. *Nat Genet*, S21-S27
- Tishkoff SA, Reed FA, Friedlaender FR, Ehret C, Ranciaro A, Froment A, Hirbo JB, Awomoyi AA, Bodo J-M, Doumbo O et al. (2009): The Genetic Structure and History of Africans and African Americans. *Science* 324, 1035–1044
- Tremblay P-B, Kaiser R, Sezer O, Rösler N, Schelenz C, Possinger K, Roots I, Brockmüller J (2003): Variations in the 5-hydroxytryptamine type 3B receptor gene as predictors of the efficacy of antiemetic treatment in cancer patients. *J Clin Oncol* 21, 2147–2155
- Tu M, Sun S, Wang K, Peng X, Wang R, Li L, Zeng S, Zhou H, Jiang H (2013): Organic cation transporter 1 mediates the uptake of monocrotaline and plays an important role in its hepatotoxicity. *Toxicology* 311, 225–230
- Tu M, Li L, Lei H, Ma Z, Chen Z, Sun S, Xu S, Zhou H, Zeng S, Jiang H (2014): Involvement of organic cation transporter 1 and CYP3A4 in retrorsine-induced toxicity. *Toxicology* 322, 34–42
- Tzvetkov MV, Vormfelde SV, Balen D, Meineke I, Schmidt T, Sehrt D, Sabolić I, Koepsell H, Brockmüller J (2009): The effects of genetic polymorphisms in the organic cation transporters OCT1, OCT2, and OCT3 on the renal clearance of metformin. *Clin Pharmacol Ther* 86, 299–306
- Tzvetkov MV, Meineke I, Sehrt D, Vormfelde SV, Brockmüller J (2010): Amelogenin-based sex identification as a strategy to control the identity of DNA samples in genetic association studies. *Pharmacogenomics* 11, 449–457

- Tzvetkov MV, Saadatmand AR, Lötsch J, Tegeder I, Stingl JC, Brockmüller J (2011): Genetically Polymorphic OCT1: Another Piece in the Puzzle of the Variable Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of the Opioidergic Drug Tramadol. *Clin Pharmacol Ther* 90, 143–150
- Tzvetkov MV, Saadatmand AR, Bokelmann K, Meineke I, Kaiser R, Brockmüller J (2012): Effects of OCT1 polymorphisms on the cellular uptake, plasma concentrations and efficacy of the 5-HT<sub>3</sub> antagonists tropisetron and ondansetron. *Pharmacogenomics J* 12, 22–29
- Tzvetkov MV, dos Santos Pereira, Joao N., Meineke I, Saadatmand AR, Stingl JC, Brockmüller J (2013): Morphine is a substrate of the organic cation transporter OCT1 and polymorphisms in OCT1 gene affect morphine pharmacokinetics after codeine administration. *Biochem Pharmacol* 86, 666–678
- Tzvetkov MV, Seitz T, Bokelmann K, Mueller T, Brockmüller J, Koepsell H (2014): Does the haplotype Met408-Del420, which was apparently predictive for imatinib efficacy, really exist and how strongly may it affect OCT1 activity? *Blood* 123, 1427–1429
- Tzvetkov MV, Dalila N, Faltraco F: Genetic Variability in Organic Cation Transporters: Pathophysiological Manifestations and Consequences for Drug Pharmacokinetics and Efficacy; In: Ciarimboli G, Gautron S, Schlatter E (Hrsg.): *Organic Cation Transporters: Integration of Physiology, Pathology, and Pharmacology*. Springer International Publishing. Cham (CH) 2015, 93–137
- Urban TJ, Sebro R, Hurowitz EH, Leabman MK, Badagnani I, Lagpacan LL, Risch N, Giacomini KM (2006): Functional genomics of membrane transporters in human populations. *Genome Res* 16, 223–230
- Venkatasubramanian R, Fukuda T, Niu J, Mizuno T, Chidambaran V, Vinks AA, Sadhasivam S (2014): ABCC3 and OCT1 genotypes influence pharmacokinetics of morphine in children. *Pharmacogenomics* 15, 1297–1309
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA et al. (2001): The Sequence of the Human Genome. *Science* 291, 1304–1351
- 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
- Vogel F: Moderne Probleme der Humangenetik; In: v. Heilmeyer L, Schoen R, Rudder B de (Hrsg.): *Ergebnisse der Inneren Medizin und Kinderheilkunde; Ergebnisse der Inneren Medizin und Kinderheilkunde 12*. Springer. Berlin Heidelberg 1959, 52–125

- 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. *Mol Pharmacol* 76, 275–289
- Wang D-S, Jonker JW, Kato Y, Kusuhara H, Schinkel AH, Sugiyama Y (2002): Involvement of Organic Cation Transporter 1 in Hepatic and Intestinal Distribution of Metformin. *J Pharmacol Exp Ther* 302, 510–515
- Wang L, Prasad B, Salphati L, Chu X, Gupta A, Hop, C. E. C. A., Evers R, Unadkat JD (2015): Interspecies Variability in Expression of Hepatobiliary Transporters across Human, Dog, Monkey, and Rat as Determined by Quantitative Proteomics. *Drug Metab Dispos* 43, 367–374
- Wang S, Lewis CM, Jakobsson M, Ramachandran S, Ray N, Bedoya G, Rojas W, Parra MV, Molina JA, Gallo C et al. (2007): Genetic variation and population structure in native Americans. *PLoS Genet* 3, e185
- Warner M, Chen LH, Makuc DM, Anderson RN, Miniño AM: Drug Poisoning Deaths in the United States, 1980–2008. NCHS Data Brief 81 (NCHS Data Brief), Hyattsville, MD 2011
- Weir BS: Genetic data analysis II: Methods for discrete population genetic data; Sinauer Associates, Sunderland, Mass. 1996
- Whittaker M: Cholinesterase (Monographs in Human Genetics 11). Karger, Basel 1986
- Witters LA (2001): The blooming of the French lilac. *J Clin Invest* 108, 1105–1107
- Xu S, Jin L (2008): A Genome-wide Analysis of Admixture in Uyghurs and a High-Density Admixture Map for Disease-Gene Discovery. *Am J Hum Genet* 83, 322–336
- Xu S, Huang W, Qian J, Jin L (2008): Analysis of Genomic Admixture in Uyghur and Its Implication in Mapping Strategy. *Am J Hum Genet* 82, 883–894
- Yu H: Identity and schooling among the Naxi: Becoming Chinese with Naxi identity / Yu Haibo (Emerging perspectives on education in China); Lexington Books, Lanham, Md. 2010
- Zanger UM, Raimundo S, Eichelbaum M (2004): Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 369, 23–37
- Zerjal T, Xue Y, Bertorelle G, Wells RS, Bao W, Zhu S, Qamar R, Ayub Q, Mohyuddin A, Fu S et al. (2003): The Genetic Legacy of the Mongols. *Am J Hum Genet* 72, 717–721
- Zhang L, Dresser MJ, Gray AT, Yost SC, Terashita S, Giacomini KM (1997): Cloning and Functional Expression of a Human Liver Organic Cation Transporter. *Mol Pharmacol* 51, 913–921

Zhang L, Schaner ME, Giacomini KM (1998): Functional Characterization of an Organic Cation Transporter (hOCT1) in a Transiently Transfected Human Cell Line (HeLa). *J Pharmacol Exp Ther* 286, 354–361

Zhou K, Donnelly LA, Kimber CH, Donnan PT, Doney AS, Leese G, Hattersley AT, McCarthy MI, Morris AD, Palmer CN et al. (2009): Reduced-Function SLC22A1 Polymorphisms Encoding Organic Cation Transporter 1 and Glycemic Response to Metformin: A GoDARTS Study. *Diabetes* 58, 1434–1439

## Internetquellen

Bundesinstitut für Risikobewertung (2013): Pyrrolizidinalkaloide in Kräutertees und Tees: Stellungnahme 018/2013 des BfR vom 5. Juli 2013.

<http://www.bfr.bund.de/cm/343/pyrrolizidinalkaloide-in-kraeutertees-und-tees.pdf>,  
abgerufen am: 04.11.2016

Bundesinstitut für Risikobewertung (2016): Pyrrolizidinalkaloide: Gehalte in Lebensmitteln sollen nach wie vor so weit wie möglich gesenkt werden: Stellungnahme Nr. 030/2016 des BfR vom 28. September 2016. <http://www.bfr.bund.de/cm/343/pyrrolizidinalkaloide-gehalte-in-lebensmitteln-sollen-nach-wie-vor-so-weit-wie-moeglich-gesenkt-werden.pdf>,  
abgerufen am: 04.11.2016

Centre d'Etude du Polymorphisme Humain (2015): Human Genome Diversity Cell Line Panel: HGDP-CEPH Database. [http://www.cephb.fr/en/hgdp\\_panel.php](http://www.cephb.fr/en/hgdp_panel.php), abgerufen am: 03.11.2016

Centre for Agriculture and Biosciences International (2015a): Invasive Species Compendium: *Crotalaria retusa* (rattleweed). <http://www.cabi.org/isc/datasheet/87408>,  
abgerufen am: 09.11.2016

Centre for Agriculture and Biosciences International (2015b): Invasive Species Compendium: *Crotalaria spectabilis* (Showy rattlepod).  
<http://www.cabi.org/isc/datasheet/16161>, abgerufen am: 09.11.2016

Mindlin B (2003): Enciclopédia dos Povos Indígenas no Brasil: Surui Paiter.  
<https://pib.socioambiental.org/en/povo/surui-paiter/print>, abgerufen am: 04.11.2016

National Center for Biotechnology Information (2014): dbSNP Human Build 141.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>, abgerufen am: 20.04.2016

Novartis (2004): Fachinformation Navoban.

<http://de.oddb.org/de/drugs/fachinfo/uid/204319>, abgerufen am: 09.12.2016

ratiopharm GmbH (2013): Fachinformation Sumatriptan.

<http://www.fachinfo.de/suche/fi/009531>, abgerufen am: 09.12.2016

Storto L (2005): Enciclopédia dos Povos Indígenas no Brasil: Karitiana.

<https://pib.socioambiental.org/en/povo/karitiana/print>, abgerufen am: 04.11.2016

## **Erklärung zu den Rechten an verwendeten Abbildungen**

Alle verwendeten Abbildungen wurden entweder selbst angefertigt oder unterliegen der Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) und wurden verwendet unter Zitierung der Erschaffer.

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. J. Brockmöller danke ich für die Ermöglichung meiner Dissertation und der wissenschaftlichen Tätigkeit in seiner Abteilung sowie für das entgegengebrachte Vertrauen bei der Überlassung dieses interessanten Themas.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. M. Tzvetkov für seine kompetente und umfassende Betreuung während der gesamten Arbeit. Vielen Dank für die stete, wertvolle Unterstützung, die lehrreiche Hilfestellung und die vielen investierten Stunden.

Schließlich möchte ich allen Mitarbeitern der Abteilung Klinische Pharmakologie der Universitätsmedizin Göttingen danken für die gute und konstruktive Zusammenarbeit. Für die Beratung bei der experimentellen Arbeit und die produktiven Diskussionen danke ich insbesondere meinen Mitdoktoranden Herrn N. Dalila und Herrn M. Hasheminasab, für die konstruktive Zusammenarbeit meiner Mitdoktorandin Frau T. Seitz und Frau Karoline Jobst für die Hilfestellung bei der praktischen Arbeit im Labor.