

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

**Erweiterte Charakterisierung
substratspezifischer Effekte genetischer
Polymorphismen im organischen
Kationentransporter OCT1**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Sawan Kumar Kakkar

aus

Kassel

Göttingen 2018

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

Betreuungsausschuss

Betreuer Prof. Dr. rer. nat. M. Tzvetkov

Ko-Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. T. Beißbarth

Prüfungskommission

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Mladen Tzvetkov

Ko-Referent: Prof. Dr. rer. nat. Tim Beißbarth

Drittreferentin: Prof. Dr. hum. biol. Margarete Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 27.11.2019

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Erweiterte Charakterisierung substratspezifischer Effekte genetischer Polymorphismen im organischen Kationentransporter OCT1" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 29.08.2018

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung	1
1.1 Pharmakokinetik und die Bedeutung des Membrantransports für das ADME-Prinzip	1
1.2 Die Familie der organischen Kationentransporter.....	2
1.3 Struktur und Funktion des OCT1	3
1.4 Genetische Variabilität des OCT1.....	4
1.5 Auswirkung von genetischen Varianten auf die Pharmakokinetik und Wirkung von Pharmaka	7
1.6 Substratspezifische Effekte und Polyspezifität des OCT1	9
1.6.1 Substratspezifität.....	9
1.6.2 Polyspezifität	10
1.7 Ziel der vorliegenden Arbeit.....	11
2 Material und Methoden	12
2.1 Material.....	12
2.1.1 Geräte	12
2.1.2 Utensilien	14
2.1.3 Reagenzien, Chemikalien und Medikamente	15
2.1.4 Enzyme	18
2.1.5 Antikörper	18
2.1.6 Primer.....	18
2.1.7 TaqMan® Assays.....	19
2.1.8 Plasmide	19
2.1.9 Zelllinien	20
2.1.10 Software und Datenbanken	21
2.2 Methoden zur DNA-Analyse	22
2.2.1 Extraktion genomischer DNA	22
2.2.2 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	22
2.2.3 Polymerase-Kettenreaktionen zur Validierung von stabil transfizierten HEK293–Zelllinien	23
2.2.4 Agarose–Gelelektrophorese.....	27
2.2.5 Sanger–Sequenzierung.....	28
2.3 Methoden zur RNA-Analyse.....	30
2.3.1 RNA–Extraktion	30
2.3.2 cDNA–Synthese	31

2.3.3	Quantitative Echtzeit-PCR	31
2.4	Zellkulturtechniken	33
2.4.1	Zellkulturbedingungen.....	33
2.4.2	Ausplattieren der Zellen.....	33
2.4.3	Einfrieren von Zellen.....	34
2.4.4	Auftauen von Zellen	34
2.4.5	Stabile Transfektion von HEK293-Zellen	35
2.5	Transportexperimente	37
2.5.1	Auswahl der beiden Einzelkonzentrationen zur Durchführung der Transportexperimente	39
2.5.2	Floureszenzspektroskopie.....	39
2.5.3	Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie (LC-MS/MS).....	40
2.6	Proteinanalysen.....	41
2.6.1	Bicinchoninsäure-Assay zur Bestimmung der Proteinmenge	41
2.6.2	Immunzytochemie.....	42
3	Ergebnisse.....	44
3.1	Generierung und Validierung stabil transfizierter HEK293-Zelllinien mit den OCT1- Varianten L364A und H367A	44
3.2	Charakterisierung substratspezifischer Effekte genetischer Polymorphismen im OCT1	50
3.2.1	Übersicht der funktionellen Charakterisierung genetischer OCT1-Varianten	51
3.2.2	Vergleichende Charakterisierung der OCT1-Varianten L364A und H367A.....	57
3.2.3	Vergleichende Charakterisierung der OCT1-Varianten D474N und D474E	58
3.2.4	Vergleichende Effektkarakterisierung von OCT1-Varianten auf die beiden eng verwandten OCT1-Substrate Sumatriptan und Zolmitriptan	61
3.2.5	Weitere OCT1-Varianten mit besonders interessanten substratspezifischen Effekten.....	63
4	Diskussion.....	70
4.1	Clusteringanalysen des Transportverhaltens untersuchter genetischer OCT1-Varianten zur Einteilung der Substrate in Substratgruppen	70
4.2	Unterschiedliche Transportaktivitäten der genetischen OCT1-Varianten im Literaturvergleich.....	77
4.3	Interpretation besonders interessanter substratspezifischer Effekte	81
4.4	Mögliche klinische Auswirkungen ausgewählter genetischer OCT1-Varianten auf die Pharmakokinetik und Wirkung von Pharmaka	83
4.5	Ist eine pauschale Vorhersage von OCT1-Substraten möglich und was muss dabei berücksichtigt werden?	86
4.6	Limitationen dieser Arbeit	87
4.7	Schlussfolgerungen und Ausblick	88
5	Zusammenfassung.....	91
6	Literaturverzeichnis	93

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Transports und der Metabolisierung von organischen Kationen in humanen Hepatozyten.	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Primerbindungsstellen für Validierungs-PCRs.	23
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Flp-In™-Systems für die Herstellung stabil transfizierter HEK293-Zelllinien.	36
Abbildung 4: Validierung der korrekten Integration der OCT1-überexprimierende Konstrukte in das Genom der HEK293 T-REx-Zellen.	46
Abbildung 5: Genexpressionsanalyse von OCT1-überexprimierenden HEK293-Zellen.	47
Abbildung 6: Subzelluläre Lokalisation von OCT1-überexprimierenden HEK293-Zellen.	48
Abbildung 7: Vergleichende Charakterisierung der OCT1-Mutanten L364A und H367A.	58
Abbildung 8: Vergleichende Charakterisierung von D474N und D474E.	60
Abbildung 9: Vergleichende funktionelle Charakterisierung der OCT1-Substrate Sumatriptan und Zolmitriptan.	62
Abbildung 10: Funktionelle Analyse von F159A.	63
Abbildung 11: Funktionelle Analyse von G401S (<i>OCT1*4</i>).	64
Abbildung 12: Funktionelle Analyse von M420del (<i>OCT1*2</i>).	65
Abbildung 13: Funktionelle Charakterisierung von S14F (<i>OCT1*7</i>).	66
Abbildung 14: Funktionelle Analyse von S189L (<i>OCT1*10</i>).	67
Abbildung 15: Funktionelle Analyse von T245M (<i>OCT1*13</i>).	68
Abbildung 16: Funktionelle Charakterisierung von I449T (<i>OCT1*11</i>).	69
Abbildung 17: Clusteringanalyse zum Transportverhalten der untersuchten genetischen Varianten bei einer Konzentration deutlich unter der K_m des jeweiligen Substrats (Konzentration 1).	72
Abbildung 18: Clusteringanalyse zum Transportverhalten der untersuchten genetischen Varianten im Konzentrationsbereich, in dem die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} erreicht ist ($\sim v_{max}$).	74
Abbildung 19: Clusteringanalyse zum Transportverhalten der untersuchten genetischen Varianten unter Berücksichtigung der Veränderung der K_m bei Konzentrationen deutlich unter der K_m des jeweiligen Substrats (Konzentration 1).	75
Abbildung 20: Vergleich der Clusteringanalyse zum Transportverhalten der untersuchten genetischen Varianten bei einer Konzentration deutlich unter der K_m des jeweiligen Substrats (Konzentration 1) mit Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe	76

Die aufgeführten Abbildungen wurden eigenständig angefertigt.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primer für Validierungs-PCRs.....	18
Tabelle 2: Sequenzierungsprimer	19
Tabelle 3: Kommerziell erworbene Plasmide	19
Tabelle 4: pcDNA5–Plasmide.....	19
Tabelle 5: Reaktionsgemisch PCR 1	24
Tabelle 6: Reaktionsbedingungen PCR 1.....	24
Tabelle 7: Reaktionsgemisch PCR 2.....	25
Tabelle 8: Reaktionsbedingungen PCR 2.....	25
Tabelle 9: Reinigungsgemisch für PCR 2-Produkt.....	26
Tabelle 10: Reaktionsgemisch PCR 3.....	26
Tabelle 11: Reaktionsbedingungen PCR 3	27
Tabelle 12: 1 x TBE-Puffer (pH 8,3).....	27
Tabelle 13: 5 x Ladepuffer	27
Tabelle 14: Reaktionsgemisch Sequenzierungs-PCR	28
Tabelle 15: Reaktionsbedingungen Sequenzierungs-PCR.....	29
Tabelle 16: Master Mix für cDNA-Synthese.....	31
Tabelle 17: Master Mix für die quantitative Echtzeit-PCR.....	32
Tabelle 18: Reaktionsbedingungen der quantitativen Echtzeit-PCR	32
Tabelle 19: RIPA-Puffer.....	38
Tabelle 20: Substrate und verwendete Detektionsmethoden	38
Tabelle 21: Messeinstellungen ASP+	39
Tabelle 22: Übersicht über die Probenaufbereitung für die Detektion intrazellulärer Substratkonzentrationen via LC-MS/MS	40
Tabelle 23: Parameter für die Detektion intrazellulärer Substratkonzentration via LC-MS/MS	41
Tabelle 24: Reaktionsgemisch BCA.....	41
Tabelle 25: 10x Blocking-Puffer.....	42
Tabelle 26: Validierungsergebnisse stabil transfizierter HEK293-Zelllinien	49
Tabelle 27: Übersicht verwendeter OCT1-Substrate und Konzentrationen zur Durchführung systematischer Mutationsanalysen.....	50
Tabelle 28: OCT1-vermittelte Aufnahme bei Konzentrationen deutlich unter der K_M (in Prozent des Wildtyps).	52
Tabelle 29: OCT1-vermittelte Aufnahme im Konzentrationsbereich, in dem die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} erreicht ist (in Prozent des Wildtyps).....	53
Tabelle 30: OCT1-vermittelte Aufnahme bei Konzentrationen deutlich unter der K_M (in Absolutwerten).....	54
Tabelle 31 OCT1-vermittelte Aufnahme im Konzentrationsbereich, in dem die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} erreicht ist (in Absolutwerten).....	55
Tabelle 32: Veränderung der K_m bei Konzentrationen deutlich unter der K_M (in Prozent des Wildtyps).	56
Tabelle 33: Chemische und molekulare Eigenschaften der verschiedenen Substratgruppen und Cycloguanil.....	73

Abkürzungsverzeichnis

ASP+	4-(4-(Dimethylamino)styryl)-N-methylpyridinium
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	<i>et alii</i>
<i>ExoI</i>	<i>Exonuklease I</i>
FA	<i>Formic Acid</i> ; Ameisensäure
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> (Fetales Kälberserum)
Flp	Flippase
FRT	<i>FLP Recognition Target</i>
GFP	<i>Green Flourescent Protein</i>
HBSS	<i>Hank's Buffered Salt Solution</i>
HCl	Salzsäure
HEK293	<i>Human Embryonic Kidney Cells 293</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hOCT1	<i>Human Organic Cation Transporter 1</i>
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MPP+	1-Methyl-4-phenylpyridinium
NaCl	Natriumchlorid
NP-40	<i>Nonyl Phenoxy polyethanol – 40</i>
OCT1	<i>Organic Cation Transporter 1</i>
PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i> ; Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> ; Polymerasekettenreaktion
PS	Penicillin/Streptomycin

RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation Assay Buffer</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkriptase
SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
SLC	<i>Solute Carrier</i>
TBE - Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBP	<i>TATA-binding Protein</i>
TEA ⁺	Tetraethylammonium
v/v	<i>Volume per Volume</i> ; Volumenprozent
w/o	<i>Without</i>
w/v	<i>Weight per Volume</i> ; Trockengewicht pro Volumen

1 Einleitung

1.1 Pharmakokinetik und die Bedeutung des Membrantransports für das ADME-Prinzip

Sobald dem menschlichen Organismus Medikamente oral zugeführt werden, werden diese vor allem im Zwölffingerdarm in das Blutplasma absorbiert. Dabei müssen Medikamente biologische Membranen permeieren. Zellmembranen bestehen aus einem Lipidbilayer mit darin eingelagerten Proteinen. Medikamente mit lipophilen Eigenschaften können durch biologische Membranen diffundieren, während Medikamente mit hydrophilen Eigenschaften auf Membrantransporter angewiesen sind. Dies trifft auch auf organische Kationen zu, vor allem beim Übertritt aus dem systemischen Blutkreislauf über die sinusoidale Plasmamembran in die Hepatozyten.

Alternativ können Medikamente auch beispielsweise durch intravenöse Injektion direkt in das Blutplasma gelangen. Die Distribution bzw. Verteilung des Medikaments in die jeweiligen Organe erfolgt folgerichtig über das Blut. Unter dem Begriff Invasion werden die Absorption und die Distribution subsumiert.

Zeitgleich erfolgt die Metabolisierung des Medikaments, zum Beispiel in der Leber. Dabei können Phase-I- und Phase-II-Reaktionen unterschieden werden. In Phase-I-Reaktionen können funktionelle Gruppen der zu metabolisierenden Substanz entweder freigelegt oder angefügt werden. Typische Reaktionen sind Hydroxylierungen oder Oxidationen. Darauf folgend werden in Phase-II-Reaktionen die funktionellen Gruppen in Glucuronidierungs- oder Acetylierungsreaktionen konjugiert. Phase-I-Reaktionen können entfallen, wenn funktionelle Gruppen an dem zu metabolisierenden Medikament bereits vorhanden sind. Die Konjugation erzeugt eine hohe Polarität und gute Wasserlöslichkeit der Metaboliten, sodass eine effiziente renale oder biliäre Ausscheidung bzw. Elimination gewährleistet ist. Die beschriebenen Prozesse der Absorption, Distribution, Metabolisierung und Elimination nach Applikation eines Medikaments werden auch unter dem ADME-Prinzip zusammengefasst.

Die Metabolisierung und die daraus resultierende Inaktivierung bzw. Aktivierung im Falle von sogenannten Pro-Drugs vieler Medikamente erfolgt also maßgeblich in der Leber. Ein Anteil des Medikaments kann sogar direkt nach der Resorption und vor dem Erreichen des

systemischen Blutkreislaufs in der Leber metabolisiert werden, dies ist der sogenannte First-Pass-Effekt.

1.2 Die Familie der organischen Kationentransporter

Organische Kationen sind entweder körpereigene Substanzen oder Substanzen nicht-endogenen Ursprungs. Zu den endogenen Substanzen gehören Neurotransmitter, wie z. B. Serotonin (Li 2006), wohingegen bei den Substanzen nicht-endogenen Ursprungs einerseits das Vitamin B₁ Thiamin genannt sei, andererseits aber vor allem Medikamente anzuführen sind. Dazu gehören das Antidiabetikum Metformin oder das Migränetherapeutikum Sumatriptan. Diese Substanzen können aufgrund ihrer Hydrophilie, ihrer starken basischen Eigenschaften oder aufgrund ihrer positiven Ladung die Barriere der Plasmamembran via Diffusion nicht überbrücken. Sie benötigen einen proteinvermittelten Transport, um in die Hepatozyten zu gelangen und dort weiter metabolisiert zu werden. Der polyspezifische organische Kationentransporter OCT1 (*SLC22A1*) ist stark in der sinusoidalen Membran (Abbildung 1) der Hepatozyten exprimiert und kann diese Aufnahme vermitteln (Gorboulev et al. 1997; Nies et al. 2009; Zhang et al. 1997).

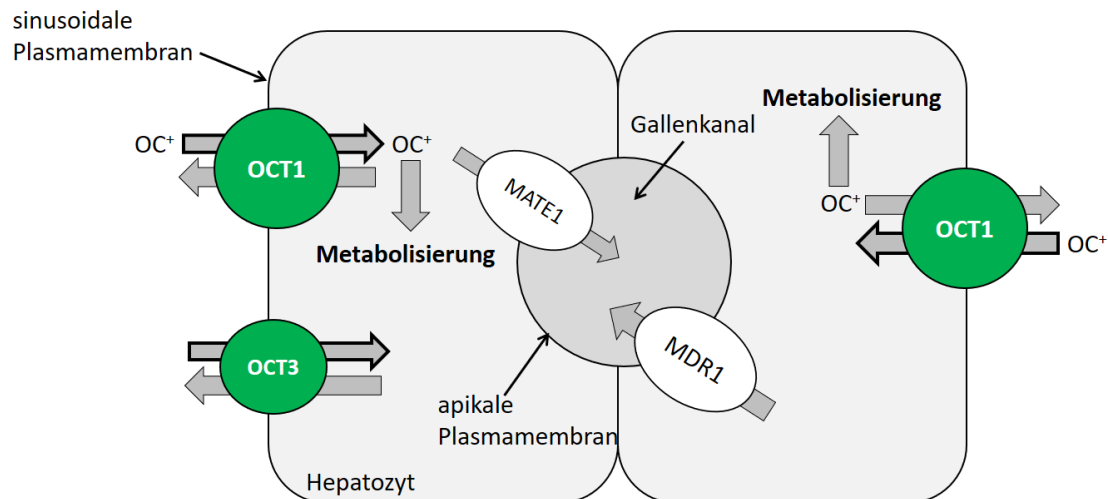


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Transports und der Metabolisierung von organischen Kationen in humanen Hepatozyten. Organische Kationen werden durch den humanen OCT1 über die sinusoidale Plasmamembran in die Hepatozyten transportiert. Neben OCT1 finden sich auch weitere organische Kationentransporter, wie OCT3, an der sinusoidalen Plasmamembran. Die Sekretion organischer Kationen in den Gallenkanal kann durch MATE1 und MDR1 vermittelt werden. OC⁺ = organische Kationen; MATE1 = Multidrug and Toxin Extrusion Protein 1; MDR1 = Multidrug-Resistance-Protein 1

Die organischen Kationen werden von Transportern in die Zellen aufgenommen, die zur sogenannten *Solute Carrier*-Familie 22 und 47 gehören. Die organischen Kationentransporter (OCT1–3) gehören zur Familie SLC22. Diese Transporterfamilie gehört zu der Obergruppe der *Major Facilitator Superfamily* (Burckhardt 2005) und beinhaltet neben OCT1–3 zehn weitere Transporter, zu denen auch die organischen Anionentransporter (OAT) gehören. Die *Major Facilitator Superfamily* stellt die zweitgrößte Transporterfamilie nach der Familie der ABC-Transporter (*ATP-binding cassette*) dar (Pao et al. 1998).

Die treibende Kraft für die Funktion der organischen Kationentransporter ist der elektrochemische Gradient (Koepsell 2011). Es handelt sich um einen elektrogenen Transport. Der Transport ist unabhängig von Natrium, Chlorid- oder von Protonengradienten. Der Transportvorgang ist reversibel, er kann also in beide Richtungen über die Plasmamembran abhängig vom Konzentrationsgradienten stattfinden (Koepsell 2011).

Die drei organischen Kationentransporter OCT1, OCT2 und OCT3 zeigen Substratspezifitäten, die zum Teil überlappen (Koepsell 2013). Dabei agieren die Transporter polyspezifisch, d. h. die Transporter können viele verschiedene Substrate binden. Die Substrate können jedoch strukturell sehr unterschiedlich aufgebaut sein (Ahlin et al. 2008; Hacker et al. 2015; Hendrickx et al. 2013; Kido et al. 2011). Allerdings reichen geringfügige Veränderungen der Struktur eines Substrats aus, damit dieses nicht mehr durch OCT1 transportiert wird. Beispielsweise ist das Opioid-Analgetikum Morphin ein Substrat von OCT1. Codein hingegen zeigt eine Methylierung der phenolischen Hydroxylgruppe am Grundgerüst des Morphins und ist kein Substrat des OCT1 (Tzvetkov et al. 2013).

1.3 Struktur und Funktion des OCT1

Das OCT1-Protein besteht aus 554 Aminosäuren. OCT1 weist 12 transmembranäre Domänen auf. Der N- und C-Terminus des Proteins liegen intrazellulär. Dabei ist das Protein aus zwei pseudosymmetrischen Hälften aufgebaut, wobei jede Hälfte sechs der zwölf Transmembrandomänen beinhaltet. Die Transmembrandomänen eins und zwei werden durch einen extrazellulären Loop miteinander verbunden. Der Loop ist glykosyliert (Zhang et al. 1997) und ist essentiell für die korrekte Lokalisierung der OCT1 an der Plasmamembran (Keller et al. 2011). Weiterhin besteht das Protein aus einem intrazellulären Loop zwischen den Transmembrandomänen sechs und sieben. Dieser Loop zeigt Stellen für

Phosphorylierungen und damit eine Möglichkeit zur kurzfristigen Regulation des Proteins (Koepsell et al. 2007).

Der Transportmechanismus ist ein erleichtertes Diffusionssystem. Ein anerkanntes Modell, das diesen Transport beschreibt, ist das sogenannte *Alternating Access Model*. Das zu transportierende Substrat bindet in der *outward-facing conformation* extrazellulär an die Substratbindetasche. Während der Translokation über die Plasmamembran durchläuft der Transporter einen Zustand, in dem das Substrat vollständig vom Transporter umschlossen wird. Dieser Zustand wird *occluded state* genannt. Sobald der Transporter die sogenannte *inward-facing conformation* erreicht, wird das Substrat aus der Substratbindetasche in das Zytosol freigesetzt. Die leere Tasche kehrt in den Ausgangszustand zurück (Koepsell 2011; Volk et al. 2009). Der Translokationsprozess und vor allem das Umschließen des Substrats während der Passage der Plasmamembran macht strukturelle Veränderungen des Proteins erforderlich. Es wird vermutet, dass sich in den offenen Konformationen die pseudosymmetrischen Hälften im Ganzen verschieben. Wird das Substrat vollständig umschlossen, zeigen die einzelnen Transmembrandomänen ein strukturelles Abknicken zusätzlich zu den Bewegungen der Proteinhälften (Gorbunov et al. 2008). Dieses Abknicken wird durch Konformationsveränderungen in den Transmembrandomänen fünf, acht und elf gewährleistet (Egenberger et al. 2012).

1.4 Genetische Variabilität des OCT1

Das humane OCT1-Gen (auch als *SLC22A1* bekannt) befindet sich gemeinsam mit dem OCT2- und OCT3-Gen auf dem langen Arm von Chromosom 6 (6q26-q27). Das Gen weist 10 Introns und 11 Exons auf.

OCT1 ist hochgradig genetisch variabel. Vergleicht man den humanen OCT1 mit anderen organischen Kationentransportern, so fällt auf, dass dieser die mit Abstand höchste absolute Anzahl an Polymorphismen vorweist (Tzvetkov et al. 2016). Genetische Polymorphismen können zu interindividuellen Unterschieden in der hepatischen Aufnahme und in der Metabolisierung führen. Das kann zu Unterschieden in der systemischen Blutplasmakonzentration von Medikamenten führen. Daraus können unterschiedliche Vorteile oder Risiken für den jeweiligen Patienten resultieren.

Bei den ersten systematischen Resequenzierungen des OCT1-Gens, die im Jahr 2002 durchgeführt worden sind, wurden 25 Nukleotidvarianten detektiert (Kerb et al. 2002).

Daraufhin wurden für 16 der 25 Varianten Frequenzen für das Auftreten der Polymorphismen in der kaukasischen Population bestimmt. Acht dieser Varianten führten zu einer Aminosäuresubstitution in der kodierenden Region des OCT1 (Kerb et al. 2002). Kurz darauf wurden fünf Varianten detektiert, die die Funktion des OCT1 herabsetzen (Shu et al. 2003). Ein vertiefender globaler Überblick wurde 2015 veröffentlicht (Seitz et al. 2015). Weltweit wurden dabei aus 67 Populationen über 2000 Personen untersucht. Dabei wurden 44 Varianten in der kodierenden Region des OCT1 gefunden. Davon führen 29 Varianten zu Aminosäuresubstitutionen (Seitz et al. 2015). Fünf Polymorphismen sind besonders hochfrequent in der kaukasischen Population vertreten: vier Aminosäuresubstitutionen R61C, C88R, G401S und G465R und die Deletion der Aminosäure Methionin an Position 420 (M420del) (Tzvetkov et al. 2016).

M420del (*OCT1*2*)

Die M420del ist mit Abstand der am häufigsten vorkommende Polymorphismus (Tzvetkov et al. 2016). Eine Besonderheit ist die weltweite Präsenz des Polymorphismus, im Mittel liegt die Allelfrequenz für M420del bei 12,2 % (Seitz et al. 2015). Allerdings zeigten weltweite Analysen zur genetischen Variabilität von OCT1, dass über 80% der Population des indigenen südamerikanischen Surui-Stamms homozygote Träger von OCT1*2 sind. Die betroffene Aminosäure befindet sich in der neunten Transmembrandomäne. Die subzelluläre Lokalisation des OCT1 verändert sich nicht durch die M420del. OCT1*2 ist, ähnlich dem OCT1-Wildtyp auf der Plasmamembran zu finden (Ahlin et al. 2011; Seitz et al. 2015).

Während man bei vielen Polymorphismen von einem generellen Funktionsverlust sprechen kann, ist der Effekt der M420del komplex, da dieser abhängig vom untersuchten Substrat ist. Man spricht von sogenannten substratspezifischen Effekten. So wird die OCT1-vermittelte Aufnahme von ASP⁺ (4-(dimethylamino)styryl)-N-methylpyridinium kaum beeinflusst (Ahlin et al. 2011). Die Aufnahme des Opioid-Analgetikums Morphin entspricht hingegen nur 25 % der Wildtypaktivität (Tzvetkov et al. 2013). Noch stärker war die OCT1-vermittelte Aufnahme des Antiemetikums Tropisetron mit nur 20% der Wildtypaktivität eingeschränkt (Tzvetkov et al. 2012). Die Aufnahme des Opioidanalgetikums O-desmethyltramadol war sogar nicht detektierbar (Tzvetkov et al. 2011). Deshalb kann nur ausgehend von dem untersuchten Substrat von einem aktiven oder inaktiven Allel gesprochen werden.

Tzvetkov et al. zeigten, dass M420del ausschließlich mit dem Valin₄₀₈-Allel (M420del/M408V) und nicht in Kombination mit dem Methionin₄₀₈-Allel vorkommt

(Tzvetkov et al. 2014). Die substratspezifischen Effekte werden dadurch aber kaum beeinflusst. Deshalb wurde auch in dieser Arbeit M420del immer in Kombination mit dem M408V-Allel untersucht.

R61C (*OCT1*3*)

Die Substitution der Aminosäure Arginin durch Cystein an Position 61 (R61C) führt zu keinem substratspezifischen Effekt, sondern zu einer herabgesetzten OCT1-vermittelten Aufnahme für alle untersuchten Substrate (Tzvetkov et al. 2016). Die Transportleistung des OCT1 ist für Metformin um 91 % reduziert (Ahlin et al. 2011), die für Morphin um 86 % (Tzvetkov et al. 2013).

R61C tritt populationsspezifisch auf, da in asiatischen und afrikanischen Populationen R61C nicht vorzufinden ist, in der kaukasischen Population ist die Substitution ein häufiger Polymorphismus mit einer Allelfrequenz von 2,14 % (Seitz et al. 2015). Arginin₆₁ befindet sich im extrazellulären Loop zwischen der ersten und zweiten Transmembrandomäne (Shu et al. 2003). Im Gegensatz zum Wildtyp ist die Expression des OCT1 auf der Plasmamembran signifikant erniedrigt, da eine vermehrte zytosolische Retention vorliegt (Ahlin et al. 2011).

G401S (*OCT1*4*)

Auch die Substitution der Aminosäure Glycin an Position 401 durch Serin (G401S) tritt nur in der kaukasischen Population auf (Seitz et al. 2015). Weltweit liegt die Allelfrequenz bei 0,57 % (Seitz et al. 2015), in der kaukasischen Bevölkerung allerdings bei 2 % (Tzvetkov et al. 2016).

Glycin₄₀₁ ist eine Aminosäure, die auch in den verwandten OCT2 und OCT3 auftritt (Shu et al. 2003). Shu et al. vermuten, bei Glycin₄₀₁ handele es sich um eine für die Funktion des OCT1 essentielle Aminosäure. Glycin₄₀₁ befindet sich im intrazellulären Loop, welcher die achte und neue Transmembrandomäne verbindet (Tzvetkov et al. 2016). G401S verursacht eine starke Funktionseinschränkung, obwohl es korrekt auf der Plasmamembran lokalisiert ist (Seitz et al. 2015). Der Effekt ist nicht substratspezifisch, sondern umfasst alle Substrate, die bisher untersucht wurden – mit einer Ausnahme: das β 2-Sympathomimetikum und Tokolytikum Fenoterol (Tzvetkov et al. 2017).

G465R

Auch der Austausch von Glycin durch Arginin an Position 465 (G465R) in der elften Transmembrandomäne ist ein genetischer Polymorphismus, der sich nur in der kaukasischen Population findet. Im Mittel liegt die Allelfrequenz weltweit bei 0,65 % (Seitz et al. 2015), in der kaukasischen Population aber erreicht sie bis zu 5 % (Tzvetkov et al. 2016).

Glycin₄₆₅ tritt auch in den verwandten OCT2 und OCT3 auf, auch hier ist von einer evolutionären Konservierung der Aminosäure auszugehen und von einer immensen Bedeutung für die Funktionstüchtigkeit des OCT1 (Shu et al. 2003). Die Expression des Transporters auf der Plasmamembran ist durch die Substitution signifikant erniedrigt (Ahlin et al. 2011; Shu et al. 2003) bis gar nicht vorhanden (Seitz et al. 2015). Das Protein ist komplett inaktiv (Tzvetkov et al. 2016), der Transport für alle untersuchten Substanzen u. a. auch Morphin ist nicht möglich (Tzvetkov et al. 2013). Die Substitution G465R tritt nur in Kombination mit M420del auf, zusammen bilden sie das Allel *OCT1*5* (Tzvetkov et al. 2016).

C88R

Der seltenste der funktionellen OCT1-Polymorphismen ist C88R. Diese Substitution tritt nur in der kaukasischen Bevölkerung auf (Tzvetkov et al. 2016). Die Allelfrequenz in Kaukasier liegt bei 0,59 % (Seitz et al. 2015).

Cystein₈₈ ist im größten extrazellulären Loop lokalisiert, der die erste und zweite Transmembrandomäne verbindet. Cystein ist an der Ausbildung von Disulfidbrücken beteiligt. Diese sind bedeutend für die Homooligomerisierung des Transporters und für die korrekte Lokalisation auf der Plasmamembran, weshalb es bei der Substitution des Cysteins zu einer starken Funktionseinschränkung des OCT1-Proteins kommt (Keller et al. 2011). Das Allel *OCT1*6* besteht aus der Substitution C88R und der M420del. Sie kodieren ein inaktives Protein, auch die Lokalisation auf der Plasmamembran ist signifikant herabgesetzt (Tzvetkov et al. 2016).

1.5 Auswirkung von genetischen Varianten auf die Pharmakokinetik und Wirkung von Pharmaka

Es stellt sich die Frage nach der klinischen Relevanz des häufigen genetisch bedingten Verlusts der OCT1-Aktivität. Anhand der Anzahl der aktiven Allele des OCT1, kann eine

Kategorisierung eines Patienten erfolgen. Liegen bei einem Patienten zwei aktive Allele vor, so kann dieser als *extensive transporter* bezeichnet werden. Bei einem defizienten Allel spricht man von *intermediate transporters* und sollte kein aktives Allel vorliegen, so spricht man von *poor transporters* (Tzvetkov et al. 2016).

In der europäischen Population lagen bei durchschnittlich 53 % der untersuchten Probanden zwei aktive Allele vor, 38 % waren *intermediate transporters* und bei weiteren 8 % lag kein aktives OCT1-Allel vor (Seitz et al. 2015). Diese Verteilung ist abhängig von der betrachteten Population, sodass es weltweit Unterschiede gibt. Bei Individuen aus Japan und Ozeanien liegen ausschließlich zwei vollständig aktive Allele vor. Andererseits sind mehr als 80% der Surui-Indianer, Anhänger eines indigenen südamerikanischen Stammes, *poor OCT1 transporter* (Seitz et al. 2015).

Genetische Polymorphismen können zu interindividuellen Unterschieden in der hepatischen Aufnahme, Metabolisierung und in der systemischen Blutplasmakonzentration von Medikamenten führen. Sollte Patient A ein *poor transporter* sein, so wird der Transport des Medikaments in die Hepatozyten eingeschränkt. Die Plasmakonzentration eines in der Leber zu metabolisierenden Medikaments steigt im Vergleich zu einem Patienten B, der zwei aktive OCT1 Allele hat, an. Dies führt zu einer überhöhten Wirkung des Medikaments, aber auch zu einem erhöhten Risiko von unerwünschten Wirkungen. Andererseits existieren Medikamente, die spezifisch in der Leber wirken sollen. Hier führt das Vorliegen von zwei inaktiven Allelen zu einer niedrigeren intrahepatischen Konzentration der jeweiligen Substanz, sodass die Wirksamkeit der Substanz signifikant erniedrigt ist (Tzvetkov et al. 2016).

Konkret zeigten beispielsweise Fukuda et al. bei *poor transporters* eine um 20% erniedrigte Morphin-clearance im Vergleich zu Trägern des Wildtypallels (Fukuda et al. 2013).

Für O-desmethyltramadol, den aktiven Metaboliten des Tramadols, konnten Tzvetkov et al. bei *poor transporters* eine doppelt so hohe Plasmakonzentration im Vergleich zu *extensive bzw. intermediate transporters* nachweisen (Tzvetkov et al. 2011). Dies führte zu verstärkten unerwünschten Arzneimittelwirkungen, wie einer längeranhaltenden und stärker ausgeprägten Miosis.

Matic et al. untersuchten kürzlich Neugeborene, die postoperativ eine Tramadolinfusion erhielten (Matic et al. 2016). Es wurde bei *extensive transporters* im Vergleich zu *intermediate bzw. poor transporters* ein signifikant geringeres Verhältnis vom aktiven O-desmethyltramadol zu Tramadol im Blutplasma beobachtet. Dies bedeutet, dass durch die defiziente OCT1-Aktivität die Plasmakonzentration von O-desmethyltramadol bei *intermediate bzw. poor*

transporters höher ist. Deshalb ist auch schon bei Neugeborenen mit verstärkten unerwünschten Arzneimittelwirkungen zu rechnen.

Darüber hinaus existieren bereits Daten, dass der genetisch bedingte OCT1-Verlust zu einer Veränderung der Pharmakokinetik von weiteren Medikamenten, wie Metformin (Shu et al. 2007), Morphin (Tzvetkov et al. 2013), Sumatriptan (Matthaei et al. 2016), Fenoterol (Tzvetkov et al. 2017) und weiteren führt. Auch andere Medikamente sind schon *in vitro* als OCT1-Substrate identifiziert worden (Hendrickx et al. 2013), hierzu existieren aber keine klinischen Daten über die Effekte in Patienten.

1.6 Substratspezifische Effekte und Polyspezifität des OCT1

1.6.1 Substratspezifität

Bei der Kategorisierung in *extensive*, *intermediate* und *poor transporters* muss aufgrund der substratspezifischen Effekte die Abhängigkeit vom untersuchten Substrat berücksichtigt werden. Dies zeigt folgende Verteilung für Sumatriptan oder Fenoterol, für diese Substanzen ist das Allel *OCT1*2* aktiv: Nur 22 % sind *intermediate transporters*, weitere 2,4 % sind *poor transporters*. Deshalb sind zwischen 2,4 und 8 % (insgesamt finden sich in der europäischen Bevölkerung 8% *poor transporters*) der kaukasischen Bevölkerung als *poor transporters* anzusehen (Tzvetkov et al. 2016).

Der Grund für die substratspezifischen Effekte ist der Verlust der Seitenkette der Aminosäure Methionin₄₂₀ (Seitz 2016). Eine andere Hypothese war die Interaktion von Methionin₄₂₀ mit Aminosäuren aus der siebten Transmembrandomäne, welche an dem Prozess der Substratbindung beteiligt zu sein scheinen (Seitz 2016). Durch die M420del wird Isoleucin₄₂₁ in die Position von Methionin₄₂₀ gezogen. Es entsteht ein sterischer Konflikt zwischen Isoleucin₄₂₁ und Leucin₃₆₄ und Histidin₃₆₇. Leucin und Histidin substituierten Seitz et al. durch Alanin, die durch ihre kleine Seitenkette den sterischen Konflikt lösen müsste. So sollten L364A und H367A mit dem M420del-Hintergrund eine dem Wildtyp entsprechende Aktivität zeigen (Seitz 2016). Allerdings zeigte sich eine starke Einschränkung der OCT1-Funktion für TEA⁺, ASP⁺ und MPP⁺ (Seitz 2016). Für TEA⁺ wurde zudem gezeigt, dass die Funktionseinschränkung unabhängig von M420del ist (Seitz 2016).

Interessante substratspezifische Effekte zeigen sich nach bisherigem Erkenntnisstand für M420del (*OCT1*2*, siehe Abschnitt 1.4) und S14F (*OCT1*7*), S189L (*OCT1*10*), T245M (*OCT1*13*), I449T (*OCT1*11*). S189L (*OCT1*10*) zeigte keinen Unterschied im Transport

von MPP⁺ im Vergleich zum Wildtyp, Metformin wurde aber deutlich schlechter transportiert (Shu et al. 2003; Shu et al. 2007). Für Metformin zeigte sich diese Beobachtung auch bei S14F (*OCT1*7*), da auch hier der OCT1-vermittelte Transport deutlich eingeschränkt war. Im Vergleich zum Wildtyp zeigte S14F allerdings einen stärkeren Transport für MPP⁺.

1.6.2 Polyspezifität

Die Polyspezifität erlaubt die Bindung und den Transport chemisch unterschiedlichster Substrate. Eine Hypothese zur Erklärung der Polyspezifität ist durch Mutationsanalysen entstanden und im Vorliegen von verschiedenen Bindungstaschen begründet. Diese könnten überlappend vorliegen, aber auch eine vereinzelt Positionierung der Bindungstaschen ist denkbar (Gorboulev et al. 1999). Durch Mutationsanalysen wurden für einzelne Kationen Affinitätsänderungen, also Veränderungen in der Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit K_m erreicht wird, beobachtet. Durch die künstliche Aminosäuresubstitution D475E wird die Affinität für 1-Methyl-4-Phenylpyridinium (MPP⁺) kaum beeinflusst, andererseits wird die K_m für Tetraethylammonium (TEA⁺) erniedrigt, die Affinität für TEA⁺ also erhöht (Gorboulev et al. 1999).

Trotzdem weisen die bisherigen OCT1-Untersuchungen einige Limitationen auf. Bis zum heutigen Tag existiert keine Kristallstruktur des OCT1. Die zur Verfügung stehenden Homologiemodelle sind auf der Basis der Kristallstruktur der Lactosepermease LacY von *E.coli* (Abramson et al. 2003) und dem Phosphattransporter PiPT des Pilzes *Piriformospora indica* (Pedersen et al. 2013) entstanden.

Viele der bisherigen Analysen sind nur mit einer begrenzten Zahl von Modellsubstraten durchgeführt worden. Naturgemäß haben diese Untersuchungen nur eine begrenzte Aussagekraft für die klinische Praxis, da Modellsubstrate zum Teil hochtoxisch sind und deswegen keine Anwendung in der Pharmakotherapie von Erkrankungen finden. Zudem decken Untersuchungen mit einer begrenzten Anzahl von Modellsubstraten nicht alle möglichen Interaktionen zwischen dem Substrat und dem Transporter ab.

1.7 Ziel der vorliegenden Arbeit

Die zentrale Idee dieser Arbeit ist eine Analyse der Effekte eines breiten Mutationsspektrums und die Untersuchung eines breiteren Substratspektrums mit stark unterschiedlichen Strukturen, um zusätzliche Ideen über den Transportmechanismus des OCT1 zu gewinnen.

Dabei sollen auch statistische Verfahren wie Clusteringanalysen der Daten eingesetzt werden, um möglichst unvoreingenommen und hypothesenfrei neue Erkenntnisse zu gewinnen.

Um das zu erreichen, habe ich 20 genetische Varianten untersucht, die in verschiedene Gruppen eingeteilt werden können:

- Substratspezifische Effekte verursachen S14F (*OCT1*7*), S189L (*OCT1*10*), T245M (*OCT1*13*), I449T (*OCT1*11*) und M420del (*OCT1*2*)
- Ein komplett inaktives Protein unabhängig vom untersuchten Substrat kodieren S29L (*OCT1*12*) und G465R/M420del (*OCT1*5*)
- Eine starke, aber nicht komplette Funktionseinschränkung des OCT1-Proteins unabhängig vom untersuchten Substrat zeigen R61C (*OCT1*3*), R206C/M420del (*OCT1*14*) und G401S (*OCT1*4*)
- *Gain-of-Function*-Varianten sind P117L (*OCT1*9*) und R488M (*OCT1*8*)
- Suballele, die nicht mehr als 50 % Zugewinn oder Verlust an OCT1-Aktivität zeigen (Seitz et al. 2015), sind F160L und R342H
- Künstliche Varianten sind F159A, W217Y, L364A, H367A, D474E und D474N

Die Varianten wurden mit den folgenden acht OCT1-Substraten untersucht: ASP⁺, Metformin, Morphin, Sumatriptan, Zolmitriptan, Ranitidin, Fenoterol und Cycloguanil.

Zudem wurden die künstlichen Aminosäuresubstitutionen L364A und H367A in HEK293-Zellen stabil transfiziert. Danach wurden L364A und H367A durch Mutationsanalysen auf substratspezifische Effekte untersucht, da diese nach bisherigem Erkenntnisstand für den Transport der Substrate TEA⁺, ASP⁺ und MPP⁺ bedeutsam sind.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
3130xl Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
7900 HT Fast Real Time PCR System	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
ABI Prism 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
API 4000 LC-MS/MS System	AB Sciex, Darmstadt, Deutschland
Autoklav Laboklav 55-195	SHP Steriltechnik, Detzel Schloss, Deutschland
Autosampler SIL-30AC	Shimadzu, Kyoto, Japan
Balance BP210S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Balance M-Pact AX2202	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Biological Safety Cabinet: CleanAir NSF 49	Cleanair, Woerden, Niederlande
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
CASY Zellzähler Modell TTC	Omni Life Science, Bremen, Deutschland
CASY Kapillare (150 µm)	Omni Life Science, Bremen, Deutschland
Controller CBM-20A	Shimadzu, Kyoto, Japan
CO ₂ -Brutschrank BBD6220	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Degasser 310SP	ERC, Riemerling, Deutschland
Dri-Block Heater DB3	Techne, Stone, Großbritannien
Elektrophoresekammer	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Fluor-S Multi Imager	BioRad, München, Deutschland
Heizplatte OTS 40	Medite, Burgdorf, Deutschland
Heraeus Multifuge X3	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
HPLC-Säule Brownlee SPP RP-Amide	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
Hybridisierungsöfen	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Kreisschüttler KS 260 Basic	IKA, Staufen, Deutschland
LaChrom Fluoreszenzdetektor L-7400	Merck Hitachi, Darmstadt, Deutschland

LaChrom HPLC System: Interface D-7000, Pumpe L-7100, Autosampler L-7200, Degasser L-7614	Merck Hitachi, Darmstadt, Deutschland
LaChrom L 7400 UV Detektor	Merck Hitachi Darmstadt, Deutschland
Laser Scanning Mikroskop LSM 710	Carl Zeiss Mikroskopie GmbH, Oberkochen, Deutschland
LiChrospher 100 CN Säule	Merck, Darmstadt, Deutschland
LiChrospher 100 CN Vorsäule	Merck, Darmstadt, Deutschland
LiChrospher 100 RP-18e	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnetrührer	IKA, Staufen, Deutschland
Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg, Germany
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss Mikroskopie GmbH, Oberkochen, Deutschland
Mini Laboratory Centrifuges Spectrafuge™	Labnet, Edison, USA
Minishaker MS2	IKA, Staufen, Deutschland
MultiScreen Column Loader	Merck, Darmstadt, Deutschland
Nanodrop Küvette	Implen, München, Deutschland
Plattformschüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
PTC-200 Thermal Cycler	BioRad, München, Deutschland
Pumpe LC-30AD mit Niederdruckventil	Shimadzu, Kyoto, Japan
QIAcube Roboter	Qiagen, Hilden, Deutschland
Sample Concentrator	Techne, Stone, Großbritannien
Säulenofen CTO-20AC	Shimadzu, Kyoto, Japan
Security Guard C18 Vorsäule	Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland
Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen, Deutschland
Tecan Ultra Microplate Reader	Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz
Thermal Cycler DNA Engine	BioRad, München, Deutschland
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Wasserbad GFL 1083	Schütt, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge 58010R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland

2.1.2 Utensilien

Utensil	Hersteller
384 Well PCR-Platte	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
96 Well Filterplatte MAHV N45	Merck, Darmstadt, Deutschland
96 Well MS-Collection Plate	Waters, Milford, MA, USA
96 Well PCR-Platte	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Adhesive sealing sheets	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Bi Cap Mate für 96 Well MS-Platten	Waters, Milford, MA, USA
CasyCups	Omni Life Science, Bremen, Deutschland
Combitips (500 µl, 2,5 ml, 5 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Corning 96 Well Mikroplatten, schwarz	Corning, Wiesbaden, Deutschland
Deckgläser	Gerhard Menzel, Braunschweig, Deutschland
Filterspitzen, steril (10, 100, 1000 µl)	Kisker, Steinfurt, Deutschland
Flachdeckelstrips, 8er	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
FrameStar 384 PCR-Platte	4titude, Wotton, Großbritannien
GelSaver II Pipettenspitzen 1- 200 µl	Kisker, Steinfurt, Deutschland
Glas-Pasteurpipetten 230 mm	Brand, Wertheim, Deutschland
Lab-Tek®II Chamber Slide	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Mikroröhre 2 ml mit Verschluss	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Nunc® CryoTubes® 1.8 ml	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Nunclon Multischalen 6 und 12 Wells	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Optically clear adhesive seal	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Petrischale für die Zellkultur, 100 mm	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Petrischale, 100 mm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen (10, 100 und 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen (2500 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Plattenhalter für die Sequenzierung	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 ml und 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Reaktionsgefäße 5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Serologische Pipetten (5, 10 und 20 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
TC-Platte 96 Well	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflasche 25 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflasche 75 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

2.1.3 Reagenzien, Chemikalien und Medikamente

Reagenzien und Chemikalien	Hersteller
2-Propanol $\geq 99,9$ %	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
2x Multiplex Master Mix	Qiagen, Hilden, Deutschland
4-Di-1-ASP	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Acetonitril	LGC Promochem, Wesel, Deutschland
Agarose UltraPure™	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Ameisensäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>Aquasafe 500 Plus Liquid Scintillator</i>	Zinsser Analytics, Frankfurt a.M., Deutschland
Bicinchoninsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
<i>Big Dye® Sequencing Kit</i>	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Borsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>Bovine Serum Albumin</i> ; Rinderalbumin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Bromphenolblau-Natriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
CasyTon	Omni Life Science, Bremen, Deutschland
Chloroform	J.T. Baker, Phillipsburg, USA
Chlorwasserstoff 32 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
DAPI	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dithiothreitol	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
DNA Leiter 1 kb	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland

DNA Leiter 100 bp	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
<i>DNeasy Blood and Tissue Kit</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland
dNTP Set (dATP, dCTP, dGTP und dTTP, jeweils 100 mM)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	Gibco, Darmstadt, Deutschland
EDTA Lösung, pH 8.0 (0,5 M)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol, vergällt 99 %	Zentralapotheke, Universitätsmedizin Göttingen
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>Expand Long Template PCR System</i>	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Fetales Kälberserum	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
<i>Fluoromount-GTM</i>	Southern Biotech, Birmingham, USA
<i>FuGENE[®] 6 Transfection Reagent</i>	Promega, Mannheim, Deutschland
Glycerol 85 %	Zentralapotheke, Universitätsmedizin Göttingen
Glycin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
HEPES	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Hygromycin B	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
<i>KOD Hot Start DNA Polymerase Kit</i>	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kupfer(II)sulfat-Pentahydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Magnesiumsulfat \geq 99,5 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	LGC Promochem, Wesel, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Nonidet [®] P40 (Nonylphenylethylenglycol)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
PBS-Puffer (10x Dulbecco's), Pulver	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Penicillin-Streptomycin, Lösung	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Poly-D-Lysin Hydrobromid, 1000 – 5000 g/mol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
ProLong [®] Gold Antifade Mountant	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland

<i>qPCR Master Mix</i>	Primer Design, Southampton, UK
<i>Q-Solution</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland
Random Hexamer Primers	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
RNase A	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
RNase Inhibitor	Affymetrix, Santa Clara, USA
RNaseZAP™	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
<i>RNeasy Plus Mini Kit</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland
Roti®-Block (10x)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Histofix 4 %, phosphatgepufferte Formaldehydlösung	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
SDS	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Sephadex G50 Superfine	GE Healthcare, Solingen, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
<i>SuperScript® II Reverse Transcriptase Kit</i>	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Tris Base	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton-X-100	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TrypLE™ Express	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland

Medikamente	Hersteller
Buforminhydrochlorid	Wako Chemicals, Neuss, Deutschland
Codeinsulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Fenoterolhydrobromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Fenoterol-d6	Toronto Research Chemicals, North York, Ontario, Kanada
Metforminhydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Morphinsulfat–Pentahydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Proguanil	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Proguanil-d6	Biozol Diagnostics, Eching, Deutschland
Ranitidin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ranitidin-d6	Toronto Research Chemicals, North York, Ontario, Kanada
Sumatriptansuccinat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Sumatriptan-d6	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Zolmitriptan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

2.1.4 Enzyme

Enzym	Hersteller
<i>EcoI</i>	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA

2.1.5 Antikörper

Primärantikörper	Hersteller	Verdünnung
<i>Monoclonal Mouse Anti-Human OCT1 (2C5)</i>	Novus Biologicals, Abingdon, Großbritannien	1:500
<i>Monoclonal Rabbit Anti-Na⁺/K⁺-ATPase (EP1845Y)</i>	Abcam Cambridge, Großbritannien	1:200
<i>Polyclonal Rabbit Anti-Calnexin</i>	Abcam, Cambridge, Großbritannien	1:1000
Sekundärantikörper	Hersteller	Verdünnung
<i>Alexa Fluor® 546 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), polyclonal</i>	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland	1:400
<i>Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse IgG (H+L), polyclonal</i>	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland	1:400

2.1.6 Primer

Tabelle 1: Primer für Validierungs-PCRs

Reaktion	Primer	Sequenz (5' → 3')	Amplikon (bp)
PCR 1	P _{SV40}	AGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGG	519
	P _{Hygr_r2}	ACGCCCTCCTACATCGAAGCTGAAA	
PCR 2	P _{CMV}	CCATGGTGATGCGGTTTGGCAGTA	3137
	P _{LacZ}	CCTTCCCTGTAGCCAGCTTTCATCAA	
PCR 3	P _{FRT_f}	AATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCC	214
	P _{Hygr_r}	CTTCGCCCTCCGAGAGCTGCATCAG	

Tabelle 2: Sequenzierungsprimer

Primer	Sequenz (5' → 3')
T245M_for	TACCAGATGGCCTTCATGGTGGGGCTGGTGGCG
M420I_rev	CAGGTGAGATAAAAATGATGACGAGGCAGGCTG
G465R_rev	GAACACACCATCACTCTGAGGTTCTGACGAAT

2.1.7 TaqMan® Assays

Gene of Interest	Spezies	Assay ID	Exongre nze	Fluoreszenzf arbstoff	Hersteller
SLC22A1	Human	Hs00427550_m1	4-5	FAM™	Applied Biosystems

Interne Kontrolle	Spezies	Zugriffsschlüssel	Bestellnum mer	Fluoreszenzf arbstoff	Hersteller
Hu TBP	Human	M55654.1	4326322E	VIC	Applied Biosystems

2.1.8 Plasmide

Tabelle 3: Kommerziell erworbene Plasmide

Plasmid	Erhalten von
pOG44	Thermo Fisher Scientific
pcDNA5/FRT	Thermo Fisher Scientific

Tabelle 4: pcDNA5–Plasmide

pcDNA5–Plasmide	Erhalten von
pcDNA5::hOCT1-L364A/M408V	Tina Seitz
pcDNA5::hOCT1-H367A/M408V	Tina Seitz

2.1.9 Zelllinien

Zelllinie	Klon	Erhalten von
Flp-In TM T-REx TM 293 (im Folgenden HEK293 genannt)		Thermo Fisher Scientific
HEK293-pcDNA5	10 II	
HEK293-hOCT1	4 I	Ali Reeza Saadatmand
HEK293-hOCT1-S14F	8 II	
HEK293-hOCT1-S29L	7 I	Tina Seitz
HEK293-hOCT1-R61C	2 I	Ali Reeza Saadatmand
HEK293-hOCT1-P117L	8 II	Tina Seitz
HEK293-hOCT1-F159A/M408V/C450M	15	Marleen Meyer
HEK293-hOCT1-F160L	14	Sherin Pojar
HEK293-hOCT1-S189L	10 I	
HEK293-hOCT1-R206C/M408V/M420del	1 I	Tina Seitz
HEK293-hOCT1-W217Y/M408V	11	
HEK293-hOCT1-T245M	6 I	
HEK293-hOCT1-R342H/M408V	21	
HEK293-hOCT1-L364A/M408V	3	Im Rahmen dieser Arbeit generiert
HEK293-hOCT1-H367A/M408V	5	
HEK293-hOCT1-G401S		Ali Reeza Saadatmand
HEK293-hOCT1-M420del/M408V	2 I	Tina Seitz
HEK293-hOCT1-I449T	3 II	
HEK293-hOCT1-G465R/M420del		Ali Reeza Saadatmand
HEK293-hOCT1-D474E/M408V	1	Tina Seitz
HEK293-hOCT1-D474N/M408V	4	Marleen Meyer
HEK293-hOCT1-R488M	1	Sherin Pojar

2.1.10 Software und Datenbanken

Software	Firma
3130x1 Data Collection Software v3.0	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Adobe Photoshop CS2 v9.0	Adobe Systems GmbH, München, Deutschland
Clone Manager 6 v6.0	Sci Ed Central
Eppendorf BioPhotometer Online v1.01	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Graph Pad Prism v5.01	GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA
ImageJ v1.46r	National Institute of Health, Bethesda, USA
Microsoft Office 2013	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Quantity One v4.2.3 und v.4.6.7	BioRad, München, Deutschland
Sequencing Analysis Software v5.2	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Staden Package	SourceForge.net
XFluor4 v4.40	Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz
ZEN 2012 v8.0	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Deutschland

Datenbank	URL
PubChem	https://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
GeneCards	http://www.genecards.org

2.2 Methoden zur DNA-Analyse

2.2.1 Extraktion genomischer DNA

Für die Isolation genomischer DNA wurde das *DNeasy Blood and Tissue Kit* von Qiagen und der QIAcube Roboter benutzt. Dabei wurde das Protokoll des Herstellers befolgt. Als Voraussetzung wurden circa ein bis zwei Millionen HEK293-Zellen für vier Minuten bei 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) resuspendiert. Die DNA wurde durch den QIAcube Roboter extrahiert, das Elutionsvolumen betrug dabei 100 µl. Die resultierende DNA-Konzentration sollte zwischen 100 und 200 ng/µl liegen.

2.2.2 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die DNA- oder RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Dafür wurden 3 µl von der jeweiligen Nukleinsäure auf eine Nanodropküvette pipettiert. Es wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm unter Benutzung des Eppendorf BioPhotometers gemessen. Die Konzentration der jeweiligen Nukleinsäure wurde automatisch durch die BioPhotometer Online v1.01 Software berechnet. Dieser Berechnung liegen das Lambert-Beersche-Gesetz und die folgende Gleichung zugrunde:

$$c \left[\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}} \right] = \text{OD}_{260} \cdot \text{DF} \cdot \text{CF}$$

Dabei steht c für die jeweilige Konzentration, OD_{260} für die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm, DF ist der Verdünnungsfaktor der Probe und CF steht für den Konversionsfaktor, der 50 µg/ml für doppelsträngige DNA und 40 µg/ml für RNA beträgt. Die Reinheit der zu untersuchenden Nukleinsäure wurde wie folgt evaluiert: Proteine haben ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm. Da das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei 260 nm liegt, es aber dennoch zu einer signifikanten Absorption bei 280 nm kommt, sollte der Absorptionsquotient $\frac{260 \text{ nm}}{280 \text{ nm}}$ für DNA bei 1,8 und für RNA bei 2,0 liegen. Sollten die Werte kleiner als 1,8 bzw. 2,0 liegen, so ist von einer Kontamination der Probe mit Proteinen auszugehen. Betroffene Proben wurden dann nicht für weitere Analysen in Betracht gezogen.

2.2.3 Polymerase-Kettenreaktionen zur Validierung von stabil transfizierten HEK293-Zelllinien

Die erfolgreiche Integration des pcDNA5-Plasmids mit dem mutierten OCT1-Gen in das Genom der HEK293-Zellen nach erfolgter stabiler Transfektion kann durch drei integrationsspezifische Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) bestätigt werden. Die erste PCR wird durchgeführt, um die korrekte Integration des Expressionsvektors in das Genom der HEK293-Zellen zu bestätigen, indem das Hygromycin B-Resistenzgen amplifiziert wird, welches durch den Expressionsvektor kodiert wird. Die zweite PCR dient demselben Zweck, allerdings wird hier das zu untersuchende bzw. das betreffende Gen (*gene of interest*) detektiert. Um eine multiple Integration des Expressionsvektors in das Genom der HEK293-Zellen auszuschließen, wird eine dritte PCR durchgeführt. Hierbei entsteht nur ein PCR-Produkt, wenn mehr als eine Kopie des betreffenden Gens vorliegt. Das in diesem Fall vorliegende PCR-Produkt ist 214 bp groß, bei Vorliegen des PCR-Produkts werden betroffene Zelllinien nicht weiter für folgende Analysen in Erwägung gezogen. Als Voraussetzung für die Durchführung der jeweiligen PCR wurde zunächst genomische DNA aus stabil transfizierten HEK293-Zellen extrahiert, wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben. Die Primersequenzen sind in Tabelle 1 aufgeführt, Abbildung 2 zeigt die Bindungsstellen der Primer.

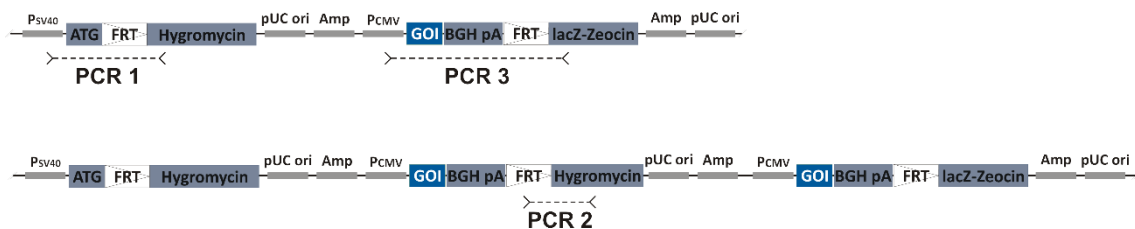


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Primerbindungsstellen für Validierungs-PCRs. PCR1 amplifiziert das Hygromycin B-Resistenzgen und führt zu einem 519 bp großen Amplikon. Mit der zweiten PCR wird das mutierte OCT1-Gen amplifiziert, das Amplikon ist 3137 bp groß. Das Amplikon des leeren pcDNA5-Vektors ist 1376 bp groß. PCR 3 führt nur im Falle einer mehrfachen Integration des pcDNA5-Vektors in das Genom der HEK293-Zellen zu einem 214 bp großen Amplikon.

Die Polymerase-Kettenreaktionen wurden wie folgt durchgeführt:

Tabelle 5: Reaktionsgemisch PCR 1

Reagenzien	Volumen [μ l]
ddH ₂ O	8,8
Q-Solution	4,4
10x KOD Puffer	2,2
dNTPs (2mM)	2,2
MgSO ₄	0,9
Primer PSV40 (100 μ M)	0,5
Primer Hyg_r2 (100 μ M)	0,5
Genomische DNA	2
KOD Polymerase	0,5
Gesamtvolumen	22

Tabelle 6: Reaktionsbedingungen PCR 1

Phase	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	2 Minuten	
Denaturierung	95	30 Sekunden	35
Primeranlagerung	64	30 Sekunden	
Elongation	72	1 Minute	
Finale Elongation	72	10 Minuten	
Kühlen	8	Unbegrenzt	

Tabelle 7: Reaktionsgemisch PCR 2

Reagenzien	Volumen [μl]
ddH ₂ O	9,3
Q-Solution	5,6
10x ExpandLong Puffer	2,8
dNTPs (2 mM)	4,5
MgSO ₄ (25 mM)	1,5
Primer forward (P _{LacZ} , 10 μM)	0,5
Primer reverse (P _{CMV} , 10 μM)	0,5
Genomische DNA	3
Expand Long Polymerase Mix	0,3
Gesamtvolumen	28

Tabelle 8: Reaktionsbedingungen PCR 2

Phase	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	94	2 Minuten	
Denaturierung	96	10 Sekunden	35
Primeranlagerung	60	20 Sekunden	
Elongation	68	5 Minute	
Finale Elongation	68	7 Minuten	
Kühlen	8	Unbegrenzt	

Von den ursprünglichen 22 (PCR 1) bzw. 28 μl (PCR 2) des jeweiligen amplifizierten PCR-Produkts werden je zehn μl auf einem 0,8 %-Agarosegel zusammen mit einer 1 kb DNA-Leiter als molekularem Marker aufgetragen. Das PCR-Produkt der ersten PCR ist 519 Basenpaare (bp) groß, das Produkt der zweiten PCR ist 3137 bp groß. Das Vorliegen der jeweiligen PCR-Produkte zeigt das amplifizierte Hygromycin-Resistenzgen (PCR 1) bzw. das zu untersuchende oder auch betreffende Gen (*gene of interest*; PCR 2). In letzterem Fall zeigt die Integration des leeren pcDNA5-Vektors ein Amplifikationsprodukt in der Größe

von 1376 bp. Dieser Vektor wird deshalb auch als Kontrolle bei der Gelelektrophorese verwendet. Das PCR-Produkt von PCR 2 wird für weitere Analysen, z.B. Kapillarsequenzierung nach Sanger, verwendet. Dafür muss das Produkt enzymatisch aufgereinigt werden. Aus diesem Grund wurden 0,3 μl *ExoI* und 2 μl SAP zu den 18 μl des PCR-Produkts pipettiert. Das Aufreinigungsgemisch wurde wie folgt angesetzt:

Tabelle 9: Reinigungsgemisch für PCR 2 - Produkt

Reagenzien	Volumen [μl]
SAP	2
<i>ExoI</i>	0,3
10x SAP Puffer	0,7
PCR 2 Produkt	18
Gesamtvolumen	21

Das Gemisch wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde danach durch eine 15-minütige Inkubation bei 80 °C gestoppt. Das auf diese Weise aufgereinigte PCR-Produkt wurde bei -20 °C gelagert.

Tabelle 10: Reaktionsgemisch PCR 3

Reagenzien	Volumen [μl]
ddH ₂ O	1,2
2x QIAGEN Master Mix	5,5
Q-Solution	2,2
10x Primer Mix (2 μM von P _{FRT_f} und P _{Hygr_r2})	1,1
Genomische DNA	1
Gesamtvolumen	11

Tabelle 11: Reaktionsbedingungen PCR 3

Phase	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	15 Minuten	
Denaturierung	94	30 Sekunden	35
Primeranlagerung	58	90 Sekunden	
Elongation	72	2 Minuten	
Finale Elongation	72	10 Minuten	
Kühlen	8	Unbegrenzt	

Hier wurden 10 µl des PCR-Produkts auf einem 1,5 %-Agarosegel zusammen mit einer 100 bp DNA-Leiter als molekularem Marker aufgetragen. Nur im Falle einer mehrfachen Integration entsteht ein Amplikon.

2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Tabelle 12: 1 x TBE-Puffer (pH 8,3)

Reagenzien	Konzentration [mM]
Tris	100
Borsäure	100
EDTA	3

Tabelle 13: 5 x Ladepuffer

Reagenzien	Konzentration
Glycerol	30 % (v/v)
EDTA	50 mM
Bromphenolblau	0,25 % (v/v)

Mithilfe der Agarose–Gelelektrophorese wurden DNA–Proben ihrer Größe nach aufgetrennt. Die DNA wandert dabei in einem elektrischen Feld in Richtung der Anode. Zu 70 ml des TBE–Puffers wurde dabei eine bestimmte Menge Agarose hinzugefügt, nämlich 0,56 g Agarose für ein 0,8 %-iges oder 1,05 g für ein 1,5 %-iges Gel. Im nächsten Schritt wurde die Agarose im Puffer gelöst, indem die Lösung bis zum Kochen erhitzt wurde. Nachdem die Lösung bei Raumtemperatur abkühlen konnte, wurde ihr 5 µl Ethidiumbromid hinzugefügt. Danach wurde die Lösung in eine Gelschale mit Gelkämmen gegossen. Sobald das Agarosegel fest geworden war, wurden die Kämmen entfernt. Das Gel wurde dann samt der Schale in eine Gelelektrophoresekammer platziert, wobei diese Kammer mit TBE-Puffer gefüllt ist. Diesem wurde hier 0,5 % Ethidiumbromid hinzugefügt. Die DNA–Proben wurden mit dem 5x Ladepuffer gemischt und auf das Gel aufgetragen. Eine DNA–Leiter (100 bp oder 1 kb DNA–Leiter) wurde auf das Gel aufgetragen und als molekularer Marker verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 120 V durchgeführt und das Gel wurde zuletzt unter UV–Licht visualisiert. Dabei wurde der *Fluor-STM Multi Imager* und die *Quantity One v4.2.3 Software* verwendet.

2.2.5 Sanger–Sequenzierung

Tabelle 14: Reaktionsgemisch Sequenzierungs-PCR

Reagenzien	Volumen [µl]
DMSO	0.25
Primer (10 µM)	0.5
BigDye®	1
ddH ₂ O	2.25
DNA	1
Gesamtvolumen	5

Tabelle 15: Reaktionsbedingungen Sequenzierungs-PCR

Phase	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	94	2 Minuten	
Denaturierung	96	15 Sekunden	35
Primeranlagerung	56,5	15 Sekunden	
Elongation	60	4 Minuten	
Finale Elongation	72	7 Minuten	
Kühlen	8	Unbegrenzt	

Die Sanger-Sequenzierung wurde durchgeführt, um die DNA-Sequenz der stabil transfizierten Klone zu validieren. Sie beruht auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger, bei der während der Synthese von DNA Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTPs) anstelle von Desoxynukleotidtriphosphaten eingebaut werden. Die DNA-Polymerase katalysiert die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-Hydroxylgruppe eines Nukleotids mit der 5'-Phosphatgruppe eines neu anzufügenden Nukleotids. Didesoxynukleotide zeigen aber nicht die für die Reaktion notwendige 3'-Hydroxylgruppe, sodass kein weiteres Nukleotid angefügt werden kann. Auf diese Weise wird die Synthese der DNA terminiert. Da der Einbau der ddNTPs zufällig geschieht, entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe, sodass diese durch die Kapillarelektrophorese ihrer Größe nach getrennt werden können. In diesem Fall wurde das *Big Dye® Sequencing Kit* benutzt, welches verschiedene fluoreszenzmarkierte ddNTPs enthält, um verschiedene DNA-Fragmente zu detektieren. Für die Sequenzierung wurde der *3130xl Genetic Analyzer* benutzt.

Es wurde eine Sequenzierungs-PCR (Tabelle 15) durchgeführt, bei der die in Tabelle 2 aufgeführten Primer verwendet wurden, um die mutierte Stelle der jeweiligen Zelllinie zu sequenzieren.

Das Produkt der Sequenzierungs-PCR wurde von Salzen und Nukleotiden, die nicht eingebaut wurden, durch Größenausschlusschromatographie gereinigt. Zur Vorbereitung der Sephadex-Säule wurden 35 mg Sephadex G50 Superfine in die Wells einer 96-Well-Filterplatte gegeben. 300 µl Wasser pro Well wurden hinzugegeben und drei Stunden inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das überschüssige Wasser durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 700 x g entfernt. Danach wurden 150 µl Wasser pro Well

pipettiert und 30 Minuten inkubiert. Danach wurde erneut für fünf Minuten bei 700 x g zentrifugiert, um das überschüssige Wasser zu entfernen.

Nach Ablauf der Sequenzierungs-PCR (Tabelle 14) wurde das PCR-Produkt auf ein Endvolumen von 40 µl mit ddH₂O verdünnt. Das Gesamtvolumen wurde auf die Sephadex-Säule gegeben. Die Platte wurde erneut bei 700 x g für fünf Minuten zentrifugiert. Dabei wurde das aufgereinigte Sequenzierungsprodukt in einer neuen 96-Well-Platte aufgefangen. Nach der Sequenzierung, die durch den *3130xl Genetic Analyzer* durchgeführt wurde, wurden die Daten durch Verwendung der Software *Sequencing Analysis v5.2* und des *Staden Package* sowie des *Clone Manager 6* ausgewertet.

2.3 Methoden zur RNA-Analyse

Durch die ubiquitäre Präsenz von RNasen, die RNA abbauen, ist RNA sehr instabil. Deshalb ist es unumgänglich, mit besonderer Vorsicht zu arbeiten und so die Kontamination mit RNasen zu vermeiden. Eine Maßnahme dabei ist das ständige Arbeiten mit Handschuhen. Diese müssen häufig gewechselt werden. RNA darf nur an einem besonderen Arbeitsplatz mit einem Abzug behandelt werden. An diesem Arbeitsplatz sind ausschließlich RNA-Arbeiten gestattet. Die Arbeitsfläche und die dort dauerhaft stationierten Pipetten müssen mit einer Dekontaminationslösung, RNaseZAP™, behandelt werden.

2.3.1 RNA-Extraktion

RNA von HEK293-Zellen wurde durch Verwendung des *RNeasy Plus Mini Kit* und des QIAcube Roboters extrahiert. Das Protokoll des Herstellers wurde dabei genau befolgt. Für die Extraktion wurden ein bis zwei Millionen HEK 293-Zellen für vier Minuten bei 400 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 350 µl RLT-Puffer Plus resuspendiert. Zu dem Puffer wurde 1 % β-Mercaptoethanol hinzugegeben (v/v). Der Puffer ist ebenfalls im o. g. Kit vorzufinden. Die RNA wurde dabei automatisch durch den QIAcube Roboter extrahiert. Die Elution erfolgt dabei mit RNase-freiem Wasser in einem Volumen von 50 µl.

2.3.2 cDNA-Synthese

Für die Synthese von komplementärer DNA (complementary DNA, cDNA) ist ausgehend von einer Vorlage in RNA-Form eine Reverse Transkriptionsreaktion notwendig. Die Reaktion wird dabei durch das gleichnamige Enzym, die Reverse Transkriptase, katalysiert. Dieses Enzym ist eine DNA-Polymerase, die RNA-abhängig arbeitet. Die Synthese von cDNA ist essentiell für mRNA-Expressionanalysen, z.B. quantitative Echtzeit-PCR (s. Abschnitt 2.3.3). Das *SuperScript® II Reverse Transcriptase Kit* (Thermo Fisher Scientific), *Random Primer* und ein RNase Inhibitor wurden für die cDNA-Synthese benötigt. Dafür wurde 1 µg RNA in einem Endvolumen von 17,75 µl RNase-freiem Wasser verdünnt. Daraufhin wurde 1 µl der *Random Primer* hinzugefügt und das Reaktionsgemisch wurde dann für zehn Minuten bei 72 °C inkubiert. Nach einer zehnminütigen Abkühlungsphase bei Raumtemperatur wurden 11,25 µl des cDNA Master Mix hinzugegeben.

Tabelle 16: Master Mix für cDNA-Synthese

Reagenzien	Volumen [µl]
5x RT Puffer	6
DTT (0.1 M)	3,5
dNTPs (10 mM)	1
RNase Inhibitor	0,5
SS II Reverse Transkriptase	0,25
Gesamtvolumen	11,25

Das nun vollständige Reaktionsgemisch wurde für eine Stunde bei 42 °C inkubiert. Die jetzt synthetisierte cDNA wurde in 70 µl ddH₂O verdünnt und bei -20 °C eingefroren.

2.3.3 Quantitative Echtzeit-PCR

Die mRNA-Expression kann durch die quantitative Echtzeit-PCR bestimmt werden. Mit dieser Methode kann der Zuwachs des amplifizierenden PCR-Produkts in Echtzeit detektiert werden. Dies gelingt, da die Proben fluoreszenzmarkiert sind. In der vorliegenden Arbeit wurden TaqMan® Genexpressionsassays verwendet, um den humanen OCT1 zu detektieren. Das humane *TATA-binding Protein* (TBP) wurde als endogene Kontrolle verwendet. Als Voraussetzung zur Durchführung der quantitativen Echtzeit-PCR wurde

RNA extrahiert (Abschnitt 2.2.1) und in cDNA transkribiert (Abschnitt 2.2.2). Dann wurde der für die PCR notwendige Master Mix wie folgt vorbereitet:

Tabelle 17: Master Mix für die quantitative Echtzeit-PCR

Reagenzien	Volumen [μ l]
2x qPCR Master Mix	9
20x TaqMan® Assay Mix	0.9
ddH ₂ O	5.1
Gesamtvolumen	15

In eine 384-Well PCR-Platte wurden 15 μ l des Master Mix und drei μ l der zuvor synthetisierten cDNA zusammengegeben. Dabei wurden alle Proben in Triplikaten gemessen. Die PCR-Platte wurde unmittelbar vor der Messung mit einer optisch durchsichtigen und klaren sowie adhäsiven Folie luftdicht verschlossen. Die Echtzeit-PCR wurde mit dem *7900 HT Fast Real Time PCR System* und unter folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt:

Tabelle 18: Reaktionsbedingungen der quantitativen Echtzeit-PCR

Phase	Temperatur [°C]	Zeit	Zykle n
Initiale Denaturierung und Aktivierung der Taq-Polymerase	95	10 Minuten	
Denaturierung	95	15 Sekunden	40
Primeranlagerung und Elongation	60	1 Minute	
Kühlen	8	Unbegrenzt	

Die relative OCT1-Expression wurde durch die $\Delta\Delta C_T$ -Methode (Livak und Schmittgen 2001) und die folgende Gleichung quantifiziert:

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{(-\Delta C_{T,s} - \Delta C_{T,r})} = 2^{-((C_{T\ target,s} - C_{T\ control,s}) - (C_{T\ target,r} - C_{T\ sample,r}))}$$

C_T	= threshold cycle (Schwellenzyklus)
S	= Zelllinie Sample (mutierter OCT1)
R	= Zelllinie Referenz (pcDNA5)
Target	= hOCT1
Control	= TBP

2.4 Zellkulturtechniken

2.4.1 Zellkulturbedingungen

Die Arbeit mit den verschiedenen Zelllinien wurde unter sterilen Bedingungen innerhalb einer sterilen Werkbank mit laminarer Luftströmung durchgeführt. Die Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit im CO₂-Inkubator BBD6220 kultiviert. Als Zellkulturmedium wurde *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) verwendet. Dem Zellkulturmedium wurde 10 % fetales Kälberserum (FCS) und 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (1 % PS) zugesetzt. Sobald die Zellen innerhalb der Zellkulturflasche eine Konfluenz von 80 % erreicht hatten, wurden die Zellen passagiert. Dafür wurden die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst, indem sie mit 12 ml frischem Zellkulturmedium vom Boden der Zellkulturflasche komplett abgespült wurden. Zwei Milliliter der Zellsuspension wurden in eine neue Zellkulturflasche mit frischem Zellkulturmedium transferiert.

2.4.2 Ausplattieren der Zellen

Die Zellen wurden hierbei durch Trypsinierung von der Zellkulturflasche abgelöst. Dafür wurden 3,5 ml der *TrypLE™ Express*-Lösung auf die Zellen pipettiert und bei 37° C für drei Minuten inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden 10 ml Zellkulturmedium der Flasche zugegeben, damit die Wirkung des Trypsins kompetiert wird. Die gesamte Zellsuspension wurde in ein 50-ml-Falcon-Röhrchen überführt. Das Röhrchen wurde dann für drei Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet wurde in 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Vor Beginn der hier dargestellten Arbeitsschritte wurde in einem sogenannten *CASYcup®*, ein spezielles Röhrchen, 10 ml der *CASYton®*-Flüssigkeit

abgefüllt. In dieses *CASYcup*® wurden 20 µl der resuspendierten Zellsuspension pipettiert. Zur automatischen Zellzählung wurde der *CASY*®-Zellzähler verwendet. Die automatisch berechnete Zellkonzentration wurde dann verwendet, um die für die folgenden Transportexperimente notwendige Anzahl an Zellen pro Well zu berechnen. Für Transportexperimente wurden Zellen in 12-Well-Platten ausplattiert. Die Platte wurde mit Poly-D-Lysin vorbehandelt, um die Adhäsion der Zellen zu ermöglichen bzw. zu verbessern. Dafür wurden 0,5 ml 2 mg/ml Poly-D-Lysin-Lösung in jedes Well pipettiert, sodass die komplette Oberfläche der Vertiefung benetzt ist. Für eine halbe Stunde inkubierte die so vorbehandelte 12-Well-Platte bei 37 °C im Inkubator. Danach wurde die Poly-D-Lysin-Lösung wieder aus dem Well entfernt und die Platte zum Trocknen unter die sterile Werkbank gebracht.

2.4.3 Einfrieren von Zellen

Um die verschiedenen Zelllinien längerfristig zu erhalten, wurden diese bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagert. Vorher müssen die Zellen jedoch in großen, also T75, Zellkulturflaschen expandiert werden, bis eine Konfluenz von mindestens 80 % erreicht ist. Die Zellen wurden in 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert und in ein 50-ml-Zentrifugationsröhrchen transferiert. Dieses wurde dann für drei Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Das so entstehende Pellet wurde in 7,2 ml vorgekühltem Kryo-Medium resuspendiert, welches aus FCS und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) besteht. Die Zellsuspension wurde danach auf vier 1,8 ml *Nunc*® *CryoTubes*® aufgeteilt. Die *Nunc*® *CryoTubes*® wurden dann für eine Stunde in einem Eiswasserbad gekühlt, bevor sie zunächst bei -80° C gelagert wurden. Ist aber eine längerfristige Aufbewahrung angedacht, so müssen die bei -80 °C gelagerten Zelllinien in den flüssigen Stickstoff überführt werden.

2.4.4 Auftauen von Zellen

Sollen im flüssigen Stickstoff gelagerte Zellen wieder aufgetaut werden, so muss das *Nunc*® *CryoTube*® mit der darin enthaltenen Zellsuspension in einem 37 °C-Wasserbad geschwenkt werden. Die Zellsuspension wurde dann schnellstmöglich in ein 50-ml-Falcon-Röhrchen transferiert. Dieses wurde vorher vorbereitet, indem 10 ml vorgewärmtes Zellkulturmedium in das Röhrchen gegeben wurden. Die nun in das Medium pipettierte Zellsuspension wurde daraufhin für drei Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgesaugt

worden war, wurde das Pellet in 5 ml frischem und vorgewärmten Zellkulturmedium resuspendiert. Dann erfolgte der Transfer in eine kleine, d.h. T25, Zellkulturflasche. Nach einem Tag wurde das Zellkulturmedium gewechselt. Sobald die Zellen eine Konfluenz von mindestens 80 % erreicht hatten, wurden die Zellen in eine große T75-Zellkulturflasche überführt.

2.4.5 Stabile Transfektion von HEK293-Zellen

Das *Flp-In*TM-System erlaubt die dauerhaft stabile Integration des Expressionsvektors mit dem betreffenden Gen in das Genom der T-REx-293-Zellen, die spezielle HEK293-Zellen darstellen (Abbildung 3). Sowohl die HEK293-Zelllinie als auch der Expressionsvektor pcDNA5 enthalten eine Stelle namens *Flp Recombination Target Site* (FRT site). Bei der stabilen Transfektion erlaubt die Flp Rekombinase, die auf dem Helferplasmid pOG44 kodiert ist, die Rekombination und dadurch die Integration des Expressionsplasmids in das Zielgenom. Stabil transfizierte Klone können dann mit Hygromycin B selektiert werden. Das Resistenzgen für Hygromycin B wird vom Expressionsplasmid kodiert.

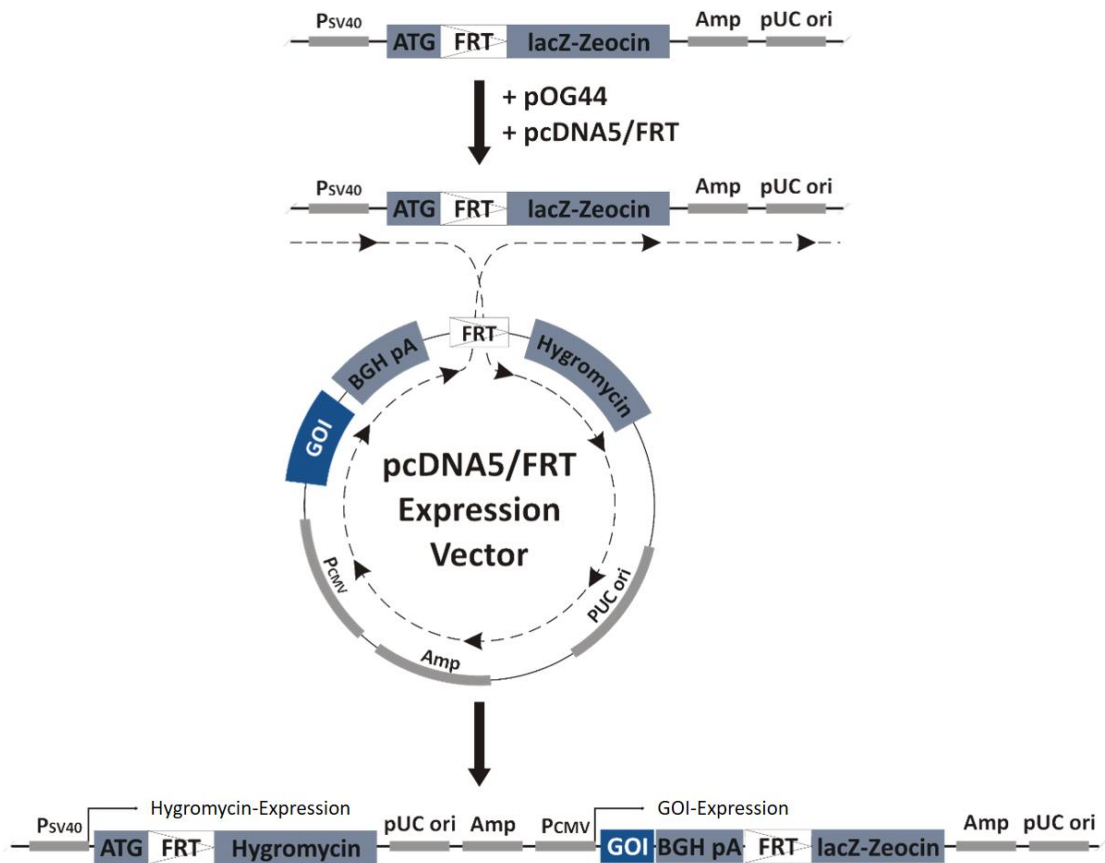


Abbildung 3: Schematische Darstellung des FLP-In™-Systems für die Herstellung stabil transfizierter HEK293-Zelllinien. Die T-REx-293-Wirtszelllinie und der pcDNA5-Expressionsvektor zeigen beide eine *Flp Recombination Target (FRT) site*. Bei der Transfektion vermittelt die FLP-Rekombinase auf dem pOG44-Helferplasmid über DNA-Rekombination an den *FRT sites* die Integration des Expressionsvektors in das Genom der T-REx-293-Zelllinie. Stabil transfizierte Klone können mit Hygromycin B selektiert werden, dessen Resistenzgen ist auf dem Expressionsplasmid kodiert. Abbildung modifiziert nach „FLP-In™-System“ von Invitrogen Life Technologies.

Eine Million HEK293-Zellen wurden in einer 6-Well-Platte ausplattiert und für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Für die Transfektion wurden 400 ng DNA des Plasmids und 3,6 µg des Helferplasmids pOG44 in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert, welches 100 µl DMEM ohne Zusätze enthält. In einem anderen Reaktionsgefäß wurde 12 µl FuGENE® 6 Transfektionsreagenz in 100 µl DMEM ohne Zusätze verdünnt. Beide Gefäße wurden für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Inhalt beider Gefäße durch fünfmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt. Das Gemisch wurde nun für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die ausplattierten Zellen einmal mit 2 ml DMEM, welches 10 % FCS enthält, gewaschen und danach zurück in den Inkubator gestellt. Nach Ablauf der 15 Minuten wurde den ausplattierten Zellen 2 ml DMEM/10 % FCS zugegeben und tröpfchenweise wurden auch 200 µl des DNA-FuGENE® 6-Gemischs

auf die Zellen pipettiert. Die Zellen wurden zurück in den Inkubator gestellt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt. Dabei wurde übliches, aus DMEM, 10 % FCS und 1 % PS bestehendes Zellkulturmedium verwendet. Einen Tag später wurden die Zellen in eine 100-mm-Petrischale transferiert, die 20 ml normales Zellkulturmedium enthielt. Wiederum einen Tag später wurde Hygromycin B in einer Konzentration von 300 µg/ml in die Petrischale gegeben. Nach etwa vier bis fünf Tagen wurde das Medium erneut gewechselt und erneut Hygromycin B (300 µg/ml) zugesetzt.

Zehn Tage nach der erstmaligen Gabe von Hygromycin B erschienen einzelne Zellkolonien auf der Petrischale. Vierundzwanzig dieser Kolonien wurden sorgfältig ausgewählt und in 12-Well-Platten transferiert, deren Wells Zellkulturmedium mit 10 % FCS und 1 % PS und 100 µg/ml Hygromycin B enthielten. Sobald die Zellen in der 12-Well-Platte eine Konfluenz von etwa 80 % erreichten, wurden sie in 6-Well-Platten transferiert und später in kleine T25-Zellkulturflaschen. Dabei blieb die Zusammensetzung des Mediums und die Hygromycin B-Konzentration unverändert. Beim ersten Passagieren in der T25-Zellkulturflasche wurden Aliquots für DNA- und RNA-Extraktion genommen (Abschnitt 2.2.1 und 2.3.1). Die korrekte Integration des Expressionsplasmids in das Genom der HEK293-Zellen wurde durch drei Polymerase-Kettenreaktionen und Genexpressionsanalysen validiert (Abschnitt 2.2.3 und 2.3.3).

2.5 Transportexperimente

Für die Durchführung von Transportexperimenten wurden 600.000 HEK293-Zellen in 12-Well-Platten ausplattiert, die mit Poly-D-Lysin vorbehandelt wurden. Daraufhin wurden die Zellen für zwei Tage bei 37 °C im CO₂-Inkubator inkubiert, um eine Konfluenz von mindestens 80 % zu erreichen. Die weitere korrekte Durchführung eines Transportexperiments erforderte die Verwendung von *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS). Der pH-Wert dieser Lösung muss bei 7,4 liegen und wurde vor Beginn der Transportexperimente an einem pH-Meter kontrolliert. Der HBSS-Lösung werden zuvor noch 5 ml einer 10 mM HEPES-Puffer-Lösung zugesetzt, die Lösung wird in der Folge HBSS+ bezeichnet.

Die ausplattierten Zellen wurden zunächst einmalig mit 2 ml vorgewärmten, 37 °C warmen HBSS+ gewaschen. Das jeweilige Substrat wurde vorher in HBSS+ verdünnt. 400 µl dieser Verdünnung wurden auf die ausplattierten Zellen pipettiert, die Reaktion startete. Nach zwei Minuten wurde die Reaktion gestoppt, indem 2 ml eiskaltes HBSS+ auf die Zellen gegeben wurde. Danach wurden die Zellen noch zweimal mit 2 ml eiskaltem HBSS+ gewaschen.

Nach diesen Waschschrinen wurde das HBSS+ restlos entfernt. Proben, die für die Proteinbestimmung gedacht sind, wurden in 500 µl RIPA-Puffer lysiert (Tabelle 19). Um die intrazelluläre Substratkonzentration zu quantifizieren, wurden die betreffenden Proben in 500 µl Lysepuffer lysiert. Dieser besteht zu 80 % aus Acetonitril, zu 20 % aus Wasser und einem für das Substrat spezifischen internen Standard (Tabelle 22). Bei der Substanz ASP⁺ wurden alle Proben in RIPA-Puffer lysiert (Tabelle 20).

Die intrazelluläre Konzentration des jeweiligen Substrats wurde abschließend auf die Gesamtproteinmenge der Probe normiert. Dafür wurde die Proteinkonzentration mit dem Bicinchoninsäure-Assay (Abschnitt 2.6.1) bestimmt. Die Aufnahme, die spezifisch über OCT1 vermittelt wurde, wurde kalkuliert, indem die Aufnahme der pcDNA5-Kontrollproben von der Aufnahme der OCT1-überexprimierenden Zellen subtrahiert wurde.

Tabelle 19: RIPA-Puffer

Reagenzien	Konzentrationen
Tris-HCl, pH 7,4	50 mM
SDS	0.1 % (w/v)
NP-40	1 % (v/v)
Natriumdeoxycholat	0.25 % (w/v)
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM

Tabelle 20: Substrate und verwendete Detektionsmethoden

Reagenzien	Detektionsmethode
ASP+	Fluoreszenzspektroskopie
Ranitidin	LC-MS/MS
Metformin	LC-MS/MS
Sumatriptan	LC-MS/MS
Fenoterol	LC-MS/MS
Morphin	LC-MS/MS
Zolmitriptan	LC-MS/MS
Cycloguanil	LC-MS/MS

2.5.1 Auswahl der beiden Einzelkonzentrationen zur Durchführung der Transportexperimente

Bei der Untersuchung eines Substrats wurden immer zwei unterschiedliche Einzelkonzentrationen gemessen. Die jeweiligen Konzentrationen wurden anhand der Michaelis-Menten-Kinetik wie folgt gewählt: Die erste Konzentration liegt deutlich unter der Substratkonzentration, bei der die Transportgeschwindigkeit halbmaximal ist, also deutlich unter der Michaelis-Menten-Konstanten K_m . Die zweite Konzentration liegt im Bereich der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} . Bei den Substanzen Metformin und Cycloguanil ergeben sich hieraus unterschiedliche Vorgehensweisen (Tabelle 22). Proben, die mit der höheren Konzentration behandelt wurden, wurden 1:200 in 0,1 %-Ameisensäure verdünnt. Das Zellysate der mit der niedrigeren Konzentration behandelten Proben wurde dahingegen mit Stickstoff verdampft. Nach dem Verdampfen wurde das verdampfte Volumen durch 0,1 % Ameisensäure substituiert. Bei den Substanzen Morphin und Ranitidin wurden alle Proben in Stickstoff verdampft. Alle Proben der Substanz Ranitidin wurden nach dem Verdampfen zusätzlich 1:10 in 0,1 % Ameisensäure verdünnt.

2.5.2 Fluoreszenzspektroskopie

Für die Detektion des Modellsubstrats ASP⁺ wurden alle Proben in 500 μ l RIPA-Puffer lysiert. Davon wurden 200 μ l des Zellysats im nächsten Schritt in eine schwarze *Corning*® 96-Well-Platte überführt. Die Messung erfolgte im *Tecan Ultra Microplate Reader*. Die Messeinstellungen sind in Tabelle 21 aufgeführt. Jede Probe wurde in Duplikaten gemessen.

Tabelle 21: Messeinstellungen ASP⁺

Kategorie	Einstellung
Measurement mode:	Fluoreszenz
Excitation wave length	485 nm
Emission wave length	612 nm
Gain	40
No. of flashes	10
Lag time	0
Integration time	40
Mirror selection	Automatisch
Plate definition file	COS96fb.pdf
Z-Position	Manuell

2.5.3 Liquid–Chromatographie–Massenspektrometrie/Massenspektrometrie (LC-MS/MS)

Die intrazelluläre Akkumulation der Substrate Ranitidin, Sumatriptan, Zolmitriptan, Fenoterol, Morphin, Metformin und Cycloguanil wurde mit der LC-MS/MS analysiert und quantifiziert (Tabelle 23). Wie in Abschnitt 2.5 beschrieben, wurden die Proben für die LC-MS/MS in 500 µl Lysepuffer lysiert. Durch Zentrifugation bei 13.300 rpm für 15 Minuten wurde der Zelldebris entfernt. Danach wurden 380 µl des Überstands in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß transferiert.

Für jede Messung eines bestimmten Substrats wurde gleichzeitig auch eine Standardkurve pipettiert. Die Konzentrationen der jeweiligen Standardkurve wurden zuvor bestimmt und in Lysepuffer vorbereitet, der auch den jeweiligen internen Standard enthält. Sowohl die Zelllysate als auch die Proben der Standardkurve werden in 0,1 %-Ameisensäure gelöst. 10 µl der Probe wurden injiziert und daraufhin mit LC-MS/MS analysiert. Für die folgende Analyse wurde ein API 4000™ Tandemmassenspektrometer benutzt, welches mit einem HPLC (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)–System der Serie 200 verbunden ist.

Tabelle 22: Übersicht über die Probenaufbereitung für die Detektion intrazellulärer Substratkonzentrationen via LC-MS/MS

Substrat	Interner Standard (IS)	Konzentration IS [ng/ml]	Probenvorbereitung
Ranitidin	Ranitidin-d6	10	1:10–Verdünnung in 0,1 % Ameisensäure und Verdampfen in Stickstoff
Sumatriptan	Sumatriptan-d6	10	1:10–Verdünnung in 0,1 % Ameisensäure
Zolmitriptan	Sumatriptan-d6	10	1:10–Verdünnung in 0,1 % Ameisensäure
Fenoterol	Fenoterol-d6	5	1:8–Verdünnung in 0,1 % Ameisensäure
Metformin	Buformin	50	1:200–Verdünnung in 0,1 % Ameisensäure bzw. Verdampfen in Stickstoff
Morphin	Codein	10	Verdampfen in Stickstoff
Cycloguanil	Proguanil-d6	10	1:10–Verdünnung in 0,1 % Ameisensäure bzw. Verdampfen in Stickstoff

Tabelle 23: Parameter für die Detektion intrazellulärer Substratkonzentration via LC-MS/MS

Substrat	Massen- transition [m/z]	Reten- tions- zeit [min]	Interner Standard (IS)	Massen- transition [m/z]	Reten- tions- zeit IS	Orga- nischer Anteil in mobiler Phase
Ranitidin	315,3 > 130,1	4,15	Ranitidin-d6	321,2 > 130,1	4,13	8 %
Sumatriptan	296,2 > 58,2	5,91	Sumatriptan- d6	302,2 > 64,2	5,87	8 %
Zolmitriptan	288,0 > 58,0	4,83	Sumatriptan- d6	302,2 > 64,2	4,29	8 %
Fenoterol	304,1 > 107,1	4,62	Fenoterol-d6	310,3 > 141,0	4,56	12 %
Metformin	130,0 > 71,0	2,86	Buformin	158,0 > 60,0	3,95	3 %
Morphin	286,2 > 201,1	3,72	Codein	300,3 > 215,1	5,06	8 %
Cycloguanil	252,2 > 195,1	4,02	Proguanil-d6	260,3 > 170,2	7,41	20 %

2.6 Proteinanalysen

2.6.1 Bicinchoninsäure–Assay zur Bestimmung der Proteinmenge

Tabelle 24: Reaktionsgemisch BCA

Reagenzien	Konzentration
BCA	98 %
4 % Kupfersulfat -Pentahydrat	2 %

Der Bicinchoninsäure–Assay wurde durchgeführt, um die absolute Proteinkonzentration einer Probe bzw. eines Zelllysats nach Behandlung mit RIPA–Puffer (Tabelle 19) zu bestimmen. Bei diesem Assay handelt es sich um eine kolorimetrische Methode, die auf der Reduktion der zweifach positiv geladenen Kupferionen zu einfach geladenen Kupferionen durch die Peptidbindungen der Proteine beruht. Nach der Reduktion können zwei Moleküle der Bicinchoninsäure ein einfach positiv geladenes Kupferion chelieren und einen violettgefärbten Komplex bilden. Die Reaktion ist dabei proportional zur Gesamtmenge des in der Probe bzw. im Lysat befindlichen Proteins (Smith et al. 1985). Die Absorption dieses

Produkts wurde bei einer Wellenlänge von 570 nm durch den *Tecan Ultra Microplate Reader* gemessen.

Die Proteinbestimmung wurde in einer 96-Well-Platte durchgeführt, wobei pro Well 5 µl von der Probe bzw. vom Zellysat pipettiert wurden. Dabei wurde die Messung in Triplikaten durchgeführt, d. h. je drei Wells enthielten Lysat aus derselben Probe. Um die Proteinkonzentration zu bestimmen, wurde eine Standardkurve in den Schritten 0 µg, 1 µg, 3 µg, 5 µg, 10 µg und 15 µg vorbereitet. Die Standardkurve enthielt BSA (*Bovine Serum Albumine*).

Zu den Wells, die Proteinproben enthielten, wurden nun 200 µl des BCA-Reaktionsgemischs pipettiert, um die kolorimetrische Reaktion zu starten. Die Reaktion wurde für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

2.6.2 Immunzytochemie

Tabelle 25: 10x Blocking-Puffer

Kategorie	Einstellung
FCS	5 % (v/v)
BSA	1 % (w/v)
Triton X-100	0.5 % (v/v)
PBS	auf 50 ml auffüllen

Die Immunzytochemie wurde verwendet, um die zelluläre Lokalisation des OCT1-Proteins zu analysieren. Die Immunfärbung wurde durch die Verwendung von fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern ermöglicht und mittels Konfokalmikroskopie visualisiert.

Einen Tag zuvor wurden 250.000 Zellen auf eine *Lab-Tek® II Chamber Slide*-Platte ausplattiert, diese ist mit Poly-D-Lysin vorbehandelt, um eine dauerhafte Adhärenz der Zellen zu gewährleisten.

Am nächsten Tag wurde die Immunfärbung durchgeführt. Die Zellen wurden dafür einmal mit 1 ml sterilem PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 1 ml einer 4 %-igen Formaldehydlösung (Roti®-Histofix) behandelt. Die Lösung wurde für 20 Minuten bei

Raumtemperatur auf die Zellen gegeben und diente zur endgültigen Fixierung der Zellen. Daraufhin wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und zur Permeabilisierung der Zellen wurde 1 ml des 1x Blocking-Puffers in die Slides pipettiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Blocking-Puffer wurde entfernt und die Zellen wurden mit Antikörpern gegen Calnexin (Marker für das endoplasmatische Retikulum) oder Natrium-Kalium-ATPase (Membranmarker) inkubiert. Es handelte sich um ein Ko-Staining, wobei OCT1 entweder mit Calnexin oder Na^+/K^+ -ATPase gefärbt wurde. Die primären Antikörper und die Verdünnungsfaktoren sind in Abschnitt 2.1.5 aufgeführt. 200 μl der primären Antikörper-Lösungen wurden den Zellen zugegeben. Es folgt eine Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur, dabei befinden sich die Platten auf einem Schüttler, der mit 15 rpm agiert.

Nach dem Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen dreimal für fünf Minuten mit 1 ml des 1x Blocking-Puffers gewaschen. Die Zellen wurden mit den fluoreszenzmarkierten Sekundäantikörpern inkubiert. Diese sind in Abschnitt 2.1.5 aufgeführt und wurden 1:400 in 1x Blocking Puffer verdünnt. Gleichzeitig wurden die Zellen mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) gefärbt, um die DNA und damit den Zellkern zu markieren. Dafür wurde DAPI 1:2000 in 1x Blocking-Puffer verdünnt. Auch jetzt wurden 200 μl der Antikörper-Verdünnungen und der DAPI-Verdünnung pipettiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Da die sekundären Antikörper lichtempfindlich sind, wurde lichtgeschützt gearbeitet. Wiederum wurden die Zellen nach einer Stunde dreimal für je 5 Minuten mit 1x Blocking-Puffer gewaschen. Ein finaler Waschschrift wurde mit 500 μl PBS für fünf Minuten durchgeführt. Nach der Zugabe von *Fluoromount-G*TM in Tröpfchenform wurden die Zellen lichtgeschützt gelagert und eingedeckt.

Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit dem Laserscan-Mikroskop LSM 710 analysiert. Die Bilder der analysierten Zellen wurden mithilfe der ImageJ Software v. 1.47 bearbeitet und analysiert.

3 Ergebnisse

3.1 Generierung und Validierung stabil transfizierter HEK293–Zelllinien mit den OCT1-Varianten L364A und H367A

HEK293–Zelllinien wurden stabil transfiziert, um die folgenden humanen OCT1–Mutanten überzuexprimieren: L364A und H367A (beide auf Valin₄₀₈-Hintergrund). Beide Zelllinien wurden zusammen mit 18 weiteren, bereits existierenden Zelllinien (Abschnitt 2.1.9) verwendet, um die OCT1-vermittelte Aufnahme von insgesamt acht OCT1-Substraten zu messen.

Anfänglich wurden für jede Zelllinie mindestens sechs, maximal jedoch acht Klone zur Validierung ausgewählt. Nach erfolgreich beendeter Validierung wurden zwei Klone als Hauptklone eingefroren. Zudem wurden ein bis drei Klone als Reserveklone eingefroren.

Die Validierung der generierten HEK293–Zelllinien erfolgte auf DNA-, RNA- und Proteinebene. Die korrekte Integration in genomischer DNA wurde durch drei integrationsspezifische PCRs überprüft (für methodische Details siehe Abschnitt 2.2.3). Die Expressionsstärke der Mutanten wurde durch RT-qPCR gemessen (für methodische Details siehe Abschnitt 2.3.3) und die korrekte Proteinlokalisierung durch Immunfluoreszenzfärbungen (für methodische Details siehe Abschnitt 2.6.2).

Es konnte für fünf Klone (Klone 1, 3, 7, 15 und 20) der L364A- und vier Klone (Klone 5, 6, 14, 15) der H367A-Variante eine korrekte und Integration in die *FRT-Site* bestätigt werden (Abbildung 4B, PCRs 1 und 2). Für die genannten Klone wurde auch mithilfe einer weiteren PCR gezeigt, dass diese nur einmal in das Genom integriert worden sind (Abbildung 4B, PCR3 und Tabelle 26). Zwei Klone der L364A- (Klone 6 und 14) und weitere zwei Klone der H367A-Variante (Klone 3 und 17) haben Signale für eine multiple Integration gezeigt und wurden von weiteren Analysen ausgeschlossen.

Des Weiteren wurde die Überexpression von OCT1 mittels RT-qPCR analysiert. Die Klone zeigten eine im Vergleich zum Wildtyp ähnliche Überexpression (Abbildung 5).

Tabelle 26 listet die Validierungsergebnisse aller getesteten Klone auf.

Um die subzelluläre Lokalisation der OCT1–Mutanten zu analysieren, wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Dazu wurde OCT1 zusammen mit Calnexin als Marker für das endoplasmatische Retikulum oder mit Na⁺/K⁺-ATPase als Membranmarker

gefärbt. Es wurde ein monoklonaler Antikörper benutzt, der den humanen OCT1 spezifisch erkennt. Der Membranmarker bestätigte die korrekte Membranlokalisierung von OCT1 im Wildtyp sowie in den Mutanten L364A und H367A (Abbildung 6). Es muss betont werden, dass der Eindruck bestand, dass die Mutanten im Vergleich zum Wildtyp eine nicht so stark ausgeprägte Membranlokalisierung aufgewiesen haben. Eine Beobachtung, die aber leider nicht quantitativ ausgewertet werden konnte, da die hier verwendete Methode eine ausschließlich qualitative Information über die OCT1-Expression liefert.

Der Klon 3 der L364A- und Klon 5 der H367A-Variante wurden für weitere detaillierte Analysen in dieser Arbeit benutzt (Tabelle 32). Die Klone 7 und 15 der L364A- und Klon 15 der H367A-Variante wurden auch asserviert. Sie sollen als Reserveklone benutzt werden, falls ein Verdacht von klonspezifischen Artefakten besteht.

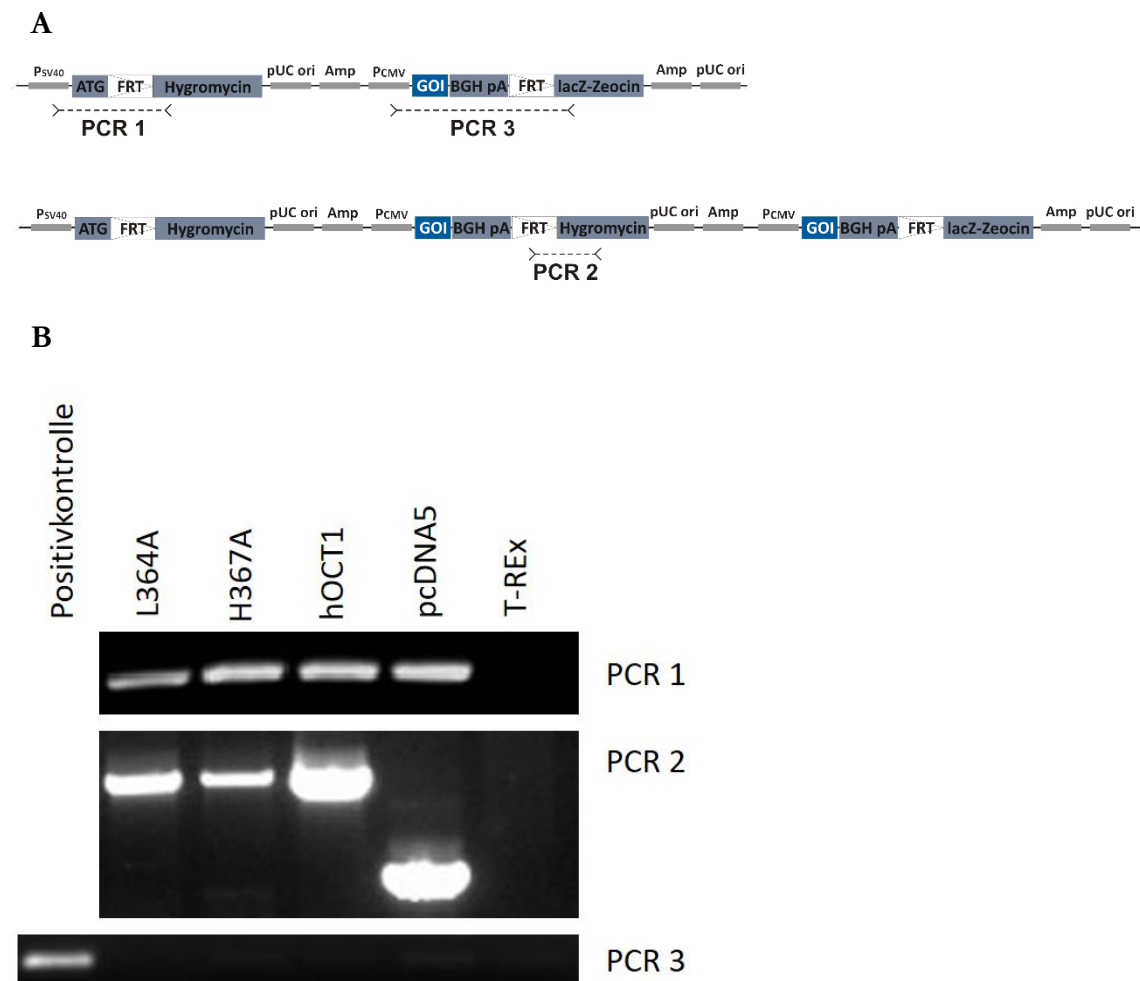


Abbildung 4: Validierung der korrekten Integration der OCT1-überexprimierende Konstrukte in das Genom der HEK293 T-REx-Zellen. A: Die erfolgreiche Integration des pcDNA5-Plasmids mit dem mutierten OCT1-Gen in das Genom der HEK293-Zellen wurde durch drei integrationsspezifische Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) bestätigt. Schematische Darstellung der Integration des mutierten OCT1 in das Genom der HEK293-Zellen. Die Bindungsstellen der Primer in den PCRs 1-3 sind abgebildet. B: Mit der PCR 1 wurde das Hygromycin-Resistenzgen amplifiziert. Das Amplikon ist 519 bp groß. PCR2 amplifizierte den mutierten OCT1, das entstehende Amplikon ist 3137 bp groß. Die Integration des leeren pcDNA5-Vektors führte zu einem Amplikon von 1376 bp Größe. PCR 3 führt nur im Falle einer mehrfachen Integration des pcDNA5-Vektors in das Genom der HEK293-Zellen zu einem 214 bp großen Amplikon. Positivkontrolle = Mehrfach integrierter Klon; T-Rex = untransfizierte HEK293-Zelllinie; L364A und H367A sind Mutanten des humanen OCT1

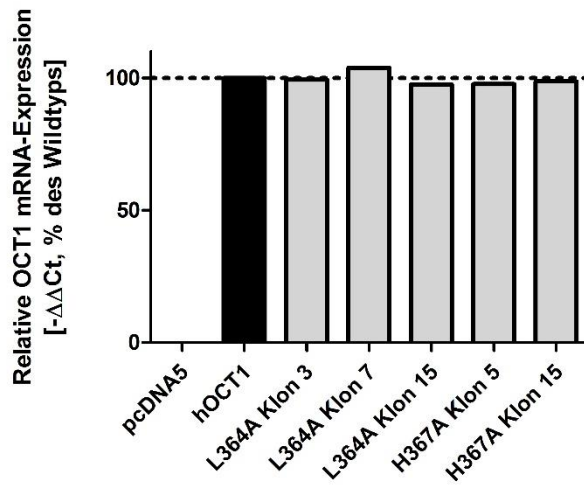


Abbildung 5: Genexpressionsanalyse von OCT1-überexprimierenden HEK293-Zellen. Die quantitative Echtzeit-PCR zeigte eine homogene Überexpression des OCT1. Die Quantifizierung erfolgte durch Anwendung der $\Delta\Delta C_t$ -Methode. TBP wurde als interne Kontrolle verwendet.

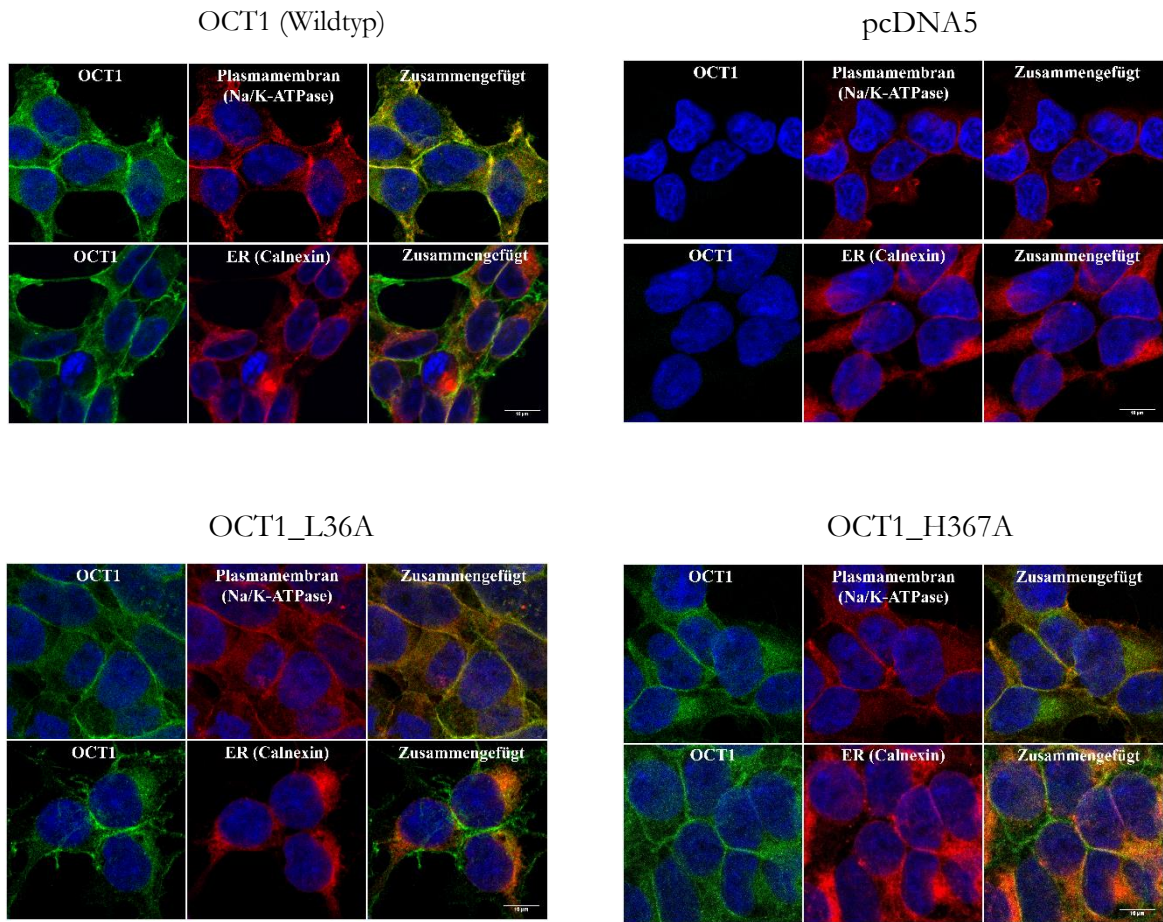


Abbildung 6: Subzelluläre Lokalisation von OCT1-überexprimierenden HEK293-Zellen. Die subzelluläre Lokalisation wurde durch Immunfluoreszenzfärbungen untersucht, der Färbung folgte die Analyse mit dem Konfokalmikroskop (100x Vergrößerung). OCT1 (grün) wurde entweder mit der Na^+/K^+ -ATPase als Plasmamembranmarker (rot, obere Spalte) oder mit Calnexin als Marker für das endoplasmatische Retikulum gefärbt (rot, untere Spalte). Sowohl der Wildtyp als auch die Aminosäuresubstitutionen L364A und H367A sind in der Plasmamembran lokalisiert, wie durch die Färbung von OCT1 mit der Na^+/K^+ -ATPase deutlich wird. Als Negativkontrolle ist pcDNA5 aufgeführt. Skalierung: 10 μM

Tabelle 26: Validierungsergebnisse stabil transfizierter HEK293-Zelllinien

Mutant	Klon	Morphologische Beurteilung	PCR 1	PCR 2	PCR 3	Genexpression	
OCT1_L364A	1	(+)	+	+	-	+	
	2	++	+	n. a.	-	n. a.	
	3	++	+	+	-	+	
	6	+	n. a.	n. a.	+	n. a.	
	7	(+)	+	+	-	+	
	14	+	n. a.	n. a.	+	n. a.	
	15	++	+	+	-	+	
	20	++	+	+	-	+	
	OCT1_H367A	3	+	n. a.	+	+	n. a.
		5	++	+	+	-	+
6		++	+	+	-	+	
14		(+)	+	+	-	+	
15		(+)	+	+	-	+	
17		+	+	n. a.	+	n. a.	

Die Zellmorphologie wurde mikroskopisch beurteilt. Dabei wurde zwischen sehr gut (++), gut (+) und adäquat ((+)) abgestuft. Die korrekte Größe des Amplikons nach einer durchgeführten PCR wird mit einem + bestätigt. PCR 3 ist eine negative PCR, ein Amplikon entsteht nur bei mehrfacher Integration des zu untersuchenden Gens. Im Normalfall sollte kein Amplikon entstehen (-). Die Analyse der Genexpression erfolgte mittels quantitativer Echtzeit-PCR und der Quantifizierung anhand der $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Nicht bei allen Klonen wurden die Validierungen komplett durchgeführt. Klone, die eine positive PCR 3 zeigten, wurden aussortiert. Orange schattiert sind Klone, die für funktionelle Transportexperimentanalysen verwendet wurden. n. a. = nicht angegeben bzw. nicht auswertbar. Orange schattiert sind die jeweiligen Hauptklone (Klon 3 der L364A- und Klon 5 der H367A-Variante), hellrot die jeweiligen Reserveklone der Varianten.

3.2 Charakterisierung substratspezifischer Effekte genetischer Polymorphismen im OCT1

Für den folgenden Teil der Arbeit wurden zur Charakterisierung substratspezifischer Effekte systematische Mutationsanalysen mit 20 genetischen OCT1-Varianten durchgeführt. Davon waren 18 Varianten bereits als stabil transfizierte HEK293-Zelllinien vorhanden. Die Varianten L364A und H367A wurden im Rahmen dieser Arbeit generiert und charakterisiert (Abschnitt 3.1).

Die OCT1-Varianten wurden mit einem breiten Spektrum von acht verschiedenen Substraten untersucht, zu denen auch wichtige Medikamente gehören. Dabei wurden zwei unterschiedliche Einzelkonzentrationen untersucht (Abschnitt 2.5.1). Die erste Konzentration liegt deutlich unter der Substratkonzentration, bei der die Transportgeschwindigkeit halbmaximal ist (also deutlich unter der Michaelis–Menten–Konstanten K_m). Die zweite Konzentration liegt im Bereich, an dem die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} erreicht ist (Tabelle 27).

Tabelle 27: Übersicht verwendeter OCT1-Substrate und Konzentrationen zur Durchführung systematischer Mutationsanalysen

Substrat	K_m [μM]	Konzentration 1 ($\ll K_m$) [μM]	Konzentration 2 ($\sim v_{max}$) [μM]
ASP ⁺	63 ± 9	5	400
Cycloguanil	18 ± 3	0,3	150
Fenoterol	$1,8 \pm 0,2$	1	40
Metformin	2420 ± 520	100	15000
Morphin	$3,4 \pm 0,3$	0,1	50
Ranitidin	63 ± 9	1	200
Sumatriptan	55 ± 8	1	200
Zolmitriptan	n.a.	1	200

3.2.1 Übersicht der funktionellen Charakterisierung genetischer OCT1-Varianten

Der Großteil der untersuchten genetischen OCT1-Varianten zeichnete sich durch einen Funktionsverlust verglichen mit der OCT1-Wildtypaktivität aus (Tabellen 27-31).

Diese können in verschiedene Gruppen unterteilt werden: S29L (*OCT1*12*) und G465R/M420del (*OCT1*5*) sind Varianten, die für alle untersuchten Substrate zu einem kompletten OCT1-Funktionsverlust geführt haben. So zeigte beispielsweise G465R eine durchschnittliche Aktivität von $1,1 \pm 2,0$ % (Konzentration 1, Tabelle 28) bzw. $4,6 \pm 2,7$ % (Konzentration 2, Tabelle 29). Einen starken, aber nicht kompletten Funktionsverlust zeigen die Varianten R61C (*OCT1*3*) und R206C/M420del/M408V (*OCT1*14*) unabhängig vom untersuchten Substrat. R61C zeigt beispielsweise eine mittlere OCT1-Aktivität von $35,3 \pm 3,2$ % (Konzentration 1, Tabelle 28) bzw. $23,8 \pm 3,0$ % (Konzentration 2, Tabelle 29).

Substratspezifische Effekte wiesen S14F (*OCT1*7*), F159A, S189L (*OCT1*10*), T245M (*OCT1*13*), G401S (*OCT1*4*), M420del/M408V (*OCT1*2*), I449T (*OCT1*11*) (für Details siehe Abschnitt 3.2.5), D474E und D474N (für Details siehe Abschnitt 3.2.3) auf. Die Varianten F160L, W217Y, R342H, L364A und H367A (für Details siehe Abschnitt 3.2.2) zeigten weder einen Funktionsgewinn noch -verlust von mehr als 50 % der OCT1-Wildtypaktivität.

Andererseits zeigten die Varianten P117L (*OCT1*9*) und R488M (*OCT1*8*) deutliche Funktionszugewinne (*Gain of function*-Varianten). P117L zeigte im Durchschnitt eine OCT1-Aktivität von $125,7 \pm 9,5$ % (Konzentration 1, Tabelle 28) bzw. $128,6 \pm 12,8$ % (Konzentration 2, Tabelle 29). Noch aktiver zeigte sich R488M mit einer durchschnittlichen OCT1-Aktivität von $128,2 \pm 9,0$ % (Konzentration 1, Tabelle 28) bzw. $151,3 \pm 12,8$ %.

Tabelle 28: OCT1-vermittelte Aufnahme bei Konzentrationen deutlich unter der K_M (in Prozent des Wildtyps).

Mutationen	Allele	ASP+		Sumatriptan		Zolmitriptan		Ranitidin		Fenoterol		Metformin		Morphin		Cycloguanil	
		Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
Wildtyp	<i>OCT1</i> *1	100,0%	1,7%	100,0%	0,3%	100,0%	5,8%	100,0%	2,0%	100,2%	1,2%	100,0%	4,6%	100,0%	3,2%	100,0%	2,9%
S14F	<i>OCT1</i> *7	90,0%	2,7%	114,9%	12,1%	58,0%	8,4%	85,7%	7,1%	67,2%	6,4%	131,1%	4,8%	69,6%	3,2%	128,0%	7,6%
S29L	<i>OCT1</i> *12	1,9%	0,8%	0,0%	0,3%	2,8%	1,3%	0,0%	0,8%	0,0%	0,5%	2,9%	3,8%	17,3%	2,5%		
R61C	<i>OCT1</i> *3	68,1%	6,2%	27,5%	1,0%	3,5%	1,8%	35,0%	8,9%	19,5%	1,8%	8,7%	1,3%	22,1%	3,2%	97,8%	1,3%
P117L	<i>OCT1</i> *9	108,9%	6,9%	126,5%	11,8%	135,4%	15,1%	125,6%	6,0%	170,2%	17,1%	99,9%	6,1%	113,7%	3,5%		
F159A*		123,7%	3,6%	134,2%	5,2%	166,7%	6,6%	93,7%	3,1%	139,3%	4,9%	229,6%	12,7%	50,1%	3,8%	146,0%	4,0%
F160L		109,2%	6,4%	126,6%	6,9%	104,3%	3,7%	107,8%	9,5%	96,2%	3,9%	47,5%	3,5%	62,2%	6,3%	140,3%	10,6%
S189L	<i>OCT1</i> *10	90,3%	3,6%	97,7%	7,7%	22,3%	6,6%	73,6%	2,9%	90,6%	9,6%	20,4%	1,3%	100,5%	6,0%		
R206C**	<i>OCT1</i> *14	51,9%	2,9%	30,0%	1,9%	27,9%	1,8%	35,0%	2,9%	36,0%	2,5%	54,7%	3,8%	24,7%	1,8%	84,3%	7,0%
W217Y***		122,4%	6,7%	100,4%	11,1%	73,6%	5,0%	79,0%	4,3%	84,1%	6,6%	54,9%	5,1%	39,2%	3,9%	72,6%	5,8%
T245M	<i>OCT1</i> *13	68,3%	7,1%	80,6%	6,7%	15,4%	1,8%	38,9%	2,6%	36,8%	2,4%	11,9%	2,7%	40,8%	3,8%	179,2%	14,3%
R342H***		115,6%	7,6%	108,9%	10,9%	109,7%	3,3%	133,9%	10,2%	116,7%	5,2%	83,1%	7,1%	99,8%	5,5%	127,5%	10,9%
L364A***		133,8%	5,8%	110,6%	5,4%	95,4%	1,1%	107,4%	5,4%	92,3%	5,2%	93,7%	10,2%	90,8%	6,7%	67,2%	5,1%
H367A***		103,5%	9,2%	106,2%	8,5%	91,5%	2,6%	98,5%	4,8%	105,2%	3,1%	118,0%	11,0%	68,5%	4,5%	126,0%	11,9%
G401S	<i>OCT1</i> *4	25,8%	3,3%	20,3%	2,4%	14,7%	4,4%	38,5%	7,1%	61,1%	6,4%	1,6%	0,3%	6,9%	1,4%	61,3%	4,1%
M420del***	<i>OCT1</i> *2	100,4%	4,1%	83,8%	5,7%	20,6%	1,8%	107,6%	9,2%	54,2%	6,5%	82,0%	5,0%	50,3%	4,6%	108,1%	6,7%
I449T	<i>OCT1</i> *11	112,1%	6,6%	94,3%	4,7%	67,3%	2,0%	118,3%	4,4%	124,2%	7,9%	59,5%	3,9%	99,8%	3,2%	171,3%	12,8%
G465R**	<i>OCT1</i> *5	1,2%	0,4%	0,0%	0,2%	1,1%	2,0%	1,1%	1,3%	-1,5%	0,2%	0,0%	2,2%	14,5%	1,8%	1,2%	0,8%
R488M	<i>OCT1</i> *8	124,9%	10,5%	113,0%	7,6%	181,0%	15,8%	118,7%	7,2%	142,0%	13,3%	82,7%	1,8%	135,5%	6,7%		
D474E***		78,8%	3,8%	49,2%	2,6%	15,1%	1,0%	110,5%	3,3%	36,0%	2,7%	19,4%	0,7%	49,6%	1,5%	145,4%	9,5%
D474N***		3,9%	0,3%	2,0%	0,4%	7,1%	1,3%	0,0%	0,6%	2,5%	1,2%	14,7%	3,0%	0,0%	3,5%		

*: Zusätzliche Hintergrundmutation C450M und M408V, **: Hintergrundmutation M420del, ***: Hintergrundmutation M408V

Tabelle 29: OCT1-vermittelte Aufnahme im Konzentrationsbereich, in dem die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{\max} erreicht ist (in Prozent des Wildtyps).

Mutationen	Allele	ASP+		Sumatriptan		Zolmitriptan		Ranitidin		Fenoterol		Metformin		Morphin		Cycloguanil	
		Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
Wildtyp	<i>OCT1</i> *1	100,0%	2,1%	100,0%	3,8%	100,0%	1,9%	100,0%	0,9%	100,0%	0,3%	100,0%	0,5%	100,0%	4,6%	100,0%	1,7%
S14F	<i>OCT1</i> *7	87,7%	3,9%	117,1%	10,6%	61,4%	3,3%	105,5%	6,4%	81,2%	8,3%	94,5%	6,8%	63,0%	6,0%	78,9%	3,1%
S29L	<i>OCT1</i> *12	2,0%	3,0%	1,3%	0,6%	1,7%	0,8%	1,2%	1,9%	0,0%		9,5%	11,4%	79,3%	8,7%		
R61C	<i>OCT1</i> *3	43,1%	3,5%	26,7%	1,7%	10,2%	1,2%	29,5%	5,8%	26,7%	4,1%	7,2%	1,2%	20,5%	4,2%	26,9%	2,1%
P117L	<i>OCT1</i> *9	118,1%	7,3%	144,7%	15,6%	105,3%	6,4%	149,1%	3,7%	155,4%	35,1%	108,7%	9,0%	118,8%	12,5%		
F159A*		277,2%	18,7%	342,7%	18,8%	203,8%	5,9%	223,0%	16,5%	242,9%	9,4%	311,3%	26,3%	53,8%	5,7%	200,2%	16,6%
F160L		103,4%	5,9%	102,3%	8,2%	119,2%	1,9%	110,9%	7,3%	94,2%	7,3%	65,5%	6,1%	93,5%	8,7%	100,9%	5,8%
S189L	<i>OCT1</i> *10	52,1%	5,2%	84,4%	8,3%	30,9%	3,8%	54,5%	4,1%	89,9%	21,2%	19,3%	1,2%	78,2%	7,2%		
R206C**	<i>OCT1</i> *14	11,6%	1,1%	21,9%	1,5%	16,1%	1,5%	6,4%	1,1%	17,1%	2,5%	21,4%	2,1%	60,5%	5,7%	13,1%	1,2%
W217Y***		161,8%	10,1%	93,4%	6,3%	86,7%	6,6%	131,2%	8,9%	150,8%	9,0%	51,5%	3,3%	90,3%	3,4%	79,0%	4,1%
T245M	<i>OCT1</i> *13	23,0%	2,0%	59,1%	5,0%	21,7%	2,5%	26,0%	1,7%	20,7%	2,1%	7,8%	1,4%	17,8%	3,1%	45,8%	4,0%
R342H***		108,5%	5,3%	97,9%	7,9%	97,8%	3,3%	153,9%	13,3%	116,7%	7,8%	77,1%	2,2%	101,0%	4,4%	105,3%	4,3%
L364A***		126,7%	8,4%	104,7%	4,9%	103,8%	0,7%	98,8%	2,8%	90,0%	5,9%	75,6%	3,7%	101,6%	5,7%	102,9%	7,0%
H367A***		69,8%	4,9%	88,4%	4,1%	75,3%	1,2%	51,2%	6,3%	63,6%	5,4%	100,2%	5,3%	56,1%	1,0%	62,6%	2,8%
G401S	<i>OCT1</i> *4	47,3%	2,6%	11,5%	1,7%	20,0%	2,6%	14,9%	1,9%	335,9%	55,3%	8,0%	1,5%	23,2%	5,5%	21,8%	1,4%
M420del***	<i>OCT1</i> *2	73,5%	3,7%	94,8%	8,2%	25,2%	2,6%	68,7%	2,7%	45,3%	4,2%	63,8%	3,0%	30,5%	3,6%	72,0%	3,8%
I449T	<i>OCT1</i> *11	169,3%	19,2%	117,2%	6,7%	76,5%	3,3%	142,0%	8,7%	126,8%	9,7%	74,2%	7,5%	72,4%	5,8%	135,0%	6,9%
G465R**	<i>OCT1</i> *5	3,0%	0,3%	3,2%	3,1%	1,4%	1,8%	4,4%	3,7%	0,0%		-3,9%	2,9%	26,7%	6,4%	2,2%	1,1%
R488M	<i>OCT1</i> *8	118,3%	12,9%	119,2%	7,9%	122,9%	10,4%	123,5%	6,6%	306,8%	32,8%	88,8%	7,9%	179,9%	11,0%		
D474E***		23,2%	2,2%	53,0%	3,3%	13,2%	2,3%	33,2%	3,9%	26,3%	0,5%	74,2%	7,5%	32,0%	1,7%	37,6%	3,4%
D474N***		3,5%	0,7%	15,6%	2,8%	7,2%	4,8%	12,4%	1,1%	96,5%	17,1%	32,2%	8,0%	0,4%	11,6%		

*: Zusätzliche Hintergrundmutation C450M und M408V, **: Hintergrundmutation M420del, ***: Hintergrundmutation M408V

Tabelle 30: OCT1-vermittelte Aufnahme bei Konzentrationen deutlich unter der K_M (in Absolutwerten).

Mutationen	Allele	ASP+		Sumatriptan		Zolmitriptan		Ranitidin		Fenoterol		Metformin		Morphin		Cycloguanil	
		Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
Wildtyp	OCT1*1	12.139,03	616,86	24,65	2,70	22,72	4,24	16,05	0,79	18,45	2,67	576,81	56,56	4,68	0,42	11,19	0,65
S14F	OCT1*7	6.837,36	1.549,87	32,36	7,12	5,59	0,92	12,98	0,94	7,74	0,51	580,62	42,32	2,67	0,12	15,24	0,87
S29L	OCT1*12	244,61	114,13	0,03	0,12	0,45	0,25	0,06	0,10	-	0,06	2,43	3,23	0,32	0,10		
R61C	OCT1*3	9.890,72	262,64	7,95	1,89	0,36	0,09	5,28	1,15	2,21	0,15	38,38	6,20	0,85	0,12	11,52	1,02
P117L	OCT1*9	12.017,57	874,89	37,14	10,28	17,25	5,32	19,05	0,95	19,08	1,44	973,24	59,37	4,36	0,13		
F159A*		14.217,18	745,18	29,58	2,31	55,48	2,13	15,82	1,57	35,44	1,10	1.632,57	92,22	2,20	0,15	12,99	0,62
F160L		12.557,62	942,73	25,76	2,27	34,72	1,28	17,92	1,77	24,47	0,89	337,20	22,52	3,63	0,30	12,40	0,65
S189L	OCT1*10	10.140,75	1.079,18	27,12	5,05	3,63	1,73	8,28	2,80	12,96	2,94	92,84	3,94	3,85	0,23		
R206C**	OCT1*14	5.959,50	384,47	6,50	0,24	9,29	0,58	5,82	0,98	9,16	0,67	387,87	23,64	1,27	0,21	7,44	0,39
W217Y***		14.060,31	957,40	21,80	1,55	24,50	1,64	13,15	1,07	21,43	1,75	389,67	34,61	2,30	0,23	6,24	0,33
T245M	OCT1*13	7.842,46	868,67	17,53	1,28	5,11	0,62	6,40	0,77	9,37	0,58	84,79	18,09	2,35	0,17	15,83	0,86
R342H***		13.231,85	760,81	25,19	3,77	36,51	1,15	22,17	1,91	28,96	0,89	588,86	43,87	5,86	0,33	11,29	0,82
I364A***		15.325,17	605,99	24,31	1,81	31,74	0,36	18,01	1,74	23,47	1,22	659,75	64,17	5,31	0,30	6,12	0,27
H367A***		11.799,87	780,72	22,69	0,84	30,45	0,87	14,46	1,71	26,78	0,85	836,08	68,67	4,04	0,36	11,09	0,59
G401S	OCT1*4	3.701,45	147,99	6,00	1,79	1,46	0,16	5,71	0,81	6,93	0,59	6,80	0,81	0,27	0,05	7,24	0,34
M420del***	OCT1*2	7.797,42	1.969,86	26,41	5,28	2,40	0,49	14,19	1,24	6,06	0,58	360,71	18,82	1,93	0,18	12,50	0,69
I449T	OCT1*11	12.872,39	877,36	20,80	1,77	24,57	2,26	20,19	2,34	31,63	2,15	421,99	23,89	5,85	0,10	15,11	0,53
G465R**	OCT1*5	164,10	38,70	0,01	0,06	0,26	0,32	0,16	0,20	-	0,02	-	1,83	0,27	0,03	0,13	0,07
R488M	OCT1*8	13.733,99	825,94	32,06	6,85	21,13	4,34	18,05	1,35	16,46	0,56	805,55	17,26	5,19	0,26		
D474E***		9.032,12	472,46	10,36	0,36	5,01	0,32	18,78	2,03	9,16	0,73	135,02	4,98	2,92	0,15	12,84	0,25
D474N***		280,49	47,44	0,62	0,23	0,94	0,32	-	0,10	0,28	0,14	12,44	2,40	-	0,06		

*: Zusätzliche Hintergrundmutation C450M und M408V, **: Hintergrundmutation M420del, ***: Hintergrundmutation M408V

Tabelle 31 OCT1-vermittelte Aufnahme im Konzentrationsbereich, in dem die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{\max} erreicht ist (in Absolutwerten).

Mutationen	Allele	ASP+		Sumatriptan		Zolmitriptan		Ranitidin		Fenoterol		Metformin		Morphin		Cycloguanil	
		Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
Wildtyp	OCT1*1	100.230,23	3.396,72	853,59	54,13	1.396,73	174,44	961,56	68,35	80,87	23,07	17.246,48	1.179,30	135,65	11,75	818,43	40,38
S14F	OCT1*7	91.186,47	4.247,26	861,89	120,03	630,82	141,99	802,81	63,65	15,28	1,46	19.007,80	1.282,77	67,72	6,45	618,31	52,25
S29L	OCT1*12	1.353,53	2.769,67	9,07	3,80	18,20	10,64	8,62	17,65	-	2,35	8,27	11,35	48,19	5,51		
R61C	OCT1*3	43.200,85	2.349,29	196,45	24,03	97,03	14,09	324,75	83,08	5,56	1,31	1.430,46	193,52	22,04	4,49	208,45	12,37
P117L	OCT1*9	116.302,68	5.738,77	1.054,73	133,04	1.078,15	235,57	1.241,01	29,28	30,04	1,45	20.677,57	1.716,02	127,70	13,40		
F159A*		302.420,85	12.973,53	3.227,33	311,11	3.633,52	181,46	2.111,06	219,75	344,43	12,40	43.142,30	1.963,80	97,38	15,02	1.698,82	149,60
F160L		113.449,10	7.283,77	961,45	103,65	2.121,12	45,51	1.049,78	99,89	133,36	9,69	9.294,00	531,53	138,84	16,01	861,28	76,54
S189L	OCT1*10	49.144,23	3.815,13	624,26	95,32	335,33	99,63	359,02	118,76	24,89	6,23	3.900,43	306,87	84,09	7,71		
R206C**	OCT1*14	12.643,16	910,08	212,83	38,58	283,04	37,20	71,09	23,40	24,21	3,42	3.175,29	452,07	87,57	6,30	111,87	12,88
W217Y***		177.943,42	15.012,79	882,91	97,64	1.552,86	157,53	1.263,75	151,00	214,00	13,88	7.381,43	571,63	135,43	8,41	674,41	57,15
T245M	OCT1*13	25.051,97	1.778,00	555,17	56,35	390,44	55,07	228,51	18,31	29,28	2,84	1.130,61	173,92	26,60	5,21	383,88	50,55
R342H***		118.736,28	5.473,36	938,14	133,68	1.743,18	83,04	1.335,46	319,87	165,28	10,31	11.320,39	293,24	149,00	7,46	895,72	55,44
I364A***		139.546,45	12.375,15	983,77	82,87	1.736,22	152,24	862,43	155,57	127,64	8,03	10.832,35	662,21	150,48	12,11	876,86	78,36
H367A***		76.979,87	7.452,29	809,82	31,42	1.420,55	71,77	443,17	52,31	90,38	8,08	14.343,39	826,78	81,63	3,34	533,30	39,67
G401S	OCT1*4	47.511,02	1.297,16	91,91	20,11	216,76	64,79	161,75	31,20	60,98	2,77	1.581,72	255,59	38,86	4,99	172,50	20,28
M420del***	OCT1*2	76.435,62	4.052,66	697,54	92,34	266,60	71,63	649,74	48,68	9,62	1,76	12.814,68	467,55	32,80	3,92	565,03	56,23
I449T	OCT1*11	183.287,37	13.226,70	1.114,95	130,71	1.362,21	64,76	1.373,83	172,88	180,11	14,67	10.334,91	992,60	107,00	9,65	1.110,13	87,67
G465R**	OCT1*5	3.039,64	269,78	26,73	24,40	20,46	23,75	52,82	38,67	-	1,70	-	4,90	16,31	4,14	19,80	10,53
R488M	OCT1*8	110.971,36	7.276,02	861,74	46,43	1.193,41	163,28	1.027,98	56,08	64,29	2,43	16.877,60	1.501,08	193,46	11,85		
D474E***		25.606,11	3.241,27	450,28	61,69	241,33	48,10	298,26	55,52	37,30	0,63	5.682,15	703,59	46,56	2,82	302,49	36,69
D474N***		3.597,61	769,89	117,54	27,32	101,36	62,73	138,53	18,77	17,57	1,52	39,44	11,69	0,17	7,15		

*: Zusätzliche Hintergrundmutation C450M und M408V, **: Hintergrundmutation M420del, ***: Hintergrundmutation M408V

Tabelle 32: Veränderung der K_m bei Konzentrationen deutlich unter der K_M (in Prozent des Wildtyps).

Mutationen	Allele	ASP+		Sumatriptan		Zolmitriptan		Ranitidin		Fenoterol		Metformin		Morphin		Cycloguanil	
		Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
Wildtyp	<i>OCT1</i> *1	100,0%	2,1%	100,0%	2,2%	100,0%	7,4%	100,0%	2,0%	100,2%	1,2%	100,0%	4,3%	100,0%	3,2%	100,0%	2,0%
S14F	<i>OCT1</i> *7	97,9%	4,4%	104,5%	10,7%	100,3%	11,9%	113,0%	4,9%	108,3%	11,4%	71,5%	4,5%	93,5%	12,0%	74,2%	5,7%
S29L	<i>OCT1</i> *12																
R61C	<i>OCT1</i> *3	63,7%	3,1%	97,6%	7,0%			92,9%	15,4%	146,2%	24,9%	85,1%	14,2%	115,6%	38,3%	56,6%	2,4%
P117L	<i>OCT1</i> *9	119,5%	4,6%	117,0%	14,8%	78,6%	5,6%	120,1%	8,8%	119,7%	17,5%	109,2%	12,1%	109,4%	8,0%		
F159A*		200,3%	6,9%	254,4%	6,5%	122,3%	2,7%	238,3%	17,9%	174,6%	6,8%	125,0%	12,6%	106,3%	6,1%	136,3%	6,8%
F160L		85,1%	1,6%	86,3%	8,2%	114,5%	3,5%	104,4%	6,3%	97,8%	6,2%	137,4%	7,1%	151,8%	13,9%	72,2%	1,7%
S189L	<i>OCT1</i> *10	60,6%	5,1%	88,3%	11,0%	193,5%	40,2%	77,2%	12,7%	114,4%	13,4%	90,9%	13,0%	80,2%	3,0%		
R206C**	<i>OCT1</i> *14	20,0%	1,0%	73,7%	11,9%	58,5%	0,9%	27,9%	6,4%	49,4%	9,4%	41,1%	5,9%	254,1%	54,5%	15,6%	1,0%
W217Y***		118,7%	4,7%	89,8%	7,5%	117,8%	5,0%	166,0%	7,8%	179,8%	2,8%	94,4%	3,6%	240,5%	19,4%	122,9%	10,1%
T245M	<i>OCT1</i> *13	30,7%	2,9%	77,8%	11,9%	152,3%	32,3%	75,3%	2,9%	55,7%	2,1%	65,0%	6,0%	49,1%	4,9%	27,9%	1,7%
R342H***		84,8%	4,8%	94,5%	1,7%	89,4%	4,3%	105,5%	9,5%	102,3%	5,5%	102,9%	4,4%	102,5%	10,5%	84,5%	8,4%
I364A***		84,7%	2,5%	94,8%	2,9%	101,4%	5,2%	88,9%	5,0%	97,9%	6,6%	110,4%	10,7%	112,0%	4,2%	149,8%	8,0%
H367A***		60,9%	2,1%	84,0%	3,1%	87,1%	2,1%	65,0%	3,2%	60,3%	4,3%	86,9%	9,0%	78,8%	6,9%	50,5%	3,4%
G401S	<i>OCT1</i> *4	190,2%	18,2%	61,6%	5,6%	74,9%	2,8%	46,9%	7,1%	527,3%	38,8%					42,7%	2,4%
M420del***	<i>OCT1</i> *2	73,6%	3,9%	104,9%	16,6%	100,2%	12,9%	75,4%	2,5%	79,3%	9,9%	78,2%	7,1%	62,4%	6,3%	79,7%	2,9%
I449T	<i>OCT1</i> *11	135,4%	12,5%	124,4%	4,4%	105,2%	7,2%	120,6%	8,3%	102,0%	4,5%	114,1%	12,7%	72,5%	6,1%	76,6%	4,1%
G465R**	<i>OCT1</i> *5																
R488M	<i>OCT1</i> *8	99,4%	5,3%	106,3%	6,3%	67,9%	4,3%	104,4%	1,9%	225,0%	25,6%	108,6%	16,5%	138,4%	11,2%		
D474E***		26,3%	1,5%	113,1%	7,5%	63,8%	5,3%	33,7%	4,0%	75,1%	8,3%	217,3%	30,1%	63,6%	2,8%	24,4%	1,9%
D474N***																	

*: Zusätzliche Hintergrundmutation C450M und M408V, **: Hintergrundmutation M420del, ***: Hintergrundmutation M408V

Für die in Tabelle 32 aufgeführten Werte wurde die Michaelis-Menten-Gleichung $v = \frac{V_{max} * [S]}{K_m + [S]}$ unter der Annahme, dass die gewählte Konzentration 1

kleiner als die K_m ist, nach $\frac{K_m(MUT)}{K_m(WT)} = \frac{V_2(MUT)}{V_1(MUT)} \times \frac{V_1(WT)}{V_2(WT)}$ umgeformt. Die angezeigten Werte zeigen das Verhältnis der K_m der jeweiligen Variante zur K_m

des Wildtyps an. Einige Felder sind leer, da aufgrund zu geringer Transportaktivität der jeweiligen Variante kein K_m -Verhältnis bestimmt werden konnte.

3.2.2 Vergleichende Charakterisierung der OCT1-Varianten L364A und H367A

Um den Effekt der Aminosäuresubstitutionen Leucin zu Alanin an Position 364 und Histidin zu Alanin an Position 367 zu beurteilen, wurden Transportexperimente mit acht verschiedenen Substraten durchgeführt.

Die OCT1-Variante L364A zeigte kaum Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp. L364A zeigte bei der Untersuchung der Konzentration $\ll K_m$ im Mittel eine OCT1-Aktivität von 98,9 % und bei der Untersuchung der Konzentration 2 ($\sim v_{max}$) eine OCT1-Aktivität von 100,5 % des Wildtyps. Die OCT1-Aktivität entspricht damit der Wildtypaktivität. Bei keinem der getesteten Substrate wurde ein Funktionsgewinn oder -verlust von mehr als 50 % beobachtet. Lediglich bei ASP⁺ fiel eine Aktivitätszunahme von 34 % (Konzentration 1) bzw. 27 % auf (Konzentration 2, Abbildung 7). Andererseits zeigten sich moderate Funktionseinbußen bei Cycloguanil (Konzentration 1) um 33 % und bei Metformin (Konzentration 2) um 25 % (Abbildung 7).

Die OCT1-Variante H367A zeigte kaum Unterschiede zum Wildtyp bei Konzentrationen $\ll K_m$, aber Transportverluste bei höheren Konzentrationen ($\sim v_{max}$). H367A zeigte eine OCT1-Aktivität von 102,2 % (Konzentration 1) bzw. von 70,9 % (Konzentration 2, Abbildung 7). Die OCT1-Aktivität entspricht im Gegensatz zu L364A nur bei Konzentration 1 der Wildtypaktivität. Bei der Untersuchung von Konzentration 2 zeigten sieben von acht untersuchte Substrate moderate Funktionseinbußen, darunter 49 % Funktionsverlust bei Ranitidin, 44 % bei Morphin, 30 % bei ASP⁺, 27 % bei Cycloguanil und 26 % bei Fenoterol. Diese Ergebnisse lassen nicht auf eine starke Beteiligung der Aminosäuren Leucin₃₆₄ und Histidin₃₆₇ im Transportprozess für die untersuchten Substanzen schließen.

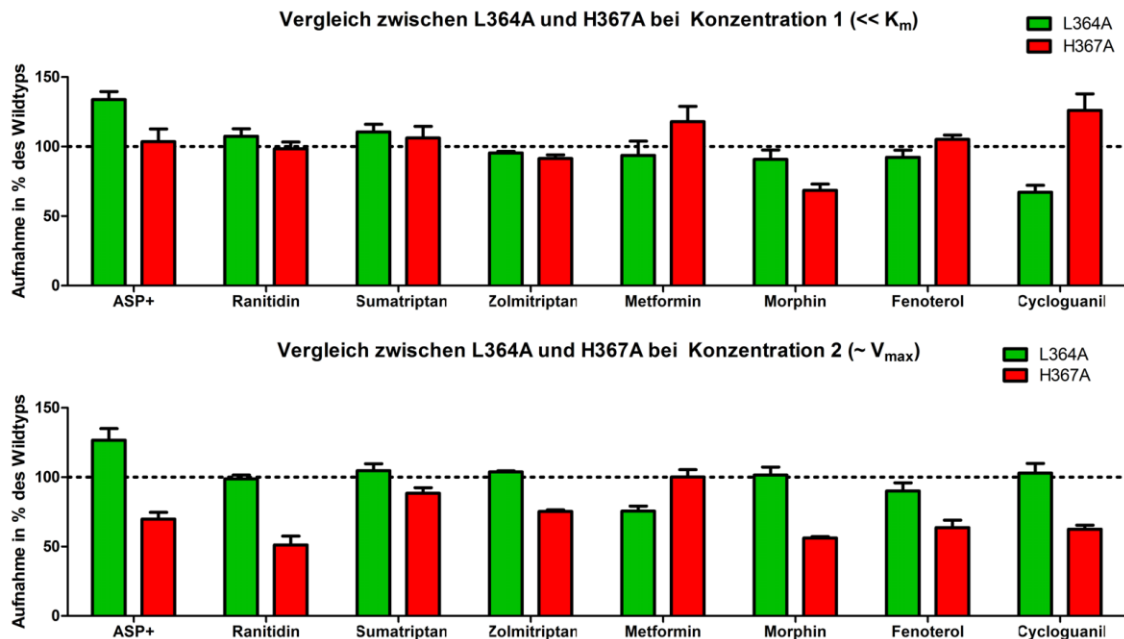


Abbildung 7: Vergleichende Charakterisierung der OCT1-Mutanten L364A und H367A. L364A (grün) und H367A (rot) wurden mit acht Substraten untersucht. Dabei wurden zwei unterschiedliche Einzelkonzentrationen gemessen: $\ll K_m$ (oben) und $\sim v_{max}$ (unten). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden

3.2.3 Vergleichende Charakterisierung der OCT1-Varianten D474N und D474E

Die Bedeutung der Aminosäure Aspartat₄₇₄ (D474) für den humanen OCT1 wurde untersucht. Die Aminosäure Aspartat₄₇₄ ist besonders interessant, weil der entsprechenden Aminosäure im OCT1 der Ratten eine wichtige Rolle im Substrattransport zugesprochen wurde (Gorboulev et al. 1999). Die Substitutionen von Aspartat₄₇₄ zu Glutamat (D474E) und Asparagin (D474N) wurden untersucht. Aspartat und Glutamat sind bei einem physiologischen pH von 7,4 negativ geladene Aminosäuren, während Asparagin eine ungeladene Abwandlung von Aspartat ist. Anstelle der Carboxygruppe trägt Asparagin eine Amidgruppe und verliert so die negative Ladung des Aspartats (Abbildung 8). Zur Charakterisierung von D474N und D474E wurden Transportexperimente mit sieben verschiedenen Substraten durchgeführt.

Bei fünf von acht untersuchten Substraten wurde ein deutlicher Unterschied zwischen den Varianten D474E und D474N beobachtet. D474E zeigte stark substratspezifische Effekte. Während bei der Untersuchung des Substrats Ranitidin eine OCT1-Aktivität von $110,5 \pm 3,3$ % gemessen wurde (nahezu kein Unterschied zum Wildtyp), zeigte sich für Metformin

und Zolmitriptan eine OCT1-Aktivität von nur $19,4 \pm 0,7$ % bzw. $15,1 \pm 1,0$ %. Für D474N hingegen war bei Ranitidin keine Transportaktivität nachweisbar, während sich die Transportleistung für Metformin und Zolmitriptan auf dem niedrigen Niveau von D474E befindet ($14,7 \pm 3,0$ % bzw. $7,1 \pm 1,3$ %).

Bei Konzentration 2 ($\sim v_{\max}$) zeigte sich sowohl für D474E wie auch für D474N (mit der Ausnahme von Fenoterol) eine starke bis sehr starke OCT1-Funktionseinschränkung für alle untersuchten Substrate. Für Fenoterol wurde eine Aktivität von $96,5 \pm 17,1$ % gemessen.

Insgesamt zeigen die Substitutionen von Aspartat₄₇₄ zu Glutamat (D474E) und Asparagin (D474N) starke Effekte auf die Funktion des OCT1. Dabei wiegt der Verlust der negativen Ladung des Aspartats durch die Substitution zu Asparagin (D474N) deutlich schwerer als die Substitution zu Glutamat (D474E). Die dargestellten Ergebnisse weisen noch einmal auf eine Beteiligung von Aspartat₄₇₄ im OCT1 für die Translokation einiger untersuchter Substrate hin.

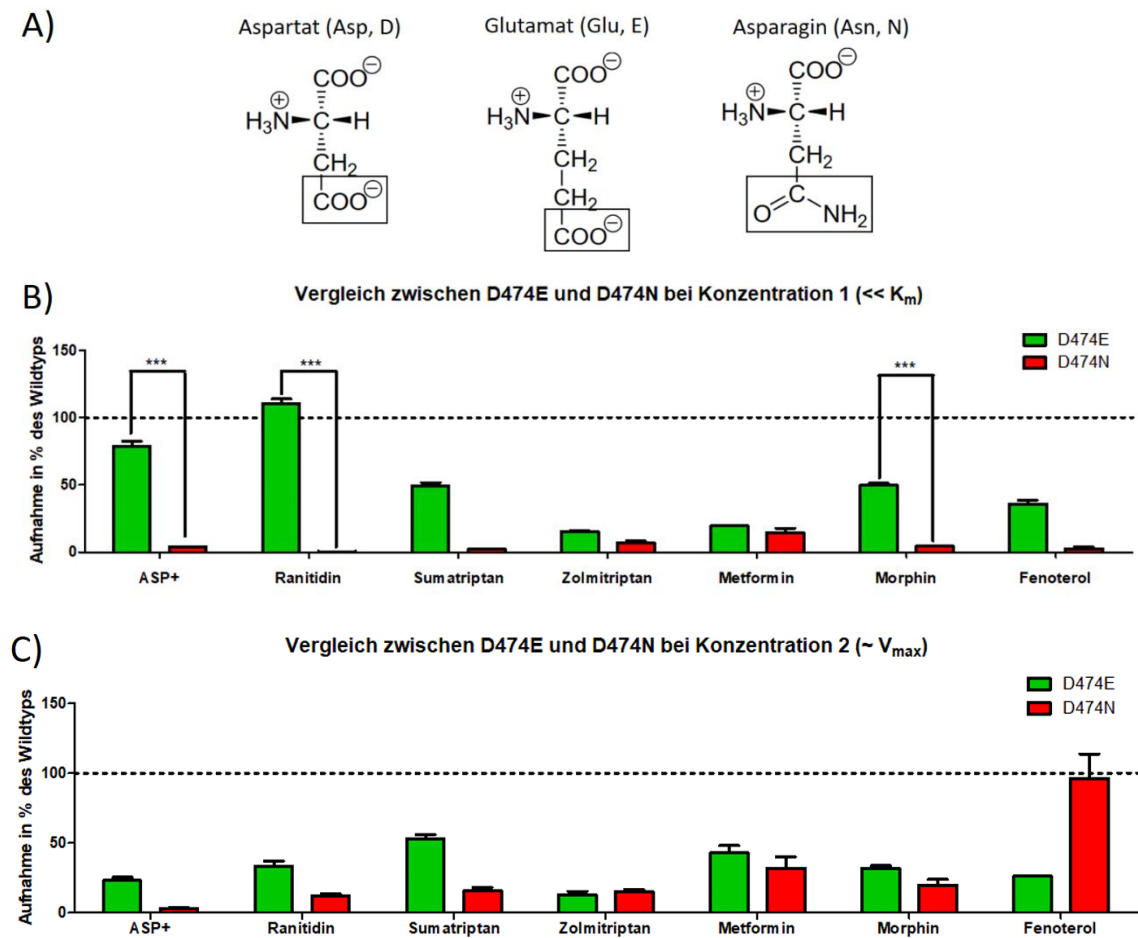


Abbildung 8: Vergleichende Charakterisierung von D474N und D474E. Die Bedeutung der Aminosäure D474 wurde durch die Aminosäuresubstitutionen D474N und D474E untersucht. A) Dargestellt sind die negativ geladenen Aminosäuren Aspartat und Glutamat sowie die neutrale Aminosäure Asparagin, die eine Amidgruppe anstelle der Carboxygruppe trägt und so die negative Ladung des Aspartats einbüßt. B) und C) D474E (grün) und D474N (rot) wurden mit sieben Substraten untersucht. Dabei wurden zwei unterschiedliche Einzelkonzentrationen gemessen: $\ll K_m$ (oben, B) und $\sim v_{max}$ (unten, C). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ verglichen mit OCT1 nach einfacher Varianzanalyse (ANOVA) und Tukey-Test.

3.2.4 Vergleichende Effektcharakterisierung von OCT1-Varianten auf die beiden eng verwandten OCT1-Substrate Sumatriptan und Zolmitriptan

Sumatriptan und Zolmitriptan sind Migränetherapeutika aus der Gruppe der Triptane. Die Triptane sind Typ 1-Serotoninrezeptoragonisten. Alle Triptane haben die für Serotonin charakteristische 3,5-substituierte Indol-Struktur. Sumatriptan ist der Vorgänger aller heute auf dem Markt befindlichen Triptane, auch Zolmitriptan ist ein Derivat des Sumatriptans. Sumatriptan und Zolmitriptan sind also eng strukturverwandt (Abbildung 9A). Beide sind Substrate des OCT1 (Matthaei et al. 2016).

Die OCT1-vermittelte Aufnahme von Sumatriptan und Zolmitriptan wurde gemessen, indem 20 genetische OCT1-Varianten und der OCT1-Wildtyp für zwei Minuten mit dem jeweiligen Triptan inkubiert wurden. Die Aufnahme wurde mittels LC-MS/MS quantifiziert.

Trotz der Strukturverwandtschaft zeigten einige genetische OCT1-Varianten deutliche Unterschiede in der Aufnahme der beiden Triptane. So zeigten die Aminosäuresubstitutionen S189L (*OCT1*10*), T245M (*OCT1*13*) und M420del (*OCT1*2*) eine OCT1-Aktivität für Sumatriptan von $97,7 \pm 7,7$ %, $80,6 \pm 6,7$ % bzw. $83,8 \pm 5,7$ %. Dagegen zeigten die gleichen Varianten bei Zolmitriptan eine deutlich geringere OCT1-Aktivität: $22,3 \pm 6,6$ %, $15,4 \pm 1,8$ % bzw. $20,6 \pm 1,8$ % der Wildtypaktivität.

Auch R61C (*OCT1*3*) wies einen statistisch hochsignifikanten Unterschied in der Aufnahme von Sumatriptan und Zolmitriptan auf, obwohl beide Substrate im Vergleich zum Wildtyp deutlich geringer transportiert wurden. Während die OCT1-Aktivität für Sumatriptan $27,5 \pm 1,0$ % betrug, lag dieser Wert für Zolmitriptan bei $3,5 \pm 1,8$ %. Diese Unterschiede beziehen sich auf die Konzentration $1 \ll K_m$ (Abbildung 9B). Die dargestellten Ergebnisse weisen auf eine Beteiligung der Aminosäuren Serin₁₈₉, Threonin₂₄₅, Methionin₄₂₀ und Arginin₆₁ im Transportprozess für Zolmitriptan, aber weniger für Sumatriptan, hin.

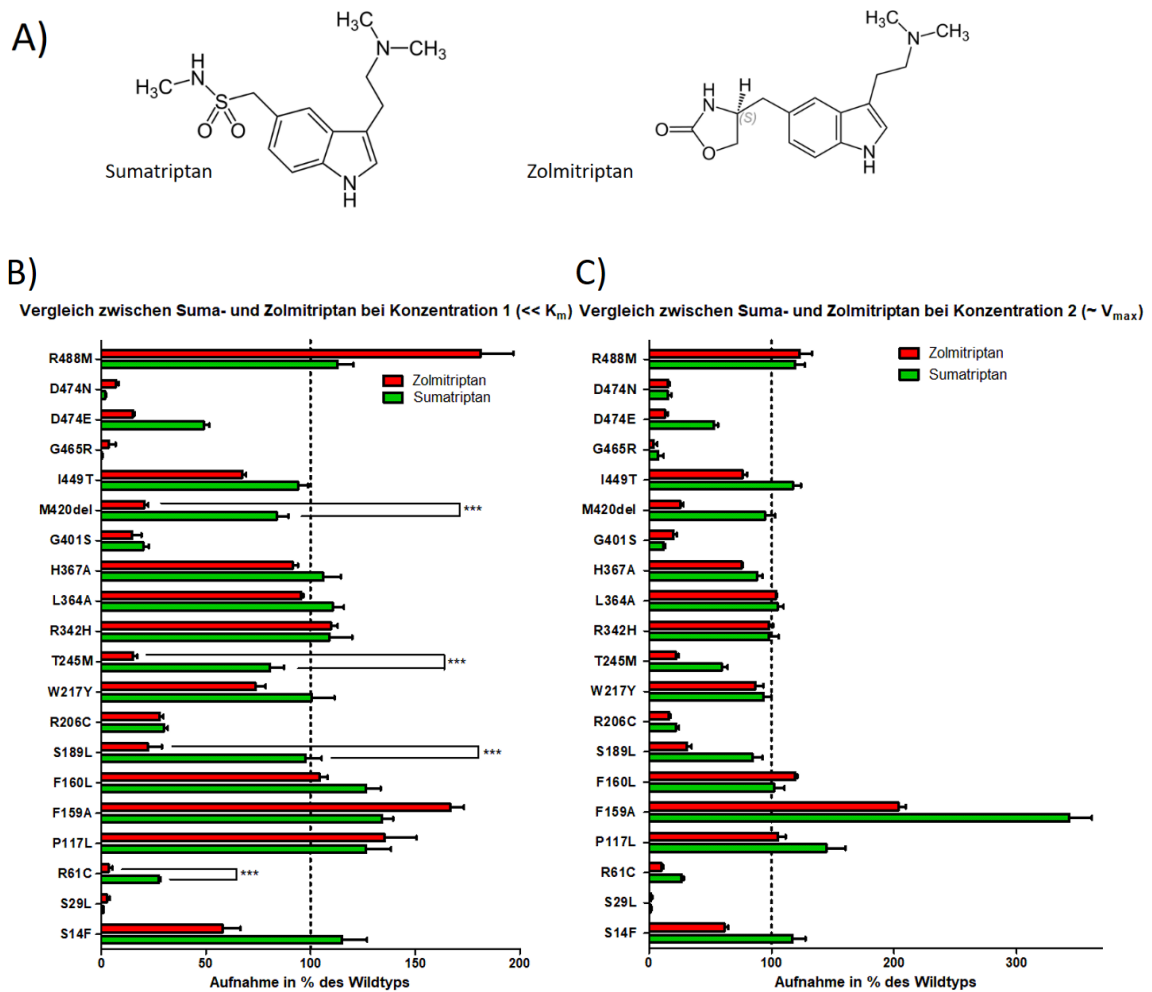


Abbildung 9: Vergleichende funktionelle Charakterisierung der OCT1-Substrate Sumatriptan und Zolmitriptan. A) Suma- und Zolmitriptan sind strukturverwandt. Beide Triptane sind 3,5-substituierte Indole und besitzen eine $(CH_3)_2N-CH_2-CH_2$ -Seitenkette am Indolring. B) und C) Sumatriptan (grün) und Zolmitriptan (rot) wurden mit zwanzig genetischen Varianten untersucht. Dabei wurden zwei unterschiedliche Einzelkonzentrationen gemessen: $\ll K_m$ (links, B) und $\sim V_{max}$ (rechts, C). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ verglichen mit OCT1 nach einfacher Varianzanalyse (ANOVA) und Tukey-Test.

3.2.5 Weitere OCT1-Varianten mit besonders interessanten substratspezifischen Effekten

Die künstliche OCT1-Variante F159A zeigte für sieben der acht getesteten OCT1-Substrate eine höhere v_{\max} als der Wildtyp (Abbildung 10B). Beispielsweise zeigte sich für Sumatriptan im Vergleich zum Wildtyp eine v_{\max} von $342,7 \pm 18,8\%$, für Metformin $311,3 \pm 26,3\%$ und für Fenoterol $242,9 \pm 9,4\%$. Allerdings zeigte sich auch hier ein substratspezifischer Unterschied. Für Morphin zeigte F159A eine v_{\max} von nur $53,8 \pm 5,7\%$ des Wildtyps (Abbildung 10B), während für die restlichen sieben Substrate eine Aktivität gemessen wurde, die durchschnittlich bei $231,9 \pm 14,7\%$ des Wildtypniveaus lag.

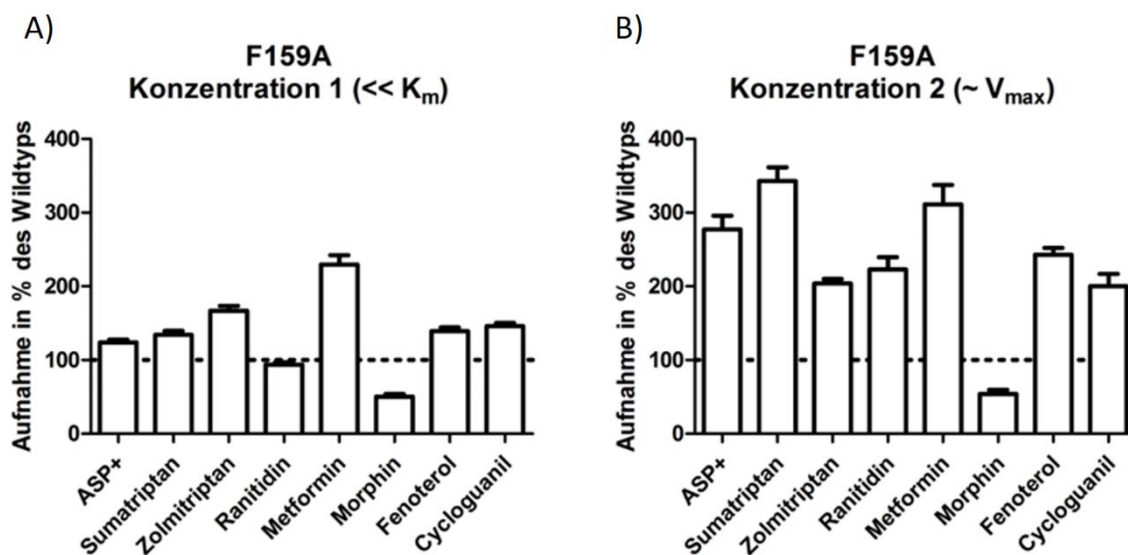


Abbildung 10: Funktionelle Analyse von F159A. F159A wurde mit acht verschiedenen Substraten untersucht. Dabei wurden zwei unterschiedliche Einzelkonzentrationen gemessen: Einmal weit unter dem K_m -Wert ($\ll K_m$, A) und an dem Punkt, an dem die maximale Transportgeschwindigkeit erreicht wurde. ($\sim v_{\max}$; B). Die Variante F159A ist auf dem Hintergrund zweier zusätzlicher Variationen M408V und C450M untersucht worden. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden.

Ein starker, substratspezifischer Effekt für Fenoterol zeigte sich bei der Untersuchung der OCT1-Variante G401S (*OCT1*4*). Bisher wurde G401S zusammen mit R61C (*OCT1*3*) und R206C (*OCT1*14*) in die Gruppe der OCT1-Varianten eingeordnet, die ausschließlich eine starke, aber nicht komplette Funktionseinschränkung des OCT1-Proteins verursachen (Seitz et al. 2015). In der vorliegenden Analyse zeigte G401S bei der Untersuchung der Konzentration 2 ($\sim v_{\max}$) von Fenoterol eine OCT1-Aktivität von $335,9 \pm 55,3$ % (Abbildung 11B). Für die restlichen sieben Substrate liegt die gemittelte maximale OCT1-Aktivität wie erwartet bei $21,0 \pm 2,4$ %.

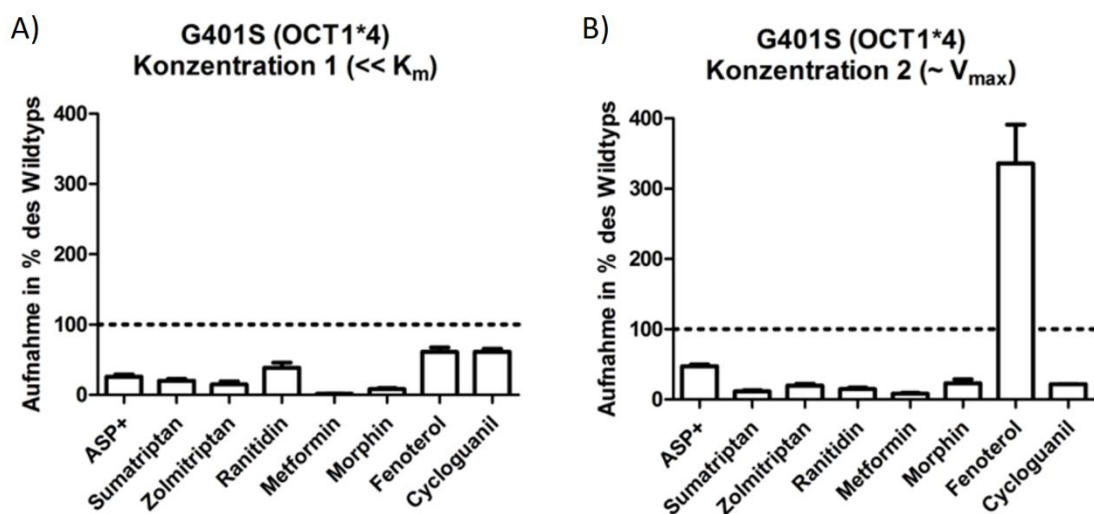


Abbildung 11: Funktionelle Analyse von G401S (*OCT1*4*). G401S wurde mit acht verschiedenen Substraten untersucht. Dabei wurden zwei unterschiedliche Einzelkonzentrationen gemessen: Einmal weit unter dem K_m -Wert ($\ll K_m$, A) und an dem Punkt, an dem die maximale Transportgeschwindigkeit erreicht wurde. ($\sim v_{\max}$; B). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden.

Bei der Untersuchung des weltweit am häufigsten vorkommenden OCT1-Allels *OCT1*2* (M420del) ergaben sich für Zolmitriptan, Fenoterol und Morphin deutliche Funktionseinschränkungen des OCT1-Proteins. So war beispielsweise durch die M420del die OCT1-Aktivität für Zolmitriptan auf $20,6 \pm 1,8$ % (Konzentration 1, Abbildung 12A) bzw. $25,2 \pm 2,6$ % (Konzentration 2, Abbildung 12B) reduziert, für Morphin auf $50,3 \pm 4,6$ % (Konzentration 1, Abbildung 12A) und auf $30,5 \pm 3,6$ % (Konzentration 2, Abbildung 12B).

Andererseits zeigten sich für ASP⁺, Sumatriptan, Ranitidin, Metformin und Cycloguanil keine deutlichen Unterschiede in Abhängigkeit von der Variante M420del. Für ASP⁺ wurde bei Konzentration 1 eine Aktivität von $100,4 \pm 4,1$ % (Abbildung 12A) und für Konzentration 2 $73,5 \pm 3,7$ % (Abbildung 12B) gemessen. M420del zeigte für Sumatriptan eine Aktivität von $83,8 \pm 5,7$ % (Konzentration 1, Abbildung 12A) bzw. $94,8 \pm 8,2$ % (Konzentration 2, Abbildung 12B). M420del zeigt damit substratspezifische Effekte.

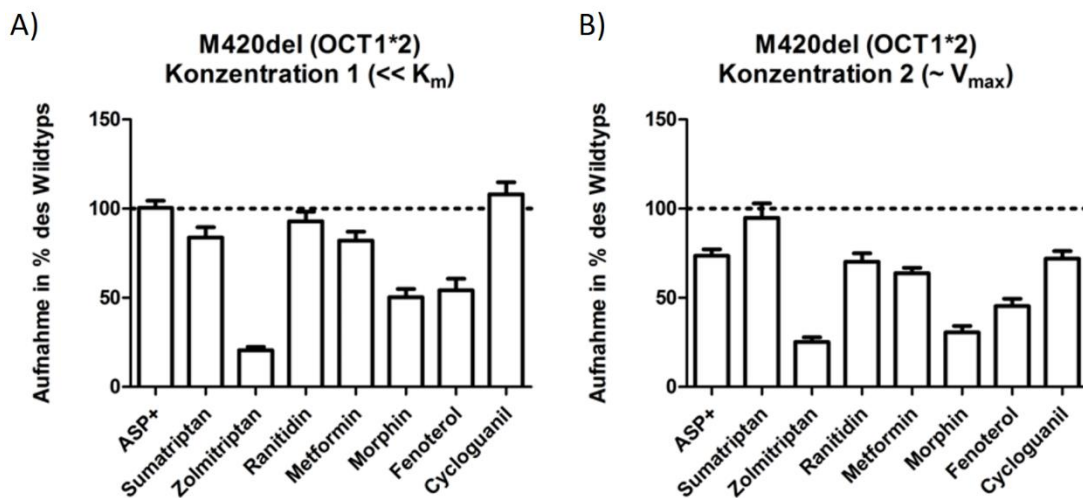


Abbildung 12: Funktionelle Analyse von M420del (*OCT1*2*). M420del wurde mit acht verschiedenen Substraten untersucht. Dabei wurden zwei unterschiedliche Einzelkonzentrationen gemessen: $\ll K_m$ (links, A) und $\sim v_{max}$ (rechts, B). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden.

Die Variante S14F (*OCT1*7*) hat die OCT1-Aktivität nur begrenzt, aber auch substratspezifisch beeinflusst. Bei der Untersuchung zeigte sich beispielsweise für Sumatriptan eine OCT1-Aktivität für Konzentration 1 ($\ll K_m$) von $114,9 \pm 12,1$ %, für Konzentration 2 ($\sim v_{max}$) wurden $117,1 \pm 10,6$ % gemessen. Dahingegen zeigte sich beispielsweise für Zolmitriptan und Morphin eine Funktionseinschränkung bei beiden Konzentrationen, die gemessen wurden. Für Zolmitriptan zeigte S14F eine OCT1-Aktivität von $58,0 \pm 8,4$ % (Konzentration 1, Abbildung 13A) bzw. $61,4 \pm 3,3$ % (Konzentration 2, Abbildung 13B), derweil wurde für Morphin eine Aktivität von $69,6 \pm 3,2$ % (Konzentration 1, Abbildung 13A) bzw. $63,0 \pm 6,0$ % (Konzentration 2, Abbildung 13B) gemessen.

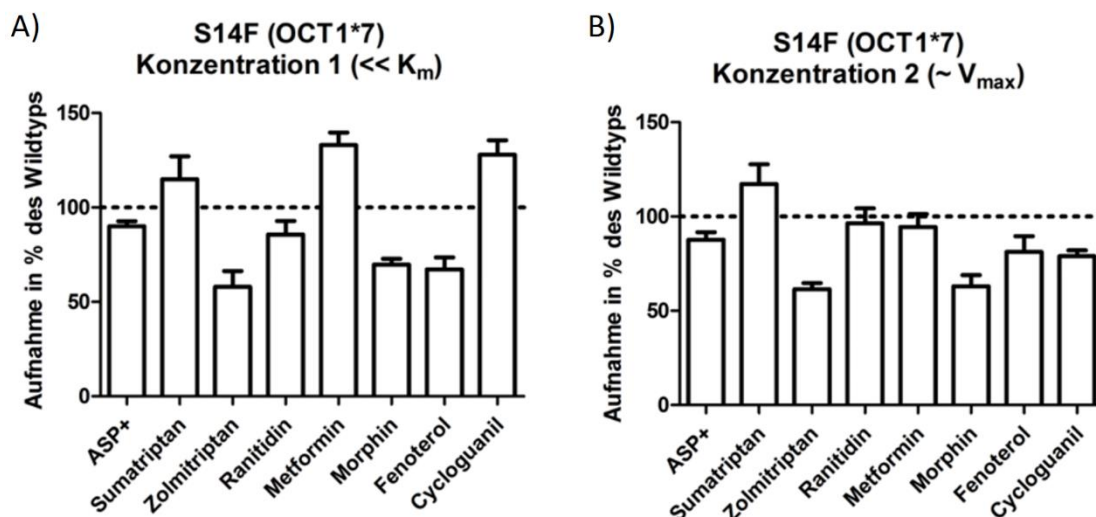


Abbildung 13: Funktionelle Charakterisierung von S14F (*OCT1*7*). S14F wurde mit acht verschiedenen Substraten untersucht. Dabei wurden zwei unterschiedliche Einzelkonzentrationen gemessen: Einmal weit unter dem K_m -Wert ($\ll K_m$, A) und an dem Punkt, an dem die maximale Transportgeschwindigkeit erreicht wurde. ($\sim v_{max}$; B). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden.

Auch bei der Variante S189L (*OCT1*10*) zeigten sich substratspezifische Unterschiede. Für Sumatriptan zeigte sich eine Aktivität, die vergleichbar mit der Wildtypaktivität ist: $97,7 \pm 7,7 \%$ für Konzentration 1 (Abbildung 14A) und $84,8 \pm 8,3 \%$ für Konzentration 2 (Abbildung 14B). Für Zolmitriptan und Metformin dagegen führte die Variante S189L zu deutlichen Funktionseinschränkungen in der OCT1-Aktivität. Die Aktivität für Zolmitriptan lag bei $22,3 \pm 6,6 \%$ (Konzentration 1, Abbildung 14A) bzw. $30,9 \pm 3,8 \%$ (Konzentration 2, Abbildung 14B). Die Einschränkung für Metformin war ähnlich mit $20,4 \pm 1,3 \%$ (Konzentration 1, Abbildung 14A) bzw. $19,3 \pm 1,2 \%$ (Konzentration 2, Abbildung 14B).

Anhand des Modellsubstrats ASP⁺ wird die Abhängigkeit einer OCT1-Funktionseinschränkung von der verwendeten Konzentration deutlich. Während bei Konzentration 1 mit $90,3 \pm 3,6 \%$ (Abbildung 14A) annähernd eine dem Wildtyp vergleichbare OCT1-Aktivität gemessen wurde, liegt bei Konzentration 2 nur noch eine Aktivität von $52,1 \pm 5,2 \%$ vor (Abbildung 14B).

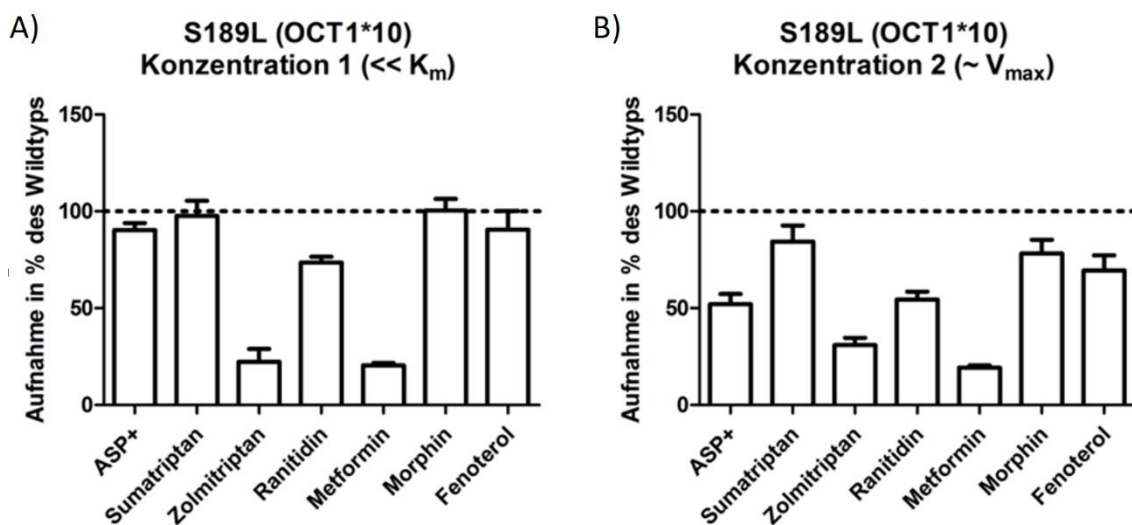


Abbildung 14: Funktionelle Analyse von S189L (*OCT1*10*). S189L wurde mit acht verschiedenen Substraten untersucht. Dabei wurden zwei unterschiedliche Einzelkonzentrationen gemessen: Einmal weit unter dem K_m -Wert ($\ll K_m$, A) und an dem Punkt, an dem die maximale Transportgeschwindigkeit erreicht wurde. ($\sim v_{max}$; B). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden.

Die Variante T245M (*OCT1*13*) führt zu einer starken, aber nicht kompletten OCT1-Funktionseinschränkung.

Besonders interessant ist der substratspezifische und konzentrationsabhängige Effekt Cycloguanils (Abbildung 15). Die Substitution T245M führte zu einer starken Reduktion der Affinität gegenüber Cycloguanil, aber nicht gegenüber den anderen Substraten (Abbildung 15A). Bei Verwendung der Konzentration 1 zeigte sich für Cycloguanil eine hohe OCT1-Aktivität von $179,2 \pm 14,3$ % (Abbildung 15A). Der Effekt auf v_{\max} dagegen ist vergleichbar zwischen Cycloguanil und den anderen Substraten, die getestet wurden (Abbildung 15B).

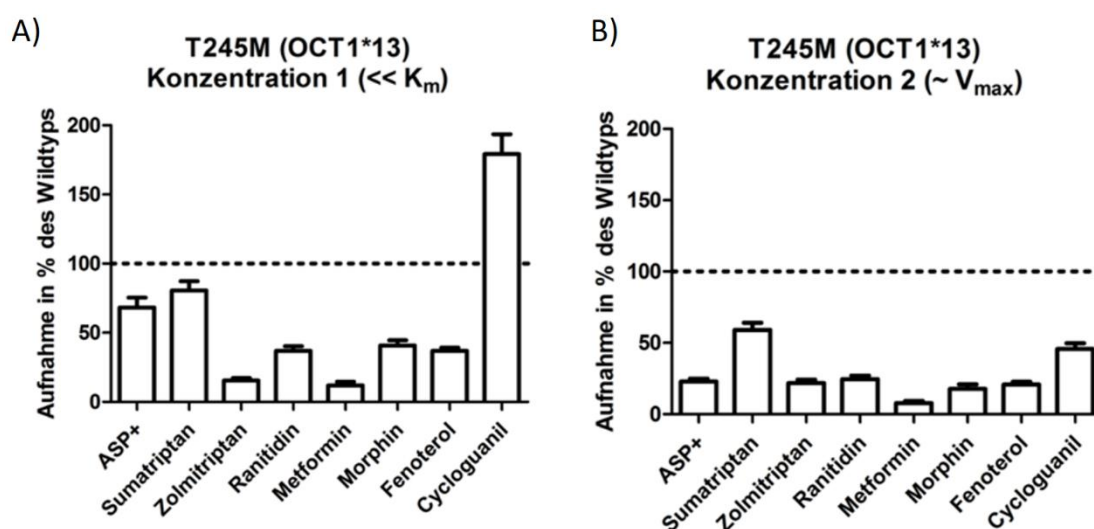


Abbildung 15: Funktionelle Analyse von T245M (*OCT1*13*). T245M wurde mit acht verschiedenen Substraten untersucht. Dabei wurden zwei unterschiedliche Einzelkonzentrationen gemessen: Einmal weit unter dem K_m -Wert ($\ll K_m$, A) und an dem Punkt, an dem die maximale Transportgeschwindigkeit erreicht wurde. ($\sim v_{\max}$; B). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden.

Auch die Variante I449T führt zu substratspezifischen Effekten. Die OCT1-vermittelte Aufnahme für ASP⁺, Sumatriptan, Ranitidin, Fenoterol und Cycloguanil scheint bei beiden untersuchten Konzentrationen nicht beeinträchtigt zu werden (Abbildung 16). So liegt beispielsweise die OCT1-vermittelte Aufnahme von Sumatriptan bei $94,3 \pm 4,7\%$ (Konzentration 1, Abbildung 16A) bzw. $117,2 \pm 6,7\%$ (Konzentration 2, Abbildung 16B) und von Fenoterol bei $124,2 \pm 7,9\%$ (Konzentration 1, Abbildung 16A) bzw. $126,8 \pm 9,7\%$ (Konzentration 2, Abbildung 16B).

Auf der anderen Seite ist die Aufnahme von Zolmitriptan und Metformin eingeschränkt. Für Metformin ist z.B. die OCT1-vermittelte Aufnahme auf $59,5 \pm 3,9\%$ (Konzentration 1, Abbildung 16A) und $74,2 \pm 7,5\%$ (Konzentration 2, Abbildung 16B) vermindert.

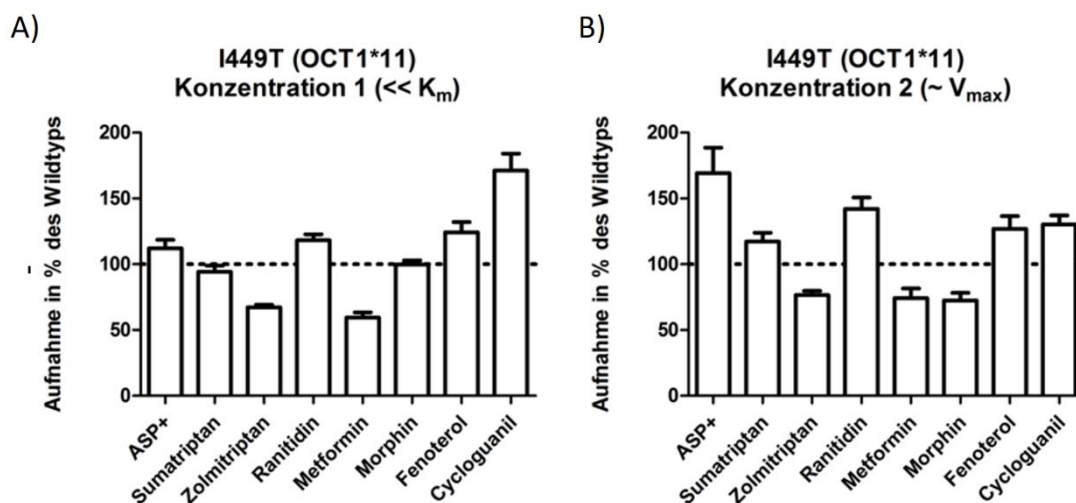


Abbildung 16: Funktionelle Charakterisierung von I449T (OCT1*11). I449T wurde mit acht verschiedenen Substraten untersucht. Dabei wurden zwei unterschiedliche Einzelkonzentrationen gemessen: Einmal weit unter dem K_m-Wert (<<K_m, A) und an dem Punkt, an dem die maximale Transportgeschwindigkeit erreicht wurde. (~ v_{max}; B). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden.

4 Diskussion

4.1 Clusteringanalysen des Transportverhaltens untersuchter genetischer OCT1-Varianten zur Einteilung der Substrate in Substratgruppen

Im Anschluss an die durchgeführten systematischen Mutationsanalysen wurde der Zusammenhang zwischen den verschiedenen Effekten von genetischen OCT1-Varianten und der unterschiedlichen Eigenschaften der untersuchten Substrate getestet. Dazu wurden hierarchische, zweidimensionale Clusteringanalysen durch Prof. Dr. Tim Beißbarth aus der Abteilung Medizinische Statistik der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt. Die Clusteringanalyse basiert auf den Transportexperimenten mit acht verschiedenen Substraten. Der Großteil dieser Daten wurde im Rahmen dieser Arbeit generiert, für die Clusteringanalyse zu den Ergebnissen von Konzentration 1 (Abbildung 17) wurden zudem sämtliche in unserem Labor generierten Daten verwendet. Deshalb liegt der Fokus im Folgenden auf den Ergebnissen der Konzentration 1. Bei der zweidimensionalen Clusteringanalyse stellen die Substrate eine Dimension (Abszisse) dar, die andere Dimension sind die genetischen Varianten (Ordinate).

Insgesamt konnten die getesteten OCT1-Substrate auf drei Cluster eingeteilt werden (Abbildung 17). Zum ersten Cluster (Substratgruppe A) gehören Morphin, Fenoterol, Sumatriptan, ASP⁺ und Ranitidin, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden. Außerdem zählen Debrisoquin und MPP⁺ zur Substratgruppe A. Genetische Varianten, die mit Substraten aus Gruppe A untersucht werden, zeigen deutlich geringere OCT1-Funktionseinschränkungen. Zum zweiten Cluster (Substratgruppe B) gehörten Metformin, Tropisetron, Zolmitriptan, TEA⁺, Monocrotalin, Tyramin und O-Desmethyltramadol. Genetische Varianten, die mit Substraten aus diesem Cluster untersucht werden, zeigen insgesamt sehr starke OCT1-Funktionseinschränkungen.

Davon abzugrenzen ist das Substrat Cycloguanil. Cycloguanil konnte weder Substratgruppe A noch Substratgruppe B zugeordnet werden und stellt das erste Substrat für eine separate Substratgruppe (Subgruppe C) dar. Die untersuchten Varianten zeigten für Cycloguanil kaum OCT1-Funktionseinschränkungen.

Es stellt sich die Frage, ob es chemisch-molekulare Eigenschaften gibt, die die Substratgruppe A von der Substratgruppe B unterscheidet. Hendrickx *et al.* beschreiben, welche molekularen Eigenschaften eines Substrats den OCT1-vermittelten Transport vorhersagen (Hendrickx *et al.* 2013). Die wichtigste Eigenschaft ist diesbezüglich das

Molekularvolumen. Ab einem Molekularvolumen von 500 \AA^3 kann kein OCT1-vermittelter Transport eines Substrats nachgewiesen werden. Das gemittelte Molekularvolumen der Substratgruppe A beträgt $280,0 \pm 22,4 \text{ \AA}^3$, das Molekularvolumen der Substratgruppe B $249,0 \pm 28,0 \text{ \AA}^3$. Der Unterschied im Molekularvolumen ist zwischen beiden Substratgruppen nicht signifikant. Daneben wurden andere chemisch-molekulare Eigenschaften der Substratgruppen untersucht, z.B. Molekulargewicht, pKa-Wert, logP-Wert und logD_{7,4}-Wert (Tabelle 33). Keine der aufgeführten Kategorien weist einen signifikanten Unterschied zwischen Substratgruppe A und B auf.

Zusammengefasst weisen diese Daten stark auf mindestens zwei unterschiedliche Bindungsstellen bzw. Transportmechanismen im OCT1 hin. Darüber hinaus zeigen die Daten, dass es einzelne Substanzen gibt, die sich bezüglich des Effekts der genetischen Varianten und vermutlich auch zur Bindung am OCT1 deutlich von anderen Substraten abheben.

Bei der Clusteringanalyse der genetischen OCT1-Varianten bei Verwendung der jeweiligen Konzentration 2 ($\sim v_{\max}$) zeigen sich zwei Unterschiede (Abbildung 18). Zunächst kann Cycloguanil in eine Untergruppe mit ASP⁺, Ranitidin und Zolmitriptan zusammengefasst werden. Dann konnte die genetische Variante F159A aufgrund ihrer größtenteils den Wildtyp überragenden Transportaktivität (Abschnitt 3.2.5) nicht mit anderen genetischen OCT1-Varianten geclustert werden.

Betrachtet man die Veränderung der K_m bei der Verwendung einer Konzentration deutlich unter der K_m , so fällt die Sonderstellung von G401S auf (Abbildung 19). G401S kann aufgrund starker K_m -Veränderungen nicht mit anderen genetischen OCT1-Varianten geclustert werden. Zudem lässt sich auch hier Cycloguanil in eine Substratgruppe mit ASP⁺, Ranitidin, Zolmitriptan und Sumatriptan clustern.

Einige wenige Untersuchungen mit genetischen OCT1-Varianten wurden bereits in der Vergangenheit in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. Zum Beweis der Unabhängigkeit der Clusteringanalysen von der individuellen Erfahrung des Untersuchers habe ich die betreffenden Werte für einen Vergleich durch meine ersetzt (Abbildung 20). Herr Prof. Dr. Tim Reißbarth führte freundlicherweise auch mit diesen Fremdergebnissen eine Clusteringanalyse durch. Der Vergleich zeigt, dass die Substratgruppen A und B in ihrer Zusammensetzung unverändert bleiben (Abbildung 20).

Die Daten für MPP⁺, TEA, Debrisoquine, Tyramin, Monocrotalin, O-Desmethyltramadol, Tropisetron stammen ausschließlich aus Fremdarbeiten (Seitz et al. 2015) und wurden freundlicherweise für die Clusteringanalysen dieser Arbeit zur Verfügung gestellt.

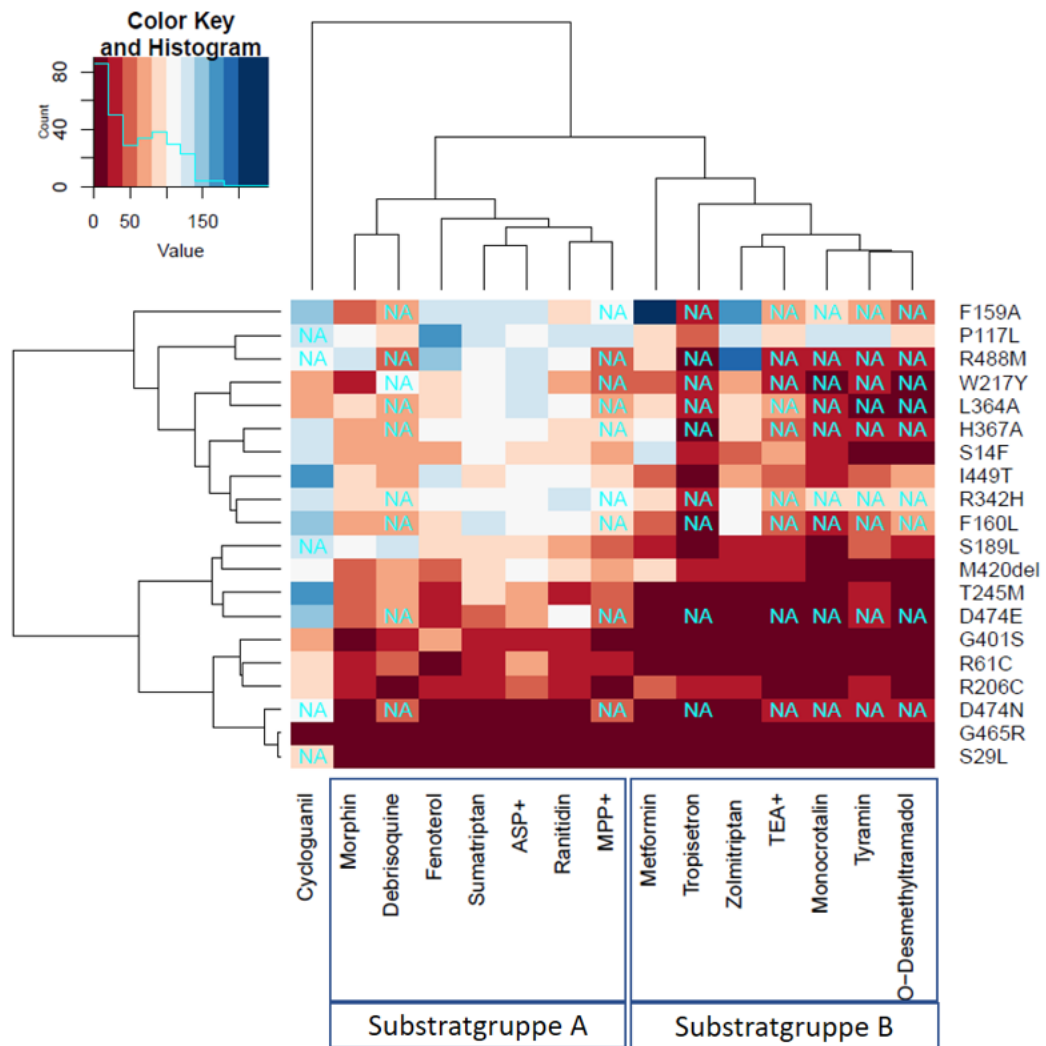


Abbildung 17: Clusteringanalyse zum Transportverhalten der untersuchten genetischen Varianten bei einer Konzentration deutlich unter der K_m des jeweiligen Substrats (Konzentration 1). Auf der Ordinate sind die 20 untersuchten genetischen OCT1-Varianten aufgeführt. Diese sind nach ihren Effekten bezüglich der Transportaktivität geclustert. Auf der Abszisse sind die untersuchten OCT1-Substrate dargestellt, diese sind auch bezüglich ihrer Effekte durch die jeweilige genetischen Variante geclustert. Die farbige Hinterlegung der jeweiligen Felder stellt den Effekt der OCT1-Variante auf den Transport eines Substrats dar. Die Farbe dunkelrot bedeutet kompletter OCT1-Funktionsverlust, weiß und hellblau entsprechen der Wildtypaktivität und dunkelblau ist gleichbedeutend mit einem OCT1-Funktionszugewinn. NA: *not available*; nicht verfügbar. Die verwendeten Daten sind reproduzierbar. Die Daten für MPP+, TEA, Debrisoquine, Tyramin, Monocrotalin, O-Desmethyldramadol, Tropisetron stammen ausschließlich aus Fremdarbeiten (Seitz et al. 2015). Die Clusteringanalyse wurde durch Prof. Dr. Tim Beißbarth aus der Abteilung Medizinische Statistik der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt.

Tabelle 33: Chemische und molekulare Eigenschaften der verschiedenen Substratgruppen und Cycloguanil

	Substratgruppe A	Substratgruppe B	Cycloguanil
Molekulargewicht [Da]	272,9 ± 27,6	220,4 ± 32,3	252
Molekularvolumen [Å ³]	280,0 ± 22,4	249,0 ± 28,0	256
Polare Oberfläche [Å ²]	56,5 ± 15,4	54,3 ± 12,3	80
Anzahl Wasserstoffbrückenbindungen (Donor)	2,1 ± 0,7	1,7 ± 0,4	2
Anzahl Wasserstoffbrückenbindungen (Akzeptor)	2,7 ± 1,0	2,7 ± 0,8	1
logP	0,3 ± 0,5	0,5 ± 0,8	0,96
logD _{7,4}	-0,6 ± 0,4	-0,7 ± 0,6	-1,79
pKa	12,3 ± 2,1	11,0 ± 1,6	10,5

Für die Substratgruppen sind die Mittelwerte aller zugehörigen Substrate und die Standardfehler der Mittelwerte (SEM; *standard error of the mean*) angegeben. Für den jeweiligen Mittelwert einer chemisch-molekularen Eigenschaft der Substratgruppen A und B wurde ein Doppelter t-Test durchgeführt, um signifikante Unterschiede zwischen den Substratgruppen zu erkennen.

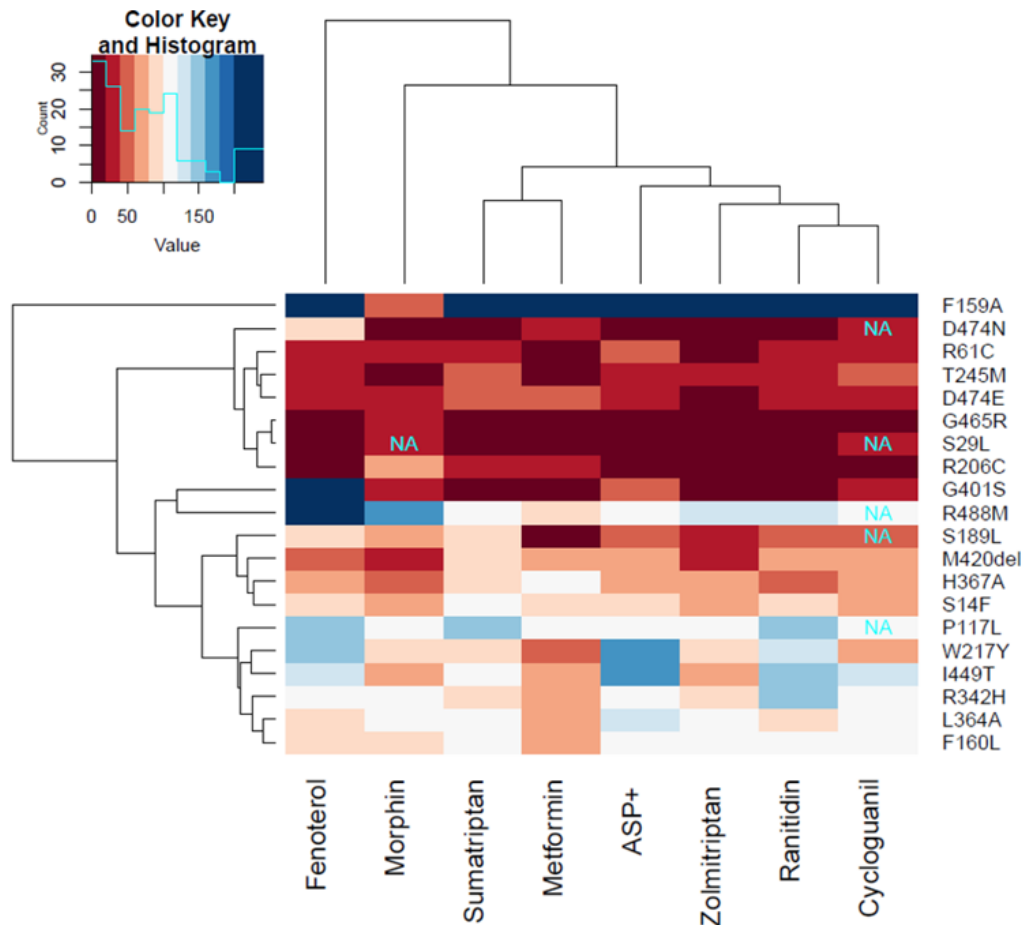


Abbildung 18: Clusteringanalyse zum Transportverhalten der untersuchten genetischen Varianten im Konzentrationsbereich, in dem die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{\max} erreicht ist ($\sim v_{\max}$). Rechts sind erneut die genetischen OCT1-Varianten aufgeführt, die nach ihren Effekten bezüglich der Transportaktivität geclustert sind. Auf der Abszisse sind die OCT1-Substrate aufgeführt. Die farbige Hinterlegung der jeweiligen Felder stellt den Effekt der OCT1-Variante auf den Transport eines Substrats dar. Die Farbe dunkelrot bedeutet kompletter OCT1-Funktionsverlust, weiß und hellblau entsprechen der Wildtypaktivität und dunkelblau ist gleichbedeutend mit einem OCT1-Funktionszugewinn. NA: *not available*; nicht verfügbar. Die verwendeten Daten sind reproduzierbar. Die Clusteringanalyse wurde durch Prof. Dr. Tim Beißbarth aus der Abteilung Medizinische Statistik der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt.

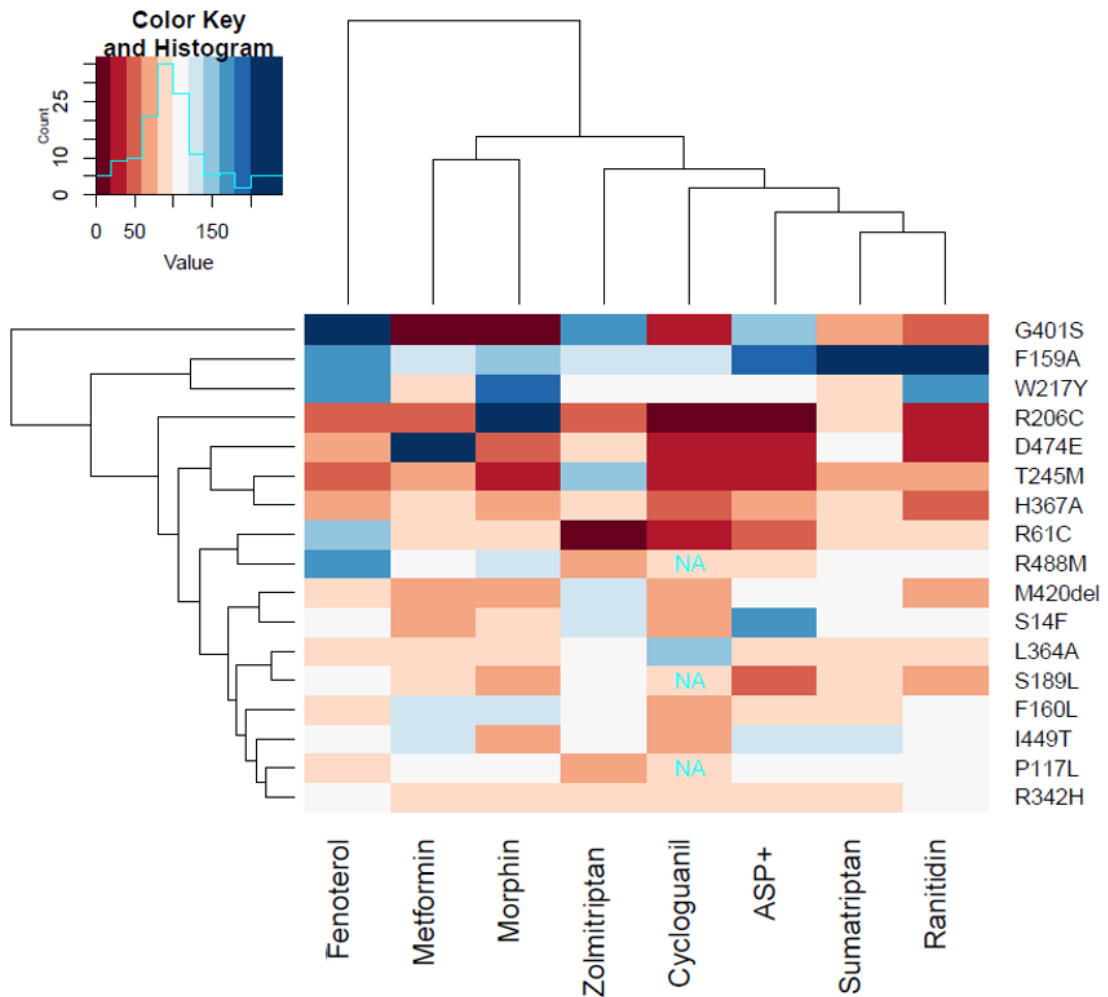


Abbildung 19: Clusteringanalyse zum Transportverhalten der untersuchten genetischen Varianten unter Berücksichtigung der Veränderung der K_m bei Konzentrationen deutlich unter der K_m des jeweiligen Substrats (Konzentration 1). Rechts sind die genetischen OCT1-Varianten aufgeführt, die nach ihren Effekten bezüglich der Transportaktivität geclustert sind. Auf der Abszisse sind die OCT1-Substrate aufgeführt. Die farbige Hinterlegung der jeweiligen Felder stellt den Effekt der OCT1-Variante auf den Transport eines Substrats dar. Die Farbe dunkelrot bedeutet kompletter OCT1-Funktionsverlust, weiß und hellblau entsprechen der Wildtypaktivität und dunkelblau ist gleichbedeutend mit einem OCT1-Funktionszugewinn. NA: *not available*; nicht verfügbar. Die verwendeten Daten sind reproduzierbar. Die Clusteringanalyse wurde durch Prof. Dr. Tim Reißbarth aus der Abteilung Medizinische Statistik der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt.

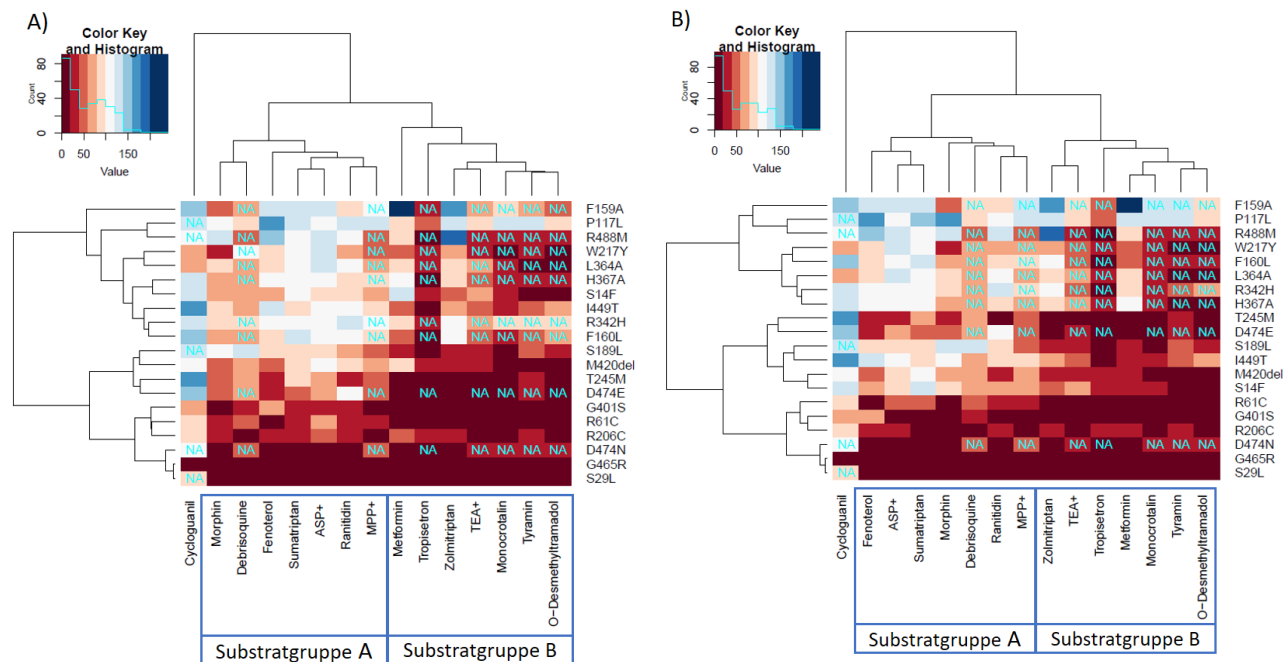


Abbildung 20: Vergleich der Clusteringanalyse zum Transportverhalten der untersuchten genetischen Varianten bei einer Konzentration deutlich unter der K_m des jeweiligen Substrats (Konzentration 1) mit Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe. A) zeigt die Clusteringanalyse mit Werten, die in dieser Arbeit generiert wurden. B) zeigt die Clusteringanalysen mit Werten, die zum Teil aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppen stammen. Auf der Ordinate sind die 20 untersuchten genetischen OCT1-Varianten aufgeführt. Diese sind nach ihren Effekten bezüglich der Transportaktivität geclustert. Auf der Abszisse sind die untersuchten OCT1-Substrate dargestellt, diese sind auch bezüglich ihrer Effekte durch die jeweilige genetischen Variante geclustert. Die farbige Hinterlegung der jeweiligen Felder stellt den Effekt der OCT1-Variante auf den Transport eines Substrats dar. Die Farbe dunkelrot bedeutet kompletter OCT1-Funktionsverlust, weiß und hellblau entsprechen der Wildtypaktivität, dunkelblau ist gleichbedeutend mit einem OCT1-Funktionszugewinn. NA: *not available*; nicht verfügbar. Die Daten für MPP+, TEA, Debrisoquine, Tyramin, Monocrotalin, O-Desmethyltramadol, Tropicsetron stammen ausschließlich aus Fremdarbeiten (Seitz et al. 2015). Die Clusteringanalyse wurde durch Prof. Dr. Tim Reißbarth aus der Abteilung Medizinische Statistik der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt.

4.2 Unterschiedliche Transportaktivitäten der genetischen OCT1-Varianten im Literaturvergleich

Die Transportaktivitäten für Metformin im Literaturvergleich

Für Metformin zeigen sich im Literaturvergleich teilweise widersprüchliche Ergebnisse, vor allem im Vergleich der prozentualen K_m -Verhältnisse. Die K_m für Metformin liegt bei $2,42 \pm 0,52$ mM (Shu et al. 2007). Die in der Folge angegebenen prozentualen Werte zeigen das Verhältnis der K_m der jeweiligen Variante zur K_m des Wildtyps an. Ahlin et al. zeigten für M420del (*OCT1*2*) eine geringfügige Veränderung des K_m -Verhältnisses (zur Erläuterung des K_m -Verhältnisses siehe Anmerkung zu Tabelle 32) auf 95,2 % (Ahlin et al. 2011), während Shu et al. ein K_m -Verhältnis von 188,4 % angeben. (Shu et al. 2007). Das in dieser Arbeit gemessene K_m -Verhältnis von 79,3 % stützt das Ergebnis von Ahlin et al. Die angegebenen Ergebnisse sind statistisch nicht signifikant (Ahlin et al. 2011; Shu et al. 2007).

Shu et al. verwendeten eine Metformin-Konzentration von 250 μ M (Shu et al. 2007) und damit eine Konzentration deutlich unter der K_m des Wildtyps. Um eine Vergleichbarkeit zu Shu et al. herzustellen und die Diskrepanz zu erklären, wurden zusätzlich Transportversuche mit einer Metformin-Konzentration von 250 μ M anstelle der eigentlich verwendeten Konzentration von 100 μ M durchgeführt. Es ergab sich ein K_m -Verhältnis von 73,4%. Auch mit einer Metformin-Konzentration von 250 μ M konnte das von Shu et al. angegebene K_m -Verhältnis nicht bestätigt werden. Die Ergebnisse für v_{max} sind auch uneindeutig: Während Ahlin et al. eine OCT1-Funktionseinschränkung auf 36,4 % (statistisch signifikant) des Wildtyps angeben, weisen Shu et al. 49,1 % aus (Ahlin et al. 2011; Shu et al. 2007). Mein Ergebnis liegt mit 63,8 % höher.

Ähnlich wie für M420del zeigten sich beim Vergleich mit Shu et al. widersprüchliche Ergebnisse für S14F (*OCT1*7*). Shu et al. haben ein K_m -Verhältnis von 109,5 % und eine v_{max} von 55,9 % des Wildtyps gemessen (Shu et al. 2007), während ich ein K_m -Verhältnis von 71,5 % und eine OCT1-Transportaktivität bei v_{max} von 94,3 % gemessen habe. Auch hier wurden zur Erklärung der Diskrepanz zusätzliche Transportexperimente mit einer Metformin-Konzentration von 250 μ M durchgeführt. Doch auch hier reichte eine

Anpassung der Konzentration zur Erklärung der unterschiedlichen Ergebnisse nicht aus, da sich ein K_m -Verhältnis von 69,0% ergab.

P117L (*OCT1*9*) ist eine Aminosäuresubstitution, die zu einem OCT1-Funktionszugewinn führt (Seitz et al. 2015). Auch in der vorliegenden erweiterten Charakterisierung von P117L zeigt sich für die acht untersuchten OCT1-Substrate im Mittel eine OCT1-Aktivität von $125,7 \pm 9,5$ % (Konzentration 1) bzw. $128,6 \pm 12,8$ % (Konzentration 2). Umso widersprüchlicher und überraschender ist das Ergebnis von Chen et al., die P117L mit Metformin untersuchten und eine OCT1-Aktivität von 51,0 % bei v_{max} publizierten (Chen et al. 2010). Im Gegensatz dazu habe ich eine Aktivität von $108, \pm 9,0$ % gemessen. Das von mir gemessene K_m -Verhältnis von $109,2 \pm 12,1$ % stimmt dahingegen besser mit dem Ergebnis von 128,0 % von Chen et al. überein (Chen et al. 2010). Auch R206C (*OCT1*14*) wurde von Chen et al. mit Metformin untersucht. Sie zeigten ein K_m -Verhältnis von 111,0 % und eine OCT1-Aktivität bei v_{max} von 19,9 % (Chen et al. 2010), während ich ein von Chen et al. abweichendes K_m -Verhältnis von 41,1 % und eine übereinstimmende OCT1-Aktivität bei v_{max} von 21,4 % messen konnte.

Bei der Beurteilung der widersprüchlichen K_m muss eine mangelnde Vergleichbarkeit in Betracht gezogen werden, da die in der vorliegenden Arbeit untersuchte OCT1-Variante R206C (*OCT1*14*) natürlicherweise auch die Hintergrundmutationen M420del und M408V aufweist (Seitz et al. 2015). Chen et al. untersuchten allerdings ausschließlich R206C ohne Hintergrundmutationen (Chen et al. 2010). Ein beachtlicher Unterschied liegt in der Tatsache, dass Chen et al. ein *green fluorescent protein* (GFP)-markiertes OCT1-Modell verwendeten (Chen et al. 2010). In dieser Arbeit war das OCT1-Modell nicht mit GFP markiert und ist deshalb eine bessere Annäherung an die In-vivo-Bedingungen als das Modell von Chen et al. Diese unterschiedlichen Modelle können die sich unterscheidenden Ergebnisse erklären.

Für die Untersuchung der substratspezifischen OCT1-Variante S189L (*OCT1*10*) mit Metformin zeigten sich mit der Literatur übereinstimmende Ergebnisse. Shu et al. konnten ein K_m -Verhältnis von 99,6 % und eine OCT1-Aktivität bei v_{max} von 20,8 % messen (Shu et al. 2007). Meine Charakterisierung ergab ein K_m -Verhältnis von 90,9 % und eine OCT1-Aktivität bei v_{max} von 19,4 %. G401S (*OCT1*4*) zeigte mit $1,6 \pm 0,3$ % (Konzentration 1) und $8,0 \pm 1,5$ % (Konzentration 2) sehr starke Funktionseinschränkungen. Auch Shu et al.

zeigen bei v_{\max} eine OCT1-Transportaktivität von nur 9,9 % (Shu et al. 2007). Durch diese praktisch kaum vorhandene Transportaktivität kann kein K_m -Verhältnis berechnet werden.

Es fällt auf, dass sich vor allem die prozentualen K_m -Verhältnisse deutlich unterscheiden. Die zitierten Arbeitsgruppen untersuchten Metformin vor allem konzentrationsabhängig und berechnen daraus die wichtigen Parameter der Michaelis-Menten-Kinetik K_m und v_{\max} . In dieser Arbeit wurden hingegen Einzelkonzentrationen gemessen und für Ergebnisse zur Konzentration 1 wurde eine mathematische Umstellung der Michaelis-Menten-Gleichung vorgenommen, um das jeweilige K_m -Verhältnis zu berechnen (Tabelle 32). Diese abweichende Art, die K_m zu bestimmen, stellt eine Limitation dieser Arbeit dar und kann unter Umständen einen Teil der Diskrepanzen erklären.

Die Transportaktivitäten für Morphin im Literaturvergleich

Die Sonderstellung des Opioid-Analgetikum Morphins könnte die besonderen Verhaltensweisen in den durchgeführten Transportexperimenten erklären, wie z. B. den substratspezifischen Effekt von F159A (Abschnitt 3.2.5). Die Besonderheit des Morphins ist, dass dieses als einziges der acht untersuchten Substanzen als natürliche Substanz einzustufen ist. Morphin wird aus Opium gewonnen, wobei Opium als Saft aus den Kapseln der Pflanze *Papaver somniferum* (Schlafmohn) etwa 10 % Morphin enthält (Aktories et al. 2004). Tzvetkov et al. untersuchten M420del (*OCT1*2*) und R61C (*OCT1*3*). Für M420del zeigen Tzvetkov et al. ein K_m -Verhältnis von 147,1 % und eine OCT1-Aktivität bei v_{\max} von 24,9 % (Tzvetkov et al. 2013). Während der in dieser Arbeit gemessene Wert für die OCT1-Aktivität bei v_{\max} mit 30,5 % mit Tzvetkov et al. übereinstimmt, weicht das K_m -Verhältnis mit einem prozentualen Wert von 78,2 % ab. Bei R61C zeigten sich übereinstimmende Werte für v_{\max} und das K_m -Verhältnis. Tzvetkov et al. geben ein K_m -Verhältnis von 102,9 % an (Tzvetkov et al. 2013), ich habe 85,1 % gemessen. Für die OCT1-Aktivität bei v_{\max} wurden von Tzvetkov et al. 21,6 % (Tzvetkov et al. 2013), für die vorliegende Charakterisierung wurden 20,5 % gemessen. Diese Übereinstimmung ist sinnvoll, da in dieser Arbeit im Vergleich zu Tzvetkov et al. dieselben standardisierten Bedingungen beachtet wurden (Tzvetkov et al. 2013).

Die Transportaktivitäten für ASP⁺ im Literaturvergleich

M420del (*OCT1*2*) und R61C (*OCT1*3*) wurden von Ahlin et al. auch mit dem Modellsubstrat ASP⁺ untersucht (Ahlin et al. 2011). Erneut fällt hier ein diskrepantes K_m -

Verhältnis für M420del auf. Ahlin et al. konnten mit 120,1 % eine Zunahme des K_m -Verhältnisses und damit eine Affinitätsniedrigung für ASP⁺ messen (Ahlin et al. 2011), während ich mit 73,6 % eine Abnahme des K_m -Verhältnisses und damit eine Affinitätszunahme messe. Für die OCT1-Aktivität bei v_{max} habe ich 73,5 % gemessen, Ahlin et al. 87,9 % (Ahlin et al. 2011). Für R61C messen Ahlin et al. ein K_m -Verhältnis von 61,2 % und eine OCT1-Aktivität bei v_{max} von 25,7 % (Ahlin et al. 2011). Diese Werte stimmen mit den für diese Arbeit gemessenen Werten überein (K_m -Verhältnis: 63,7 % und OCT1-Aktivität bei v_{max} : 43,7 %).

Die Aminosäuresubstitution M420del (OCT1*2) im Literaturvergleich

Für Metformin, Morphin und ASP⁺ geben Shu et al., Tzvetkov et al. und Ahlin et al. ein diskrepantes K_m -Verhältnis für M420del (OCT1*2) an (Ahlin et al. 2011; Shu et al. 2007; Tzvetkov et al. 2013). Dies kann dadurch erklärt werden, dass für die vorliegende Arbeit die OCT1-Variante M420del mit der zusätzlichen Hintergrundmutation M408V untersucht wurde (Abschnitt 2.1.9).

Dahingegen verwendeten Shu et al. und Ahlin et al. das Valin₄₀₈-Allel anstelle des Methionin₄₀₈-Allels. Einschränkend muss erwähnt werden, dass die Hintergrundmutation M408V den substratspezifischen Effekt von M420del nur schwach beeinflusst (Tzvetkov et al. 2014).

Die OCT1-Varianten L364A und H367A im Literaturvergleich

Die OCT1-Varianten L364A und H367A wurden im Rahmen dieser Arbeit stabil transfiziert (Abschnitt 3.1). Die Charakterisierung von L364A zeigte für alle untersuchten Substrate keinen bedeutenden OCT1-Funktionsverlust. Auch H367A verhielt sich vor allem bei der jeweiligen Konzentration 1 (Tabelle 27) ähnlich der Wildtypaktivität, bei höheren Konzentrationen zeigten sich moderate Funktionseinbußen (Abschnitt 3.2.2). Für L364A und H367A zeigte Seitz in ihrer Arbeit zum Teil stark unterschiedliche Ergebnisse (Seitz 2016).

ASP⁺ ist die einzige Substanz, die in beiden Arbeiten gemessen wurde. Für ASP⁺ verwendete Seitz eine Konzentration von 5 μ M, diese Konzentration entspricht der in dieser Arbeit verwendeten Konzentration 1. Seitz zeigte für L364A eine OCT1-Aktivität von 84 bzw. 38 % für H367A (Seitz 2016). Im Gegensatz dazu konnte diese Arbeit keinen OCT1-Funktionsverlust nachweisen. Für L364A wurde eine OCT1-Aktivität von $133,8 \pm 5,8$ %

gemessen, für H367A $103,5 \pm 9,2$ %. In dieser Arbeit konnte für L364A und H367A bei der Untersuchung der acht OCT1-Substrate eine OCT1-Funktionseinschränkung dieses Ausmaßes nicht gezeigt werden.

Zusammenfassende Beurteilung unterschiedlicher Transportaktivitäten im Literaturvergleich

Insgesamt zeigt sich eine gute Vergleichbarkeit zwischen den in dieser Arbeit gemessenen Transportaktivitäten der genetischen OCT1-Varianten und den publizierten Transportaktivitäten internationaler Arbeitsgruppen. Die besprochenen Diskrepanzen in den jeweiligen Vergleichen sind hauptsächlich auf die anderweitige Berechnung der K_m -Verhältnisse zurückzuführen. Weiterhin spielen auch Hintergrundmutationen verwendeter genetischer OCT1-Varianten eine Rolle. Beispielsweise zeigte die untersuchte Variante R206C zusätzlich die Hintergrundmutationen M420del und M408V, natürlicherweise bilden alle drei Mutationen zusammen *OCT1*14*. In der Literatur werden hauptsächlich die Hauptmutationen untersucht. Weiterhin muss beachtet werden, dass diskrepante Werte auch durch Unterschiede in den verwendeten Konzentrationen erklärt werden können. So nutzten Shu et al. eine Metformin-Konzentration von 250 μ M (Shu et al. 2007), während Chen et al. eine 14 C-Metformin-Konzentration von nur 10 μ M verwendeten (Chen et al. 2010). In dieser Arbeit wurde als Konzentration 1 100 μ M Metformin genutzt. Obwohl die jeweils verwendeten Konzentrationen unterschiedlich sind, liegen alle drei angeführten Konzentrationen weit unter der für Metformin von Shu et al. publizierten K_m von $2,42 \pm 0,52$ mM (Shu et al. 2007). Daher scheinen unterschiedlich verwendete Konzentrationen in der Erklärung diskrepanter Werte keine große Rolle zu spielen.

4.3 Interpretation besonders interessanter substratspezifischer Effekte

Bei der vergleichenden Charakterisierung der OCT1-Varianten D474E und D474N zeigten sich starke Effekte auf die OCT1-Funktion. Der Verlust der negativen Ladung des Aspartats durch die Substitution zu Asparagin (D474N) wiegt dabei deutlich schwerer als die Substitution zu Glutamat (D474E) (Abschnitt 3.2.3). Die negative Ladung bleibt bei der Variante D474E erhalten. Die Position der negativen Ladung ist allerdings im Vergleich zur Aminosäure Aspartat verschoben. Während die Variante D474N zu einem substratübergreifenden Aktivitätsverlust führt, zeigt D474E substratspezifische Effekte (Abbildung 8). Dies ist ein erneuter wichtiger Hinweis für die essentielle Bedeutung der

negativen Ladung der Aminosäure Aspartat₄₇₄ im Translokationsprozess einiger untersuchter Substrate. Konkret zeigten sich beispielsweise für ASP⁺ und Ranitidin durch die Variante D474E kaum Beeinträchtigungen in der OCT1-Aktivität (Abbildung 8B, Konzentration $\ll K_m$). Beide Substrate gehören zu der Substratgruppe A, die generell eher geringe Effekte auf die OCT1-Aktivität zeigte. Für D474N allerdings zeigen ASP⁺ und Ranitidin deutliche Funktionseinbußen, die auf den Verlust der negativen Ladung des Aspartats zurückgeführt werden können. Für Ranitidin war beispielsweise keine Transportaktivität nachweisbar. Auf der anderen Seite zeigen Substrate der Substratgruppe B, beispielsweise Zolmitriptan und Metformin, unabhängig von der Verschiebung der negativen Ladung (D474E) oder dem Verlust der negativen Ladung (D474N) starke Effekte auf die OCT1-Aktivität. Es kann geschlussfolgert werden, dass die Bindungstasche von Zolmitriptan und Metformin durch die jeweilige Variante deutlich stärker beeinflusst wird, als die Bindungstasche von ASP⁺ und Ranitidin.

Trotz struktureller Ähnlichkeit zeigen Sumatriptan und Zolmitriptan signifikante Unterschiede in der OCT1-vermittelten Aufnahme bei mehreren Varianten. Die Substitutionen S189L, T245M, R61C und die M420del zeigten signifikante Unterschiede in der Aufnahme beider Triptane. Sumatriptan wurde deutlich besser aufgenommen. Dies ist ein Hinweis auf die besondere Bedeutung der Aminosäuren Serin₁₈₉, Threonin₂₄₅, Methionin₄₂₀ und Arginin₆₁ im Transportprozess für Zolmitriptan, aber weniger für Sumatriptan. Die genannten OCT1-Varianten könnten zu einer Veränderung der Bindungstasche für Zolmitriptan führen. Auf diese Bindungstasche ist Sumatriptan offenbar nicht angewiesen. Diese These wird auch dadurch unterstützt, dass Sumatriptan zu der Substratgruppe A gehört, während Zolmitriptan der Substratgruppe B zugehörig ist. Durch die ähnliche Struktur wird auch klar, dass nicht die Indol-Struktur, sondern der substituierte Rest an Position 3 eine wichtige Rolle in der Interaktion mit der jeweiligen Bindungstasche spielt. Dies ist in Übereinstimmung mit der bisherigen Beobachtung, dass geringfügige Veränderungen der Struktur eines Substrats ausreichen, damit dieses nicht mehr durch OCT1 transportiert wird. Beispielsweise ist das Opioid-Analgetikum Morphin ein Substrat von OCT1. Codein hingegen zeigt eine Methylierung der phenolischen Hydroxylgruppe am Grundgerüst des Morphins und ist kein Substrat des OCT1 (Tzvetkov et al. 2013)

Eine Veränderung der Bindungstasche durch Aminosäuresubstitutionen könnte auch der Grund dafür sein, dass durch die Variante F159A die Bindungstasche ausschließlich für Morphin verändert wird. Morphin zeigte hier eine v_{max} von nur $53,8 \pm 5,7$ % des Wildtyps (Abbildung 10B), während für die restlichen sieben Substrate eine Aktivität gemessen wurde, die durchschnittlich bei $231,9 \pm 14,7$ % des Wildtypniveaus lag. Denkbar ist zudem auch,

dass durch F159A die quantitative Menge des Transporters an der sinusoidalen Membran der Hepatozyten herunterreguliert wird. Dadurch ist die Syntheserate des Transporters eingeschränkt und in der Folge wird die Transportaktivität im Vergleich zum Wildtyp reduziert. Weiterhin könnte durch F159A auch die Dauer des Transports verkürzt werden. Hier würde zwar die Syntheserate stabil bleiben, aber der Abbau des Transporters durch F159A ist beschleunigt. Gegen diese Theorien spricht allerdings, dass die v_{\max} durch F159A nur für Morphin reduziert ist, nicht aber für die restlichen untersuchten Substrate. Deshalb sind weitere Erklärungen für diese Beobachtungen notwendig.

Ähnliches gilt auch für die Variante G401S, da hier bei der Untersuchung der Konzentration 2 ($\sim v_{\max}$) von Fenoterol eine OCT1-Aktivität von $335,9 \pm 55,3$ % (Abbildung 11B). Für die restlichen sieben Substrate liegt die gemittelte maximale OCT1-Aktivität wie erwartet bei $21,0 \pm 2,4$ %.

4.4 Mögliche klinische Auswirkungen ausgewählter genetischer OCT1-Varianten auf die Pharmakokinetik und Wirkung von Pharmaka

Klinische Auswirkungen von M420del (OCT1*2) und R61C (OCT1*3) auf die Wirkung von Metformin

M420del (OCT1*2) und R61C (OCT1*3) sind mit erniedrigter hepatischer Metforminaufnahme und erhöhter Rate an Nebenwirkungen durch Metformin assoziiert (Dujic et al. 2016; Sundelin et al. 2017). Sundelin et al. untersuchten die hepatische Metforminaufnahme mittels dynamischer Positronen-Emissions-Tomographie-Bildgebung in-vivo (Sundelin et al. 2017). Dabei wurde angenommen, dass die OCT1-Varianten M420del und R61C die Aufnahme abschwächen (Sundelin et al. 2017). Die hepatische Metforminaufnahme der *extensive transporter* war doppelt so hoch im Vergleich zu *poor transporter*. Auch nach intravenöser Injektion von ^{11}C -Metformin bestätigte sich die abgeschwächte hepatische Metforminaufnahme bei Vorliegen von M420del und R61C (Sundelin et al. 2017).

In einer anderen Studie wurde eine Korrelation zwischen den genetischen OCT1-Varianten M420del und R61C und gastrointestinalen Nebenwirkungen, die durch Metformin hervorgerufen werden, untersucht (Dujic et al. 2016). Bei 20-30 % der mit Metformin behandelten Patienten treten gastrointestinale Nebenwirkungen auf. Aufgrund anhaltender Nebenwirkungen mussten 5% der Probanden die Behandlung mit Metformin abbrechen. Zu

diesen Nebenwirkungen, die die Lebensqualität erheblich einschränken, gehören: Flatulenzen, Bauchschmerzen, Übelkeit, Diarrhöen und Erbrechen in Abwesenheit einer akuten gastrointestinalen Infektion. Dujic et al. beobachteten 92 mit Metformin behandelte Patienten, davon waren 40 % *intermediate transporter*, 8 % *poor transporter*. Insgesamt zeigten 47% der Patienten gastrointestinale Nebenwirkungen, dabei ist die Anzahl der funktionsbeeinträchtigenden OCT1-Allele statistisch signifikant mit dem Auftreten von Nebenwirkungen durch Metformin verbunden (Dujic et al. 2016).

Internationale Arbeitsgruppen definieren in ihren Studien M420del (*OCT1*2*) und R61C (*OCT1*3*) substratunabhängig als genetische OCT1-Varianten, die die OCT1-Funktion einschränken (Dujic et al. 2016; Sundelin et al. 2017). Im Vergleich mit der in dieser Arbeit erzielten Charakterisierung muss in Betracht gezogen werden, dass diese Annahme unter Umständen nicht korrekt ist. Es handelt sich bei M420del und R61C um Loss-of-Function-Varianten, die unterschiedlichen Kategorien zugeordnet werden müssen. Ein Blick auf die In-vitro-Daten dieser Arbeit zeigt Folgendes: R61C bewirkt tatsächlich substratunabhängig eine starke, aber nicht komplette OCT1-Funktionseinschränkung. Für Metformin zeigte R61C bei Konzentration 1 ($\ll K_m$) eine OCT1-Aktivität von $8,7 \pm 1,3$ % bzw. $7,2 \pm 1,2$ % bei Konzentration 2 ($\sim V_{max}$).

Im Gegensatz dazu zeigt M420del substratspezifische Effekte. Die OCT1-Aktivität bei der Untersuchung für Metformin betrug 64 % (Konzentration 2) bzw. 82% (Konzentration 1). Dabei korreliert die jeweils verwendete Konzentration 1 deutlich besser mit der physiologischen Blutplasmakonzentration eines Medikaments. In Anbetracht dieser Daten bzw. bei Bestätigung dieser Daten ist die Auswahl von M420del (*OCT1*2*) durch Sundelin et al. und Dujic et al. zu überdenken.

Für zukünftige Studien dieser Art sollten G401S (*OCT1*4*) und G465R (*OCT1*5*) neben R61C als Loss-of-Function-Varianten definiert werden. G401S bewirkt auch eine substratunabhängige OCT1-Funktionseinschränkung. Für Metformin zeigte sich eine OCT1-Aktivität von nur $1,6 \pm 0,3$ % (Konzentration 1) bzw. $8,0 \pm 1,5$ % (Konzentration 2). G465R verursacht eine komplette Funktionseinschränkung des OCT1-Proteins und zeigt auch für Metformin keine Transportaktivitäten.

Auch die genetischen OCT1-Varianten S189L (*OCT1*10*), S29L (*OCT1*12*), T245M (*OCT1*13*) eignen sich aufgrund ihrer geringen In-vitro-Transportaktivitäten für Metformin, die den Tabellen 27 und 28 entnommen werden können, für eine In-vivo-Untersuchung. Einschränkend bei der Durchführung von Studien unter Berücksichtigung der genannten alternativen genetischen OCT1-Varianten wird sein, dass die Allelfrequenzen für G401S

bzw. G465R bei nur 0,57 % bzw. 0,65 % liegen, während es sich bei M420del um die mit Abstand häufigste genetische OCT1-Variante handelt, die weltweite Allelfrequenz liegt bei 12,2 % (Seitz et al. 2015).

Klinische Auswirkungen von M420del (*OCT1*2*), R61C (*OCT1*3*) und G401S (*OCT1*4*) auf die Wirkung des Opioid-Analgetikums Morphin

Internationale Arbeitsgruppen zeigen teilweise widersprüchliche In-vivo Daten auf die klinische Auswirkung von genetischen OCT1-Varianten auf die Wirkung von Morphin (Nielsen et al. 2017; Venkatasubramanian et al. 2014).

Nielsen et al. stellten die Hypothese auf, dass die genetischen OCT1-Varianten M420del, R61C und G401S die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Morphin beeinflussen (Nielsen et al. 2017). Dazu wurden 22 Patienten genetisch analysiert. Untersucht wurde der Einfluss der genetischen OCT1-Varianten auf pharmakokinetische Parameter (Verteilungsvolumen, maximale Blutplasmakonzentration etc.) und auf die Pharmakodynamik. Die Pharmakodynamik wurde anhand von Schmerzschwellen nach Ausübung von mechanischem Druck auf Muskulatur und Rektalregion sowie dem Eiswassertest (dabei wird die Hand in eiskaltes Wasser getaucht) objektiviert. (Nielsen et al. 2017). Nielsen et al. konnten allerdings keinen Einfluss des OCT1-Genotyps auf pharmakokinetische oder pharmakodynamische Parameter zeigen.

Venkatasubramanian et al. zeigen im Gegensatz zu Nielsen et al. auch in vivo den Einfluss von M420del, R61C, G401S und G465R auf die Pharmakokinetik von Morphin (Venkatasubramanian et al. 2014). Dabei wurden Kinder im Alter zwischen 6 und 15 Jahren während einer Tonsillektomie mit einem Morphinbolus von 0,2 mg/kg Körpergewicht behandelt. 13 Kinder wiesen zwei defiziente OCT1-Allele auf. Diese Gruppe zeigte eine um 14 % geringere Morphinclearance und eine um 39 % geringere Bildung von Metforminmetaboliten im Vergleich zu Kindern, die zwei aktive Allele besitzen (Venkatasubramanian et al. 2014).

Die Ergebnisse von Nielsen et al. überraschen, denn die In-vitro-Daten meiner Arbeit weisen auf deutliche OCT1-Funktionseinschränkungen für die Aufnahme von Morphin durch M420del, R61C und G401S hin. Bei Konzentration 1 zeigen sich für M420del, R61C und G401S OCT1-Aktivitäten von 50,3 %, 22,1 % bzw. 6,9 %. Bei Konzentration 2 zeigen sich OCT1-Aktivitäten von 30,5 %, 20,5 % bzw. 23,2 %. Auch die In-vitro-Daten von Tzvetkov et al. weisen auf eine OCT1-Funktionseinschränkung durch M420del und R61C bei der Untersuchung von Morphin hin (Tzvetkov et al. 2013).

4.5 Ist eine pauschale Vorhersage von OCT1-Substraten möglich und was muss dabei berücksichtigt werden?

Ein wichtiges langfristiges Ziel in der OCT1-Forschung ist, OCT1-Substrate und die Effekte von häufig vorkommenden genetischen Varianten auf die Aufnahme dieser Substrate vorhersagen zu können. Um dieses Ziel zu erreichen, fokussieren sich viele Arbeitsgruppen auf die Generierung von Pharmakophor-Modellen. Ein Pharmakophor-Modell zeigt dreidimensional sämtliche chemische Wechselwirkungen zwischen einem Substrat und seinem Rezeptor (Wolber und Langer 2005). Liu et al. analysierten die physikochemischen Eigenschaften der Inhibitoren, die mit Transportern der SLC22-Familie interagieren (Liu et al. 2016). So sollten Strukturelemente erkannt werden, die die Vorhersage der Bindung an einen der vier untersuchten Transporter der SLC22-Familie (OAT1, OAT3, OCT1 und OCT2) ermöglichen (Liu et al. 2016). Inhibitoren von OAT1 und OAT3 sind negativer geladen, zeigen mehr Doppelbindungen in ihrer Struktur und haben mehr Akzeptorstellen zur Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen im Vergleich zu den Inhibitoren der Transporter OCT1 und OCT2. Ein weiterer Unterschied besteht in der Dreidimensionalität der Liganden. Für die Dreidimensionalität ist der SP3-Charakter ein geeignetes Maß. Je höher der SP3-Charakter eines Liganden, desto dreidimensionaler ist dieser Ligand. Inhibitoren von OCT1 und OCT2 haben einen höheren SP3-Charakter als Inhibitoren der OAT-Familie (Liu et al. 2016).

Bisher erstellte Pharmakophor-Modelle lassen polyspezifische Bindungstaschen unberücksichtigt (Liu et al. 2016; Nies et al. 2011). Liu et al. haben diejenigen Inhibitoren in ihre Analyse einbezogen, die hochaffin ($\leq 100 \mu\text{M}$) mit OCT1 interagieren. Bei der Erstellung von Pharmakophor-Modellen wird angenommen, dass alle als Substrat in Frage kommenden Substanzen an derselben Stelle des OCT1 binden. Wolber et al. nennen dieses Vorgehen ligandenbasiertes Design. Nies et al. zeigten in einem ebenfalls ligandenbasierten Design ein OCT1-Pharmakophor-Modell, welches eine hydrophobe Interaktionsstelle und zwei Akzeptorstellen für Wasserstoffbrückenbindungen darstellt (Nies et al. 2011).

Die Clusteringanalysen meiner systematischen Mutationsanalysen zeigen allerdings, dass die genannten Arbeitsgruppen die Existenz von unterschiedlichen multiplen Bindungsstellen in polyspezifischen Transportern wie OCT1 unberücksichtigt lassen. In Abschnitt 4.1 wurde gezeigt, dass zwei verschiedene Cluster generiert wurden. Neben den Substratgruppen A und B besteht auch eine Substratgruppe C, wobei für Substratgruppe C nach heutigem Stand mit Cycloguanil nur ein Substrat bekannt ist. Aus dem Vorliegen mindestens zwei verschiedener

Substratgruppen kann geschlossen werden, dass mindestens zwei verschiedene Bindungsmöglichkeiten bzw. Transportmechanismen für OCT1-Substrate existieren.

Demnach ist es nicht möglich, ein Pharmakophor-Modell mit der Annahme zu erstellen, dass alle OCT1-Substrate an derselben Stelle binden.

In der Zukunft muss ein Pharmakophor-Modell für jede einzelne Substratgruppe erstellt werden. Liu et al. clusterten die analysierten Substrate zwar nach ihrer dreidimensionalen Struktur in neun verschiedene Gruppen und erstellten für jede dieser Gruppen ein einzelnes Pharmakophor-Modell. Sinnvoller ist jedoch ein Clustering der Substrate in Substratgruppen nach ihrem Aufnahmeverhalten durch verschiedene genetische OCT1-Varianten.

4.6 Limitationen dieser Arbeit

Eine Limitation dieser Arbeit stellt die Messung von nur zwei Einzelkonzentrationen anstelle der Durchführung kompletter Analysen der Konzentrationsabhängigkeit dar. Dabei wurden die Michaelis-Menten-Konstante K_m und die v_{max} nicht berechnet, sondern geschätzt. Die erste Konzentration liegt deutlich unter der K_m . Die zweite Konzentration liegt im Bereich der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} . In dieser Arbeit wurde für Ergebnisse zur ersten Konzentration eine mathematische Umstellung der Michaelis-Menten-Gleichung vorgenommen, um das jeweilige K_m -Verhältnis zu berechnen (Tabelle 32). Diese Umstellung findet unter der Annahme statt, dass dem Transportprozess eine Michaelis-Menten-Kinetik zugrunde liegt. Durch die genannte Umstellung konnten in dieser Arbeit auch keine absoluten K_m -Werte generiert werden, sondern nur ein Verhältnis der K_m -Werte. Zukünftig sollten genetische OCT1-Varianten, die substratspezifische Effekte zeigen, konzentrationsabhängig untersucht werden. Andererseits habe ich mich bewusst für die Messung von zwei Einzelkonzentrationen entschieden, da so relativ viele Substrate mit vielen genetischen OCT1-Varianten unter standardisierten Bedingungen untersucht werden konnten. Dieses standardisierte Vorgehen ist eine unabdingbare Voraussetzung für die Clusteringanalysen.

Des Weiteren wurden alle in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse durch In-vitro-Transportexperimente gewonnen. Die in Abschnitt 4.4 kritisch beleuchteten In-vivo-Studien zeigen teilweise Abweichungen von bekannten Ergebnissen, die auf Einflüsse im lebenden Organismus hinweisen können, die im In-vitro-Modell nicht kalkuliert werden.

Deshalb sollten zukünftig weitere In-vivo-Studien durchgeführt, die die hier gezeigten substratspezifischen Effekte bestätigen. Ein Beispiel wäre eine In-vivo-Untersuchung von Zolmitriptan (Abschnitt 3.2.4). Die genetischen OCT1-Varianten M420del (*OCT1*2*), R61C (*OCT1*3*), S189L (*OCT1*10*) und T245M (*OCT1*13*) zeigen für Zolmitriptan trotz der strukturellen Ähnlichkeit zu Sumatriptan signifikante substratspezifische Effekte. Die Variante M420del ist die häufigste OCT1-Variante in Deutschland. Deshalb ist es vor allem bei M420del von klinischer Relevanz, ob für M420del ein aktives oder inaktives Allel kodiert wird.

4.7 Schlussfolgerungen und Ausblick

Schlussfolgerung 1: Klinische Relevanz

Durch die erweiterte Charakterisierung genetischer Varianten im OCT1 wurden bisher noch nicht identifizierte substratspezifische Effekte der genetischen OCT1-Varianten gezeigt (Abschnitt 3.2.5). Da bisher hauptsächlich das Transportverhalten der genetischen OCT1-Varianten für Modellsubstrate, wie MPP⁺ und TEA⁺ bekannt war, wurde mit dieser Arbeit das Transportverhalten für wichtige Medikamente im klinischen Alltag untersucht. Dies kann einen medizinischen Mehrgewinn für die Behandlung von Migränepatienten mit Sumatriptan und Zolmitriptan, für die Behandlung von Schmerzpatienten mit Morphin, für die Behandlung von Patienten mit einem Asthma bronchiale mit dem kurzwirksamen β_2 -Sympathomimetikum Fenoterol, für die Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2 mit Metformin oder zur Behandlung der gastroösophagealen Refluxkrankheit mit Ranitidin darstellen.

Ausblick 1:

Die In-vitro-Daten dieser Arbeit sollten einer klinisch-prospektiven randomisierten Studie in vivo untersucht werden. Nur so kann herausgefunden werden, ob die Hinweise auf einen medizinischen Mehrgewinn, die in dieser Arbeit in-vitro erlangt wurden, tatsächlich in vivo existieren. Dieser Mehrgewinn kann allerdings nur im Rahmen einer personalisierten Medizin vollständig ausgenutzt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass in Zukunft zur optimalen Dosierung von Pharmaka auch die OCT1-Genotypisierung in Betracht gezogen werden muss. Das Ergebnis der Genotypisierung sollte dann genutzt

werden, um eine Einteilung in *poor*, *intermediate* und *extensive transporters* vorzunehmen (Abschnitt 1.5) und erst danach sollte nach dieser Vorstellung eine Dosisempfehlung ausgesprochen werden. Um diesen Prozess für OCT1 zu optimieren, müssen in der Zukunft noch weitere genetische OCT1-Varianten und weitere Pharmaka umfassend untersucht werden. Hierfür bieten sich auch Pharmaka natürlichen Ursprungs an, wie an der Sonderstellung des Morphins in Abschnitt 4.2 deutlich wurde. Aktuelle Studien erachten ein solches Vorgehen auch für den selektiven Östrogenrezeptormodulator Tamoxifen und das Protein CYP2D6 für sinnvoll. Tamoxifen wird für die Behandlung des hormonrezeptorpositiven Mammakarzinoms eingesetzt. Durch CYP2D6 entsteht aus dem Prodrug Tamoxifen der aktive Metabolit Endoxifen, der die Wirkungen des Medikaments vermittelt (Goetz et al. 2007). Für CYP2D6 kann eine Einteilung in *extensive*, *intermediate* und *poor metabolizers* erfolgen, je nachdem ob zwei aktive, ein aktives oder kein aktives Allel vorliegt (Goetz et al. 2007). Schroth et al. analysierten retrospektiv 1325 mit Tamoxifen behandelte Personen bezüglich der Rezidivrate des Mammakarzinoms und der Mortalität. Für *extensive metabolizers* lag die Rezidivrate nach neun Jahren bei 14,9 %, *poor metabolizers* zeigten mit 29,0 % eine nahezu doppelt so hohe Rezidivrate im Vergleich zu *extensive metabolizers* (Schroth et al. 2009). Daraus schließen Schroth et al. einen Zusammenhang zwischen der Anzahl der aktiven CYP2D6-Allele und dem klinischen Endpunkt des Mammakarzinoms. Lum et al. empfehlen aufgrund solcher Studienergebnisse eine CYP2D6-Genotypisierung, um auf Grundlage des vorliegenden Genotyps eine Tamoxifen-Therapie adäquat steuern zu können (Lum et al. 2013). Um den Nutzen einer durch den jeweiligen Genotyp gesteuerten Tamoxifen-Therapie besser einschätzen zu können, fordern Brauch et al. allerdings die Durchführung prospektiver Studien und erläutern, dass neben CYP2D6 auch andere Faktoren die Wirkung von Tamoxifen beeinflussen könnten (Brauch et al. 2013).

Schlussfolgerung 2: Struktur-zu-Wirkungs-Beziehung des OCT1

In dieser Arbeit wurden 20 genetische OCT1-Varianten mit einem breiten Spektrum von acht OCT1-Substraten unterschiedlichster Struktur erweitert charakterisiert. Dadurch konnten einige, bisher noch nicht identifizierte substratspezifische Effekte der genetischen OCT1-Varianten identifiziert werden (Abschnitt 3.2.5). Bisher wurde von vielen Arbeitsgruppen hauptsächlich das Transportverhalten der genetischen OCT1-Varianten für einzelne Modellsubstrate, wie MPP⁺ und TEA⁺, untersucht. Mit dieser Arbeit allerdings wurde unter standardisierten Bedingungen das Transportverhalten der genetischen OCT1-Varianten für Modellsubstrate und auch für wichtige Medikamente, wie Sumatriptan,

Ranitidin und Fenoterol, analysiert. Die dargestellten Ergebnisse geben Hinweise auf das Vorliegen mehrerer Substratbindetaschen für verschiedene OCT1-Substratgruppen. Neben den vorbekannten Substratgruppen A und B (Seitz 2016) wurde mit Cycloguanil auch ein Substrat einer möglichen Substratgruppe C gefunden. Weiterhin sind auch einige Substrate zu den beiden Substratgruppen A und B durch diese Arbeit hinzugefügt worden. Je mehr Substrate zu einer Substratgruppe gehören, desto besser können gemeinsame Charakteristiken definiert werden.

Ausblick 2:

In der Zukunft sollte zudem die Suche nach einer chemisch-molekularen Eigenschaft, die eine Vorhersage zur Zugehörigkeit eines Substrats zu einer der Substratgruppen ermöglicht, intensiviert werden.

Die Substratgruppe C besteht momentan nur aus Cycloguanil, bei der Untersuchung weiterer Substrate sollte das Hauptaugenmerk auf die Erweiterung der Substratgruppe C gelegt werden. Dabei können anhand der chemisch-molekularen Parameter von Cycloguanil (Tabelle 33) in dieser Hinsicht ähnliche OCT1-Substrate ausgewählt werden. Unabhängig von der Erweiterung der Substratgruppe C sollten auch weiterhin noch mehr OCT1-Substrate analysiert werden.

Ein weiterer Punkt besteht in der Durchführung von Kreuzinhibitionsexperimenten. Dies dient vor allem zur weiteren Untersuchung der verschiedenen Substratbindetaschen. Sollte die jeweilige Substratbindetasche der Substratgruppe A und B nicht überlappen, so wird beispielsweise ein Substrat aus der Substratgruppe A nur den OCT1-vermittelten Transport weiterer Substrate der Gruppe A effektiv inhibieren. Sollten überlappende Substratbindetaschen vorliegen, so könnte auch ein Substrat der Substratgruppe B neben der Inhibition weiterer Substrate derselben Gruppe auch den OCT1-vermittelten Transport der Substratgruppe A inhibieren.

5 Zusammenfassung

OCT1 ist stark genetisch variabel. Genetische Polymorphismen können zu interindividuellen Unterschieden in der hepatischen Aufnahme von Medikamenten führen. Dadurch können Unterschiede in der hepatischen Elimination und in der systemischen Blutplasmakonzentration resultieren. Etwa 9% der deutschen Bevölkerung sind Träger zweier inaktiver OCT1-Allele (auch *poor OCT1 transporter* genannt). Bei diesen wurden erhöhte Plasmakonzentrationen von Opioiden wie Morphin und O-desmethyltramadol (dem aktiven Metaboliten des Tramadols) beobachtet. Dies kann zu einer verbesserten Wirkung des Wirkstoffs, aber auch zu einem erhöhten Risiko für Nebenwirkungen führen. OCT1 ist ein polyspezifischer Transporter. Er kann Substrate mit stark unterschiedlichen Strukturen erkennen und über die Plasmamembran der Hepatozyten transportieren. Andererseits sind geringfügige Veränderungen der Struktur ausreichend, damit das Molekül nicht mehr durch OCT1 als Substrat erkannt und transportiert wird. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind aber kaum bekannt.

Ziel dieser Arbeit war, durch systematische Mutationsanalysen neue Erkenntnisse zu den zugrundeliegenden Mechanismen der Polyspezifität des OCT1-Transporters zu gewinnen. Es wurden die Effekte von 20 genetischen OCT1-Varianten (natürlich vorkommende Polymorphismen und künstliche Mutationen) auf die Aufnahme der acht OCT1-Substrate untersucht. Dazu wurden HEK293-Zellen benutzt, die die Varianten überexprimieren. Für zwei der OCT1-Varianten, nämlich L364A und H367A, wurden die HEK293-Zellmodelle im Rahmen dieser Arbeit eigenständig generiert. Alle Varianten wurden mit zwei unterschiedlichen Substratkonzentrationen untersucht. Die erste Konzentration liegt deutlich unter der Michaelis–Menten–Konstanten K_m . Die zweite Konzentration liegt im Bereich der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} . Die Transportaktivität wurde durch Messungen der intrazellulären Substratakkumulation mittels LC-MS/MS quantifiziert. Im Anschluss wurden anhand der generierten Daten zweidimensionale Clusteringanalysen (genetische Varianten vs. Substrate) durchgeführt.

Es konnten zwei große Substratcluster generiert werden: Substratgruppe A und Substratgruppe B. Bei der Substratgruppe A (Morphin, Fenoterol, Sumatriptan, ASP⁺, Ranitidin, Debrisoquin und MPP⁺) führten die genetischen Varianten von OCT1 zu geringen Funktionseinschränkungen. Bei der Substratgruppe B (Metformin, Tropisetron, Zolmitriptan, TEA⁺, Monocrotalin, Tyramin und O-Desmethyltramadol) kam es dahingegen

zu starken OCT1-Funktionseinschränkungen. Cycloguanil konnte weder Substratgruppe A noch B zugeordnet werden und stellt die erste Substanz einer Substratgruppe C dar. Das Vorliegen von drei verschiedenen Substratgruppen ist ein Hinweis auf die Existenz von verschiedenen bzw. unterschiedlichen polyspezifischen Bindungstaschen.

Weitere wichtige Ergebnisse und Schlussfolgerungen dieser Arbeit sind:

- D474E und D474N zeigen starke, aber unterschiedliche Effekte auf die Funktion des OCT1. Dabei wiegt der Verlust der negativen Ladung des Aspartats (D474N) deutlich schwerer als die Substitution zu Glutamat (D474E).
- Trotz struktureller Ähnlichkeit zeigen Sumatriptan und Zolmitriptan signifikante Unterschiede in der OCT1-vermittelten Aufnahme bei mehreren Varianten. Sumatriptan wird deutlich besser als Zolmitriptan durch diese Varianten aufgenommen.
- L364A zeigte kaum Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp. H367A zeigte leichte Transportverluste bei höheren Konzentrationen ($\sim v_{\max}$). Insgesamt liegt aber kein Hinweis auf eine besondere Bedeutung im Transportprozess vor.
- G401S führte nur bei Fenoterol zu einer deutlich erhöhten Transportaktivität (336 % der Wildtypaktivität bei Konzentration 2 ($\sim v_{\max}$)). Für die restlichen sieben Substrate liegt die OCT1-Aktivität wie erwartet < 25 % des Wildtyps.
- T245M führte zu einer starken Reduktion der Affinität gegenüber Cycloguanil, aber nicht gegenüber den anderen Substraten. Bei Verwendung der Konzentration 1 zeigte sich für Cycloguanil eine hohe OCT1-Aktivität von $179,2 \pm 14,3$ %.

Diese Arbeit weist auf die Existenz von verschiedenen polyspezifischen Bindungstaschen des OCT1-Transporters hin. Bis heute ist hauptsächlich das Transportverhalten der genetischen OCT1-Varianten für Modellsubstrate wie MPP⁺ und TEA⁺ bekannt. Mit dieser Arbeit wurde das Transportverhalten für wichtige Medikamente im klinischen Alltag untersucht. Zukünftig müssen aber weitere genetische OCT1-Varianten und Medikamente umfassend untersucht werden.

Dies kann ein Mehrgewinn für die medikamentöse Behandlung von Patienten darstellen, der vor allem im Rahmen einer personalisierten Medizin ausgenutzt werden kann. Die Ergebnisse dieser Arbeit geben einen Hinweis darauf, dass in Zukunft optimale Dosisempfehlungen für Pharmaka nur auf der Grundlage der zuvor bestimmten OCT1-Aktivität gegeben werden können. Vor Beginn einer medikamentösen Therapie muss also eine OCT1-Genotypisierung der Patienten stattfinden.

6 Literaturverzeichnis

1. 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
2. Ahlin G, Karlsson J, Pedersen JM, Gustavsson L, Larsson R, Matsson P, Norinder U, Bergstrom CA, Artursson P (2008): Structural requirements for drug inhibition of the liver specific human organic cation transport protein 1. *J Med Chem* 51, 5932-5942
3. 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* 11, 400-411
4. Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K: Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Begründet von W. Forth, D. Henschler, W. Rummel. 9. Auflage; Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, München 2004
5. Brauch H, Schroth W, Goetz MP, Murdter TE, Winter S, Ingle JN, Schwab M, Eichelbaum M (2013): Tamoxifen use in postmenopausal breast cancer: CYP2D6 matters. *J Clin Oncol* 31, 176-180
6. Burckhardt G (2005): Polyspecific organic cation transport: insights into the substrate binding site. *Mol Pharm* 67, 1391-1392
7. Chen L, Takizawa M, Chen E, Schlessinger A, Segenthar 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
8. Dujic T, Causevic A, Bego T, Malenica M, Velija-Asimi Z, Pearson ER, Semiz S (2016): Organic cation transporter 1 variants and gastrointestinal side effects of metformin in patients with Type 2 diabetes. *Diabet Med* 33, 511-514
9. Egenberger B, Gorboulev V, Keller T, Gorbunov D, Gottlieb N, Geiger D, Mueller TD, Koepsell H (2012): A Substrate Binding Hinge Domain Is Critical for Transport-related Structural Changes of Organic Cation Transporter 1. *J Biol Chem* 287, 31561-31573
10. 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

11. Goetz MP, Knox SK, Suman VJ, Rae JM, Safgren SL, Ames MM, Visscher DW, Reynolds C, Couch FJ, Lingle WL, et al. (2007): The impact of cytochrome P450 2D6 metabolism in women receiving adjuvant tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat* 101, 113-121

12. 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

13. Gorboulev V, Volk C, Arndt P, Akhoundova A, Koepsell H (1999): Selectivity of the Polyspecific Cation Transporter rOCT1 Is Changed by Mutation of Aspartate 475 to Glutamate. *Molecular Pharmacology* 56, 1254-1261

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

15. Hacker K, Maas R, Kornhuber J, Fromm MF, Zolk O (2015): Substrate-Dependent Inhibition of the Human Organic Cation Transporter OCT2: A Comparison of Metformin with Experimental Substrates. *PLoS One* 10, e0136451

16. 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

17. Keller T, Egenberger B, Gorboulev V, Bernhard F, Uzelac Z, Gorbunov D, Wirth C, Koppatz S, Dötsch 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

18. 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. *ResearchGate* 12, 591-595

19. Kido Y, Matsson P, Giacomini KM (2011): Profiling of a Prescription Drug Library for Potential Renal Drug–Drug Interactions Mediated by the Organic Cation Transporter 2. *Journal of Medicinal Chemistry* 54, 4548-4558

20. Koepsell H (2011): Substrate recognition and translocation by polyspecific organic cation transporters. *Biological Chemistry* 392, 95-101

21. Koepsell H (2013): The SLC22 family with transporters of organic cations, anions and zwitterions. *Molecular Aspects of Medicine* 34, 413-435
22. Koepsell H, Lips K, Volk C (2007): Polyspecific Organic Cation Transporters: Structure, Function, Physiological Roles, and Biopharmaceutical Implications. *Pharmaceutical Research* 24, 1227-1251
23. Li Q (2006): Cellular and molecular alterations in mice with deficient and reduced serotonin transporters. *Molecular Neurobiology* 34, 51-65
24. Liu HC, Goldenberg A, Chen Y, Lun C, Wu W, Bush KT, Balac N, Rodriguez P, Abagyan R, Nigam SK (2016): Molecular Properties of Drugs Interacting with SLC22 Transporters OAT1, OAT3, OCT1, and OCT2: A Machine-Learning Approach. *J Pharmacol Exp Ther* 359, 215-229
25. Livak KJ, Schmittgen TD (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408
26. Lum DW, Perel P, Hingorani AD, Holmes MV (2013): CYP2D6 genotype and tamoxifen response for breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 8, e76648
27. Matic M, de Wildt SN, Elens L, de Hoon JN, Annaert P, Tibboel D, van Schaik RH, Allegaert K (2016): SLC22A1/OCT1 Genotype Affects O-desmethyltramadol Exposure in Newborn Infants. *Ther Drug Monit* 38, 487-492
28. Matthaei J, Kuron D, Faltraco F, Knoch T, Dos Santos Pereira JN, Abu Abed M, Prukop T, Brockmoller 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
29. Nielsen LM, Sverrisdottir E, Stage TB, Feddersen S, Brosen K, Christrup LL, Drewes AM, Olesen AE (2017): Lack of genetic association between OCT1, ABCB1, and UGT2B7 variants and morphine pharmacokinetics. *Eur J Pharm Sci* 99, 337-342
30. 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 (Baltimore, Md.)* 50, 1227-1240

31. Nies AT, Hofmann U, Resch C, Schaeffeler E, Rius M, Schwab M (2011): Proton pump inhibitors inhibit metformin uptake by organic cation transporters (OCTs). *PLoS One* 6, e22163
32. Pao SS, Paulsen IT, Saier MH (1998): Major facilitator superfamily *Microbiology and molecular biology reviews: Microbiol Mol Biol Rev* 62, 1-34
33. Pedersen BP, Kumar H, Waight AB, Risenmay AJ, Roe-Zurz Z, Chau BH, Schlessinger A, Bonomi M, Harries W, Sali A, et al. (2013): Crystal structure of a eukaryotic phosphate transporter. *Nature* 496, 533-536
34. Schroth W, Goetz MP, Hamann U, Fasching PA, Schmidt M, Winter S, Fritz P, Simon W, Suman VJ, Ames MM, et al. (2009): Association between CYP2D6 polymorphisms and outcomes among women with early stage breast cancer treated with tamoxifen. *JAMA* 302, 1429-1436
35. Seitz T (2016): Functional characterization of genetic polymorphisms in the organic cation transporter OCT1 with a special focus on the substrate-specific effects of the M420del polymorphism
36. Seitz T, Stalmann 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 Medicine* 7, 56
37. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 5902-5907
38. 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
39. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150, 76-85

40. Sundelin EI, Gormsen LC, Jensen JB, Vendelbo MH, Jakobsen S, Munk OL, Christensen MM, Brosen K, Frokiaer J, Jessen N (2017): Genetic Polymorphisms in Organic Cation Transporter 1 Attenuates Hepatic Metformin Exposure in Humans. *Clin Pharmacol Ther* 102, 841-848
41. Tzvetkov MV, Saadatmand AR, Lotsch J, Tegeder I, Stingl JC, Brockmoller 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
42. Tzvetkov MV, Saadatmand AR, Bokelmann K, Meineke I, Kaiser R, Brockmoller J (2012): Effects of OCT1 polymorphisms on the cellular uptake, plasma concentrations and efficacy of the 5-HT(3) antagonists tropisetron and ondansetron. *Pharmacogenomics J* 12, 22-29
43. Tzvetkov MV, dos Santos Pereira JN, Meineke I, Saadatmand AR, Stingl JC, Brockmoller J (2013): Morphine is a substrate of the organic cation transporter OCT1 and polymorphisms in OCT1 gene affect morphine pharmacokinetics after codeine administration. *Biochemical Pharmacology* 86, 666-678
44. Tzvetkov MV, Seitz T, Bokelmann K, Mueller T, Brockmoller 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
45. Tzvetkov M, 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, Cham u.a. 2016, 93-138
46. Tzvetkov MV, Matthaei J, Pojar S, Faltraco F, Vogler S, Prukop T, Seitz T, Brockmoller J (2017): Increased systemic exposure and stronger cardiovascular and metabolic adverse reactions to fenoterol in individuals with heritable OCT1 deficiency. *Clin Pharmacol Ther* 103, 868-878
47. 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
48. Volk C, Gorboulev V, Kotsch 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 Pharm* 76, 275-289

-
49. Wolber G, Langer T (2005): LigandScout: 3-D pharmacophores derived from protein-bound ligands and their use as virtual screening filters. *J Chem Inf Model* 45, 160-169
50. 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 Pharm* 51, 913-921

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof Dr. Mladen V. Tzvetkov, bedanken. Ich bedanke mich für die Möglichkeit, meine Dissertation im Institut für Klinische Pharmakologie verfassen zu dürfen und ich bedanke mich für das damit verbundene Vertrauen in meine Person. Zudem möchte ich mich für seine Unterstützung in allen Phasen der Dissertation bedanken. Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Tim Reißbarth für seine Unterstützung als Zweitbetreuer und für das Durchführen der Clusteringanalysen im Anschluss an die systematischen Mutationsanalysen.

Auch meinen Mitarbeitern im Labor, Marleen Meyer und Ole Jensen, gebührt ein besonderer Dank für das geduldige Einarbeiten eines Neulings im Labor, für das Fördern und Fordern, für die stets hilfreiche wissenschaftliche und moralische Unterstützung.

Abschließend möchte ich bei der Studienstiftung des deutschen Volkes und namentlich bei Frau Dr. Dorothea Trebesius und Herrn Prof. Dr. Andreas Busch für die unkomplizierte Verlängerung meines Stipendiums aufgrund des für die vorliegende Arbeit notwendigen Freisemesters, für die Förderung meines bisherigen Studiums und für die hilfreichen Antworten auf meine Fragen bedanken.