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

Speziesunterschiede im organischen Kationentransporter OCT1: Vergleich der Effekte der Aminosäuren F159, W217 und D474 in OCT1 des Menschen, der Maus und der Ratte

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Maximilian Bolesta

aus

Gehrden

Göttingen 2019

Dekan:	Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in	Prof. Dr. rer. nat. M. V. Tzvetkov
Ko-Betreuer/in:	Prof. Dr. rer. nat. H. Jarry

Prüfungskommission

Referent:	Prof. Dr. rer. nat. M. V. Tzvetkov
Ko-Referent:	Prof. Dr. rer. nat. H. Jarry
Drittreferentin:	Prof. Dr. hum. biol. M. Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 09.12.2020

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Speziesunterschiede im organischen Kationentransporter OCT1: Vergleich der Effekte der Aminosäuren F159, W217 und D474 in OCT1 des Menschen, der Maus und der Ratte" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den …… ……

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis ..... **III**

Tabellenverzeichnis ..... **IV**

Abkürzungsverzeichnis ..... **VI**

1 Einleitung **1**

1.1 Der organische Kationentransporter OCT1 3
1.1.1 Struktur von OCT1 3
1.1.2 Transportmechanismus und Substrate von OCT1 4
1.1.3 Speziesunterschiede von OCT1 7
1.2 Bekannte Effekte der Aminosäuren in rOct1, mOct1 und hOCT1 8
1.3 Ziel dieser Arbeit 10

2 Material und Methoden **12**

2.1 Material 12
2.1.1 Geräte 12
2.1.2 Verbrauchsmaterial 14
2.1.3 Software 15
2.1.4 Reagenzien, Medien, Pharmaka und Antibiotika 16
2.1.5 Enzyme und TaqMan®-Assays 18
2.1.6 Primer 19
2.1.7 Bakterienstamm und Plasmide 22
2.1.8 Zelllinien 23
2.2 Methoden 24
2.2.1 Mikrobiologische Methoden 24
2.2.2 Molekularbiologische Methoden (DNA) 29
2.2.3 Molekularbiologische Methoden (RNA) 39
2.2.4 HEK293-Zellen 43
2.2.5 Transportexperimente 48
2.2.6 Quantifizierung der Aufnahme von Substraten 49
2.2.7 Proteinquantifizierung 51
2.2.8 Datenanalyse 52

3 Ergebnisse **53**

3.1 Speziesspezifische Unterschiede im OCT1-vermittelten Transport am Beispiel von Ranitidin 53
3.2 Vergleichende Untersuchung zur Auswirkung der Aminosäuremutationen auf die Transportkinetik von hOCT1 und mOct1 55
3.2.1 Effekte der Mutationen von Schlüsselaminosäuren auf die Transportparameter vom menschlichen OCT1 55
3.2.2 Effekte der Mutationen an Schlüsselpositionen im murinen OCT1 58

3.2.3 Starke spezies- und substratspezifische Effekte der D474/475N-Mutation 61
3.2.4 Starke speziesspezifische Effekte der F159/160A-C450/451M-Mutationen 63
3.2.5 Geringfügige Unterschiede im Effekt der Mutationen W217/218Y und F159/160Y 66
3.3 Detaillierte Analysen der starken Effekte des Doppelmutanten F159A-C450M auf den hOCT1-Transport 70
3.3.1 Generierung und Validierung der HEK293-Zellen mit den Einzelmutationen F159A und C450M in hOCT1 70
3.3.2 Vergleich der Auswirkungen von F159A und C450M auf die Transportaktivität von hOCT1 78
3.4 Bedeutung des *Unstirred Water Layer* für die beobachteten Effekte der Mutationen auf den K_M-Wert 80

4 Diskussion 84
4.1 Funktionelle Ähnlichkeit von rOct1 und hOCT1 im Transport des Substrates Ranitidin – eine Ausnahme unter vielen Substraten 85
4.2 Die Rolle der in rOct1 ermittelten Schlüsselaminosäuren für Substratbindung und -translokation in mOct1 und hOCT1 88
4.3 Aspartat in Position 474/475 ist nicht immer essentiell für den Substrattransport über die Zellmembran 91
4.4 Mutationen von F159/160 beweisen die funktionellen Differenzen von Mensch und Maus 95

5 Zusammenfassung 100

6 Ausblick 102

7 Literaturverzeichnis 103

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung relevanter Transporter im Hepatozyten. 2
Abbildung 2: Sekundärstruktur von OCT1. 3
Abbildung 3: Schematische Darstellung des postulierten Transportmechanismus für OCT1. 5
Abbildung 4: Schema des Flp-In™ Systems für die gezielte chromosomale Integration in HEK293-Zellen. 45
Abbildung 5: Speziesunterschiede im OCT1-vermittelten Transport von Ranitidin. 54
Abbildung 6: Konzentrationsabhängige Effekte der Schlüsselmutationen auf den Transport unterschiedlicher Substrate durch hOCT1. 56
Abbildung 7: Konzentrationsabhängige Effekte der Schlüsselmutationen auf den Transport unterschiedlicher Substrate durch mOct1. 60
Abbildung 8: Relative Veränderung der Aufnahme des jeweiligen Substrates bei höchster gemessener Konzentration bzw. relative Veränderung von V_{max} für D474/475N. 63
Abbildung 9: Relative Veränderung von K_M und V_{max} durch die Kombinationsmutation F159/160A-C450/451M. 65
Abbildung 10: Relative Veränderung von K_M und V_{max} durch die Mutation W217/218Y. 67
Abbildung 11: Relative Veränderung von K_M und V_{max} durch die Mutation F159/160Y. 68
Abbildung 12: Darstellung der Plasmide nach zielgerichteter Mutagenese sowie nach *Dpn*I-Verdau. 71
Abbildung 13: Verdau mit diversen Restriktionsenzymen zur Validierung generierter *OCT1*-Plasmide. 72
Abbildung 14: Genexpressionsanalyse von OCT1-überexprimierenden HEK293-Zellen. 74
Abbildung 15: Validierung der OCT1-überexprimierenden HEK293-Zellen. 75
Abbildung 16: Nachweis gewünschter Mutationen in den generierten HEK293-Zelllinien mittels Kapillarsequenzierung. 78
Abbildung 17: Effekte der Mutationen F159A und C450M auf den Transport von Fenoterol und Sumatriptan. 79
Abbildung 18: Vergleich der C450M-Bakterienklone K5 und K6. 80
Abbildung 19: Auswirkungen der Formel zur Elimination des *Unstirred Water Layer*-Fehlers am Beispiel von Fenoterol. 83
Abbildung 20: Primärstruktur von mOct1, rOct1 und hOCT1. 88

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Laborgeräte. 12
Tabelle 2: Verwendetes Verbrauchsmaterial. 14
Tabelle 3: Verwendete Software. 15
Tabelle 4: Verwendete Datenbanken. 15
Tabelle 5: Verwendete Reagenzien. 16
Tabelle 6: Verwendete Pharmaka und Antibiotika. 18
Tabelle 7: Verwendete Enzyme. 18
Tabelle 8: Verwendete TaqMan®-Assays. 19
Tabelle 9: Primer für zielgerichtete Mutagenese. 19
Tabelle 10: Primer für Validierungs-PCR. 20
Tabelle 11: Primer für Sequenzierungs-PCR. 20
Tabelle 12: Verwendeter Bakterienstamm. 22
Tabelle 13: Im Handel erworbene Plasmide. 22
Tabelle 14: Laborinterne und selbst generierte pcDNA5-Plasmide. 22
Tabelle 15: Benutzte und generierte HEK293-Zelllinien. 23
Tabelle 16: Zusammensetzung LB-Medium. 24
Tabelle 17: Zusammensetzung Resuspensionspuffer (Mini-Präp). 27
Tabelle 18: Zusammensetzung Lyse-Puffer (Mini-Präp). 27
Tabelle 19: Zusammensetzung Neutralisationspuffer (Mini-Präp). 27
Tabelle 20: Zusammensetzung Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung. 28
Tabelle 21: Zusammenfassung aller in Template-Plasmiden generierten Mutationen. 30
Tabelle 22: Reaktionsgemisch bei zielgerichteter Mutagenese. 31
Tabelle 23: PCR-Bedingungen bei zielgerichteter Mutagenese. 31
Tabelle 24: Analytischer Restriktionsverdau. 32
Tabelle 25: Verwendete Restriktionsenzyme und Puffer für den analytischen Restriktionsverdau. 33
Tabelle 26: 1x TBE-Puffer pH 8,3. 33
Tabelle 27: 5x Ladepuffer. 34
Tabelle 28: PCR_{Hygr}: Reaktionsbedingungen. 35
Tabelle 29: PCR_{Hygr}: Reagenzien. 35
Tabelle 30: PCR_{GOI}: Reaktionsbedingungen. 35
Tabelle 31: PCR_{GOI}: Reagenzien. 36
Tabelle 32: PCR_{Double}: Reaktionsbedingungen. 36
Tabelle 33: PCR_{Double}: Reagenzien. 36
Tabelle 34: Ansatz zur Aufreinigung des PCR_{GOI}-Produktes. 37
Tabelle 35: Sequenzierungs-PCR: Reaktionsbedingungen. 38
Tabelle 36: Sequenzierungs-PCR: Reagenzien. 38
Tabelle 37: Reagenzien für die cDNA-Synthese. 40
Tabelle 38: Real-Time PCR: Reaktionsbedingungen. 41
Tabelle 39: Real-Time PCR: Reagenzien. 42
Tabelle 40: Zusammensetzung RIPA-Puffer. 48
Tabelle 41: Methoden für die Quantifizierung der Substrataufnahme. 49
Tabelle 42: Überblick über die Zusammensetzung der Lyse-Puffer und der Probenaufbereitung für die LC-MS/MS-Messungen der Substrataufnahme. 49

Tabelle 43: LC-MS/MS-Parameter für die Bestimmung der intrazellulären Substratkonzentration. 50
Tabelle 44: BCA-Reaktionsansatz. 51
Tabelle 45: Parameter des Ranitidintransportes von hOCT1, mOct1 und rOct1. 55
Tabelle 46: K_M- und V_{max}-Werte hOCT1 Wildtyp und Mutanten nach Substraten. 57
Tabelle 47: K_M- und V_{max}-Werte mOct1 Wildtyp und Mutanten nach Substraten. 61
Tabelle 48: Vollständig validierte Bakterienklone. 73
Tabelle 49: Überblick einiger generierter HEK293-Klone, die mutierte *hOCT1*-Gene überexprimierten und die Ergebnisse der Validierung. 76
Tabelle 50: K_M- und V_{max}-Werte hOCT1 Wildtyp und transfizierte Mutanten nach Substraten. 80

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
ADME	Absorption, Distribution, Metabolisierung und Exkretion
ASP^+	4-Di-1-ASP, 4-(4-(dimethylamino)styryl)-N-methylpyridinium, IUPAC-Name: 4-((E)-2-[4-(Dimethylamino)phenyl]vinyl)-1-methylpyridiniumiodid
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	*Copy-DNA*
ddH_2O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DTT	Dithiothreitol (IUPAC Name: (2S,3S)-1,4-bis(sulfanyl)butan-2,3-diol)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FA	Ameisensäure
FCS	*fetal calf serum*
Flp	Flippase
HBSS	*Hank's Balanced Salt Solution*
HCl	Salzsäure
HEK293	*Human Embryonic Kidney Cells 293*
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonsäure
hOCT1	*human organic cation transporter*
LB-Medium	*Lysogeny Broth Medium* (Luria-Bertani Medium)
LC-MS/MS	*liquid chromatography-mass spectrometry*
mOct	*mouse organic cation tranporter 1*
NaOH	Natronlauge
OCT1	*organic cation transporter 1*
PCR	*Polymerase Chain Reaction*, Polymerase-Kettenreaktion
RIPA	*Radioimmunoprecipitation Assay*
RNA	Ribonukleinsäure
rOct1	*rat organic cation tranporter 1*
rpm	*revolutions per minute*; Umdrehungen pro Minute
SAP	*Shrimp Alkaline Phosphatase*
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLC	*solute carrier*
TBE-Puffer	Tris-Base, Borsäure, EDTA Puffer
TBP	*TATA-binding protein*
TMD	Transmembrandomäne
UHPLC	*Ultra High Performance Liquid Chromatography*
UV	ultraviolett

1 Einleitung

Der organische Kationentransporter OCT1 (auch als SLC22A1 bekannt) ist ein Membrantransporter der *Solute Carrier Family 22* (SLC22), der bei verschiedenen Spezies, wie z. B. beim Menschen, der Maus und der Ratte vorkommt. Er vermittelt die Aufnahme verschiedener körpereigener und körperfremder Substanzen in die Zellen, für die die Plasmamembran eine Diffusionsbarriere darstellt (Abbildung 1).

Zu den körpereigenen Substanzen gehört z. B. Thiamin (Chen L et al. 2014), zu den körperfremden Substanzen gehören z. B. Morphin, Sumatriptan, Metformin, O-Desmethyltramadol und Fenoterol (Matthaei et al. 2016; Moaddel et al. 2010; Tzvetkov et al. 2011; 2013; Wang et al. 2002). Diese Substrate haben die Gemeinsamkeit, dass sie unter physiologischen Bedingungen im Organismus kationische Anteile in ihrer Molekülstruktur besitzen.

OCT1 wurde 1994 erstmals aus der Rattenniere kloniert (rOct1) (Gründemann et al. 1994). Da dies der erste Transporter der SLC22A-Familie war, der erfolgreich kloniert worden ist, war rOct1 Gegenstand intensiver Forschung im Bereich Proteinstruktur und -funktion. Er diente damit als Modell für das Verständnis der Funktion von OCT1 aller Spezies. Zudem ist rOct1 dazu fähig, unterschiedliche Substrate zu transportieren. Der menschliche OCT1 (hOCT1) wurde Jahre später gleichzeitig von zwei Forschungsgruppen erstmals kloniert und beginnend charakterisiert (Gorboulev et al. 1997; Zhang et al. 1997). Auch hOCT1 ist in der basolateralen Plasmamembran der Hepatozyten lokalisiert (Hilgendorf et al. 2007) und kann daher im Sinne des pharmakokinetischen ADME-Prinzips (ADME: Adsorption, Distribution, Metabolisation, Exkretion) an der Verteilung und dem Metabolismus verschiedener therapeutisch häufig eingesetzter Pharmaka beteiligt sein.

OCT1 spielt auch beim Menschen eine relevante Rolle. Das Verständnis über die Struktur-Funktions-Beziehung des humanen OCT1 könnte in Zukunft von hoher Relevanz im Rahmen der klinischen Behandlung von Patienten sein. Diese Relevanz resultiert aus der Tatsache, dass für das humane *OCT1*-Gen acht häufige Allele bekannt sind, die auf Polymorphismen beruhen und für die Unterschiede in der Transportkapazität diverser Substrate festgestellt wurden (Kerb et al. 2002). Außerdem sind etwa 40 % aller oral applizierten Pharmaka schwache organische Basen, die bei physiologischem pH von 7,4 kationische Anteile besitzen (Neuhoff et al. 2003). Auch deswegen kann der organische

Kationentransporter OCT1 von hoher Relevanz für die Distribution und Exkretion von bis zu 40% aller Pharmaka sein und die Wirksamkeit und Toxizität von ebendiesen bestimmen. Darüber hinaus kann aufgrund hinweisender *in-vitro*-Experimente auch erwartet werden, dass OCT1 im menschlichen Organismus für gefährliche Arzneimittelinteraktionen mitverantwortlich ist, denn OCT1 ist Transporter für eine hohe Zahl von Pharmaka, deren Transport sich gegenseitig aufzuheben vermag (Chen EC et al. 2017).

Vor allem versucht man bis heute zu verstehen, wie die Struktur des Transporters die Funktion beeinflusst und welche Aminosäuren dabei Schlüsselrollen spielen. Die Forschung fokussierte sich dabei im Wesentlichen auf den Oct1 der Ratte. Es ist im Vergleich dazu weniger darüber bekannt, inwieweit auch die analogen Aminosäuren im Oct1 der Maus oder im OCT1 des Menschen ähnlich wichtige Rollen im Bereich Substrattransport spielen.

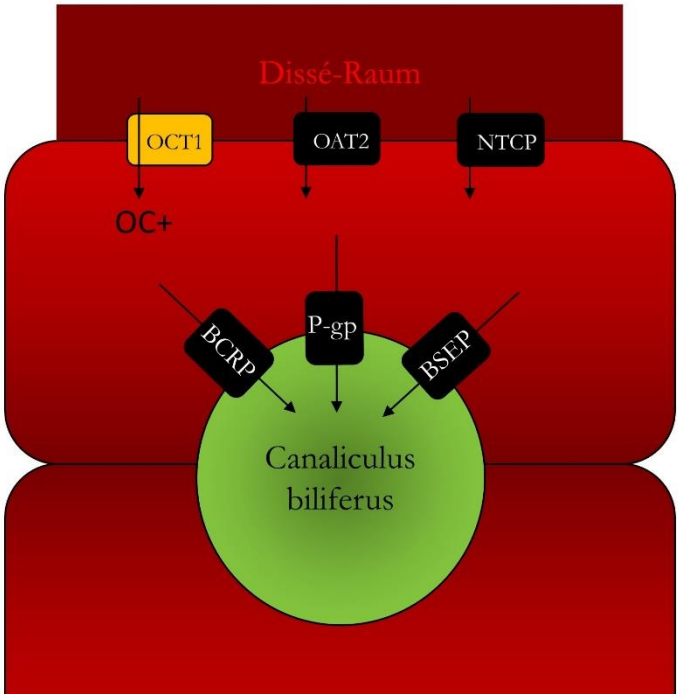


Abbildung 1: Schematische Darstellung relevanter Transporter im Hepatozyten.

Der organische Kationentransporter OCT1 ist ein Membrantransporter der *Solute Carrier Family 22* (SLC22), der sowohl beim Menschen als auch bei der Maus und der Ratte vorkommt. Er vermittelt die Aufnahme verschiedener körpereigener und körperfremder Substanzen in die Zellen, für die die Plasmamembran eine Diffusionsbarriere darstellt. OCT1 = organischer Kationentransporter 1; OAT2 = organischer Anionentransporter 2; NTCP = Natriumtaurocholsäure-Cotransporter-Peptid; P-gp = P-Glykoprotein; BSEP = *Bile Salt Export Pump*; BCRP = *Breast Cancer Resistance Protein.* Modifiziert nach: Zamek-Gliszczynski *et. al.* (2018).

1.1 Der organische Kationentransporter OCT1

1.1.1 Struktur von OCT1

OCT1 ist ein integraler Transporter in der Plasmamembran. Er besteht aus mindestens zwei identischen Proteinen. Jedes dieser integralen pseudosymmetrischen Membranproteine besitzt zwölf α-helikale Transmembrandomänen (Abbildung 2). Amino- und Carboxyterminus sind nach intrazellulär gerichtet. Zwischen den Transmembrandomänen (TMD) 1 und 2 befindet sich ein extrazellulär lokalisierter Proteinabschnitt, an welchem eine Glykosylierung erfolgen kann. Dieser Abschnitt ist für die korrekte Lokalisierung des Transporters in der Zellmembran unerlässlich und vermutlich auch für die Dimerisierung (teilweise Oligomerisierung) verantwortlich (Keller et al. 2011). Ein weiterer wichtiger Proteinabschnitt verbindet TMD 6 und 7 intrazellulär miteinander. Dieser ist die Stelle der Phosphorylierung regulatorischer Proteine der Zelle und damit von wichtiger Funktion für kurzfristige Regulierung der Transportaktivität (Mehrens et al. 2000).

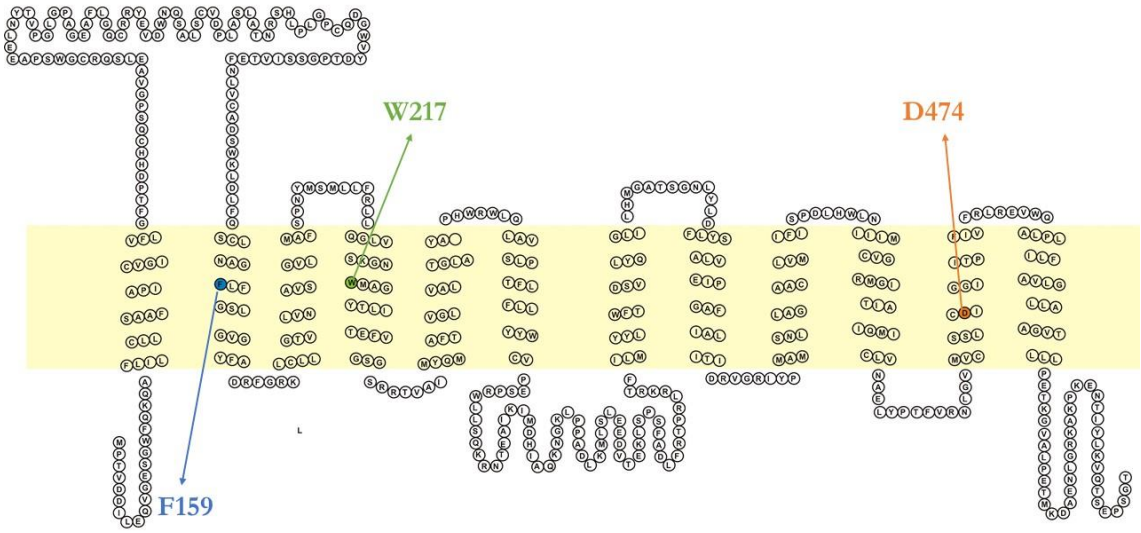


Abbildung 2: Sekundärstruktur von OCT1.

Ein pseudosymmetrisches Monomer besteht aus zwölf α-helikalen Transmembrandomänen. Amino- und Carboxyterminus sind nach intrazellulär gerichtet. Zwischen den Transmembrandomänen 1 und 2 befindet sich eine extrazellulär lokalisierte Aminosäurekette, an welcher eine Glykosylierung erfolgen kann. Eine weitere wichtige Aminosäurekette verbindet TMD 6 und 7 intrazellulär miteinander. Farbig markiert sind die Aminosäuresubstitutionen, die in dieser Arbeit analysiert wurden. Modifiziert nach laborinterner Darstellung der Sekundärstruktur; Genehmigung durch M. V. Tzvetkov.

Die Kristallstruktur von OCT1 ist nicht bekannt. Für die aus der Sekundärstruktur resultierende Tertiärstruktur wurde ein Homologie-Modell für rOct1 postuliert, welches von der Laktose-Permease *LacY* von *E. coli* abgeleitet ist (Gorbunov et al. 2008; Popp et al. 2005).

Ein weiteres neueres Homologie-Modell leitet sich vom Phosphat-Transporter des Pilzes *Piriformospora indica* ab (Chen EC et al. 2017). Allerdings weisen sowohl *LacY* von *E. coli* als auch der Phosphat-Transporter von *P. indica* weniger als 20 % identische Aminosäuren zum OCT1 auf (Chen EC et al. 2017).

Der folgende beschriebene Transportmechanismus von OCT1 beruht auf der Struktur des Homologie-Modells *LacY* von *E. coli*.

1.1.2 Transportmechanismus und Substrate von OCT1

Die treibende Kraft für den OCT1-Transport über die Membran ist das Konzentrationsgefälle. Man geht beim Transport vom *alternating access*-Modell (Ciarimboli 2008; Jardetzky 1966). Im Ruhezustand nimmt der Transporter eine Form an, in der er seine Bindetasche nach extrazellulär geöffnet hat. Bindet ein Substrat in dieser Bindetasche, kommt es aufgrund von Strukturdynamiken und nach Durchlaufen einiger Konformationszustände zum Wechsel in eine nach intrazellulär geöffnete Bindetasche (Koepsell 2011). Das Substrat kann nun in die Zelle entlassen werden und der Transporter wieder in den nach außen gerichteten Ruhezustand zurückkehren.

Die zweite treibende Kraft für den Transport ist das Transmembranpotenzial. Prinzipiell kann der beschriebene Vorgang auch im Sinne eines Effluxtransportes in die andere Richtung ablaufen. Da der Transporter aber aufgrund eines negativen Zellpotenzials bevorzugt Kationen entlang des Ladungsgradienten nach intrazellulär befördert (Koepsell et al. 2007), spielt der Auswärtstransport keine wesentliche Rolle.

Die geöffneten Zustände der Transporter werden durch die Interaktion zweier Monomere gewährleistet, wohingegen die geschlossenen Zustände durch die Konfiguration der TMDs zueinander geformt werden (Gorbunov et al. 2008). Abbildung 3 skizziert den postulierten Transportmechanismus schematisch.

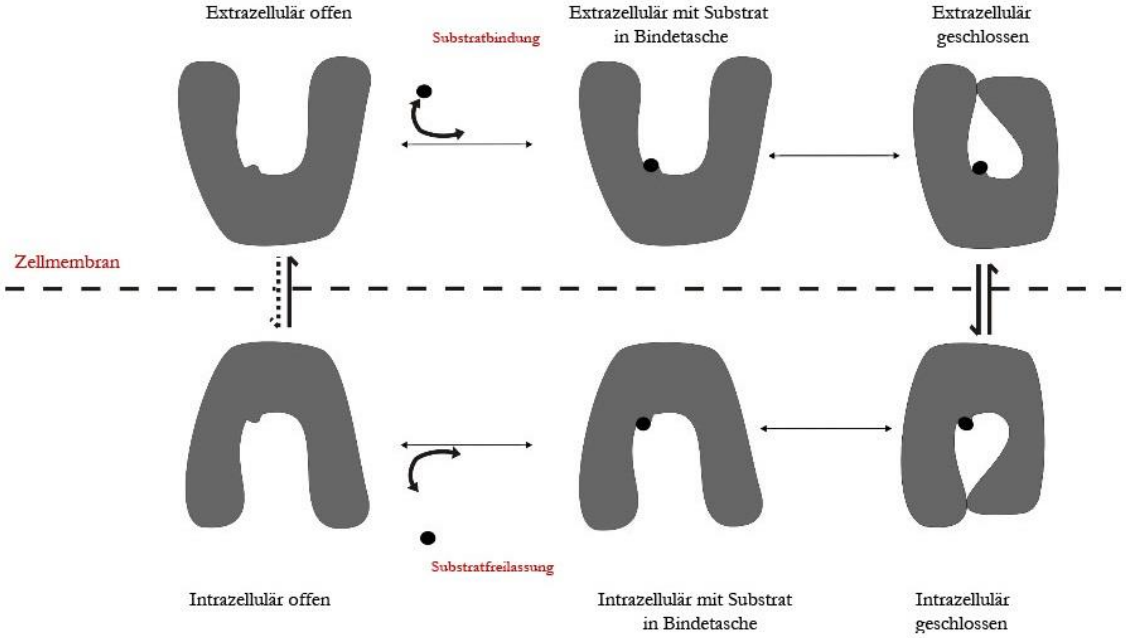


Abbildung 3: Schematische Darstellung des postulierten Transportmechanismus für OCT1.

Im Ruhezustand ist die Bindetasche für Substrate nach extrazellulär geöffnet. Bindet ein Substrat in dieser Bindetasche, kommt es durch dynamische Strukturveränderungen und nach Durchlaufen einiger Konformationszustände zum Wechsel in eine nach intrazellulär geöffnete Bindetasche (Koepsell 2011). Das Substrat kann nun in die Zelle entlassen werden und der Transporter wieder in den nach außen gerichteten Ruhezustand zurückkehren. Modifiziert nach Seitz *et al.* (2015).

Substrate des Transporters sind nachgewiesenermaßen MPP^+ (1-Methyl-4-phenylpyridinium), TEA^+ (Tetraethylammonium), Metformin, Amisulprid, Debrisoquin, Morphin, Ranitidin, Tiotropium, Tramadol, Ganciclovir, Aciclovir, Sumatriptan, Tropisetron und das körpereigene Substrat Thiamin (Koepsell et al. 2007; Matthaei et al. 2016; Takeda et al. 2002; Tzvetkov et al. 2012; 2013; Zhang et al. 1997).

All diese Substrate binden innerhalb der Bindetasche an unterschiedlichen Positionen. Zum Teil haben diese Positionen überlappende Anteile zwischen den Substraten (Koepsell 2011). Dies macht den Transporter polyspezifisch. Polyspezifisch bedeutet, dass OCT1 Kationen mit untereinander sehr unterschiedlicher Struktur, diese aber mit hoher Selektivität transportiert (Gründemann et al. 1994). Kleine Veränderungen in der Molekülstruktur des Substrates können bereits einen Transport verhindern. Begründet ist dies in der Dynamik der Tertiärstruktur, die durch Bindung von Substraten an relevante Aminosäuren in der Bindetasche bewirkt wird. OCT1 ist zudem in der Lage, mehrere Substrate gleichzeitig zu transportieren (Popp et al. 2005).

Mit Hilfe der Kristallstruktur der Laktose-Permease *LacY* von *E. coli* als Homologie-Modell rekonstruierte man eine mögliche Konfiguration der TMDs von rOct1 zu einer

hypothetischen Bindetasche (Gorbunov et al. 2008; Popp et al. 2005), da sowohl OCT1 als auch *LacY* zur gleichen *Facilitator*-Familie gehören (Popp et al. 2005).

Das Modell implizierte die räumliche Nähe der zwölf TMDs zueinander. Aus ihr wurde ersichtlich, dass für die Substraterkennung und für den transmembranären Transport nicht eigens das Vorhandensein oder Fehlen einzelner Aminosäuren verantwortlich ist. Die Translokation eines Substrates ist vielmehr ein multifaktorielles Geschehen mit komplexen Umlagerungen der Transporterdomänen. So bilden die TMDs 1, 2, 4 und 5 der einen Hälfte sowie die TMDs 7, 8, 10 und 11 der anderen Hälfte des OCT1 die nach intrazellulär gerichtete Bindetasche aus (Popp et al. 2005). Obwohl die Übereinstimmung der Aminosäuren zwischen rOct1 und *LacY* lediglich 16 % beträgt, kann man für OCT1 von ähnlichen Mechanismen ausgehen.

Aminosäuren, deren Substitution signifikante Veränderungen in der Transportkinetik von Substraten in rOct1 bewirkten, sind unter anderem Phenylalanin in Position 160 (F160) (Volk et al. 2009), Aspartat in Position 475 (D475) (Gorboulev et al. 1997) und Tryptophan in Position 218 (W218) (Popp et al. 2005). Das Homologie-Modell zeigt, dass sich die genannten Aminosäuren alle in der hypothetischen Substratbindetasche befinden (Koepsell 2016). Besonders hervorzuheben ist hierbei, dass D475 und W218 in der Bindetasche auf gleicher Höhe angeordnet sind (Popp et al. 2005).

Zur Untersuchung der Wichtigkeit dieser Aminosäuren wurden im Wildtyp-Transporter diese Aminosäuren durch andere ersetzt und die Parameter K_M und V_{max} bestimmt. Die Interpretation der Ergebnisse berücksichtigte dabei, dass die Substitution einerseits Einfluss auf die Bindung des Substrates an den Transporter sowie auf die Dynamik der Tertiärstruktur haben kann. So wurde beispielsweise herausgefunden, dass die Aminosäure D475 wichtig für die Bindung des Modellsubstrates TEA^+ ist (Koepsell 2016). Weiterhin weiß man, dass die Bindetasche 80 Å tief ist und eine 20 x 60 Å große Querschnittsfläche besitzt. Dies zeigte auf, dass mehrere Substrate in der Bindetasche binden können (Popp et al. 2005).

Die Interpretation der Ergebnisse stellt uns vor ein Problem: der Oct1 der Ratte weist im Vergleich zu mOct1 und hOCT1 einige expressionsspezifische strukturelle und damit wahrscheinlich auch funktionelle Unterschiede auf. Diese machen es uns unmöglich, Erkenntnisse der Experimente an rOct1 unmittelbar auf humane Transporter zu übertragen oder diese als Grundlage für klinische Studien zu verwenden. Diese Unterschiede werden im Folgenden genauer ausgeführt.

1.1.3 Speziesunterschiede von OCT1

Bekannte Unterschiede zwischen rOct1, mOct1 und hOCT1 betreffen zum einen das Expressionsmuster innerhalb der Spezies, die Struktur des Transporters und letztlich auch das Transportverhalten.

1.1.3.1 Unterschiede in der Gewebeexpression und Struktur

Der humane OCT1 ist vorrangig in der basolateralen Membran der Hepatozyten exprimiert (Gorboulev et al. 1997). In geringerem Ausmaße ist hOCT1 auch in der Niere exprimiert (Urakami et al. 1998), zeigt hier jedoch eine andere Lokalisation im Tubulusepithel als rOct1 und mOct1 (Karbach et al. 2000; Sugawara-Yokoo et al. 2000). Während hOCT1 eher an der apikalen Membran lokalisiert ist, finden sich rOct1 und mOct1 eher basolateral. Oct1 der Nagetiere Maus und Ratte sind zu gleichen Teilen in Leber und Niere exprimiert (Gründemann et al. 1994). Auch innerhalb der Leber ist hOCT1 im Vergleich zu den Nagetier-Oct1-Phänotypen eher gleichmäßig verteilt, wohingegen rOct1 und mOct1 näher im Bereich der Zentralvene zu liegen kommen (Meyer-Wentrup et al. 1998).

Strukturell unterscheiden sich hOCT1 und r/mOct1 in der Proteinlänge. hOCT1 besteht aus 554 Aminosäuren (Koehler et al. 1997), während r/mOct1 aus jeweils 556 Aminosäuren bestehen. Die Übereinstimmung der Aminosäuren zwischen hOCT1 und r/mOct1 beträgt lediglich 77 % (Meyer 2016).

1.1.3.2 Unterschiede im Substrattransport

Die dargestellten Unterschiede im Expressionsmuster und in der Struktur des Transporters implizieren, dass es Unterschiede in der Funktion des Transporters gibt. Dennoch bleibt an dieser Stelle festzuhalten, dass sowohl hOCT1 als auch rOct1 und mOct1 mit ihrer hepatischen Expression eine wichtige Rolle bei der Metabolisierung körperfremder Pharmaka zu spielen scheinen. Daher ist ein Vergleich der Transportfunktion zwischen den Spezies sinnvoll. Obwohl sich die strukturellen Unterschiede zwischen hOCT1 und r/mOct1 mit 77-prozentiger Aminosäureübereinstimmung in Grenzen halten, sind die bereits gefundenen Unterschiede eindrücklich.

Laborinterne Untersuchungen zeigten für die Substrate TEA^+ und ASP^+ deutliche Unterschiede in der Transportkinetik zwischen hOCT1 und r/mOct1 (Seitz, unveröffentlichte Daten). Zudem zeigten sich deutliche teilweise hochsignifikante Unterschiede in weiteren Untersuchungen für die Substrate MPP^+, Ipratropium, Metformin, Thiamin und Fenoterol (Meyer 2016). Zuvor wurden für diverse n-Tetraalkylammoniumderivate Unterschiede im Substrattransport zwischen den Spezies

festgestellt (Dresser et al. 2000). In diesen Untersuchungen zeigte hOCT1 eine deutlich geringere Affinität zu den Derivaten.

Die bisherigen Ergebnisse verdeutlichten nahezu immer Unterschiede in der Affinität sowie in der Transportkapazität der Substrate zwischen den Spezies. Es scheint also trotz der hohen Übereinstimmung der Aminosäuren zwischen hOCT1 und r/mOct1 einen deutlichen Einfluss dieser Unterschiede auf die Sekundärstruktur und die daraus resultierende Tertiärstruktur zu geben. Diese Unterschiede könnten analog zu Differenzen in der Konfiguration der Substratbindetasche führen und bekannte speziesspezifische Effekte herbeiführen. Bekannt sind in diesem Zusammenhang ebenfalls die Effekte von Mutationen der bereits angesprochenen Aminosäuren (D474/475, W217/218, F159/160), die eine Schlüsselrolle in der Bindung und im Transport von Substraten spielen. Die Substitution der Aminosäuren an genannten Stellen führte in hOCT1 zu anderen Veränderungen in Affinität und Transport als in rOct1 oder mOct1 (Seitz et al. 2015; Kapitel 1.2).

1.2 Bekannte Effekte der Aminosäuren in rOct1, mOct1 und hOCT1

Die Untersuchung der Effekte bestimmter Aminosäuren folgt einem einfachen Prinzip. Man variiert Aminosäuren im OCT1 und ersetzt sie künstlich durch andere, teilweise sehr ähnliche Aminosäuren. Man vergleicht den Effekt dieses Aminosäureaustausches zwischen den Spezies. Eine Mutation ist beispielsweise die von Aspartat in Position 475 zu Glutamat (D475E). Es wird also nur eine Methylgruppe im Aminosäurerest hinzugefügt und analysiert, ob diese kleine Veränderung einen Unterschied im Transportverhalten herbeiführt. Dieses Prinzip gilt für die meisten künstlich eingefügten Veränderungen, weil es uns ermöglicht genau zu differenzieren, welche funktionelle Gruppe einer Aminosäure für die Transportfunktion bestimmter Substrate essenziell ist.

Es wurden in einigen bereits erwähnten Untersuchungen eindrückliche Unterschiede im Substrattransport zwischen den Spezies aufgedeckt. Dies führte zu der Fragestellung, inwieweit die bereits bekannten Schlüsselaminosäuren in rOct1 – z. B. D475, F160, W218 und noch einige andere – ebenfalls wichtige Rollen für hOCT1 und mOct1 spielen. In bereits durchgeführten Transportanalysen zeigten sich interessante Unterschiede in Substrataffinität und Transportkapazität, was die Theorie unterschiedlicher TMD-Konfiguration und Tertiärstrukturen untermauert.

Laborinterne Untersuchungen zeigten Unterschiede zwischen den Spezies Ratte, Maus und Mensch mit den Mutationen D474/475E, W217/218Y und F159/160A für die Substrate

TEA^+, MPP^+, ASP^+ und Morphin (Seitz et al. 2015). Diese Experimente wurden mit Einzelkonzentrationen durchgeführt, daher war ein direkter Vergleich der Parameter K_M und V_{max} nicht möglich. In weiteren Analysen fand man außerdem heraus, dass auch die Mutation D474/475N signifikante Unterschiede im Transport von TEA^+ zwischen mOct1 und hOCT1 herbeiführt (Meyer 2016). Während mOct1 eine Verringerung der Affinität und eine gleichzeitige Erhöhung der Transportkapazität zeigte, zeigte hOCT1 einen kompletten Verlust der Transportfähigkeit. In derselben Arbeit wurde aber auch gezeigt, dass die Mutation D474/475E sowohl beim Menschen als auch bei der Maus eine vergleichbare Verringerung der Transportkapazität zeigt. Dies lässt vermuten, dass sich hOCT1 und mOct1 in gewissen Aspekten funktionell nicht in jedem Falle unterscheiden, wie es andere Experimente vermuten lassen. Vorige Experimente zeigten für die Mutation D475E in rOct1 keinerlei wesentliche Veränderung der Affinität für das Modellsubstrat MPP^+, der K_M-Wert sank lediglich von 2.7 auf 2.2 μM (Gorboulev et al. 1999).

Die Aminosäure W218 wurde in rOct1 durch mehrere Aminosäuren ersetzt (W218F, W218Y und W218L), wobei vor allem die Mutation W218Y eine signifikante Affinitätszunahme sowohl für TEA^+ als auch für MPP^+ zeigte. Gleichzeitig nahm die Transportkapazität aber hochsignifikant ab (Popp et al. 2005). Zudem wurde der Aminosäure F160 in rOct1 eine Schlüsselposition für die Bindung von TEA^+ zugeschrieben (Volk et al. 2009).

Analysen an chimären Maus-Mensch-OCT1 Konstrukten, die einerseits Anteile von hOCT1 und andererseits Anteile von mOct1 aufwiesen, zeigten zudem die meiste Übereinstimmung im Transport von Substraten mit dem jeweiligen OCT1-Wildtyp, wenn die TMDs 1-6 von ebendiesem abstammten (Meyer 2016). Dies bestätigte sich im Zusammenhang mit mOct1 besonders. Bei hOCT1 spielten auch die TMDs 10-12 eine wichtige Rolle. So zeigten chimäre Konstrukte immer dann eine Ähnlichkeit mit dem Wildtyp im Transportverhalten, wenn sowohl die TMDs 1-6 als auch die TMDs 10-12 den gleichen Domänen im Wildtyp entsprachen.

1.3 Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen menschlichem (hOCT1) und Nagetiertransporter (rOct1, mOct1) besser zu verstehen.

Es stellten sich folgende Fragen:

1. Wie sehr unterscheidet sich das Transportverhalten des hOCT1, mOct1 und rOct1 voneinander? Lassen sich strukturelle Ähnlichkeiten und Unterschiede auf die Funktion übertragen?
   Für die drei Transporter unterschiedlicher Spezies wurde die Transportkinetik für das Substrat Ranitidin charakterisiert. Dabei wurden die Parameter K_M und V_{max} nach dem Michaelis-Menten-Gesetz bestimmt. Die Analysen dienten dazu aufzuklären, inwieweit das in vielen Fällen etablierte Mausmodell *in vitro* Ergebnisse liefert, die auf menschliche Verhältnisse übertragbar sind. Zwar ist für einige Substrate ein großer Unterschied festgestellt worden, für das Substrat Ranitidin fehlt ein solcher Vergleich noch.
2. Sind die Aminosäuren D475, F160 und W218, die eine wichtige Bedeutung für die Substratbindung und den Substrattransport von rOct1 haben, auch von Bedeutung für die Transportkinetik in hOCT1 und mOct1?
   Hierzu wurde die Kinetik der Mutanten D474N, F159A-C450M, W217Y und F159Y von hOCT1 sowie der Mutanten D475N, F160A-C451M, W218Y und F160Y von mOct1 analysiert. Die Ergebnisse der Charakterisierung von Mutanten beider Spezies wurden vergleichend gegenübergestellt. Der Vergleich erfolgte dabei für Substrate, die dahingehend noch nicht untersucht wurden: den Histamin-Rezeptorblocker Ranitidin, das Migränemittel Sumatriptan, das kurzwirksame Betasympathomimetikum Fenoterol und die Modellsubstrate MPP^+ und TEA^+, mit Hilfe derer Experimente zur Charakterisierung von rOct1 durchgeführt wurden. Ziel war es hier, zugrundeliegende Transportmechanismen herauszuarbeiten.
3. Welche der beiden Mutationen im Doppelmutanten von hOCT1-F159A-C450M ist für den starken Effekt auf die Transportkinetik verantwortlich?
   Nach Generierung von Mutanten mit den Einzelmutationen F159A und C450M wurden diese ebenfalls bzgl. K_M und V_{max} charakterisiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können Antworten auf mehrere Fragen liefern. Die wichtigste Frage ist, welche Rolle die Schlüsselaminosäuren von rOct1 für die hier untersuchten Substrate in hOCT1 und mOct1 spielen. Dies klärt auch im weitesten Sinne, inwieweit das Tiermodell Ratte/Maus bzgl. Untersuchungen an OCT1 auf den Menschen übertragbar ist.

Speziell wird hierbei herausgearbeitet, wie die Transportmechanismen in OCT1 ansatzweise funktionieren und wie sich diese voneinander unterscheiden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: **Verwendete Laborgeräte.**

Geräte	Hersteller
3130xl Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt, D
7900 HT Fast Real Time PCR System	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D
Absaugpumpe FTA-1	Grant Bio, Cambridgeshire, UK
API 4000 LC-MS/MS-System	AB Sciex, Darmstadt, D
Autoklav Laboklav 55-195	SHP Steriltechnik, Detzel Schloss, D
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, D
Brownlee SPP RP-Amid Säule	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
CO_2 Inkubator BBD6220	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D
CO_2 Inkubator Cellsafe	Integra Biosciences Inc, Woburn, MA, USA
Elektrophoresekammer	PeqLab, Erlangen, D
Elektroporator Gene Pulser II	BioRad, München, D
Feinwaage Balance BP210S	Sartorius, Göttingen, D
Feinwaage Balance M-Pact AX2202	Sartorius, Göttingen, D
Fluor-S™ Multi Imager	BioRad, München, D
Heizbarer Kleintier OP-Tisch 12501	Medax, Neumünster, D
Heizblock Dri-Block® DB3	Techne, Stone, UK
Heizplatte OTS 40	Medite, Burgdorf, D
Hybridisierungsofen	Binder, Tuttlingen, D
Inkubator Hood Incudrive H	Schütt, Göttingen, D
LaChrom HPLC-System: - Entlüfter L-7614 - Autosampler L-7200 - Pumpe L-7100 - Interface D-7000	Merck Hitachi, Darmstadt, D
LiChrospher 100 CN Säule	Merck, Darmstadt, D
LiChrospher 100 CN Schutzsäule	Merck, Darmstadt, D
LiChrospher 100 reverse Phase-18e	Merck, Darmstadt, D
Magnetrührer	IKA, Staufen, D

Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg, D
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, D
Mini Laborzentrifugen Spectrafuge™	Labnet, Edison, USA
MS2 Mini Shaker	IKA, Staufen, D
Multiscreen Column Loader	Merck, Darmstadt, D
Neubauer Zählkammer	Carl Roth, Karlsruhe, D
Orbital Schüttler KS 260 basic	IKA, Staufen, D
Pipettierhilfe accu-jet pro®	Brand, Wertheim, D
Pipette Research (1000, 100, 10 µl)	Eppendorf, Hamburg, D
Plattform Schüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments, Schwabach, D
Probenkonzentrierer	Techne, Stone, UK
PTC-200 Thermal Cycler	BioRad, München, D
QIAcube Roboter	Qiagen, Hilden, D
QIAvac 24 Plus manifold	Qiagen, Hilden, D
Security Guard C18 Vorsäule	Phenomenex, Aschaffenburg, D
Sequenzdetektionssystem	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen, D
Sicherheitswerkbank CleanAir NSF 49	Cleanair, Woerden, NE
Szintillationszähler LS6500	Beckman Coulter, Krefeld, D
Tecan Ultra Microplate Reader	Tecan Group AG, Männedorf, CH
ThermalCycler DNA Engine®	BioRad, München, D
Thermomixer® Comfort	Eppendorf, Hamburg, D
UHPLC-System Nexera X2: - Controller CBM-20A - Autosampler SIL-30AC - Tray für zwei Mikrotiterplatten - Säulenofen CTO-20AC - Pumpe LC-30AD mit Niederdruckventil	Shimadzu, Kyoto, JP
Vorsäule C18, ODS, 4x2 mm	Phenomenex, Torrance, CA, USA
Wasserbad GFL 1083	Schütt, Göttingen, D
Zentrifuge 58010R	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D
Zentrifuge Heraeus Multifuge X3	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2: **Verwendetes Verbrauchsmaterial.**

Material	Hersteller
12-Well Platte CytoOne®	USA Scientific®, Ocala, FL, USA
384-Well Platte	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D
6-Well Platte Nunclon™ Delta Surface	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D
96-Well Collection Plate, 1 ml PP Square	Waters, Milford, MA, USA
96-Well Filterplatte MAHV N45	Merck, Darmstadt, D
96-Well PCR Platte	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D
96-Well Platte Nunclon™ Delta Surface	Apogent, Roskilde, DK
Adhärente Klebefolie	
adhesive sealing sheets	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D
BiCap Mate für 96-Well Platte	Waters, Milford, MA, USA
Combitips (5 ml; 2,5 ml; 500 µl)	Eppendorf, Hamburg, D
Deckgläschen	Gerhard Menzel, Braunschweig, D
Dialyse Membranfilter 0,025 µm	Merck, Darmstadt, D
Elektroporationsküvetten 2 mm	PeqLab, Erlangen, D
Filter Pipettenspitzen (steril)	
(1000, 100, 10 µl)	Kisker, Steinfurt, D
Glaspasteurpipette 230 mm	Brand, Wertheim, D
Minisart-plus Filter, 0,2 µM	Sartorius, Göttingen, D
Nunc® CryoTubes® 1,8 ml	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D
Optisch transparente Klebefolie	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D
PCR Caps (flach, 8er)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D
PCR-Platte 384-Well FrameStar	4titude, Wotton, UK
Petrischale (100mm)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Petrischale für Zellkultur (100 mm)	BD Biosciences, Heidelberg, D
Pipettenspitze (1000, 100, 10 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Pipettenspitze (2500 µl)	Eppendorf, Hamburg, D
Plattenhalter für Sequenzierung	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Reaktionsgefäß (2 ml, 1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Reaktionsgefäß (5 ml)	Eppendorf, Hamburg, D
Reaktionsgefäß mit Schraubverschluss	Sarstedt, Nümbrecht, D
Serologische Pipette (25, 10, 5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D

Zellkulturflasche 25 cm²	Sarstedt, Nümbrecht, D
Zellkulturflasche 75 cm²	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D

2.1.3 Software

Tabelle 3: **Verwendete Software.**

Software	Firma
3130xl Data Collection Software v3.0	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Adobe Photoshop CS2 v9.0	Adobe Systems GmbH, München, D
Clone Manager 6 v6.0	Sci Ed Central
CorelDraw X3 v13	Corel Corporation, München, D
EndNote X7	Thomson Reuters, New York, NY, USA
Eppendorf BioPhotometer Online v1.01	Eppendorf, Hamburg, D
GraphPad Prism v5.01	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
Microsoft Office 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Quantity One v4.2.3 und v4.6.7	BioRad, München, D
Sequencing. Analysis Software v5.2	Applied Biosystems, Darmstadt, D
SPSS v23	SPSS Inc., IBM, Chicago, IL, USA
Staden Package	SourceForge.ne
XFluor v4.40	Tecan Group AG, Männedorf, CH

Tabelle 4: **Verwendete Datenbanken.**

Datenbanken	URL
National Center for Biotechnology Information	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed

2.1.4 Reagenzien, Medien, Pharmaka und Antibiotika

Tabelle 5: **Verwendete Reagenzien.**

Reagenzien, Chemikalien und Medien	Hersteller
2-Propanol ≥ 99,9 %	AppliChem, Darmstadt, D
2x Multiplex Master Mix	Qiagen, Hilden, D
Acetonitril	LGC Promochem, Wesel, D
Agar Bacteriology grade	AppliChem, Darmstadt, D
Agarose ultrapure	Invitrogen, Darmstadt, D
Ameisensäure	Merck, Darmstadt, D
Aquasafe 500 Plus Flüssigszintillator	Zinsser Analytics, Frankfurt a. M., D
Bicinchoninsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Big Dye® Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Borsäure	Merck, Darmstadt, D
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Bromphenolblau Natriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe, D
Chloroform	J.T. Baker, Phillipsburg, USA
Dimethylsulfoxid	AppliChem, Darmstadt, D
DMEM Zellkulturmedium	Gibco, Darmstadt, D
DNA-Leiter 1 kbp	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D
DNA-Leiter 100 bp	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D
DNeasy Blood and Tissue Kit	Qiagen, Hilden, D
dNTP Set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; jeweils 100 mM)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D
DTT	Invitrogen, Darmstadt, D
EDTA Lösung, pH 8,0 (0,5 M)	AppliChem, Darmstadt, D
Ethanol	Merck, Darmstadt, D
Ethanol, denaturiert 99 %	Zentralapotheke, UM Göttingen
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt, D
Expand long template PCR System	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Fetales bovines Serum	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D
FuGENE® Transfektionsreagenz	Promega, Mannheim, D
Glycerol 85 %	Zentralapotheke, UM Göttingen
Glycin	AppliChem, Darmstadt, D
HBSS	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D

Hefeextrakt	AppliChem, Darmstadt, D
HEPES	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Hexanukleotid Random Primer	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Isoamylalkohol 89 %	Merck Schuchardt, Hohenbrunn, D
KOD Hot Start DNA Polymerase Kit	Merck, Darmstadt, D
Kupfersulfatpentahydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Magnesiumsulfat ≥ 99,5 %	Merck, Darmstadt, D
Methanol	LGC Promochem, Wesel, D
MPP^+, N-[methyl-^{3}H], 80 Ci/mmol	Hartmann Analytic, Braunschweig, D
MPP-dihydrochloridhydrat ≥ 97 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, D
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, D
Nonidet® P40 Substitution (Nonylphenylethylenglycol)	Fluka/Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
PBS-Puffer (10x Dulbecco's) in Pulverform	AppliChem, Darmstadt, D
Plasmid Midi-Präp Kit	Qiagen, Hilden, D
Poly-D-Lysin-hydrobromid, 1000-4000g/mol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Q-Lösung	Qiagen, Hilden, D
qPCR Master Mix	Primer Design, Southampton, UK
RNase A	AppliChem, Darmstadt, D
RNase Inhibitor	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
RNaseZAP™	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen, Hilden, D
Salzsäure 32 %	Merck, Darmstadt, D
SDS	AppliChem, Darmstadt, D
Sephadex G50 Superfine	GE Healthcare, Solingen, D
SuperScript® II Reverse Transkriptase Kit	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D
TEA [ethyl-1-^{14}C], 55 mCi/mol	Hartmann Analytic, Braunschweig, D
Tetraethylammoniumchlorid ≥ 99 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Triton-X-100	Carl Roth, Karlsruhe, D
Trypanblau-Lösung, 0,4 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
TrypLE™ Express	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D
Trypton	AppliChem, Darmstadt, D
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D

Tabelle 6: **Verwendete Pharmaka und Antibiotika.**

Pharmaka und Antibiotika	Hersteller
Ampicillin Natriumsalz	AppliChem, Darmstadt, D
Fenoterol-d6	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Fenoterolhydrobromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Hygromycin B	Invitrogen, Darmstadt, D
Penicillin – Streptomycin Lösung	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D
Ranitidin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Ranitidin-d6	Toronto Res. Chemicals, North York, USA
Sumatriptan-d6	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D
Sumatriptansuccinat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D

2.1.5 Enzyme und TaqMan®-Assays

Tabelle 7: **Verwendete Enzyme.**

Enzyme	Hersteller
*Dpn*I	New England Biolabs, Frankfurt a. M., D
*Eco*RI	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D
*Eco*RV	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D
*Exo*I	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D
*Hin*dIII	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D
*Pst*I	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D
*Sal*I	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, D
Shrimp alkaline phosphatase (SAP)	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA

Tabelle 8: **Verwendete TaqMan®-Assays.**

Nachzuweisendes Gen	Spezies	Assay ID	Exonbindung	Fluoreszenz-farbstoff	Hersteller
SLC22A1[1]	Mensch	Hs00427550_m1	4-5	FAM™	Applied Biosystems
Interne Kontrolle	**Spezies**	**Acc. Nummer**	**Bestellnummer**	**Fluoreszenz-farbstoff**	**Hersteller**
Hu TBP[2]	Mensch	M55654.1	4326322E	VIC	Applied Biosystems

[1] *Solute Carrier 22A1*

[2] *TATA-binding protein*

2.1.6 Primer

Tabelle 9: **Primer für zielgerichtete Mutagenese.**

Die unterstrichenen Basen zeigen das betreffende Codon; die ausgetauschten Basen sind fettgedruckt.

Primer	Sequenz (5‘-3‘)	Annealing bei
F160A_mf	TCCTGTGTGAACTTGGGC**GC**CTTCCTGGGCTCCCTGGTT	58 °C
F160A_mr	AACCAGGGAGCCCAGGAAG**GC**GCCCAAGTTCACACAGGA	58 °C
C451M_mf	ATTGTGTTGCAGATGGTC**ATG**CTAGTGAACGCTGAGCTG	50 °C
C451M_mr	CAGCTCAGCGTTCACTAG**CAT**GACCATCTGCAACACAAT	50 °C
C450M_hf	ATTGCAATACAAATGATC**ATG**CTGGTGAATGCTGAGCTG	55 °C
C450M_hr	CAGCTCAGCATTCACCAG**CAT**GATCATTTGTATTGCAAT	55°C

Tabelle 10: **Primer für Validierungs-PCR.**

Primer	Sequenz (5‘-3‘)	Amplikon	Reaktion
$\mathbf{P_{SV40}}$	AGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGG	519 bp	PCR_{Hygr}
$\mathbf{P_{Hygr_r2}}$	ACGCCCTCCTACATCGAAGCTGAAA		
$\mathbf{P_{CMV}}$	CCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTA	3137 bp	PCR_{GOI}
$\mathbf{P_{LacZ}}$	CCTTCCTGTAGCCAGCTTTCATCAA		
$\mathbf{P_{FRT_f}}$	AATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCC	214 bp	PCR_{Double}
$\mathbf{P_{Hygr_r}}$	CTTCGCCCTCCGAGAGCTGCATCAG		

Tabelle 11: **Primer für Sequenzierungs-PCR.**

Primer	Sequenz (5‘-3‘)	Zweck
2-for-mr	GGACTGGAACCAGAGCACCCTT	Validierung Insert Plasmid: pcDNA5 mOct1-C451M; mOct1-F160A
5-for-m	GGTTGAATGTGACCCTCGCTT	Validierung Insert Plasmid: pcDNA5 mOct1-C451M; mOct1 F160A
C88R_for	GGCCTTCCTTGGCCAGCGCAG GCGCTATGAAGT	Validierung Insert Plasmid: pcDNA5 hOCT1-C450M-M408V; hOCT1-F159A-M408V Validierung Hauptklone: C450M K5 I2, I3; F159A I3, II8; C450M K6 I1, I6 Nachweis über fehlendes C450M in hOCT1-F159A I3 und II8
F159A_hr_new	CCGAGAGAGCCAAAGAAGGCG CCCGCATG	Validierung Insert Plasmid: pcDNA5 hOCT1-C450M-M408V; hOCT1-F159A-M408V
F160A_mr	AACCAGGGAGCCCAGGAAGGC GCCCAAGTTCACACAGGA	Validierung Insert Plasmid: pcDNA5 mOct1-C451M; mOct1-F160A

Primer	Sequenz (5‘-3‘)	Zweck
R206C_rev	GACCAGGCCCTGCAGCAGGCAGA AGAGCAGCATGGACATGT	Validierung Hauptklone: C450M K5 I2, I3; F159A I3, II8; C450M K6 I1, I6 Nachweis über fehlendes C450M in hOCT1-F159A I3 und II8
P341L_for	GACCTGTTCCGCACGCTGCGCC TGAGGAAGCGC	Validierung Hauptklone: C450M K5 I2, I3; F159A I3, II8; C450M K6 I1, I6 Nachweis der C451M Mutation in mOct1-F160A-C451M Nachweis über fehlendes C450M in hOCT1-F159A I3 und II8
L364A_for	TGTGCTCTATCAGGGGGCCATC CTGCACATGGGC	Validierung Insert Plasmid: pcDNA5 hOCT1-C450M-M408V; hOCT1-F159A-M408V Validierung Hauptklone: C450M K5 I2, I3; F159A I3, II8; C450M K6 I1, I6 Nachweis über fehlendes C450M in hOCT1-F159A I3 und II8
H367A_for	ATCAGGGGCTCATCCTGGCCAT GGGCGCCACCAGCG	Validierung Insert Plasmid: hOCT1-F159A-M408V
M408V_for	CATCTACCCCATGGCCGTGT CAAATTTGTTGC	Validierung Insert Plasmid: pcDNA5 hOCT1-C450M-M408V; hOCT1-F159A-M408V Validierung Hauptklone: C450M K5 I2, I3; F159A I3, II8; C450M K6 I1, I6 Nachweis über fehlendes C450M in hOCT1-F159A I3 und II8

Primer	Sequenz (5‘-3‘)	Zweck
M408V_rev	GCCAACAAATTTGACACGGCCA TGGGGTAG	Validierung Insert Plasmid: pcDNA5 hOCT1-C450M-M408V; hOCT1-F159A-M408V
G465R_rev	GAACACACCATCACTCTGAGGT TCCTGACGAAT	Validierung Insert Plasmid: hOCT1 F159A-M408V

2.1.7 Bakterienstamm und Plasmide

Tabelle 12: **Verwendeter Bakterienstamm.**

Bakterienstamm	Herkunft	Besonderheit	Hersteller
One Shot® TOP10 *E. coli*	Escherichia coli	Elektrokompetent	Th. Fisher Scientific

Tabelle 13: **Im Handel erworbene Plasmide.**

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

Tabelle 14: **Laborinterne und selbst generierte pcDNA5-Plasmide.**

Plasmide	Erhalten von
pcDNA5::hOCT1-F159A-M408V	Marleen Meyer
pcDNA5::hOCT1-M408V	Tina Seitz
pcDNA5::mOct1	Helen Massy
pcDNA5::hOCT1-C450M-M408V	Eigens hergestellt
pcDNA5::mOct1-C451M	
pcDNA5::mOct1-F160A	

2.1.8 Zelllinien

Tabelle 15: **Benutzte und generierte HEK293-Zelllinien.**

Zelllinie	Klon	Herkunft
Flp-In™ T-REx™ 293[1]		Thermo Fisher Scientific
HEK293 – pcDNA5	10II	Ali Reeza Saadatmand
HEK293 – hOCT1-M408V	4I	Tina Seitz
HEK293 – mOct1	A	Tina Seitz
HEK293 – hOCT1-D474N-M408V	4	Marleen Meyer
HEK293 – hOCT1-F159A-C450M-M408V	15	Marleen Meyer
HEK293 – hOCT1-F159Y-M408V	10	Tina Seitz
HEK293 – hOCT1-W217Y-M408V	11	Tina Seitz
HEK293 – mOct1-D475N	1	Marleen Meyer
HEK293 – mOct1-F160A-C451M	1	Marleen Meyer
HEK293 – mOct1-F160Y	5	Helen Massy
HEK293 – mOct1-W218Y	6	Helen Massy
HEK293 – hOCT1-F159A-M408V	II8	Eigens generiert
HEK293 – hOCT1-C450M-M408V (Bakt. 5[2])	I3	
HEK293 – hOCT1-C450M-M408V (Bakt. 6[2])	I1	

[1]Humane embryonale Nierenzellen 293 (*Human Embryonic Kidney Cells 293*), die eine *Flp* (Flippase) *Recombination Target* Stelle für stabile Transfektionen besitzen. Diese Zelllinie ist die einzige, die in dieser Arbeit benutzt worden ist.

[2]Bezeichnet sind hier die Bakterienklone nach erfolgter Transformation, die gewünschte Basensequenzen im Insert zeigten. Für Transportexperimente wurden beide Klone verwendet.

Alle verwendeten hOCT1-Klone wiesen an Stelle 408 ein Valin auf. M408V stellt in diesem Falle keine Mutation dar. Es handelt sich um ein häufiges Allel in der europäischen Bevölkerung und wird laborintern als Wildtypallel betrachtet. M408V hat keinen Einfluss auf die Transportkinetik. mOct1 besitzt an der analogen Stelle 409 ein Alanin. Daher würde sich auch im Falle eines M408-hOCT1 Wildtyps die Maus vom Menschen unterscheiden.

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

Alle hier aufgeführten mikrobiologischen Methoden wurden in unmittelbarer Nähe eines Bunsenbrenners durchgeführt, um unter sterilen Bedingungen unerwünschte Kontaminationen durch andere Mikroorganismen zu vermeiden.

2.2.1.1 Kulturbedingungen

Die mikrobiologischen Techniken in dieser Arbeit wurden mit Hilfe von One Shot® TOP10 Electrocomp™ *E. coli* Bakterien durchgeführt. Diese wurden entweder in LB-Medium (*Lysogeny Broth Medium)* oder auf Agarplatten kultiviert. Hierzu wurden folgende Substanzen verwendet:

Tabelle 16: **Zusammensetzung LB-Medium.**

Substanz	Menge
Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
ddH_20	1000 ml

Um das LB-Medium herzustellen, wurden die Substanzen in angegebener Menge in ddH_2O (doppelt destilliertes Wasser) aufgelöst, autoklaviert und bei 4 °C gelagert. Zur Herstellung der Agarplatten wurden 14 g Agar in 1000 ml LB-Medium aufgelöst und ebenfalls autoklaviert. Das Gemisch wurde auf 55 °C heruntergekühlt und dann durch das Antibiotikum Ampicillin ergänzt. Die Endkonzentration von Ampicillin betrug 100 µg/ml. Das Gemisch wurde daraufhin sofort in Petrischalen gegossen und härtete bis zum nächsten Tag bei Raumtemperatur aus. Nachdem das Medium in den Petrischalen erhärtet war, wurden diese bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

2.2.1.2 Feste Bakterienkulturen

Für Bakterienkulturen auf Ampicillin-haltigen Agarplatten wurden Bakterienlösungen mit Hilfe eines Drigalski-Glasspatels auf diesen Platten ausgestrichen. Hierfür wurden Drigalski-Glasspatel aus Glaspasteurpipetten über der Flamme eines Bunsenbrenners geformt. Nach Abkühlung des Spatels wurden dann jeweils unterschiedliche Volumina (50, 100, 200 µl) entsprechender Bakterienlösungen auf die Platte pipettiert und mit dem Drigalski-Glasspatel ausgestrichen. Für das Bakterienwachstum wurden die Platten dann 24 Stunden bei 37 °C inkubiert und ggf. vier Wochen lang bei 4 °C gelagert.

2.2.1.3 Flüssige Bakterienkulturen

Um Bakterien mit dem Ampicillin-Resistenzgen in flüssigem LB-Medium zu kultivieren, wurden einzelne Kolonien mit sterilen Pipettenspitzen von der Agarplatte entnommen, in 5 ml LB-Medium überführt und resuspendiert. Dieses wurde zuvor in 15 ml Falcon-Röhrchen abgefüllt. Daraufhin wurde Ampicillin bis zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml hinzugegeben. Zuletzt wurden die Flüssigkulturen bei 37 °C unter Schütteln und ausreichender Sauerstoffzufuhr über Nacht inkubiert.

2.2.1.4 Langzeitlagerung von Bakterienstämmen

Für die Lagerung von Bakterienstämmen über längere Zeit wurden 600 µl der flüssigen Über-Nacht-Kultur mit 600 µl von 50-prozentigem Glycerol gemischt und dieses Gemisch sofort bei -80 °C gelagert.

2.2.1.5 Transformation von elektrokompetenten *E. coli* mittels Elektroporation

Die Transformation eines Plasmids in ein Bakterium erlaubt die Vervielfältigung und Expression eines Gens. Um die Transformation des Plasmids zu gewährleisten, wurden die elektrokompetenten One Shot® *E. coli*, das zu transformierende Plasmid und die Küvette für die Elektroporation auf Eis gelagert und vorgekühlt. Zur Herstellung einer Bakterien-Arbeitslösung wurde der Bakterienstock im Verhältnis 1:4 mit ddH_2O gemischt. Um eine Störung der Elektroporation durch Salze zu vermeiden, wurde die Plasmidlösung zuvor dialysiert. Die Elektroporation wurde mit dem Electroporator Gene Pulser II durchgeführt und es wurden folgende Einstellungen verwendet:

2,5 kV Spannung
25 µF Kapazität
200 Ω Widerstand

Die Lösung zur eigentlichen Elektroporation bestand zu 40 µl aus der Bakterien-Arbeitslösung und zu 1 µl aus der dialysierten Plasmidlösung, die in der vorgekühlten Küvette gemischt wurden. Sofort nach der Elektroporation mit oben genannter Einstellung wurden 800 µl des vorgewärmten LB-Mediums hinzugefügt und das Gemisch für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. In dieser Zeit kam es zur Expression des vom Plasmid kodierten Resistenzgens, sodass dann unterschiedliche Volumina (50, 100, 200 µl) der Suspension auf Agarplatten pipettiert und mit einem Drigalski-Spatel ausgestrichen werden konnten (vgl. Kapitel 2.2.1.2). Die festen Bakterienkulturen wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert, sodass am nächsten Tag einzelne Kolonien in eine Flüssigkultur überführt werden konnten, wie in Kapitel 2.2.1.3 beschrieben. Diese Flüssigkulturen wurden dafür verwendet, das vervielfältigte Plasmid zu isolieren (siehe auch Kapitel 2.2.1.6).

2.2.1.6 Isolation der Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse (Mini-Präp)

Die erste Isolation von Plasmid-DNA aus der Über-Nacht-Kultur, wie sie in Kapitel 2.2.1.5 beschrieben ist, folgte einem Dreischritt. Zunächst wurden die Bakterien mit einer alkalischen Lösung lysiert, danach wurde die DNA mit einer Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung extrahiert und mittels Ethanol präzipitiert.

Um die Bakterienklone über kürzere Zeit zu verwahren, wurden 5 µl der Über-Nacht-Kultur auf einer Agarplatte ausgestrichen, wiederum inkubiert und bei 4 °C gelagert. Die Isolation der Plasmid-DNA aus derselben Über-Nacht-Kultur erfolgte zunächst mit einer Zentrifugation der Röhrchen für zehn Minuten bei 4000 rpm (rpm: *revolutions per minute*). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 250 µl Resuspensionspuffer aufgenommen. Dieser setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 17: **Zusammensetzung Resuspensionspuffer (Mini-Präp).**

Substanz	Konzentration
Tris-HCl[1]	50 mM
EDTA[2]	10 mM
RNase A[3]	10 µg/ml

[1]Salzsäure

[2]Ethylendiamintetraacetat

[3]RNase A wurde erst nach dem Autoklavieren des Puffers hinzugegeben. Der Puffer wurde bei 4 °C gelagert.

Die Suspension wurde dann in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und 250 µl des Lyse-Puffers hinzugegeben. Das Gemisch wurde unter vorsichtigem Invertieren homogenisiert. Der Lyse-Puffer hatte folgende Zusammensetzung:

Tabelle 18: **Zusammensetzung Lyse-Puffer (Mini-Präp).**

Substanz	Konzentration
NaOH[1]	200 mM
SDS[2]	1 % (w/v)

[1]Natriumhydroxid

[2]Natriumdodecylsulfat

Anschließend wurden 350 µl Neutralisationspuffer hinzugegeben, dann wurde wiederum vorsichtig invertiert und das Reaktionsgefäß auf Eis gelagert:

Tabelle 19: **Zusammensetzung Neutralisationspuffer (Mini-Präp).**

pH 5,5

Substanz	Konzentration
Kaliumacetat	3 M

Nach weiterer Zentrifugation (zehn Minuten; 13000 x g) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 500 µl einer Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung hinzugegeben:

Tabelle 20: **Zusammensetzung Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung.**

Substanz	Volumen
Chloroform	96 ml
Isoamylalkohol	4 ml

Die Gefäße wurden mehrmals invertiert, um den Zelldetritus auszufällen. Zur Trennung der Plasmid-DNA von der Flüssigkeit wurden die Reaktionsgefäße bei 13000 x g fünf Minuten lang bei Raumtemperatur zentrifugiert, die obere Phase (enthielt Plasmid-DNA) in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 650 µl Isopropanol (-20 °C) hinzugegeben. Alles zusammen wurde geschüttelt und 15 Minuten lang bei 13000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das verbleibende Pellet, das die Plasmid-DNA enthielt, in 800 µl von 70-prozentigem Ethanol gewaschen. Nach dem Waschschritt erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 13000 x g für fünf Minuten. Der Schritt von der letzten Zentrifugation bis zum Waschen mit Ethanol wurde mindestens einmal wiederholt und der Überstand nach letztlicher Zentrifugation verworfen. Das Pellet wurde bei 37 °C getrocknet und zuletzt in 50 µl H_2O resuspendiert. Zur Quantifizierung der Plasmid-DNA wurde die Konzentration dieser mittels photometrischer Bestimmung ermittelt (Kapitel 2.2.2.2). Die Plasmid-DNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.1.7 Isolation der Plasmid-DNA mittels Festphasenextraktion (Midi-Präp)

Für die stabile Transfektion des gentragenden Plasmids in HEK293-Zellen (Kapitel 2.2.4) muss die Plasmid-DNA in hoher Konzentration vorliegen. Zu diesem Zweck wurde eine Isolation der Plasmid-DNA mit Hilfe des Qiagen Plasmid Plus Midi Kits unter Berücksichtigung der Herstelleranleitung durchgeführt. Zunächst wurde eine Vorkultur aus plasmidtragenden Bakterien angelegt, indem diese in 5 ml LB-Medium inklusive Ampicillin als Selektionsantibiotikum für acht Stunden unter Schütteln und ausreichender Sauerstoffzufuhr kultiviert wurden. Aus dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur angelegt, indem 30 µl der Vorkultur in 30 ml ampicillinhaltigem LB-Medium gelöst wurden. Die Hauptkultur wurde für zwölf bis 16 Stunden bei 37 °C unter Schütteln und bei ausreichender Sauerstoffzufuhr inkubiert. Nach Verstreichen dieser Zeit wurden die Bakterien isoliert, indem sie für 15 Minuten bei 4 °C und 7100 rpm zentrifugiert wurden. Um die Plasmid-DNA

zu extrahieren, wurde nach Herstellerangaben gearbeitet. Die DNA-Konzentration im Eluat wurde photometrisch bestimmt und die DNA bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden (DNA)

2.2.2.1 DNA-Extraktion

Zum Zweck der Extraktion von DNA aus kultivierten HEK293-Zellen wurde der QIACube Roboter unter Zuhilfenahme der Herstelleranleitung verwendet. Dafür wurden etwa ein bis zwei Millionen Zellen vier Minuten lang bei 400 x g zentrifugiert, das Kulturmedium entfernt und die Zellen in 100 µl PBS-Puffer aufgenommen. Mit der Einstellung des Elutionsvolumens von 100 µl wurde die DNA automatisch extrahiert.

2.2.2.2 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration der DNA-Lösungen wurde mit Hilfe des Eppendorf Biophotometers photometrisch bestimmt. Hierfür wurden 3 µl der Lösung auf eine Nanodrop-Küvette gegeben und die Absorption bei bestimmter Wellenlänge gemessen. Grundlage für die Bestimmung der Konzentration war das Lambert-Beer'sche Gesetz:

$$C\ [\mu g/\mu l] = D_{260} \times DiF \times CoF$$

C = Konzentration

D_{260}= Optische Dichte bei 260 nm Wellenlänge

DiF = Dilutionsfaktor der Lösung

CoF = Konversionsfaktor (50 µg/ml für dsDNA[1], 37 µg/ml für ssDNA[2])

[1]Doppelstrang-DNA; [2]Einzelstrang-DNA

Der Konversionsfaktor entspricht der Konzentration der jeweiligen Nukleinsäure bei einer optischen Dichte von 1 bei 260 nm. Die Funktion des Biophotometers erlaubt eine Überprüfung der Probe auf Proteinkontaminationen. Da DNA bei 260 nm und Proteine bei 280 nm absorbieren, lässt sich aus dem Verhältnis der beiden Werte der Grad der Kontamination bestimmen. Während ein Verhältnis von 1,8 bis 2,2 auf ein reines Produkt hinweist, deutet ein Verhältnis von weniger als 1,8 auf eine Proteinkontamination hin.

2.2.2.3 Dialyse

Für die Entfernung der störenden Salze bei der Bakterientransformation, wie sie in Kapitel 2.2.1.5 beschrieben ist, wurde ein Membranfilter der Firma Merck verwendet (0,025 µM). Es wurden dafür vorsichtig 20 µl der Plasmid-DNA auf eine solche Membran gegeben, die in einer mit ddH_2O gefüllten Petrischale schwamm. Nach 30 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die aufgereinigte Plasmid-DNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.2.2.4 Zielgerichtete Mutagenese

Die zielgerichtete Mutagenese wurde in dieser Arbeit genutzt, um die Mutationen F159/160A bzw. C450/451M einzeln in das *OCT1*-Gen der Template-Plasmide pcDNA5::hOCT1-M408V bzw. pcDNA5::mOct1 (siehe Tabelle 14) einzufügen. Diese Plasmide wurden in unserem Labor von Mitarbeitern bereits vor Beginn dieses Projektes generiert und sind im Labor etabliert. Ebenfalls etabliert waren die Primer, die für den Zweck der zielgerichteten Mutagenese verwendet wurden. Grundsätzlich betrachten wir hier jeweils die Mutation an einer Stelle des Wildtyps, die einen Aminosäureaustausch herbeiführt. Die Mutation M408V, wie sie im Template-Plasmid zu finden ist, wurde ursprünglich eingefügt, da 49,9 % der Bevölkerung diesen Polymorphismus tragen. Dieser Phänotyp wurde in unserem Labor als Wildtyp für hOCT1 etabliert. Aus der zielgerichteten Mutagenese, die in diesem Projekt durchgeführt wurde, resultieren die in Tabelle 21 aufgelisteten Mutanten von hOCT1 und mOct1.

Tabelle 21: **Zusammenfassung aller in Template-Plasmiden generierten Mutationen.**

Aus hOCT1-M408V	Aus mOct1
F159A-M408V	F160A
C450M-M408V	C451M

Die Generierung dieser Plasmide war notwendig, da geklärt werden musste, durch welche Einzelmutation der starke Effekt des Doppelmutanten F159A-C450M auf das Transportverhalten zu erklären ist. Zuvor wurde hOCT1-F159A vor dem

C450M-Hintergrund generiert, um eine Vergleichbarkeit zu vorigen Experimenten an rOct1 zu gewährleisten, die ebenfalls mit dieser Hintergrundmutation getestet worden sind.

Die Sequenzen der Primer sind in Tabelle 9 zu finden. Für die optimale Annealing-Temperatur des jeweiligen Primers wurde die Gradient-PCR (PCR: *Polymerase Chain Reaction*) herangezogen, die Annealing-Temperaturen von 50 °C bis 70 °C ermöglichte. Die Annealing-Temperaturen für die einzelnen Primer sind ebenfalls in Tabelle 9 gelistet.

Die PCR wurde mit folgendem Master Mix und unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Tabelle 22: **Reaktionsgemisch bei zielgerichteter Mutagenese.**

Reagenz	Volumen [µl]
ddH_2O	11,2
Q-Lösung	5
10x KOD[1] Puffer	2,5
dNTPs[2]	2,5
$MgSO_4$	1
Primer for (10 µM)	0,65
Primer rev (10 µM)	0,65
Template-Plasmid (50 ng/ml)	1
Hot Start KOD[1] Polymerase	0,5
Gesamt	25

[1]Thermostabile Polymerase von *Thermococcus* der Spezies KOD

[2]Desoxynukleotidtriphosphate

Tabelle 23: **PCR-Bedingungen bei zielgerichteter Mutagenese.**

Phase	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95	3 Min	
Denaturierung	95	30 s	
Annealing	50-70	30 s	19
Elongation	72	4 Min	
Kühlung	8	Unbegrenzt	

Für weitere Analysen mittels Agarose-Gelelektrophorese oder für die Transformation in elektrokompetente One Shot® *E. coli* (Kapitel 2.2.1.5) wurde das PCR-Produkt mit dem Restriktionsenzym *Dpn*I verdaut, welches spezifisch methylierte DNA-Stränge abbaut und damit die Template-DNA beseitigt, die in Bakterien vervielfältigt wurde und somit methyliert war. Das unmethylierte PCR-Produkt blieb intakt und wurde dadurch aufgereinigt. Hierfür wurden 2 µl *Dpn*I zum Reaktionsprodukt gegeben und dieses eine Stunde lang bei 37 °C inkubiert. Alternativ war auch ein Verdau bei 37 °C über Nacht möglich. Hierfür wurden jedoch 3 µl *Dpn*I hinzugegeben. Um zu prüfen, ob der Verdau und die PCR erfolgreich verlaufen sind, wurde das Reaktionsprodukt mittels Agarose-Gelelektrophorese auf 0,8-prozentigem Gel aufgetrennt und die 1-kb-DNA-Leiter als Referenz verwendet.

2.2.2.5 Analytischer Restriktionsverdau

Die analytischen Restriktionsverdaue wurden als erste Validierungsschritte angewendet, um zu prüfen, ob das *OCT1*-Gen korrekt in das pcDNA5-Plasmid integriert wurde. Nach dem Verdau mit Restriktionsenzymen für eine Stunde bei 37 °C wurden die Produkte auf einem 0,8-prozentigen Gel mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (Produkte vom Verdau mit *Pst*I wurden auf 1,5-prozentigem Gel aufgetrennt). Mit zu erwartenden Banden bei bestimmten Fragmentlängen ließ sich ermitteln, ob die Integration erfolgreich war. Der Master Mix setzte sich folgendermaßen zusammen:

Tabelle 24: **Analytischer Restriktionsverdau.**

Reagenz	Volumen [µl]
ddH_2O	7
Enzym	1
Puffer	1
Plasmid-DNA	1
Gesamt	10

Tabelle 25 zeigt die verwendeten Enzyme, die dazugehörigen Puffer und die zu erwartenden Fragmentlängen.

Tabelle 25: **Verwendete Restriktionsenzyme und Puffer für den analytischen Restriktionsverdau.**

Enzym	Puffer	Fragmentlänge [bp]	
		pcDNA5::hOCT1	**pcDNA5::mOct1**
***Eco*RV, *Hin*dIII**	Puffer R	1814, 5017	1689, 5019
***Sal*I**	Puffer O	2188, 4643	2188, 4520
***Eco*RI**	Puffer *Eco*RI	879, 5952	1386, 5322
***Pst*I**	Puffer O	68, 168, 929, 924, 4702	6708

2.2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Reaktionsprodukte der zielgerichteten Mutagenese (Kapitel 2.2.2.4) und des analytischen Restriktionsverdaus (Kapitel 2.2.2.5) wurden mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese nach ihrer Länge aufgetrennt und analysiert. Dafür wurde je nach Auftrennung entweder 1,5-prozentiges oder 0,8-prozentiges Gel vorbereitet (w/v), indem die Agarose in 1x TBE-Puffer (TBE: Tris-Base, Borsäure und EDTA) aufgelöst wurde.

Tabelle 26: **1x TBE-Puffer pH 8,3.**

Substanz	Konzentration
Tris-Base	100 mM
Borsäure	100 mM
EDTA	3 mM

Zunächst wurden 0,8 oder 1,5 g Agarose in einem Becherglas mit Rührfischchen abgewogen und mit 100 ml 1x TBE-Puffer versetzt. Die Suspension wurde gerührt und in einer Mikrowelle zum Sieden gebracht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Das Gel wurde dann bei Raumtemperatur und unter Rühren bis zu einer Temperatur von etwa 60 °C abgekühlt. Bevor das Gel in einen Gelträger mit Gelkämmen gegossen wurde, um es zum Erhärten zu bringen, wurden 5 µl Ethidiumbromid hinzugefügt. Nachdem es erhärtet war, wurden die Kämme entfernt und das Gel mit dem Träger in eine Elektrophoresekammer überführt, die mit 1x TBE-Puffer und 0.5 % Ethidiumbromid (v/v) gefüllt war.

Um die DNA mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese auftrennen zu können, musste diese zunächst mit 5x Ladepuffer gemischt werden, damit daraus eine Endkonzentration von 1x Ladepuffer entstanden ist.

Tabelle 27: **5x Ladepuffer.**

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

Von jeder Probe wurden dann 12 bis 13 µl in jeweils eine Tasche des Gels gegeben und diese bei etwa 120 V elektrophoretisch aufgetrennt. Als Referenz mit bekannten Fragmentlängen wurde eine DNA-Leiter mitgeführt, damit die resultierenden Banden ihrer Länge zugeordnet werden konnten. Die mit Ethidiumbromid gefärbte DNA wurde sofort nach der Gelelektrophorese unter UV-Licht (ultraviolettes Licht) im Fluor-S™ Multi Imager visualisiert und mit der Quantity One v4.2.3 Software bearbeitet.

2.2.2.7 Validierung der HEK293-Zellen

Für die Validierung der bei der stabilen Transfektion generierten HEK293-Zellen musste geprüft werden, ob das Zielgen, welches die Mutation im untersuchten OCT1-Protein bewirkt, korrekt aus dem Plasmid in das HEK293-Zellgenom integriert wurde. Hierfür wurden für jeden generierten HEK293-Zellklon drei unterschiedliche PCRs durchgeführt. Zwei dieser PCRs (PCR_{Hygr} und PCR_{GOI}) resultierten in einem Reaktionsprodukt, wenn das mutierte *OCT1*-Gen korrekt in das Zellgenom integriert wurde. PCR_{Hygr} eruierte, ob das Gen für die Hygromycin B-Resistenz vorhanden war, während die PCR_{GOI} das eigentliche *OCT1*-Gen detektierte. PCR_{Double} resultierte nur dann in einem Reaktionsprodukt, wenn das Gen mehrfach in das Zellgenom integriert wurde. Zellklone, deren PCR_{Double} positiv war, wurden aussortiert.
Die Bindung der Primer an die jeweilige Ziel-DNA ist schematisch in Abbildung 15 in Kapitel 3.3.1 dargestellt. Die Primersequenzen sind in Tabelle 10 zu finden.

Die Reaktionsbedingungen sowie die verwendeten Reagenzien sind im Folgenden aufgeführt:

Tabelle 28: **PCR_{Hygr}: Reaktionsbedingungen.**

Phase	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95	2 Min	
Denaturierung	95	30 s	
Annealing	64	30 s	35
Elongation	72	1 Min	
Finale Elongation	72	10 Min	
Kühlung	8	Unbegrenzt	

Tabelle 29: **PCR_{Hygr}: Reagenzien.**

Reagenz	Volumen [µl]
ddH_2O	8,8
Q-Lösung	4,4
10x KOD Puffer	2,2
dNTPs (2mM)	2,2
$MgSO_4$ (25mM)	1
Primer for (P_{SV40}, 100 µM)	0,5
Primer rev (P_{Hygr}_r2, 100 µM)	0,5
Extrahierte genomische DNA	2
Hot Start KOD Polymerase	0,5
Gesamt	22

Tabelle 30: **PCR_{GOI}: Reaktionsbedingungen.**

Phase	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
Denaturierung	94	2 Min	
Denaturierung	96	10 s	
Annealing	60	20 s	35
Elongation	68	5 Min	
Finale Elongation	68	7 Min	
Kühlung	8	Unbegrenzt	

Tabelle 31: **PCR_{GOI}: Reagenzien.**

Reagenz	Volumen [µl]
ddH_2O	9,3
Q-Lösung	5,6
10x ExpandLong Puffer 1	2,8
dNTPs (2mM)	4,5
$MgSO_4$ (25mM)	1,5
Primer for (P_{LacZ}, 10 µM)	0,5
Primer rev (P_{CMV}, 10 µM)	0,5
Extrahierte genomische DNA	3
ExpandLong Polymerase Mix	0,3
Gesamt	28

Tabelle 32: **PCR_{Double}: Reaktionsbedingungen.**

Phase	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95	15 Min	
Denaturierung	94	30 s	
Annealing	58	1 Min 30 s	35
Elongation	72	2 Min	
Finale Elongation	72	10 Min	
Kühlung	8	Unbegrenzt	

Tabelle 33: **PCR_{Double}: Reagenzien.**

Reagenz	Volumen [µl]
ddH_2O	1,2
Q-Lösung	2,2
2x QIAGEN Master Mix	5,5
10x Primer Mix (2 µM je P_{FRT}_f und P_{Hygr}_r2)	1,1
Extrahierte genomische DNA	1
Gesamt	11

Für die PCRs wurde die DNA gemäß Kapitel 2.2.2.1 extrahiert. Für die elektrophoretische Analyse der Produkte von PCR_{Hygr} und PCR_{GOI} wurden 0,8-prozentige Agarosegele und die 1-kb-DNA-Leiter verwendet, für die PCR_{Double} Produkte 1,5-prozentige Gele und die 100-bp-DNA-Leiter. Es wurden jeweils 10 µl des jeweiligen PCR-Produktes für die Gelauftrennung verwendet. Die restlichen 18 µl aus der PCR_{GOI} wurden für Sequenzanalysen der Mutationsstelle im *OCT1*-Gen verwendet. Zunächst musste das Produkt von PCR_{GOI} für Sequenzanalysen enzymatisch aufgereinigt werden. Hierfür wurde folgendes Reaktionsgemisch angesetzt:

Tabelle 34: **Ansatz zur Aufreinigung des PCR_{GOI}-Produktes.**

Reagenz	Volumen [µl]
SAP	2
10x SAP-Puffer	0,7
ExoI	0,3
PCR_{GOI}-Produkt	18
Gesamt	21

Das Reaktionsgemisch wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und die Reaktion gestoppt, indem es für 15 Minuten bei 80 °C inkubiert und bei -20 °C gelagert wurde.

Bei der Agarose-Gelelektrophorese waren Reaktionsprodukte der Länge 519 bp für die PCR_{Hygr} und 3137 bp für das *OCT1*-Gen bzw. 1376 bp für den leeren pcDNA5-Vektor bei PCR_{GOI} zu erwarten. PCR_{Double} resultierte nur dann in einem Produkt von 214 bp, wenn der Vektor mehrfach in das Zellgenom integriert wurde, da die Primer nur dann anlagern konnten. Bei einer korrekten einfachen Integration gab es kein Reaktionsprodukt, was eine erfolgreiche Validierung zu bedeuten hatte.

2.2.2.8 Kapillarsequenzierung nach Sanger

Die Methode der Kapillarsequenzierung nach Sanger wurde in dieser Arbeit verwendet, um die Basensequenzen der generierten Plasmide sowie der generierten HEK293-Zellklone zu validieren. Das Prinzip der Detektion der Basensequenz beruht auf einer etablierten Methode von Frederick Sanger und seinen Kollegen, die eine Kombination aus Amplifikation von DNA mittels PCR und DNA-Kettenabbrüchen durch Einbau von fluoreszenzmarkierten ddNTPs (Didesoxynukleotidtriphosphate) darstellt. Neben üblichen Primern, der

DNA-Polymerase, dNTPs und der zu untersuchenden DNA wurden fluoreszenzmarkierte ddNTPs dem PCR-Gemisch zugesetzt. Dies hatte zur Folge, dass diese ddNTPs während der PCR per Zufall immer wieder in den DNA-Strang eingebaut wurden und es dadurch zum Abbruch der PCR an jenem Strang kam. Resultat war ein Gemisch aus Amplifikaten unterschiedlicher Länge, die sich in einem elektrischen Feld mittels Kapillarelektrophorese der Größe nach auftrennen ließen. Da die DNA-Stränge unterschiedlicher Länge jeweils in der Farbe fluoreszierten, die vom ddNTP bestimmt wurden, konnte die Basensequenz mit Hilfe eines Detektors im 3130xl Genetic Analyzer bestimmt werden.

Zu diesen Zwecken wurde das BigDye® Sequenzierungskit und die in Tabelle 11 gelisteten Primer verwendet. Die Sequenzierungs-PCR wurde wie folgt durchgeführt:

Tabelle 35: **Sequenzierungs-PCR: Reaktionsbedingungen.**

Phase	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
Denaturierung	94	2 Min	
Denaturierung	96	15 s	
Annealing	56.5	15 s	25
Elongation	60	4 Min	
Finale Elongation	72	7 Min	
Kühlung	8	Unbegrenzt	

Tabelle 36: **Sequenzierungs-PCR: Reagenzien.**

Reagenz	Volumen [µl]
DMSO[1]	0,25
Primer (10 µM)	0,5
BigDye®	1
ddH_2O	2,25
DNA	1
Gesamt	5

[1]Dimethylsulfoxid

Das PCR-Produkt wurde vor der Sequenzanalyse mit Hilfe von Sephadex Superfine G50 durch Ausschluss-Chromatographie aufgereinigt. Hierfür wurden zunächst 35 mg des Sephadex-Pulvers in eine MAHV-N45 Filterplatte gegeben, 300 µl ddH_2O je Well hinzugefügt und der Ansatz für drei Stunden quellen gelassen. Überschüssiges ddH_2O wurde

durch Zentrifugation bei 700 x g für fünf Minuten entfernt, bevor nochmals 150 µl hinzugefügt wurden und damit ein weiteres halbstündiges Quellen eingeleitet wurde. Überschüssiges Wasser wurde wieder durch Zentrifugation bei 700 x g für fünf Minuten entfernt.

Jedes PCR-Produkt wurde durch 35 µl ddH_2O ergänzt und dann auf die Sephadex-Säulen gegeben. Die Filterplatte wurde bei 700 x g für fünf Minuten zentrifugiert und das dadurch aufgereinigte Produkt in einer sauberen 96-Well Platte für Sequenzierungen gesammelt. Die Analyse der Basensequenz erfolgte dann im 3130xl Genetic Analyzer unter Berücksichtigung der Herstellerangaben. Für die Bearbeitung der Daten stand die Sequencing Analysis Software v5.2 und das Staden Package in der Clone Manager 6 Software zur Verfügung.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden (RNA)

Die Bearbeitung von RNA (Ribonukleinsäure) bedarf im Laborbetrieb besonderer Vorsicht und spezieller Behandlung der Proben, da sich in der gesamten Umwelt RNasen befinden, die diese RNA degradieren könnten. Die RNasen befinden sich an Luftpartikeln, an Oberflächen und auch am Experimentator selbst. Aus diesem Grunde ist es unerlässlich, dass man bei der Behandlung von RNA-Proben stets Schutzhandschuhe trägt, alle Experimente an dafür vorgesehenen Arbeitsplätzen mit Dunstabzugshauben durchführt und RNasen mit Hilfe entsprechender Reagenzien (RNaseZAP™) unschädlich macht.

2.2.3.1 RNA-Extraktion

Die Extraktion der RNA-Moleküle aus HEK293-Zellen erfolgte mit Hilfe des RNeasy Plus Mini Kits und dem QIACube Roboter unter Berücksichtigung der Herstellerangaben. Im Vorfeld wurden dafür etwa ein bis zwei Millionen HEK293-Zellen bei 400 x g für vier Minuten zentrifugiert und das DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) entfernt. Dann wurden die Zellen in 350 µl RLT-Puffer (im RNeasy Kit enthalten) mit 1 % β-Mercaptoethanol (v/v) resuspendiert. Der QIACube Roboter löste die RNA-Proben in 50 µl RNase-freiem ddH_2O.

2.2.3.2 cDNA-Synthese

Um analysieren zu können, wie stark beispielsweise ein HEK293-Zellklon transfizierte DNA exprimierte, war es nötig die mRNA-Expression (mRNA: *messenger*-RNA) zu quantifizieren. Da dies jedoch aufgrund der hohen Gefahr der Degradierung durch RNasen nur schlecht praktikabel ist, musste aus der extrahierten RNA (Kapitel 2.2.3.1) cDNA (*copy-DNA*) generiert werden.

Hierfür wurde mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) eine Reverse Transkription aus der RNA-Vorlage durchgeführt. Zunächst wurden dafür die RNA-Proben so verdünnt, dass 1 µg in 17,75 µl RNase-freiem ddH_2O gelöst waren. Dann wurde den Proben 1 µl eines Gemisches von Hexamer-Primern zugesetzt und das Reaktionsgemisch für zehn Minuten bei 72 °C für eine Anlagerung inkubiert. Es handelte sich dabei um Primer bestehend aus sechs Nukleotiden, die in dem Gemisch zufällige Anordnungen und Reihenfolgen aufwiesen. Nach einem Zeitintervall von weiteren zehn Minuten zur Abkühlung auf Raumtemperatur wurden 11,25 µl eines Reaktionsgemisches zugegeben, welches die Synthese der cDNA ausgehend von Hexamer-Primern ermöglichte. Für die Reagenzien wurden stets die Herstellerangaben beachtet.

Tabelle 37: **Reagenzien für die cDNA-Synthese.**

Reagenz	Volumen [µl]
5x RT Puffer	6
DTT[1] (0,1 M)	3,5
SuperScript® II Reverse Transkriptase	0,25
RNase Inhibitor	0,5
dNTPs (10 mM)	0,25
Gesamt	11,25

[1]Dithiothreitol

Nach Zugabe des Reaktionsgemisches wurden die gesamten 30 µl des Ansatzes für eine Stunde bei 42 °C inkubiert, dann mit 70 µl ddH_2O verdünnt und das cDNA-Produkt bei -20 °C gelagert.

2.2.3.3 Real-Time PCR

Mit Hilfe der hier beschriebenen Methode war es möglich, die mRNA-Expression der generierten HEK293-Zellklone zu quantifizieren. Sie beruhte auf dem Prinzip, dass die zuvor generierten cDNA-Proben (Kapitel 2.2.3.2) mit fluoreszenzmarkierten Sonden versehen wurden. Diese ermöglichten es, den Zuwachs an DNA im Verlauf einer PCR in Echtzeit zu verfolgen. Unter Berücksichtigung der Zyklen, nach welchen eine bestimmte Fluoreszenzschwelle überwunden wurde, konnte man quantitative Rückschlüsse auf die Expression der mRNA ziehen.

In dieser Arbeit wurden *TaqMan® Gene Expression* Assays verwendet, um *hOCT1* enthaltende mRNA zu detektieren (Ansätze in Kapitel 2.1.5). Der *PrecisionPLUS 2x Master Mix* wurde von *Primer Design* erworben und wird laborintern für die Detektion von OCT1 enthaltender mRNA verwendet. Das humane TBP (*TATA-binding protein*) wurde als endogene Kontrolle verwendet. Eine quantitative Real-Time PCR setzt voraus, dass RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben wird (Kapitel 2.2.3.1 und 2.2.3.2). Es wurde dann ein Genexpressions-Master Mix hergestellt und 15 µl davon mit 3 µl cDNA Lösung einer Probe in einer 384-Well Platte gemischt. Jede Probe wurde in Triplikaten vorbereitet und die Platte dann mit einer optisch transparenten Klebefolie versiegelt. Die Real-Time PCR wurde unter Anwendung des 7900 HT Fast Real Time PCR Systems durchgeführt:

Tabelle 38: **Real-Time PCR: Reaktionsbedingungen.**

Phase	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
Denaturierung und Aktivierung der Taq-Polymerase	95	10 Min	
Denaturierung	95	15 s	
Annealing	60	1 Min	40
Kühlung	8	Unbegrenzt	

Tabelle 39: **Real-Time PCR: Reagenzien.**

Reagenz	Volumen [µl]
2x qPCR Master Mix	9
20x TaqMan® Assay Mix	0,9
ddH_2O	5,1
Gesamt	15

Der humane TaqMan®-Assay (ID: Hs00427550_m1) bindet an Exon 3 bis 4 des *hOCT1*-Gens. Die relative OCT1 Expression wurde unter Anwendung der $\Delta\Delta C_T$ Methode ermittelt. Hierzu wurde folgende Formel angewandt:

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{-(\Delta C_{T,\,S} - \Delta C_{T,\,R})} = 2^{-((C_{T\ hOCT1,\,S} - C_{T\ Kontrolle,\,S}) - (C_{T\ hOCT1,\,R} - C_{T\ Probe,\ R}))}$$

C_T = Schwellen-PCR-Zyklus

S = HEK293-Zellklon-Probe (OCT1-Mutant)

R = Referenz-Zelllinie (HEK293-pcDNA5)

Kontrolle = TBP

TBP wurde als interne Kontrolle verwendet.

2.2.4 HEK293-Zellen

HEK293-Zellen sind die einzigen Zellen, die in dieser Arbeit für Transportexperimente verwendet wurden. Es handelt sich um eukaryotische Säugerzellen. Um jegliche Form von Kontamination zu vermeiden, wurden alle Schritte, die die Kultivierung dieser Zellen betreffen, unter sterilen Bedingungen in einer sterilen Sicherheitswerkbank durchgeführt.

2.2.4.1 Zellkulturbedingungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden stets im CO_2-Inkubator kultiviert. Dieser hielt konstante physikalische Bedingungen aufrecht (relative Luftfeuchtigkeit 95 %, CO_2-Gehalt 5 %, Temperatur 37 °C). Als Nährmedium für die HEK293-Zellen wurde DMEM verwendet, welches durch 10% FCS (*fetal calf serum*), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin ergänzt wurde. Die Zellen wurden in T75-Zellkulturflaschen kultiviert und passagiert, sobald sie eine 80-prozentige Konfluenz aufwiesen. Dafür wurde das alte Medium aus der Flasche abgesaugt und die adhärenten Zellen mit 12 ml frischem Medium vom Flaschenboden abgespült. Von der Zellsuspension wurden dann 2 ml in eine neue Zellkulturflasche überführt, in der 13 ml frisches DMEM vorgelegt waren.

2.2.4.2 Auftauen von Zellen

Um die in flüssigem Stickstoff gelagerten HEK293-Zellen aufzutauen, wurden diese in den Einfriergefäßen sofort nach dem Herausholen aus dem Stickstofftank in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Sofort nachdem die Suspension in den flüssigen Zustand überging, wurde sie in 10 ml vorgewärmtes DMEM überführt und für drei Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Der DMSO-haltige Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5 ml DMEM resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann in eine T25-Zellkulturflasche überführt und diese in den CO_2-Inkubator gebracht.

2.2.4.3 Ausplattieren von Zellen

Die Ausplattierung von Zellen erforderte im Falle der konfluenten HEK293-Zellen in T75-Zellkulturflaschen eine Trypsinisierung. Die Behandlung mit TrypLE™ Express Lösung gewährleistete den enzymatischen Verdau der Zell-Zell-Kontakte. Zu diesem Zweck wurden 3,5 ml der Lösung auf die Zellen gegeben und diese bei 37 °C für drei Minuten im Inkubator belassen. Die Trypsinisierung wurde durch Zugabe von 10 ml DMEM gestoppt

und die trypsinhaltige Zellsuspension bei 300 x g für drei Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10 ml frischem DMEM resuspendiert. Um sicherzustellen, dass in jedem Well einer Platte die gleiche Anzahl an Zellen ausplattiert wurde, mussten die Zellen gezählt werden. Hierfür wurden 50 µl der Zellsuspension mit 50 µl Trypanblau (1:1) gemischt, um eine Färbung der toten Zellen zu erzielen. Dieses Gemisch wurde dann in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und in jedem der vier Quadranten die Zellzahl bestimmt. Die Zellzahl pro ml wurde mit folgender Formel berechnet:

$$ZZ\ \left[\frac{Zellen}{ml}\right] = \frac{\sum Zellen\ in\ allen\ vier\ Quadranten}{VF} * 10^4$$

ZZ = Zellzahl

VF = Verdünnungsfaktor (hier 2)

Aus der berechneten Zellkonzentration ließ sich dann ermitteln, welches Volumen der vorliegenden Zellsuspension mit DMEM verdünnt werden musste, um eine gewünschte Zellzahl pro Well zu erhalten, wenn man 1 ml in die 12-Well Platte gibt.

Für Transportexperimente (Kapitel 2.2.5) mussten die 12-Well Platten zunächst mit Poly-D-Lysin beschichtet werden, damit die Zellen adhärieren konnten. Es wurden 0,5 ml von 2 mg/ml konzentriertem Poly-D-Lysin in jedes Well gegeben und die Platten dann für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Verstreichen der Inkubationszeit wurde das Poly-D-Lysin entfernt und die Platten in der sterilen Sicherheitswerkbank getrocknet.

2.2.4.4 Stabile Transfektion von HEK293-Zellen mittels gezielter chromosomaler Integration

Als Voraussetzung für eine gezielte chromosomale Integration, die in dieser Arbeit durchgeführt wurde, wurde zunächst eine zielgerichtete Mutagenese im pcDNA5-Plasmid durchgeführt (Kapitel 2.2.2.4). Dieses Plasmid diente als Vektor für das zu transfizierende mutierte *OCT1*-Gen. Für die chromosomale Integration wurde in dieser Arbeit das Flp-In™ System und als Wirtszelllinie T-REx™ HEK293-Zellen verwendet. Das Flp-In™ System erlaubte die Integration von DNA an eine bestimmte Stelle des Wirtszellgenoms. Sowohl der pcDNA5-Vektor als auch die verwendete Wirtszelllinie besitzen ein sogenanntes *Flp Recombination Target*. Dieses erlaubte dem Enzym Flp-Rekombinase, welches von dem gleichzeitig transfizierten Helferplasmid pOG44 kodiert wurde, eine Rekombination und damit eine stabile Integration des im pcDNA5-Plasmid kodierten Gens in das

Wirtszellgenom. Aufgrund der Tatsache, dass im Vektor auch das Hygromycin B-Resistenzgen enthalten war, konnte eine gezielte Selektion der Klone durch Hygromycin B-Gabe erzielt werden. Abbildung 4 zeigt den Integrationsvorgang schematisch.

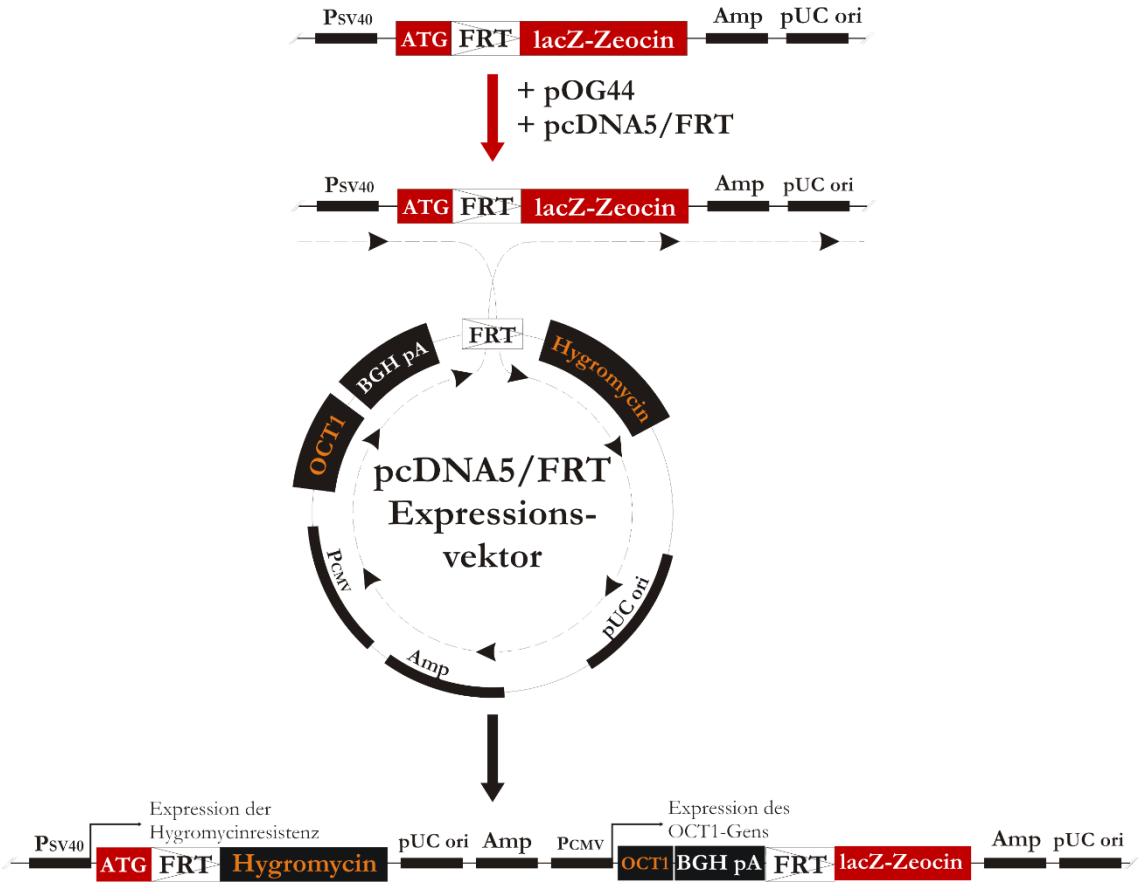


Abbildung 4: Schema des Flp-In™ Systems für die gezielte chromosomale Integration in HEK293-Zellen.

Das Flp-In™ System erlaubte eine Integration von DNA an eine bestimmte Stelle des Wirtszellgenoms. Sowohl der pcDNA5-Vektor als auch die verwendete Wirtszelllinie besitzen ein sogenanntes *Flp Recombination Target* (FRT). Dieses erlaubte dem Enzym Flp-Rekombinase, welches von dem gleichzeitig transfizierten Helferplasmid pOG44 kodiert wurde, eine Rekombination und damit eine stabile Transfektion des im pcDNA5-Plasmid kodierten Gens in das Wirtszellgenom. Aufgrund der Tatsache, dass im Vektor auch das Hygromycin B-Resistenzgen enthalten war, konnte eine gezielte Selektion der Klone erzielt werden, die bei der Transfektion entstanden sind. (Modifiziert aus *Invitrogen User Manual: Flp-In™ System*; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Ole Jensen)

Der praktische Ablauf der eigentlichen stabilen Transfektion stellte sich folgendermaßen dar: Eine Million T-REx™-HEK293-Zellen wurden in einer 6-Well Platte pro Well ausplattiert (wie in Kapitel 2.2.4.3 beschrieben) und 24 Stunden lang kultiviert. Nach Verstreichen der Zeit wurden 400 ng der zu transfizierenden Plasmid-DNA und 3.6 µg des Helferplasmids pOG44 in einem Reaktionsgefäß in 100 µl purem DMEM gelöst. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurde das Transfektionsreagenz FuGENE® 6 zu 12 µl in 100 µl purem

DMEM gelöst. Beide Gemische wurden fünf Minuten lang inkubiert und miteinander gemischt. Dieses Gemisch wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit wurden die ausplattierten T-REx™-HEK293-Zellen mit 2 ml DMEM/FCS (10 %) gewaschen. Nach Ablauf der Zeit wurden je Well 200 µl des DNA-FuGENE® Reaktionsgemisches auf die Zellen getropft. Nach 24 Stunden im CO_2-Inkubator wurde das Medium durch übliches Zellkulturmedium ersetzt (DMEM/FCS 10%/PS 1 %). Einen weiteren Tag später wurden die Zellen aus den 6-Well Platten in 100 mm Petrischalen überführt und mit 20 ml Zellkulturmedium versorgt. Nach Ablauf weiterer 24 Stunden wurden 120 µl von Hygromycin B (50 mg/ml) in die Petrischalen hinzugefügt, sodass eine Konzentration von 300 µg/ml resultierte. Etwa fünf Tage später wurde das Medium durch frisches 300 µg/ml Hygromycin B-haltiges DMEM ausgetauscht. Weitere fünf Tage später erschienen in den Petrischalen erstmals hygromycinresistente HEK293-Zellkolonien. Für ein transfiziertes Gen wurden dann 24 Kolonien in 24 Wells von 12-Well Platten transferiert und mit FCS- und PS-haltigem DMEM kultiviert, welches nun nur 100 µg/ml Hygromycin B enthielt. Für jede Kolonie/für jeden Klon wurde eine 70- bis 80-prozentige Konfluenz in den Wells abgewartet und die Zellen dann in die Wells einer 6-Well-Platte überführt. Waren die Zellen in diesen wiederum konfluent, wurden sie in T25-Zellkulturflaschen überführt und regelmäßig passagiert. Beim Passagieren wurden regelmäßig DNA- und RNA-Proben genommen und wie in Kapitel 2.2.2.1 und 2.2.3.1 extrahiert. Aus diesen Proben war es möglich, eine Validierung der gewonnenen Klone zu erzielen.

2.2.4.5 Überblick über die Generierung stabil transfizierter HEK293-Zellen

Viele der zuvor erläuterten Methoden dienten im weitesten Sinne dazu, stabil transfizierte HEK293-Zellen zu generieren, die später für Transportexperimente (Kapitel 2.2.5) verwendet werden konnten. Dieser Abschnitt soll dazu dienen, einen chronologischen Überblick über den gesamten Ablauf einer stabilen Transfektion darzustellen.

Zur Verfügung standen anfangs die Template-Plasmide pcDNA5::hOCT1-M408V und pcDNA5::mOct1, in welchen durch zielgerichtete Mutagenese Basensequenzen im *OCT1*-Gen verändert wurden (Kapitel 2.2.2.4). Nach erfolgter Mutagenese-PCR wurde das Template-Plasmid vom Restriktionsenzym *Dpn*I verdaut und das PCR-Produkt dadurch aufgereinigt (Kapitel 2.2.2.4). Um störende Elektrolyte in der Plasmidlösung zu entfernen, wurde sie dialysiert (Kapitel 2.2.2.3). Das mutierte Plasmid war dadurch für eine Transformation in OneShot® TOP10 *E. coli* präpariert. Eine solche wurde, wie in Kapitel

2.2.1.5 beschrieben, durchgeführt und die Bakterien auf Ampicillin-haltigen Agarplatten über Nacht kultiviert (Kapitel 2.2.1.2). Am folgenden Tag wurden aus den Platten einzelne Kolonien für eine flüssige Bakterienkultur über Nacht gewonnen (Kapitel 2.2.1.3) und aus diesen dann eine Isolation und Anreicherung des Plasmids mittels Mini-Präp durchgeführt (Kapitel 2.2.1.6). Das gewonnene Plasmid wurde dann durch unterschiedliche analytische Restriktionsverdaue (*Eco*RV, *Hin*dIII, *Sal*I, *Eco*RI und *Pst*I; Kapitel 2.2.2.5) und direktes Auftrennen auf Agarosegelen (Kapitel 2.2.2.6) validiert. Da eine direkte Mutagenese in das pcDNA5-Plasmid nicht üblich ist, war es sinnvoll das gesamte *OCT1*-Insert mittels Kapillarsequenzierung nach Sanger zu analysieren, um unerwünschte Mutationen auszuschließen und die gewünschte Mutation im Gen zu bestätigen (Kapitel 2.2.2.8). Nach dem gesamten Ablauf der Validierung generierter Plasmide (in Tabelle 14 gelistet) entschied man sich für das vollständig validierte Plasmid eines Bakterienklons und reicherte dieses mittels Festphasenextraktion an (Kapitel 2.2.1.7), um mit diesem dann die stabile Transfektion durchzuführen (Kapitel 2.2.4.4). Die Validierung der generierten HEK293-Zellklone mit Hilfe der dafür entworfenen PCRs (Kapitel 2.2.2.7) und die Quantifizierung der mRNA-Expression (Kapitel 2.2.3.3) selektierte zwei der ursprünglich 24 kultivierten Klone für Transportexperimente aus. Diese wurden für die Langzeitlagerung eingefroren (Kapitel 2.2.4.6). Die Ergebnisse der Validierung sind in Kapitel 3.3.1 dargestellt.

2.2.4.6 Einfrieren von Zellen

Die Langzeitlagerung der HEK293-Zellen erfolgte in -196 °C kaltem flüssigem Stickstoff. Hierfür wurden die Zellen in T75-Zellkulturflaschen bis zu 90-prozentiger Konfluenz kultiviert und in 10 ml frisches Zellkulturmedium suspendiert. Die Suspension wurde in einem 50 ml Zentrifugationsröhrchen für drei Minuten bei 300 x g zentrifugiert und das Zellpellet in 7,2 ml vorgekühltem Einfriermedium (90 % FCS und 10 % DMSO) resuspendiert. Die neue Suspension wurde in vier CryoTubes® zu je 1,8 ml verteilt und diese für eine Stunde in einem Eis-Kochsalz-Bad kaltgestellt. In nächster Instanz wurden die Zellen dann bei -80 °C gelagert, bevor sie nach wenigen Tagen in den flüssigen Stickstoff überführt werden konnten.

2.2.5 Transportexperimente

Zum Zwecke der Charakterisierung des Transportes bestimmter Substrate durch OCT1 und seiner Mutanten war es sinnvoll, die Aufnahme in Abhängigkeit von der Konzentration zu bestimmen, in welcher das Substrat auf die Zellen gegeben wurde. Dazu wurden wie in Kapitel 2.2.4.3 beschrieben in jedes Well der 12-Well Platte 6 x 10^5 HEK293-Zellen ausplattiert. Dies wurde für die pcDNA5-Zellen als Negativkontrolle, für die Wildtyp-Zellen als Positivkontrolle und für die Mutanten von OCT1 gleichermaßen praktiziert. Nach 48 Stunden wurde das eigentliche Transportexperiment durchgeführt, sofern die Zellen in den Wells bis zu 90-prozentige Konfluenz aufwiesen. Im Falle der Quantifizierung der Aufnahme mittels LC-MS/MS (*liquid chromatography-mass spectrometry*) dienten zwei der zwölf Wells für die Quantifizierung des Proteingehaltes pro Well (Kapitel 2.2.7), im Falle der Quantifizierung mit Hilfe von radioaktiv markierten Substanzen dienten alle Wells für die Proteinquantifizierung. Hier wurden demnach alle Wells für die Inkubation mit einem bestimmten Substrat genutzt. Das Transportexperiment wurde bei einem pH von 7,4 durchgeführt, indem die HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) durch 10 mM HEPES-Puffer (HEPES: 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonsäure) ergänzt wurde (dieses Gemisch wird im Folgenden als HBSS+ bezeichnet). Zunächst wurden die adhärenten Zellen in 1 ml HBSS+ (37 °C) gewaschen und dann mit 400 µl einer HBSS+-Substrat-Lösung bestimmter Konzentration für zwei Minuten inkubiert. Nach zwei Minuten wurde die Aufnahme des Substrates durch Zugabe von 2 ml kaltem HBSS+ (4 °C) gestoppt und die Zellen zwei Mal mit 2 ml kaltem HBSS+ gewaschen. Bei Substraten, deren Aufnahme durch die Massenspektrometrie bestimmt wurde, wurden die für die Quantifizierung der Proteine bestimmten Wells in 500 µl RIPA-Puffer (RIPA: *Radioimmunoprecipitation Assay*) lysiert:

Tabelle 40: **Zusammensetzung RIPA-Puffer.**

Substanz	Konzentration
Tris-HCl, pH 7,4	50 mM
SDS	0,1 % (w/v)
NP-40	1 % (v/v)
Natriumdesoxycholat	0,25 % (w/v)
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM

Die restlichen Wells, die mit dem Substrat in unterschiedlicher Konzentration inkubiert wurden, wurden mit einem Lyse-Puffer behandelt (80 % Acetonitril, 20 % ddH_2O inklusive internem Standard). Zellen, deren Substrataufnahme durch radioaktiv markierte Reagenzien bestimmt wurde, wurden in 0,1 N NaOH/0,1 % SDS lysiert. Dieses Reagenz sowie der RIPA-Puffer als auch der Lyse-Puffer hatten eine Zelllyse zur Folge.

Die intrazellulär bestimmte Substratkonzentration wurde stets auf die Proteinmenge normiert. Die Quantifizierung der Proteinmenge ist in Kapitel 2.2.7 beschrieben. Die konzentrationsabhängige Aufnahme eines Substrates wurde berechnet, indem die Aufnahme des Substrates von pcDNA5-Zellen von der Aufnahme der OCT1-überexprimierenden Zellen subtrahiert wurde. Durch EDV-gestützte nichtlineare Regression wurde durch die Datenpunkte eine Michaelis-Menten-Kurve gelegt und aus dieser die Parameter K_M und V_{max} bestimmt.

Tabelle 41: **Methoden für die Quantifizierung der Substrataufnahme.**

Substrat	Methode
Ranitidin	LC-MS/MS
Fenoterol	LC-MS/MS
Sumatriptan	LC-MS/MS
TEA+	Radioaktiv
MPP+	Radioaktiv

2.2.6 Quantifizierung der Aufnahme von Substraten

2.2.6.1 LC-MS/MS

Tabelle 42: **Überblick über die Zusammensetzung der Lyse-Puffer und der Probenaufbereitung für die LC-MS/MS-Messungen der Substrataufnahme.**

Substrat	Interner Standard (IS)	IS Konzentration [ng/ml]	Lyse-Puffer	Probenaufbereitung
Ranitidin	Ranitidin-d6	10	80 % ACN[1] + IS	1:10 Verdünnung in 0,1% FA[2] nach 2x Aufkonzentrierung durch Abdampfen
Fenoterol	Fenoterol-d6	5	80 % ACN + IS	1:8 Verdünnung in 0,1 % FA
Sumatriptan	Sumatriptan-d6	10	80 % ACN + IS	1:10 Verdünnung in 0,1% FA

[1]Acetonitril; [2]Ameisensäure

Tabelle 43: **LC-MS/MS-Parameter für die Bestimmung der intrazellulären Substratkonzentration.**

Substrat	Massen-übergang [m/z]	Retentions-zeit [Minuten]	Interner Standard (IS)	Massen-übergang von IS [m/z]	Retentions-zeit IS [min]	Organischer Anteil in mobiler Phase
Ranitidin	315,3 > 130,1	4,15	Ranitidin-d6	321,2 > 130,1	4,13	8 %
Fenoterol	304,1 > 107,1	4,49	Fenoterol-d6	310,3 > 141,0	4,45	12 %
Sumatriptan	296,2 > 58,2	6,61	Sumatriptan-d6	302,2 > 64,2	6,0	8 %

Nach dem Transportexperiment wurde der Zelldetritus durch Zentrifugation der Lysate bei 17000 x g für 15 Minuten entfernt und der Überstand für die Detektion der intrazellulären Substratkonzentration verwendet. Dafür wurden die Lysate wie in Tabelle 42 beschrieben aufbereitet. Für jedes Substrat wurden ebenfalls Proben bekannter Konzentration als Eichkurve mitgeführt und in gleicher Weise aufbereitet. In das LC-MS/MS wurden dann 10 µl der aufbereiteten Proben injiziert. Für die Analyse der Substratkonzentration in den Zellen wurde das API 4000™ System Tandem Massenspektrometer verwendet, welches mit einem HPLC-System verbunden war. Die Lösung der Substrate in der mobilen Phase wurde erreicht, indem unterschiedliche Verhältnisse organischer Lösungsmittel für das jeweilige Substrat bei einer Flussrate von 300 µl/min verwendet wurden (Tabelle 43). Die jeweiligen Substrate und internen Standards wurden mit Hilfe des multiplen Reaktionsüberwachungs-Modus detektiert. Die Masse-Ladungs-Verhältnisse und Retentionszeiten sind in Tabelle 43 aufgeführt.

2.2.6.2 Quantifizierung von radioaktiv-markierten Substanzen

Die Quantifizierung der radioaktiv markierten Substrate (^{3}H-MPP^{+}, ^{14}C-TEA^{+}) wurde durch den Beckman Coulter Szintillationszähler LS6500 ermöglicht. Dafür wurden 400 µl des Zelllysates in ein 20 ml-Fläschchen überführt und mit 9 ml Szintillationsflüssigkeit (*Aquasafe 500 Plus liquid scintillator*) gemischt.

2.2.7 Proteinquantifizierung

Die Proteinquantifizierung wurde nach der etablierten Methode von P. K. Smith und Kollegen durchgeführt (Smith et al. 1985).

Um die intrazellulär gemessenen Konzentrationen eines Substrates zwischen den untersuchten Zelllinien vergleichbar machen zu können, musste nach jedem durchgeführten Transportexperiment der durchschnittliche Proteingehalt in den zwölf Wells einer Platte bestimmt werden. Die Bestimmung der Proteinmenge beruhte auf dem Prinzip des BCA-Reaktionsansatzes (BCA: Bicinchoninsäure). In diesem Ansatz werden Cu^{2+}-Ionen durch die Peptidbindungen im Protein temperaturabhängig zu Cu^{+} reduziert. Die Menge der entstehenden Cu^{+}-Ionen ist proportional zur Proteinmenge. Die Bicinchoninsäure bildet mit den Cu^{+}-Ionen farbige Chelatkomplexe, die Licht der Wellenlänge 570 nm absorbieren. Mit Hilfe der Bestimmung der Lichtabsorption bei einer Wellenlänge 570 nm konnte demnach für jede Probe die Proteinmenge ermittelt werden.

Praktisch wurden dafür aus jedem Well, welches für die Quantifizierung von Proteinen bestimmt war (LC-MS/MS: zwei Wells mit RIPA-Puffer behandelt; Radioaktiv: alle Wells, die auch für die Quantifizierung der Substrataufnahme verwendet wurden), 5 µl des Lysates in eine 96-Well Platte pipettiert. Zuvor wurden die Platten zehn Minuten lang bei 13000 x g zentrifugiert. Jedes Well wurde in Triplikaten gemessen. Als Referenz wurde BSA (bovines Serumalbumin) in bekannten Konzentrationen als Eichgerade (0 bis 15 µg BSA) in die 96-Well Platte gegeben. Dies geschah in Duplikaten.

Zu jeder Probe der 96-Well Platte wurden 200 µl des BCA-Reaktionsansatzes gegeben:

Tabelle 44: **BCA-Reaktionsansatz.**

Substanz	Konzentration
BCA	98 %
4 % Kupfersulfatpentahydrat	2 %

Die Proben wurden dann 30 Minuten lang bei 37 °C mit dem BCA-Ansatz inkubiert und es wurde sofort die Absorption bei 570 nm im TECAN Ultra Microplate Reader gemessen.

2.2.8 Datenanalyse

Die Charakterisierung des Transportes beinhaltete die Bestimmung der K_M- und V_{max}-Werte. Diese wurden mittels nichtlinearer Regression unter Anwendung der Michaelis-Menten-Formel ermittelt. Dafür wurde die Software GraphPad Prism v5.01 verwendet.

Für multiple Vergleiche zwischen den Gruppen wurden Varianzanalysen (ANOVA) und der Tukey's Test als Post-Hoc-Analyse angewendet (*Tukey's Honestly Significant Difference*). Die genutzte Software war SPSS v23 (SPSS Inc., IBM, Chicago, IL, USA).

3 Ergebnisse

3.1 Speziesspezifische Unterschiede im OCT1-vermittelten Transport am Beispiel von Ranitidin

Das erste Ziel dieser Arbeit war es, das Transportverhalten von OCT1 der Spezies Ratte, Maus und Mensch miteinander zu vergleichen. In diesem Kontext wurde insbesondere das Substrat Ranitidin untersucht. Hierfür wurden HEK293-Zellen, die stabil mit *rOct1*-, *mOct1*- und *hOCT1*-Genen transfiziert wurden, mit aufsteigenden Konzentrationen von Ranitidin inkubiert. Die verwendeten Konzentrationen, mit denen man K_M und V_{max} zuverlässig bestimmen konnte, wurden in vorherigen Experimenten laborintern etabliert und in allen hier aufgeführten Experimenten benutzt. Als Negativkontrolle wurden Zellen verwendet, die stabil mit dem leeren pcDNA5-Vektor transfiziert wurden. Daraus resultierende Werte wurden von den Werten für rOct1, mOct1 und hOCT1 subtrahiert, um nur die Transporter-vermittelte Substrataufnahme aus der Kombination von Transport und Diffusion zu berücksichtigen. Tabelle 45 fasst die ermittelten Parameter für das Transportverhalten des Substrates Ranitidin zusammen.

Für Ranitidin zeigten sich deutliche Unterschiede im Transportverhalten zwischen den Spezies (Abbildung 5). Es zeigte sich sowohl für K_M als auch für V_{max} ein signifikanter Unterschied zwischen mOct1 und hOCT1. mOct1 zeigte eine ungefähr 2,5-fach höhere Transportkapazität als hOCT1. Die Substrataffinität von mOct1 war auf etwa die Hälfte gesunken (2,2-fache Erhöhung des K_M-Wertes). Im Gegensatz dazu zeigte sich ein eher geringfügiger Unterschied zwischen rOct1 und hOCT1. Die Transportkapazität von rOct1 war 1,4-fach höher als von hOCT1 und der K_M-Wert von rOct1 1,6-fach höher verglichen mit hOCT1.

Obwohl sich die Aminosäuren in OCT1 zwischen Maus und Ratte kaum unterscheiden, zeigte sich in diesem Experiment ein hochsignifikanter Unterschied in der Transportkapazität von Ranitidin (V_{max} von mOct1 1,75-fach höher als von rOct1). Der Unterschied zwischen Mensch und Ratte dagegen war nicht signifikant.

Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass in diesem Experiment deutliche Unterschiede im Transport von Ranitidin zwischen den Spezies Ratte, Maus und Mensch gefunden wurden. Entgegen aller Erwartungen unterschied sich vor allem die Maus von dem Menschen und von der Ratte.

Diese Beobachtung ist einmalig. Für alle bisher untersuchten Substrate zeigten sich auch funktionell mehr Ähnlichkeiten zwischen rOct1 und mOct1.

Das Ergebnis lässt Diskussionen zu, die in Kapitel 4.1 ausgeführt werden.

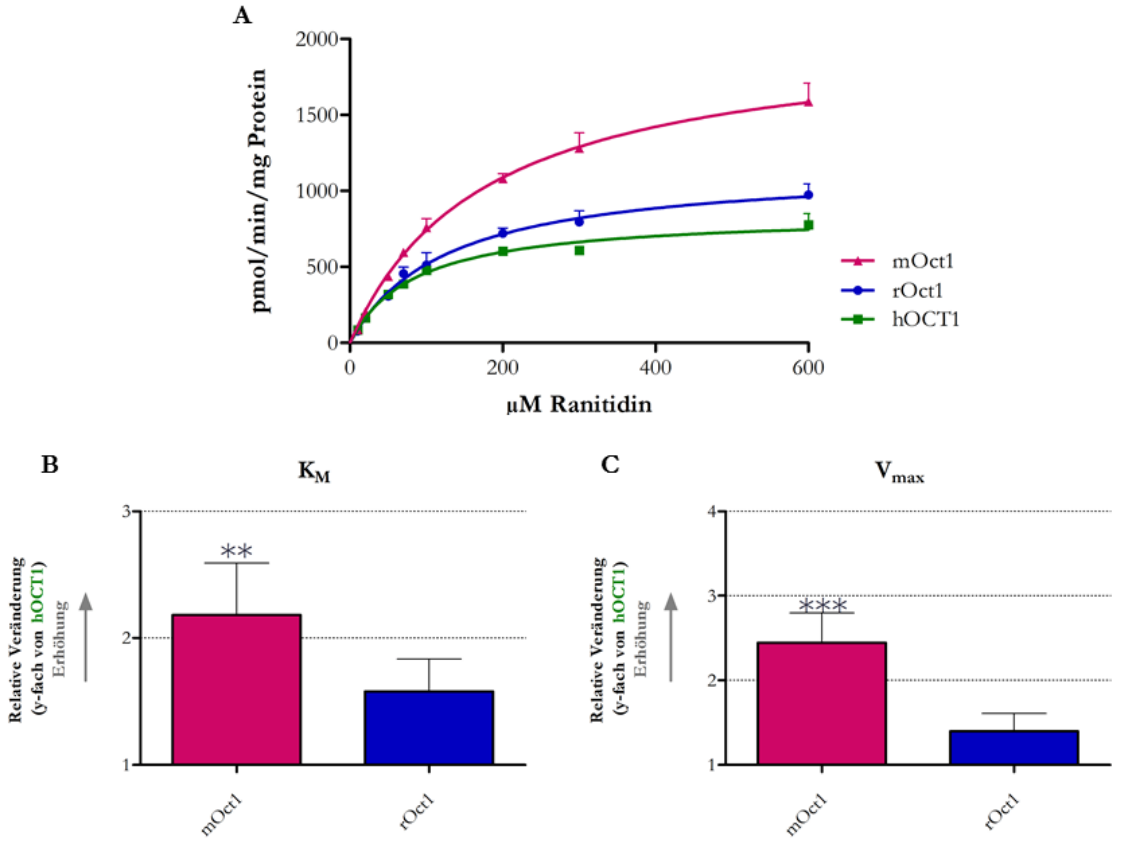


Abbildung 5: Speziesunterschiede im OCT1-vermittelten Transport von Ranitidin.

Stabil transfizierte HEK293-Zellen, die *hOCT1*, *mOct1* oder *rOct1* überexprimierten, wurden zwei Minuten lang mit aufsteigenden Konzentrationen von Ranitidin inkubiert. Die OCT1-vermittelte Aufnahme wurde berechnet, indem die gemessene Substrataufnahme der Negativkontrolle (pcDNA5-Vektor) von der gemessenen Aufnahme der OCT1-überexprimierenden Zellen subtrahiert wurde. **A** Die Aufnahme von Ranitidin in Abhängigkeit von der Konzentration. **B** und **C** Die relative Veränderung von K_M (**B**) und V_{max} (**C**) von mOct1 und rOct1 in Bezug auf hOCT1. Die Ergebnisse sind Mittelwerte und beruhen auf drei unabhängigen Experimenten. Die Balken zeigen den Standardfehler an. *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001 Signifikanzniveau in der ANOVA mit Tukey's Post-Hoc-Analyse.

Tabelle 45: **Parameter des Ranitidintransportes von hOCT1, mOct1 und rOct1.**

Ranitidinaufnahme	Spezies		
	hOCT1	mOct1	rOct1
K_M [µM]	79,7 (± 15,1)	161,3** (± 14,7)	121,2 (± 19,8)
V_{max} [pmol/min/mg Protein]	857,2 (± 72,2)	2053,3*** (± 187,4)	1170,3 (± 73,9)

*p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001 Signifikanzniveau in der ANOVA mit Tukey's Post-Hoc-Analyse (verglichen mit hOCT1)

3.2 Vergleichende Untersuchung zur Auswirkung der Aminosäuremutationen auf die Transportkinetik von hOCT1 und mOct1

Ein anderes wesentliches Ziel dieser Arbeit war es, die Effekte der Mutation von wichtigen Aminosäuren in OCT1 von Mensch und Maus zu vergleichen. Es wurden Aminosäuren analysiert, die in rOct1 bekannterweise deutliche Veränderungen im Transportverhalten verursachen. Hierzu wurde (analog zu den Experimenten in Kapitel 3.1) die Transportkinetik von mOct1 und hOCT1 miteinander verglichen. Es wurden mehrere Substrate benutzt: Ranitidin, Fenoterol und Sumatriptan sowie die Modellsubstrate TEA^+ und MPP^+. Die Zellen in diesen Experimenten waren jedoch mit *OCT1*-Genen der jeweiligen Spezies transfiziert, die an den Stellen F159/160, D474/475 und W217/218 Mutationen aufwiesen. Es wurde der pcDNA5-Vektor in HEK293-Zellen als Negativkontrolle, der jeweilige Wildtyp von hOCT1 bzw. mOct1 als Positivkontrolle und die Mutanten F159/160A, D474/475N, W217/218Y und F159/160Y als zu untersuchende Zellen verwendet.

3.2.1 Effekte der Mutationen von Schlüsselaminosäuren auf die Transportparameter vom menschlichen OCT1

Mutationen von Schlüsselaminosäuren in hOCT1 führten zu ähnlichen Effekten bei den verschiedenen Substraten, die getestet worden sind (Abbildung 6, Tabelle 46). Während D474N für alle untersuchten Substrate einen Verlust der Transportfähigkeit zur Folge hatte, nahm beim Doppelmutanten F159A-C450M die Transportkapazität für alle untersuchten Substrate zu. Außerdem zeigte sich eine deutliche Zunahme der K_M-Werte für F159A-C450M. Für die ausgewählten Konzentrationen war der Transport von Ranitidin und

Sumatriptan, besonders bei dem F159A-C450M-Mutanten, nicht gesättigt (Abbildung 6, Tabelle 46).

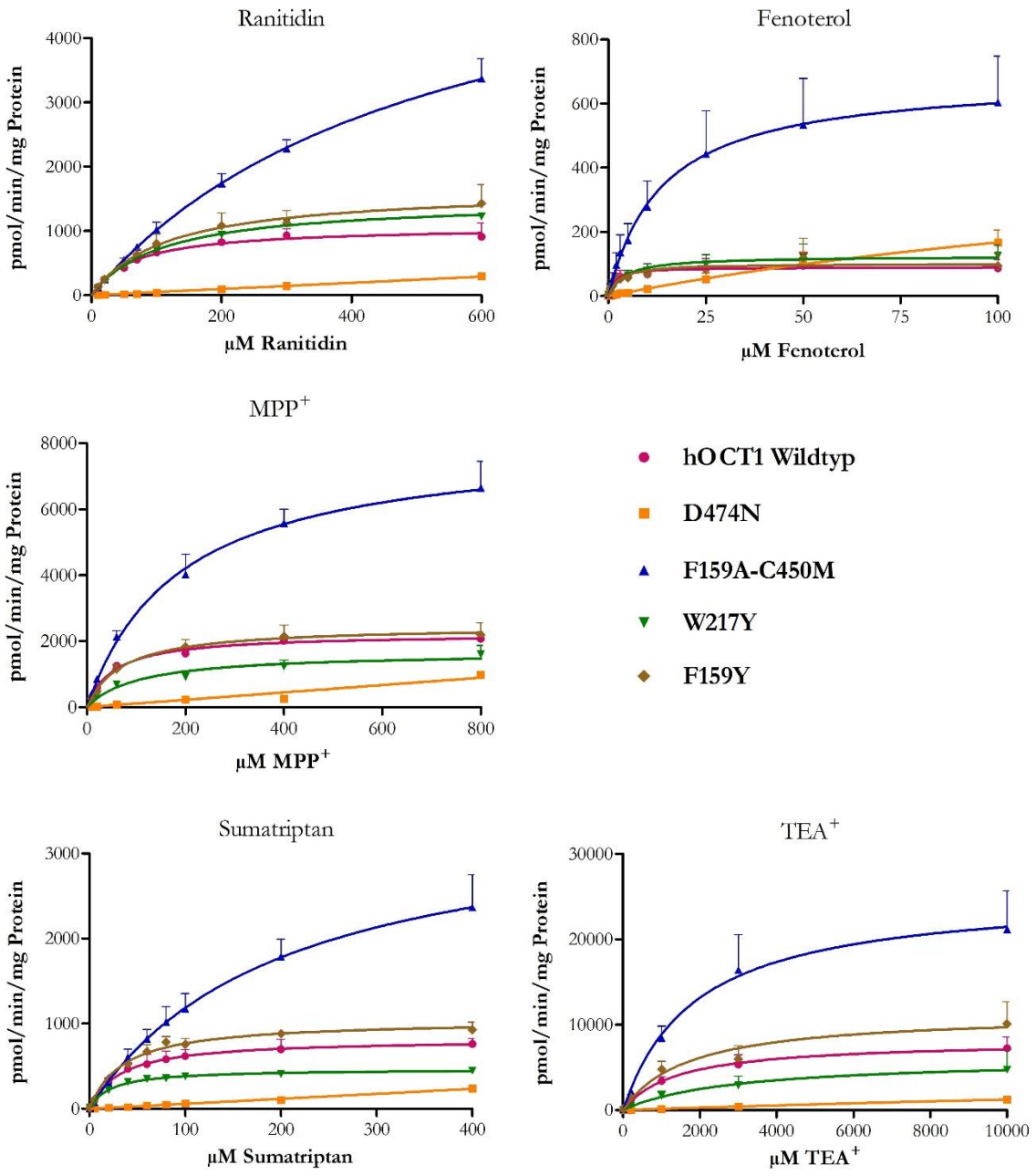


Abbildung 6: Konzentrationsabhängige Effekte der Schlüsselmutationen auf den Transport unterschiedlicher Substrate durch hOCT1.

Stabil transfizierte HEK293-Zellen, die den *hOCT1*-Wildtyp und die Mutanten F159A-C450M, D474N, W217Y und F159Y überexprimierten, wurden zwei Minuten lang mit aufsteigenden Konzentrationen von Ranitidin, Fenoterol, Sumatriptan, TEA^+ und MPP^+ inkubiert. Die OCT1-vermittelte Aufnahme wurde berechnet, indem die gemessene Substrataufnahme der Negativkontrolle (pcDNA5-Vektor) von der gemessenen Aufnahme der OCT1-überexprimierenden Zellen subtrahiert wurde. MPP^+- und TEA^+-Werte beruhen auf einem Durchschnitt der Proteinmenge in den Wells. Abgebildet sind die Mittelwerte der einzelnen Konzentrationen sowie der Standardfehler. Die Ergebnisse beruhen auf mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Tabelle 46: **K_M- und V_{max}-Werte hOCT1 Wildtyp und Mutanten nach Substraten.**

		Ranitidin	Fenoterol	Sumatriptan	TEA^+	MPP^+
K_M [µM]	Wildtyp	60,6 (± 11,6)	0,8 (± 0,2)	28,8 (± 5,3)	1594,9 (± 589,3)	39,6 (± 4,6)
	D474N	n. e.	n. e.	n. e.	n. e.	n. e.
	F159A C450M	493,9*** (± 64,2)	10,5 (± 3,6)	172,2*** (± 2,9)	1830,5 (± 427,3)	186,9 (± 82,2)
	W217Y	105,2 (± 21,5)	3,5 (± 1,2)	18,7 (± 1,7)	2235,3 (± 1107,6)	121,8 (± 46,9)
	F159Y	100,5 (± 8,4)	2,1 (± 0,9)	28,1 (± 2,7)	1179,0 (± 209,5)	58,1 (± 12,9)
V_{max} [pmol/min/mg Protein]	Wildtyp	1095,7 (± 183,6)	89,7 (± 30,5)	824,3 (± 90,4)	8477,5 (± 1806,0)	2236,6 (± 184,7)
	D474N[1]	296,4[1] (± 126,0)	166,8[1] (± 39,4)	238,7[1] (± 34,3)	1220,2[1] (± 371,7)	986,6[1] (± 5,5)
	F159A C450M	6453,8*** (± 834,1)	691,9* (± 157,4)	3548,7*** (± 572,3)	25987,5* (± 5859,4)	9066,7*** (± 1061,2)
	W217Y	1514,3 (± 196,4)	126,2 (± 37,3)	450,4 (± 27,3)	6571,5 (± 3765,1)	1801,6 (± 359,4)
	F159Y	1665,3 (± 353,2)	135,5 (± 58,5)	1109,0 (± 37,0)	11494,0 (± 3241,1)	2508,3 (± 376,8)

* = $p<0,05$; ** = $p<0,01$; *** = $p<0,001$ Signifikanzniveau in der ANOVA mit Tukey's Post-Hoc-Analyse: Unterscheidung bezüglich hOCT1; n. e. = Parameter nicht ermittelbar; MPP^+- und TEA^+-Werte beruhen auf einem Durchschnitt der Proteinmenge in den Wells.

[1]Gezeigt sind die gemessenen intrazellulären Konzentrationen in pmol/min/mg Protein bei höchster Inkubationskonzentration, da sich V_{max} für den D474N-Mutanten nicht ermitteln ließ.

Für das Substrat Ranitidin zeigten die Mutanten W217Y und F159Y eine fast identische Transportkinetik verglichen mit dem Wildtyp. D474N zeigte nahezu gar keinen Unterschied im Vergleich zum pcDNA5-Vektor und führt offensichtlich zu keinem funktionsfähigen Transporter. F159A hatte eine Substrataffinitätsverringerung sowie eine deutliche Erhöhung der Transportkapazität zur Folge, zeigte für die untersuchten Konzentrationen jedoch keine Sättigung (siehe dazu „Ranitidin" in Abbildung 6). Die Veränderung im Vergleich zum Wildtyp war sowohl bezüglich V_{max} und K_M hochsignifikant.

Für Fenoterol ergaben sich dieselben Effekte mit dem Unterschied, dass die aufgenommene Menge an Fenoterol bei Inkubation mit 100 µM für D474N höher war als beim Wildtyp, auch wenn sich eine lineare, nicht sättigbare Aufnahme darstellte. Der Transport des Mutanten F159A war bei der höchstgemessenen Konzentration von 100 µM Fenoterol gesättigt (siehe dazu „Fenoterol" in Abbildung 6). Die Erhöhung von V_{max} war statistisch signifikant.

Die Effekte der Mutationen auf den Transport der Modellsubstrate TEA^+, MPP^+ sowie des Pharmakons Sumatriptan ergaben die gleichen stereotypen Muster der Transportkinetik. Dennoch war bei all diesen Substraten eine leichte Abnahme der Transportkapazität (V_{max}) für den Mutanten W217Y zu ermitteln (57,7 % bis 85 % vom Wildtyp), die aber nicht signifikant war. Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass die Mutanten für alle Substrate vergleichbare Effekte zeigten. Substratspezifische Effekte blieben in diesem Teil der Experimente aus.

3.2.2 Effekte der Mutationen an Schlüsselpositionen im murinen OCT1

Um die Erkenntnisse der Messungen am hOCT1 auf mOct1 beziehen zu können, wurden die gleichen Experimente am murinen Oct1 und den analogen Mutanten D475N, F160A-C451M, W218Y und F160Y durchgeführt. Im Gegensatz zu hOCT1 zeigten die Mutationen an den gleichen Stellen in mOct1 sehr heterogene Effekte für die einzelnen Substrate. Es ließ sich kein vergleichbar einfaches Muster der Effekte ableiten, wie für den menschlichen OCT1.

Für die Pharmaka Ranitidin, Sumatriptan und Fenoterol ließ sich zusammenfassen, dass fast alle betrachteten Mutationen eine Beeinträchtigung des Substrattransportes zur Folge hatten, was sich in abnehmenden V_{max}-Werten widerspiegelte (Abbildung 7).

Der Transport von Ranitidin wurde durch alle untersuchten Mutationen abgeschwächt, für F160Y war die Änderung in V_{max} auf dem 0,01%-Niveau signifikant. Eine Änderung in der Substrataffinität war nicht auszumachen.

Auch für die Substrate Fenoterol und Sumatriptan entwickelte sich keine Veränderung der Substrataffinität durch die Mutationen, wohl jedoch eine Verringerung der Transportkapazität für die Mutanten W218Y (nur bei Sumatriptan), F160A-C451M und F160Y. F160A-C451M und F160Y veränderten V_{max} für Fenoterol signifikant ($p<0,01$). Die Mutationen bewirkten bei dem Substrat Sumatriptan einen ähnlichen Effekt, wie er bei

Ranitidin zu sehen war. Hier war die maximale Transportgeschwindigkeit bei W218Y ($p<0,01$) und F160Y ($p<0,001$) signifikant erniedrigt.

Die Mutationen F160A-C451M, F160Y und W218Y hatten keinen signifikanten Einfluss auf den Transport der Modellsubstrate TEA^+ und MPP^+ (Abbildung 7). Die Mutation D475N dagegen hatte eine Abnahme der Substrataffinität und eine deutliche Steigerung der Transportkapazität zur Folge hatte. Nur diese Mutation veränderte den Transport von TEA^+ und MPP^+ signifikant ($p<0,001$).

Der höchste Unterschied zwischen den Substraten war beim Mutanten D475N auszumachen. Für die Pharmaka Ranitidin, Fenoterol und Sumatriptan hatte diese Mutation einen Transportverlust der Substrate zur Folge, wohingegen bei den Modellsubstraten TEA^+ und MPP^+ ein deutlich besserer Transport festgestellt werden konnte, als er für den Wildtyp gemessen wurde.

Zusammengefasst haben die Mutationen im murinen Oct1 einen wesentlich substratspezifischeren Einfluss auf die Transportkinetik als im menschlichen OCT1. Dies wurde besonders deutlich bei der Betrachtung der D474/475N-Mutation. Während diese bei hOCT1 einen substratunabhängigen Funktionsverlust herbeiführte, gab es für TEA^+ und MPP^+ offensichtlich trotz Verlust von Aspartat an Position 475 eine Möglichkeit, die Substrate zu transportieren. Ein weiterer wesentlicher Unterschied war der Effekt der F159/160A-C450/451M-Mutation. Die Elimination des Benzolrings von Phenylalanin bewirkte in hOCT1 ausnahmslos eine Steigerung des Transportes. Diese Beobachtung war ebenfalls nicht substratspezifisch. Beim murinen Oct1 zeigten sich hingegen substratspezifisch unterschiedlich starke Beeinträchtigungen des Transportes durch die Mutation an Position 160.

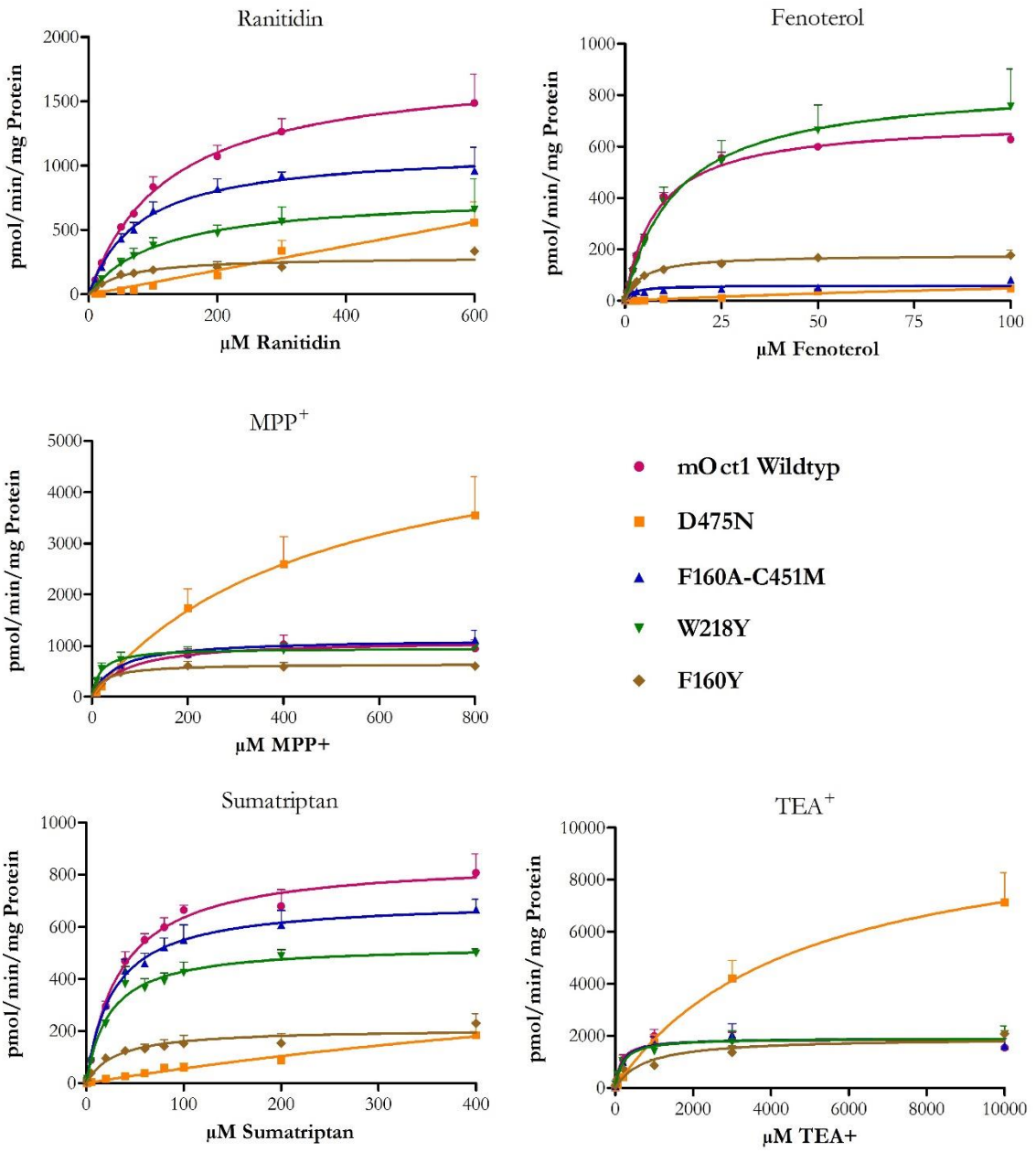


Abbildung 7: Konzentrationsabhängige Effekte der Schlüsselmutationen auf den Transport unterschiedlicher Substrate durch mOct1.

Stabil transfizierte HEK293-Zellen, die den *mOct1*-Wildtyp und die Mutanten F160A-C451M, D475N, W218Y und F160Y überexprimierten, wurden zwei Minuten lang mit aufsteigenden Konzentrationen von Ranitidin, Fenoterol, Sumatriptan, TEA^+ und MPP^+ inkubiert. Die OCT1-vermittelte Aufnahme wurde berechnet, indem die gemessene Substrataufnahme der Negativkontrolle (pcDNA5-Vektor) von der gemessenen Aufnahme der OCT1-überexprimierenden Zellen subtrahiert wurde. MPP^+- und TEA^+-Werte beruhen auf einem Durchschnitt der Proteinmenge in den Wells. Abgebildet sind die Mittelwerte der einzelnen Konzentrationen sowie der Standardfehler. Die Ergebnisse beruhen auf mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Tabelle 47: **K_M- und V_{max}-Werte mOct1 Wildtyp und Mutanten nach Substraten.**

		Ranitidin	Fenoterol	Sumatriptan	TEA^+	MPP^+
K_M [µM]	Wildtyp	124,4 (± 44,45)	3,3 (± 0,1)	28,9 (± 1,9)	137,6 (± 26,5)	64,3 (± 8,8)
	D475N	n. e.	n. e.	n. e.	4598,6*** (± 574,8)	434,7*** (± 45,8)
	F160A C451M	71,4 (± 6,36)	3,0 (± 2,2)	22,8 (± 2,7)	157,7 (± 31,3)	46,0 (± 9,1)
	W218Y	114,0 (± 40,73)	7,0 (± 0,5)	23,2 (± 3,8)	218,9 (± 66,1)	15,3 (± 7,0)
	F160Y	44,4 (± 14,3)	3,1 (± 0,2)	30,5 (± 9,4)	544,7 (± 313,2)	20,9 (± 1,0)
V_{max} [pmol/min/mg Protein]	Wildtyp	1870,3 (± 348,0)	687,5 (± 20,1)	860,7 (± 63,7)	1886,3 (± 189,6)	1118,5 (± 215,3)
	D475N	339,7[1] (± 80,6)	46,8[1] (± 13,4)	184,2[1] (± 51,3)	10526,3*** (± 1810,7)	5666,3** (± 1210,6)
	F160A C451M	1133,3 (± 155,1)	63,6** (± 10,3)	702,9 (± 52,3)	1919,7 (± 358,4)	1139,5 (± 130,8)
	W218Y	831,2 (± 270,0)	849,3 (± 152,6)	550,7** (± 27,3)	1922,7 (± 396,1)	965,6 (± 105,3)
	F160Y	279,0** (± 59,6)	189,8** (± 11,5)	214,3*** (± 48,7	1674,9 (± 393,2)	638,6 (± 78,2)

* = $p<0,05$; ** = $p<0,01$; *** = $p<0,001$ Signifikanzniveau in der ANOVA mit Tukey's Post-Hoc-Analyse: Unterscheidung bezüglich mOct1; n. e. = nicht ermittelbar; MPP^+- und TEA^+-Werte beruhen auf einem Durchschnitt der Proteinmenge in den Wells.

[1]Gezeigt sind die gemessenen intrazellulären Konzentrationen in pmol/min/mg Protein bei höchster Inkubationskonzentration, da sich V_{max} für den D474N Mutanten nicht ermitteln ließ.

3.2.3 Starke spezies- und substratspezifische Effekte der D474/475N-Mutation

Die beiden Spezies Maus und Mensch zeigten in den Experimenten mit verschiedenen Substraten nach Mutation der Schlüsselaminosäuren unterschiedliche Ausprägungen der Effekte. Dies wurde bei der Mutation D474/475N besonders deutlich. Bei hOCT1 führte die D474N-Mutation zu einem starken Verlust der Transportfähigkeit für fast alle getesteten Substrate (Abbildung 6). Die D474N-Mutanten zeigten nur einen schwachen nicht

sättigbaren Transport. Die maximalen Aufnahmewerte lagen dabei 1,7- bis 7,7-fach geringer als der Wildtyp (Abbildung 8). Die einzige Ausnahme war Fenoterol, welches der D474N-Mutant mit reduzierter Affinität transportierte. Dennoch war aber ein Transport mit vergleichbarer maximaler Kapazität wie beim Wildtyp zu sehen (Abbildung 6).

Dieser Verlust der Transportfähigkeit war bei mOct1 auch beobachtet worden, jedoch nicht für die Substrate TEA^+ und MPP^+. Ansonsten waren die Effekte der D474/475N-Mutation bei den Substraten Ranitidin, Fenoterol und Sumatriptan vergleichbar mit dem Menschen (Abbildung 6, 7, 8). Bei diesen Substraten sind auch für mOct1 lineare Zunahmen gemessen worden, die eine sättigbare Aufnahme zwar ausschließen, aber nicht prinzipiell gegen eine Aufnahme der Substrate im Sinne einer Diffusion sprächen (siehe dazu „Ranitidin“ in Abbildung 7).

Vergleicht man den Einfluss von D474/475N auf den Transport von Maus und Mensch, so ließ sich eindeutig ein Unterschied im Mechanismus der Aufnahme von TEA^+ und MPP^+ feststellen. Der murine Oct1 war in der Lage, diese Substrate im Sinne eines gesättigten Transportes aufzunehmen (Abbildung 8). Dabei waren die maximalen Aufnahmewerte für D475N in mOct1 sogar höher (5,1-fach für MPP+ und 5,6-fach für TEA+) als beim Wildtyp (Abbildung 8).

Relevant ist hier die Erkenntnis, dass mOct1 die Modellsubstrate TEA^+ und MPP^+ nachweislich über den Transporter in die Zellen überführen kann. Der Verlust dieser Fähigkeit bei hOCT1 zeigt den ersten wichtigen Unterschied: hOCT1 ist für die Aufnahme dieser Substrate vom Aspartat an Position 474 komplett abhängig. Es wird aus diesen Untersuchungen jedoch nicht deutlich, woran dies liegt. Möglicherweise gelangt der Transporter nicht in die Zellmembran oder aber der in der Membran befindliche Transporter ist in der Translokation der Substrate über die Membran behindert.

Der Unterschied im Ausmaß der Erniedrigung des Transportes bei „funktionslosen“ Transportern zwischen Maus und Mensch untermauert in diesem Experiment Unterschiede im Transportmechanismus desselben OCT1-Substrates.

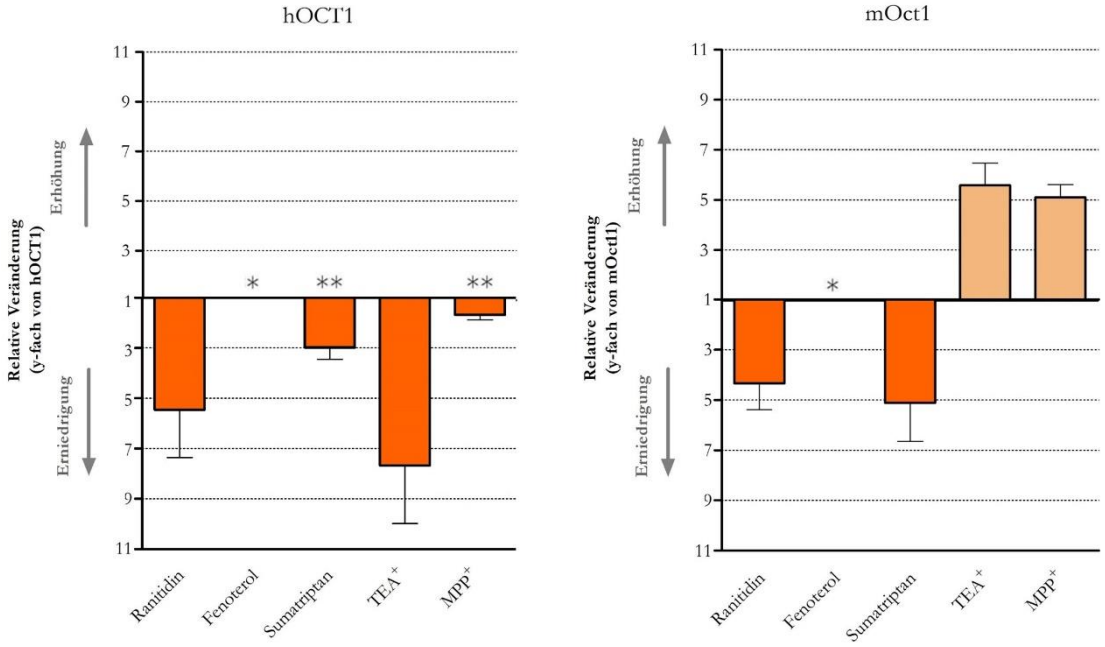


Abbildung 8: Relative Veränderung der Aufnahme des jeweiligen Substrates bei höchster gemessener Konzentration bzw. relative Veränderung von V_{max} für D474/475N.
Dargestellt ist das Verhalten des Mutanten D474N gegenüber dem hOCT1-Wildtyp (links) und das Verhalten des Mutanten D475N gegenüber dem mOct1-Wildtyp (rechts). Dabei zeigt sich die relative Veränderung von V_{max} in hellorange. In dunkelorange sind die Veränderungen der Aufnahme bei höchster Inkubationskonzentration dargestellt, da der Transport in diesen Fällen keine Sättigung zeigte und V_{max} für D474/475N nicht ermitteln werden konnte. Abgebildet sind die Mittelwerte der relativen Veränderungen sowie der Standardfehler. Aufgrund fehlender Michaelis-Menten-Kinetik konnten keine K_M-Werte bestimmt werden. *bei Fenoterol war weder V_{max} noch ein anderes reproduzierbares Ergebnis zu ermitteln. **bei MPP^+ und Sumatriptan von hOCT1 wurde in dieser Analyse jeweils eines von drei Einzelexperimenten exkludiert, um Fehler durch Ausreißer zu korrigieren.

3.2.4 Starke speziesspezifische Effekte der F159/160A-C450/451M-Mutationen

Alle Experimente in diesem Kapitel sind mit dem Doppelmutanten F159/160A-C450/451M durchgeführt worden. Die (hier zunächst als potenziell unbedeutend betrachtete) C450/451M-Mutation wurde neben der F159/160A-Mutation in das OCT1-Gen eingefügt, um eine Vergleichbarkeit experimenteller Ergebnisse (Meyer 2016) mit vorherigen Ergebnissen aus anderen Forschungsgruppen (Volk et al. 2009) zu gewährleisten. Von Interesse war in diesem Experiment jedoch vor allem die Veränderung der Aminosäure Phenylalanin zu Alanin an Position 159 oder 160 (F159/160A).

Die Kombinationsmutation F159/160A-C450/451M zeigte einen besonders speziesspezifischen Effekt. Es zeigten für diese Mutation alle gemessenen Substrate eine (hoch-)signifikante Erhöhung der Transportkapazität des hOCT1 um das 3- bis 9-fache verglichen mit dem Wildtyp (Abbildung 9). Der maximale Transport von Fenoterol war auf

das 8,4-fache, von Ranitidin auf das 5,9-fache, von MPP^+ auf das 4,5-fache, von Sumatriptan auf das 4,3-fache und von TEA^+ auf das 3,3-fache erhöht. Gleichzeitig ergaben sich deutliche Zunahmen des K_M-Wertes im Vergleich zum Wildtyp, für Sumatriptan hochsignifikant ($p<0,001$). Eine Ausnahme stellte TEA^+ dar, welches eine nahezu identische Substrataffinität aufwies wie der Wildtyp. Die überwiegende Zunahme verdeutlichte eine Affinitätsabnahme, die sich in K_M-Erhöhungen um das 1,4- bis 12-fache niederschlug. Eindeutig wurde in diesem Zusammenhang, dass die Mutation F159A-C450M den Transport der untersuchten Substrate verbesserte.

Ganz anders hingegen verhielt sich der Transport bei Mutanten von mOct1. Für vier der fünf gemessenen Substrate zeigte sich weder eine signifikante Veränderung in der Affinität noch eine signifikante Veränderung in der maximalen Transportkapazität. Nur für Fenoterol führte die F160A-C451M-Mutation zu einer 11-fachen Abnahme der maximalen Transportkapazität ($p<0,01$). Die Effekte von F160A-C451M auf den murinen Oct1 sind verglichen mit dem humanen OCT1 substratspezifischer, denn sie haben nur einen Einfluss auf den Transport von Fenoterol. Der Transport wurde durch die Mutation verringert und nicht verbessert, wie dies bei hOCT1 der Fall war (Abbildung 9).

Damit haben sowohl D474/475N sowie die Doppelmutation F159/160A-C450/451M unterschiedliche Effekte auf den Transport von OCT1 der jeweiligen Spezies. Dies suggeriert, dass die Mechanismen der OCT1-Struktur zur Translokation von Substraten zwischen Maus und Mensch nicht vergleichbar sind.

Es muss weiterhin untersucht werden, welche der beiden Mutationen (F159A/C450M) für diesen starken Effekt verantwortlich ist oder ob beide Mutationen in Kombination besagten Effekt haben (Kapitel 3.3). Weiterhin müssen Überlegungen angestellt werden, wie die Mutationen das Transportverhalten von OCT1 verbessern konnten, wie es beim Mutanten F159A-C450M zu beobachten war. Nachgewiesen war im Rahmen dieser Arbeit durch Kapillarsequenzierung nach Sanger, dass auch mOct1-F160A die Hintergrundmutation C451M tatsächlich besaß. Der interspezifische Effekt beruhte nicht auf der An- bzw. Abwesenheit einer analogen Aminosäuremutation.

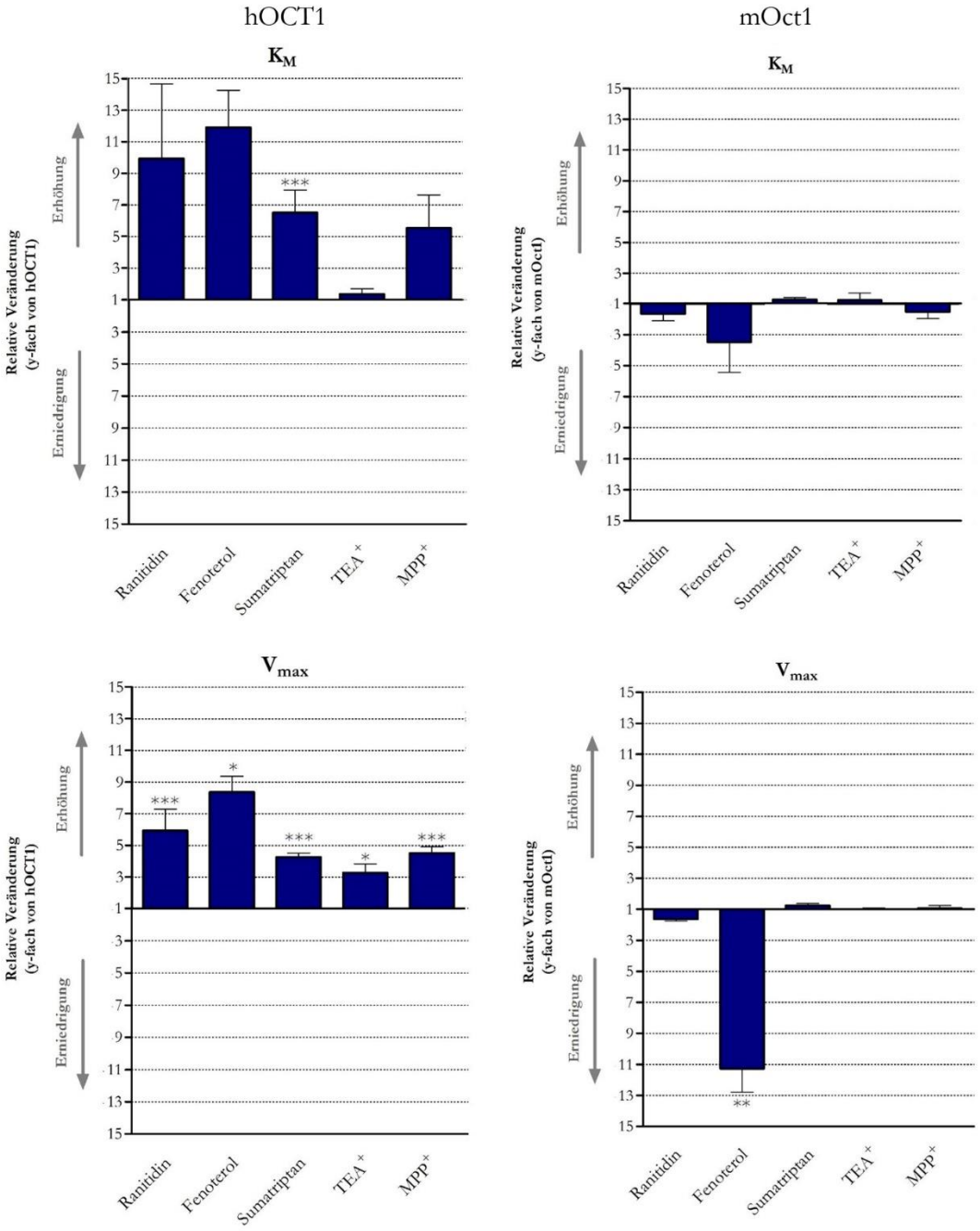


Abbildung 9: Relative Veränderung von K_M und V_{max} durch die Kombinationsmutation F159/160A-C450/451M.

Dargestellt ist die Veränderung von K_M und V_{max} durch die Mutationen F159A-C450M verglichen dem hOCT1-Wildtyp (linke Spalte) und die Veränderung durch die Mutationen F160A-C451M verglichen mit dem mOct1-Wildtyp (rechte Spalte). Die Effekte dieser Kombinationsmutation waren auf den hOCT1 bezogen eher weniger substratspezifisch, da für fast alle Substrate das gleiche Verhalten gezeigt werden konnte, außer für TEA^+. Ganz anders hingegen verhielt sich das Muster des murinen Oct1 und der Mutationen an analogen Stellen. Für vier der fünf gemessenen Substrate zeigte sich weder eine signifikante Veränderung in der Affinität noch eine signifikante Veränderung in der maximalen Transportkapazität. Eine Ausnahme stellte in diesem Zusammenhang Fenoterol dar, welches durch die F160A-C451M-Mutation eine 11-fache signifikante ($p<0,01$) Abnahme der maximalen Transportkapazität einbüßen musste. Abgebildet sind die Mittelwerte sowie der Standardfehler. *$p<0,05$; **$p<0,01$; ***$p<0,001$ Signifikanzniveau in der ANOVA mit Tukey's Post-Hoc-Analyse.

3.2.5 Geringfügige Unterschiede im Effekt der Mutationen W217/218Y und F159/160Y

Die Mutationen W217/218Y und F159/160Y ergaben heterogene (teils signifikante) Effekte auf die Transportkinetik verglichen mit den Wildtypen. Allerdings wurden nur für wenige Substrate statistisch signifikante Auswirkungen beobachtet. Beide Mutationen bewirkten eher Abnahmen der Transportkapazität.

Besonders bei W217/218Y ergaben die Tendenzen der K_M- und V_{max}-Veränderungen keinen wesentlichen Unterschied zwischen Maus und Mensch. So bewirkte die Mutation sowohl bei hOCT1 als auch bei mOct1 eine Erhöhung des K_M-Wertes für TEA^+ auf etwa das Doppelte. Typische Charakteristika der Mutation W217Y bei hOCT1 waren Zunahmen das K_M-Wertes auf etwa das 2- bis 5-fache und Erniedrigungen der maximalen Transportgeschwindigkeit bis auf ein Drittel der Wildtypreferenz. Die Mutation W218Y in mOct1 zeigte zum Teil eine Verdoppelung der K_M-Werte, aber auch Reduzierungen des K_M-Wertes auf ein Drittel des Wildtyps („MPP^+"; Abbildung 10). Das Spektrum der Veränderungen in V_{max} verhielt sich ähnlich zu hOCT1. Besonders ähnlich waren die Charakteristika der Transportkinetik für Fenoterol und Sumatriptan, die sich sowohl für hOCT1 und mOct1 identisch verhielten. Leichte Unterschiede fanden sich für Ranitidin, TEA^+ und MPP^+, die aufgrund ihrer geringfügigen Abweichung aber nicht relevant sind.

Die Mutation F159/160Y ergab in den Messungen weder in Bezug auf den menschlichen noch auf den murinen Transporter eine signifikante Veränderung Substrataffinität (K_M). Beachtet man die gewisse Messvariabilität, so sind die in Abbildung 11 dargestellten Veränderungen des K_M-Wertes nicht von Relevanz. Diesen fehlenden Effekt hatten hOCT1 und mOct1 gemeinsam.

Viel eindrücklicher war in den Experimenten zur Untersuchung von F159/160Y die Veränderung der maximalen Transportkapazität V_{max}. Bei hOCT1 war für keines der untersuchten Substrate eine Veränderung von V_{max} zu beobachten. Die analoge Mutation F160Y in mOct1 bewirkte für Ranitidin, Fenoterol und Sumatriptan eine signifikante Erniedrigung auf ein Viertel bis ein Siebtel der Wildtypreferenz. Die stärkste V_{max}-Erniedrigung wurde bei Ranitidin gemessen, bei TEA^+ und MPP^+ wurden nicht signifikante Abnahmen von V_{max} auf etwa die Hälfte ermittelt. Die maximale Transportgeschwindigkeit von Fenoterol und Sumatriptan wurde durch F160Y signifikant auf ein Viertel bzw. ein Fünftel reduziert.

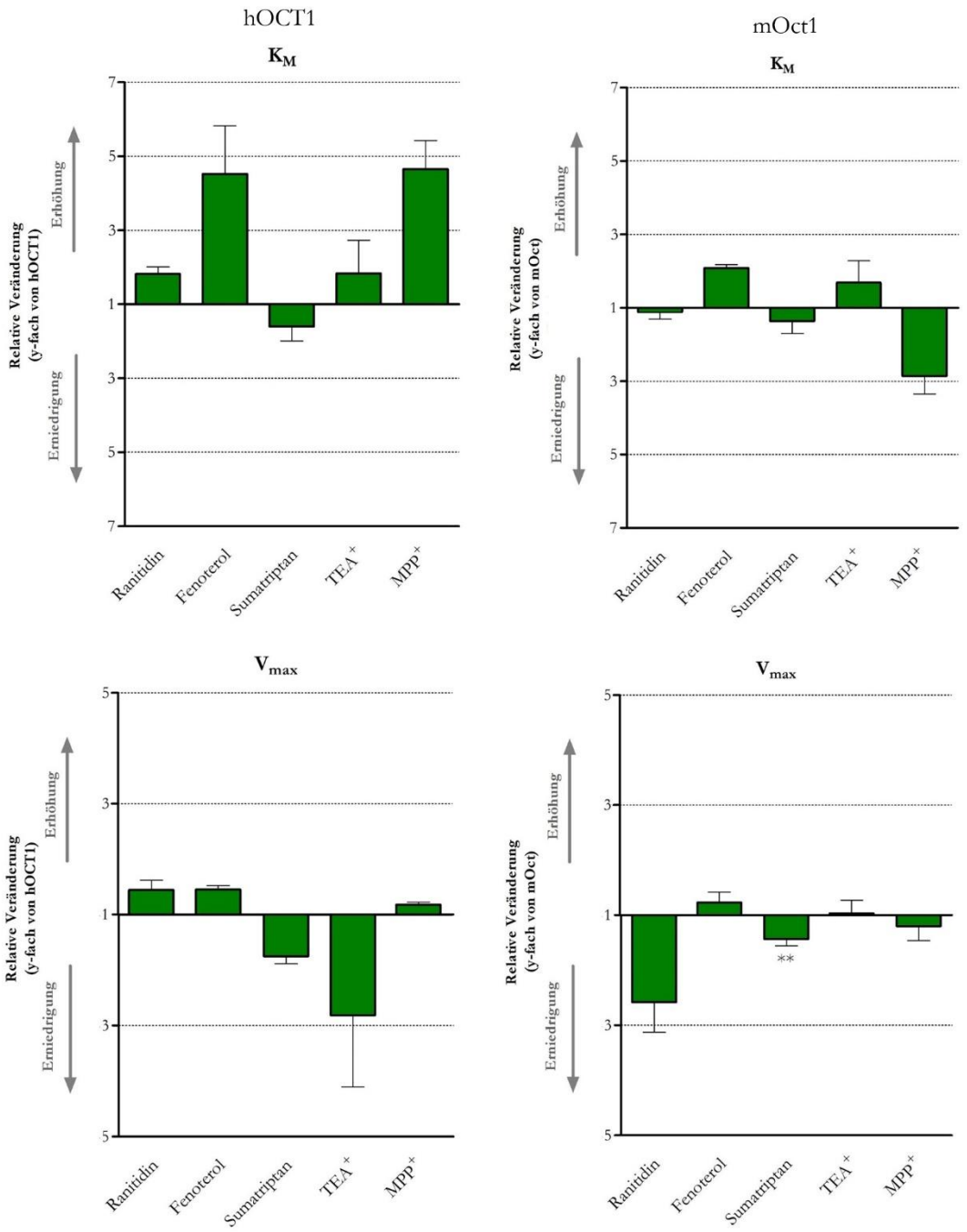


Abbildung 10: Relative Veränderung von K_M und V_{max} durch die Mutation W217/218Y.

Dargestellt ist die Veränderung von K_M und V_{max} durch die Mutation W217Y verglichen dem hOCT1-Wildtyp (linke Spalte) und die Veränderung durch die Mutationen W218Y verglichen mit dem mOct1-Wildtyp (rechte Spalte). Typische Charakteristika der Mutation W217Y beim Menschen waren Zunahmen das K_M-Wertes auf etwa das Zwei- bis Fünffache und Erniedrigungen der maximalen Transportgeschwindigkeit bis auf ein Drittel der Wildtypreferenz. Die Mutation W218Y in mOct1 zeigte zum Teil eine Verdoppelung der K_M-Werte, aber auch Reduzierungen des K_M-Wertes auf ein Drittel des mOct1-Wildtyps (MPP^+). Das Spektrum der Veränderungen in V_{max} verhielt sich ähnlich zu hOCT1. Abgebildet sind die Mittelwerte sowie der Standardfehler. *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001 Signifikanzniveau in der ANOVA mit Tukey's Post-Hoc-Analyse.

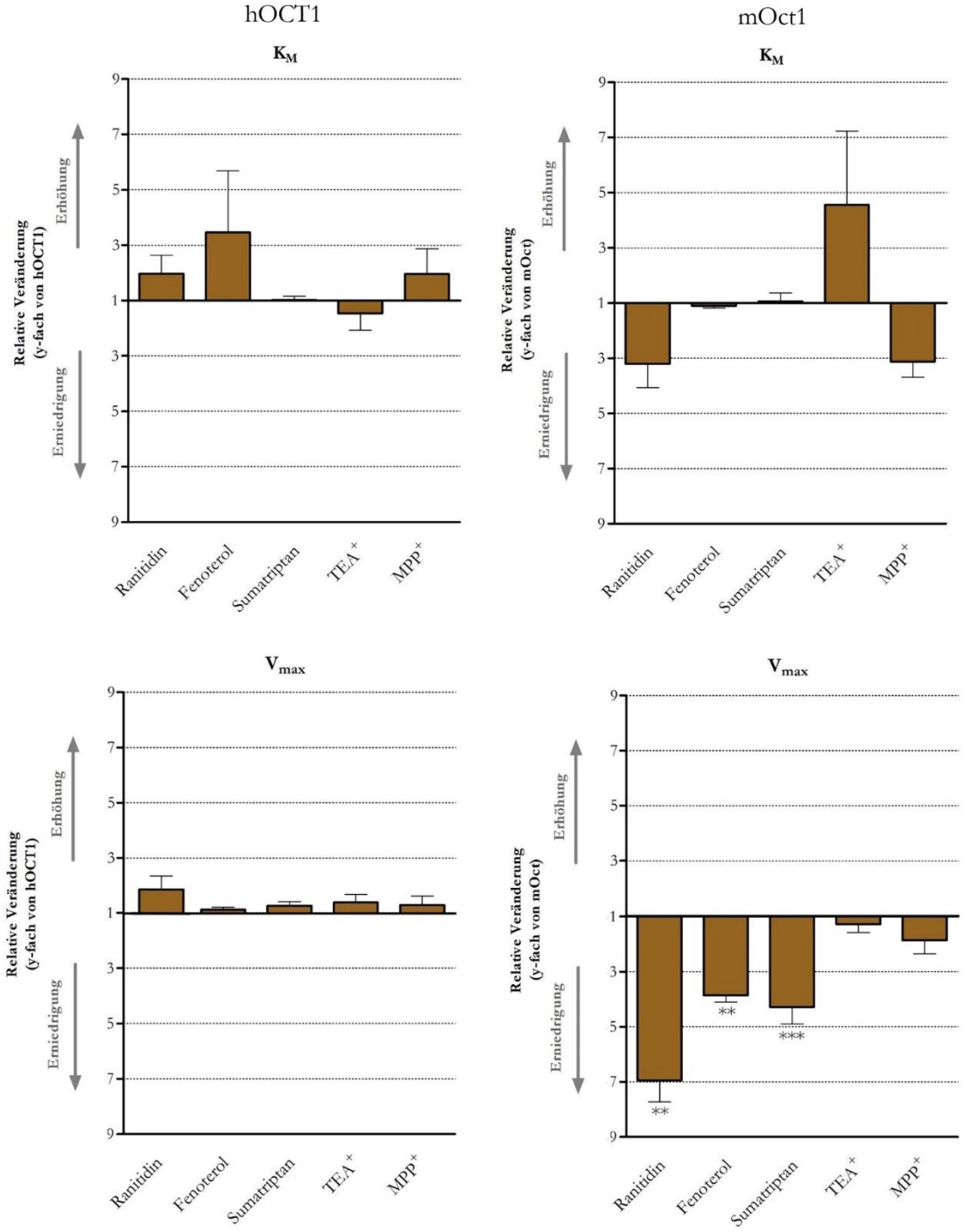


Abbildung 11: Relative Veränderung von K_M und V_{max} durch die Mutation F159/160Y.

Dargestellt ist die Veränderung von K_M und V_{max} durch die Mutation F159Y verglichen dem hOCT1-Wildtyp (linke Spalte) und die Veränderung durch die Mutationen F160Y verglichen mit dem mOct1-Wildtyp (rechte Spalte). Die Mutation F159/160Y ergab in den Messungen weder in Bezug auf den menschlichen noch auf den murinen Transporter eine signifikante Veränderung Substrataffinität (K_M). Diesen fehlenden Effekt hatten hOCT1 und mOct1 gemeinsam. Viel eindrücklicher war in den Experimenten zur Untersuchung von F159/160Y die Veränderung der maximalen Transportkapazität V_{max}. *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001 Signifikanzniveau in der ANOVA mit Tukey's Post-Hoc-Analyse.

Die beschriebenen Effekte unterschieden die Maus wiederum ganz wesentlich vom Menschen. Zu erwähnen ist in diesem Zusammenhang, dass die Mutation F160A-C451M (Kapitel 3.2.4; Abbildung 9) in mOct1 nur einen negativen Effekt auf den Transport von Fenoterol zeigte. Auf die anderen Substrate hatte diese Mutation keinen Einfluss. Betrachtet man F160Y, ergab sich eine deutliche Verringerung von V_{max} für mehrere Substrate in hohem Ausmaß. Ebenfalls anzumerken sei auch, dass die Mutation F159A-C450M in hOCT1 eine Erhöhung von V_{max} zur Folge hatte, wohingegen F159Y in hOCT1 keine Veränderung herbeiführte.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass sich hOCT1 und mOct1 nach Mutation der wichtigen Aminosäuren in rOct1 sehr unterschiedlich verhielten. Die Transportkinetik des menschlichen OCT1 wurde im Wesentlichen durch die Mutationen D474N und F159A-C450M beeinflusst. Die Mutationen W217Y und F159Y hatten wenige relevante Effekte. Die Auswirkungen von D474N und F159A-C450M waren beim menschlichen OCT1 nicht substratspezifisch, da die Kinetik aller untersuchten Substrate die gleiche Tendenz zeigte. Besonderes Augenmerk sei hierbei auf die Mutationen F159A-C450M und F159Y gerichtet. Die Mutation der gleichen Aminosäure Phenylalanin zu Alanin (A) oder zu Tyrosin (Y) brachte unterschiedliche Effekte hervor. Es wurde daher im Folgenden geklärt, ob der stark akzelerierende und affinitätsvermindernde Effekt von F159A-C450M von der Mutation des Phenylalanins an Position 159 oder des Cysteins an Position 450 abhing.

Der murine Oct1 verhielt sich in vielerlei Hinsicht unterschiedlich verglichen mit dem menschlichen OCT1. Die Mutation D475N bewirkte im Gegensatz zu D474N in hOCT1 keinen Verlust der sättigbaren Transportfähigkeit für alle gemessenen Substrate. TEA^+ und MPP^+ wurden mit wesentlich geringerer Affinität und hoher maximaler Transportgeschwindigkeit transportiert. Auch die Mutation F160A hatte lediglich einen negativen Effekt auf den Transport von Fenoterol, der Transport anderer Substrate wurde nicht beeinflusst. Auch dies war ein wesentlicher Unterschied im Vergleich mit hOCT1. Weiterhin wurde deutlich, dass der Mutant F160Y eine Erniedrigung von V_{max} der Substrate Ranitidin, Fenoterol und Sumatriptan zur Folge hatte. Kein vergleichbarer Effekt war bei hOCT1 zu erkennen. Die Mutation W218Y war in dieser Arbeit ähnlich wie die Mutation W217Y in hOCT1 nicht relevant an der Veränderung der Transportkinetik beteiligt.

Insgesamt waren die beobachteten Auswirkungen aller Mutationen in mOct1 aufgrund der vorigen Ausführungen wesentlich substratspezifischer als in hOCT1. Darüber hinaus zeigten die analogen Mutationen teils gegenläufige Effekte, was Unterschiede in der Strukturdynamik des OCT1 von Mensch und Maus untermauert.

3.3 Detaillierte Analysen der starken Effekte des Doppelmutanten F159A-C450M auf den hOCT1-Transport

Aufgrund der beobachteten starken und signifikanten Effekte der F159A-C450M-Kombinationsmutation auf den Transport des menschlichen OCT1 (Kapitel 3.2.4) haben wir uns dafür entschieden, die Gründe genauer zu analysieren. Dafür wollten wir die beobachteten Effekte differenziert betrachten. Es war zu klären, welche der beiden Einzelmutationen für die Beobachtungen der V_{max}- und K_M-Erhöhung verantwortlich war. Hierzu wurden Plasmide mit entsprechend mutierten *OCT1*-Genen generiert und diese stabil in HEK293-Zellen transfiziert, da Zelllinien mit den Einzelmutationen F159A bzw. C450M nicht zur Verfügung standen. Die Gesamtprozedur von der Generierung der Plasmide bis zur HEK293-Zellklonselektion ist in Kapitel 2.2.4.5 methodisch zusammengefasst.

Im Folgenden werden daher zunächst die Ergebnisse der Transfektions- und Validierungsprozedur präsentiert (Kapitel 3.3.1). Nach erfolgreicher Transfektion wurden Transportexperimente zur Untersuchung der Transportkinetik von Fenoterol und Sumatriptan durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Transportexperimente sind in Kapitel 3.3.2 aufgeführt.

3.3.1 Generierung und Validierung der HEK293-Zellen mit den Einzelmutationen F159A und C450M in hOCT1

Für die stabile Transfektion mutierter *OCT1*-Gene in HEK293-Zellen mussten zunächst Mutationen in pcDNA5-Plasmide eingefügt werden. Als Template-Plasmid wurde dafür pcDNA5::hOCT1-M408V verwendet. Zur Generierung der Plasmide mit analogen Mutationen in mOct1 stand pcDNA5::mOct1 zur Verfügung. Das Prozedere für die zielgerichtete Mutagenese ist in Kapitel 2.2.2.4 ausführlich dargestellt. Zur Aufreinigung der Produkte der Mutations-PCR wurde ein Verdau mit dem Restriktionsenzym *Dpn*I durchgeführt und eine Agarose-Gelelektrophorese auf 0,8-prozentigem Gel durchgeführt (Abbildung 12).

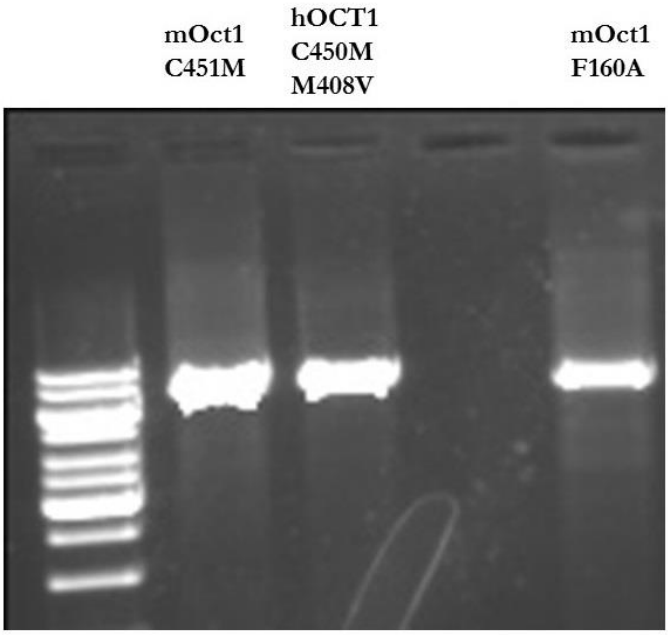


Abbildung 12: Darstellung der Plasmide nach zielgerichteter Mutagenese sowie nach *Dpn*I-Verdau.

Zur Aufreinigung der Produkte der Mutations-PCR wurde ein Verdau mit dem Restriktionsenzym *Dpn*I und eine Agarose-Gelelektrophorese auf 0,8-prozentigem Gel durchgeführt. Die dargestellten Banden weisen eine erfolgreiche Amplifikation nach. Anmerkung: hOCT-F159A-M408V lag als Plasmid bereits vor und musste nicht generiert werden, daher wurde auf eine Elektrophorese verzichtet.

Die hier generierten Plasmide wurden dialysiert (Kapitel 2.2.2.3), in Bakterien transformiert (Kapitel 2.2.1.5) und nach Aufbereitung der Bakterien durch Methoden der Kultivierung mit der Mini-Präp-Methode angereichert (Kapitel 2.2.1.6). Um das Vorliegen des korrekt isolierten *OCT1*-haltigen Plasmids nachzuweisen, war eine Reihe von analytischen Restriktionsverdauen notwendig (Kapitel 2.2.2.5). Für jeweils acht gewonnene Bakterienklone pro Mutation (mOct1-C451M; mOct1-F160A; hOCT1-C450M) wurden Analysen mittels Restriktionsverdau mit *Eco*RV/*Hin*dIII durchgeführt. hOCT1-F159A-M408V lag als Plasmid vollständig validiert vor und wurde freundlicherweise von Marleen Meyer zur Verfügung gestellt. Der Verdau mit *Eco*RV/*Hin*dIII selektierte aufgrund negativer Ergebnisse bestimmte Klone aus, sodass der nächste Kontrollverdau mit einem anderen Restriktionsenzym für weniger Bakterienklon-Plasmide durchgeführt wurde. Diese Prozedur sorgte dafür, dass je Mutation letztlich etwa vier Bakterienklone zur weiteren Validierung sequenziert wurden. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Elektrophorese zur Validierung gewonnener *OCT1*-tragender Plasmide aufgeführt (Abbildung 13).

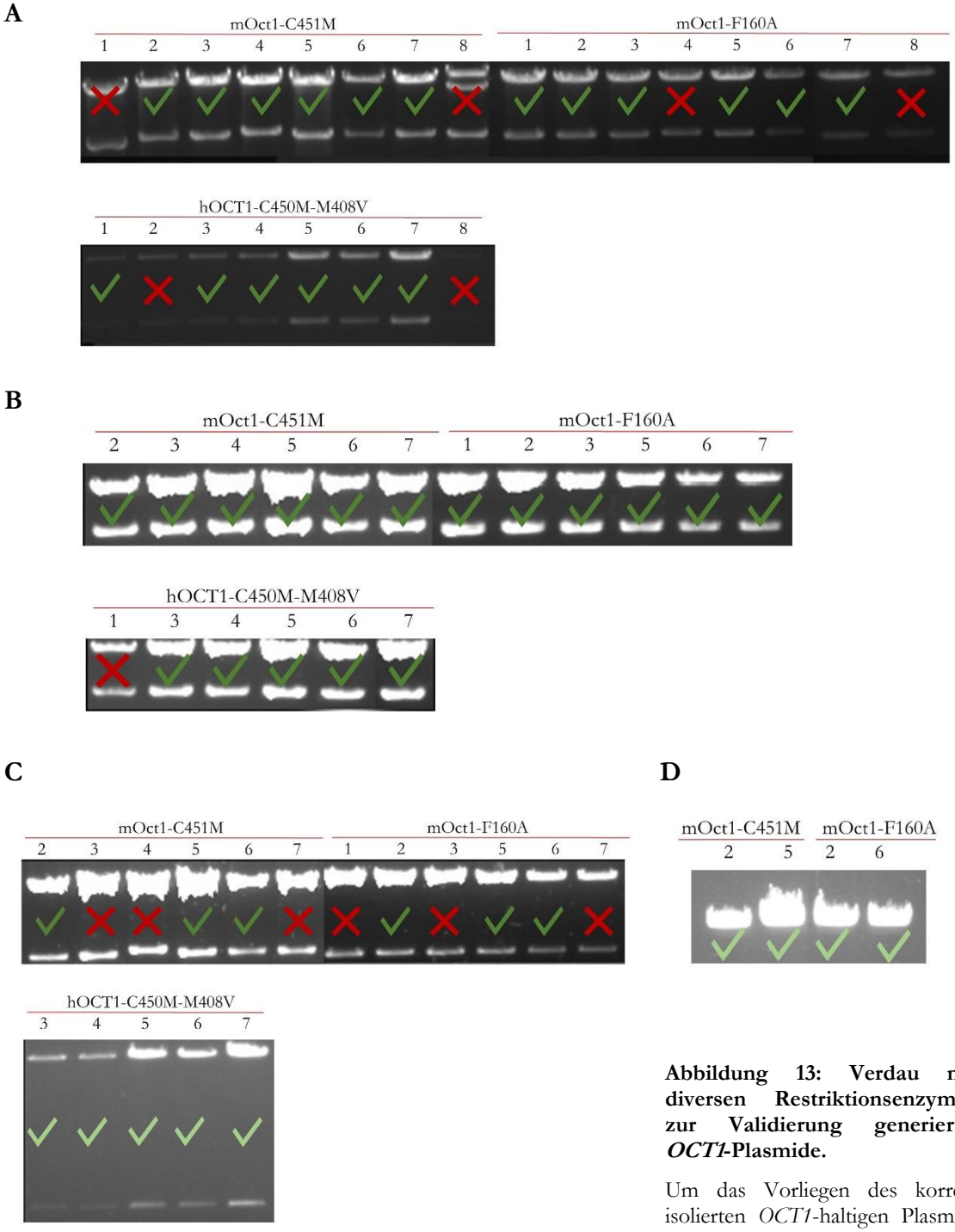


Abbildung 13: Verdau mit diversen Restriktionsenzymen zur Validierung generierter *OCT1*-Plasmide.

Um das Vorliegen des korrekt isolierten *OCT1*-haltigen Plasmids nachzuweisen, war eine Reihe von analytischen Restriktionsverdauen notwendig. **A** Verdau mit Restriktionsenzymen *Eco*RV und *Hin*dIII. Es resultierten erwartungsgemäß Fragmente mit der Länge 5019 bp und 1689 bp bei den mOct1-Plasmiden und der Länge 5017 bp und 1816 bp bei den hOCT1-Plasmiden. Die mit roten Kreuzen markierten Plasmide wurden aussortiert, wenn sie das gewünschte Ergebnis nicht zeigten. Ggf. wurden bei acht guten Ergebnissen trotzdem zwei Klone aussortiert, um die Klonmenge einzugrenzen (z. B. mOct1 F160A). **B** Verdau mit dem Restriktionsenzym *Sal*I zur weiteren Validierung verbleibender Plasmidklone. Es resultierten Fragmente mit der Länge 4520 bp und 2188 bp bei den mOct1-Plasmiden und der Länge 4643 bp und 2188 bp bei hOCT1-Plasmiden. Es folgte eine Validierung mit *Eco*RI derselben mOct1-Plasmide und aller hOCT1-Plasmide bis auf Bakterienklon 1 (C). **C** Verdau mit dem Restriktionsenzym *Eco*RI. Es ergaben sich erwartungsgemäß Fragmentlängen für mOct1 mit 1386 und 5322 bp sowie für hOCT1 879 und 5952 bp. Hier war eine optische Trennung zwischen Maus und Mensch anhand der Banden erstmals möglich. Die mit den roten Kreuzen markierten Plasmide wurden nicht weiter validiert und aussortiert. **D** Der zusätzliche Verdau mit *Pst*I wurde repräsentativ für vier ausgewählte mOct1-Plasmide durchgeführt.

Die Validierung der Plasmide erforderte eine vollständige Sequenzanalyse des *OCT1*-Gen-Inserts im pcDNA5-Vektor. Um eine lückenlose Sequenzierung zu gewährleisten, war es erforderlich verschiedene Primer zu benutzen, die in der Tabelle 11 mit der Bemerkung „Validierung Insert Plasmid" aufgeführt sind. Nach erfolgter Sequenzierung wurden letztendlich folgende Bakterienklone als positiv selektiert, sie waren in ihrer Sequenz frei von unerwünschten Mutationen und damit vollständig validiert (Tabelle 48):

Tabelle 48: **Vollständig validierte Bakterienklone.**

Mutant	Klone
mOct1-C451M	2, 5, 6
mOct1-F160A	5
hOCT1-C450M-M408V	5[1], 6[1], 7

[1]Klone mit freundlicher Unterstützung von Marleen Meyer mittels *Next Generation Sequencing* vollständig sequenziert. Diese Methode wurde angewandt, um relevante unerwünschte Mutationen im gesamten pcDNA5-Vektor außerhalb des Inserts auszuschließen. Eine zielgerichtete Mutagenese erfolgt normalerweise zunächst im sog. pcDNA3-Vektor als einen zusätzlichen Schritt, bevor das mutierte *OCT1*-Gen auf den pcDNA5-Vektor übertragen wird. Eine direkte Mutagenese im pcDNA5-Vektor ist unüblich und erforderte daher eine gesonderte Beachtung. Die Sequenzierung mittels *Next Generation Sequencing* erfolgte nur für die markierten Klone 5 und 6, da nur diese für die Aufbereitung und die stabile Transfektion verwendet wurden.

Die selektierten Klone wurden im Zuge einer Midi-Präp-Aufbereitung angereichert (Kapitel 2.2.1.7) und waren für eine stabile Transfektion ausreichend aufbereitet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde entschieden, lediglich die menschlichen Mutanten zu transfizieren. Es wurde also das Ziel verfolgt, die Effekte der Mutationen C450M-M408V (Plasmid in dieser Arbeit generiert) und F159A-M408V (Plasmid von Marleen Meyer zur Verfügung gestellt) zu untersuchen. Demnach wurde auch das bereits verfügbare F159A-M408V-Plasmid mit der Midi-Präp Methode aufbereitet. Die stabile Transfektion erfolgte zum einen mit dem Plasmid F159A-M408V, zum anderen mit dem Plasmid C450M-M408V der Bakterienklone 5 und 6. Die so generierten HEK293-Zellen überexprimierten den jeweils mutierten OCT1. Alle generierten HEK293-Zellen wurden durch Genexpressionsanalysen (Kapitel 2.2.3.3) und drei integrationsspezifische PCRs (Kapitel 2.2.2.7) validiert.

Das mRNA-Expressionslevel der *OCT1*-Mutanten wurde mittels *Real Time PCR* analysiert. Diese zeigte, dass alle verwendeten Klone eine gleichartig homogene Überexpression von OCT1 verglichen mit dem Wildtyp aufwiesen (Abbildung 14). Alle Klone, mit denen Transportexperimente durchgeführt wurden, wiesen in Genexpressionsanalysen eine

Integration des zu untersuchenden *OCT1*-Gens an der korrekten Lokalisation im HEK293-Zellgenom auf (Abbildung 15).

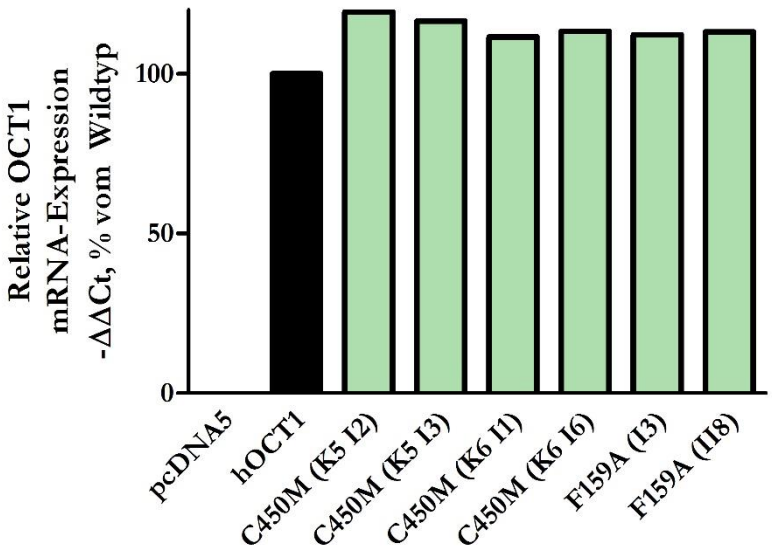
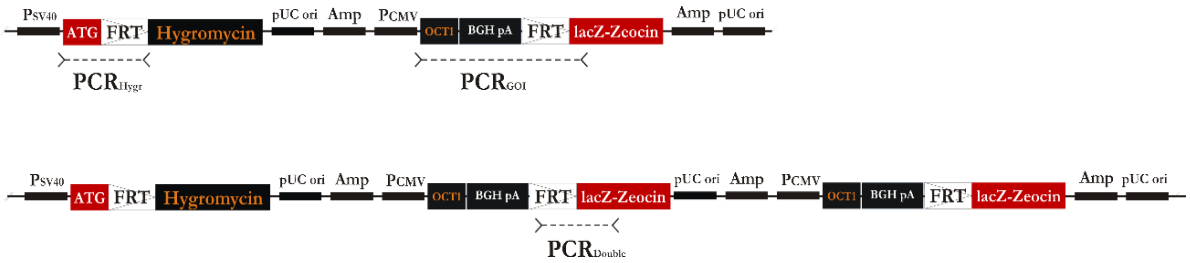


Abbildung 14: Genexpressionsanalyse von OCT1-überexprimierenden HEK293-Zellen.

Die quantitative *Real Time* PCR zeigte eine gleichartige und homogene Überexpression von *OCT1* der generierten Mutanten verglichen mit dem Wildtyp. Die in Grün dargestellten Mutanten sind solche von hOCT1. „K5“ oder „K6“ geben die Bakterienklone an, die Bezeichnung „I2“, „I3“ usw. den jeweiligen HEK293-Zellklon. Die Quantifizierung beruhte auf der ΔΔCt-Methode. TBP wurde als interner Standard verwendet. Alle Mutanten inklusive dem Wildtyp wiesen die Hintergrundmutation M408V auf.

A



B

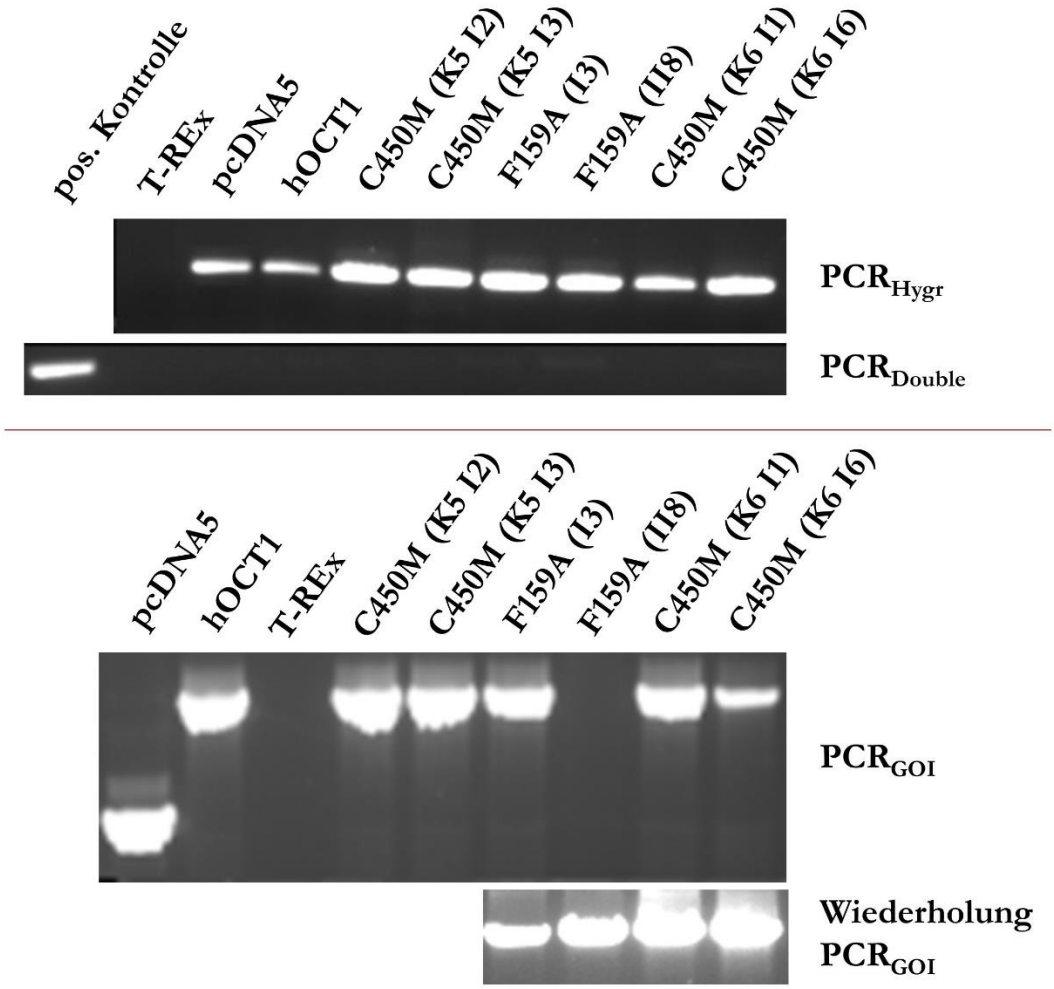


Abbildung 15: Validierung der OCT1-überexprimierenden HEK293-Zellen.

Die korrekte Integration des Expressionsvektors pcDNA5, welches das mutierte *OCT1*-Gen trug, wurde mit Hilfe von drei integrationsspezifischen PCRs nachgewiesen. **A** Schematische Darstellung der Integrationsstelle, die das *Gene of interest* enthielt. Die Stellen der Primerbindung sind skizziert. **B** PCR_{Hygr} analysierte das Vorhandensein des Hygromycin B-Resistenzgens, welches auf dem pcDNA5-Vektor kodiert war. Es resultierte ein Produkt von 519 bp Länge. PCR_{Double} resultierte nur dann in einem Produkt von 214 bp Länge, wenn der pcDNA5-Vektor mehrfach in das HEK293-Zellgenom integriert wurde. PCR_{GOI} vervielfältigte das mutierte Zielgen (mutiertes *OCT1*-Gen) und zeigte ein Produkt von 3137 bp Länge; der leere pcDNA5-Vektor resultierte in einem 1376 bp langen Produkt. Diese PCR wurde für F159A II8 wiederholt und es zeigte sich ein Vorhandensein des mutierten *OCT1*-Gens. Pos. Kontrolle: Multipler Integrand; T-REx: untransfizierte Wirtszelllinie; C450M und F159A: Mutanten von OCT1; K5 und K6: Bakterienklone; I2, I3 etc.: HEK293-Zellklone. Alle Mutanten inklusive dem Wildtyp wiesen die Hintergrundmutation M408V auf.

Tabelle 49: **Überblick einiger generierter HEK293-Klone, die mutierte *hOCT1*-Gene überexprimierten und die Ergebnisse der Validierung.**

Die in grüner Farbe hinterlegten HEK293-Zellklone wurden für die funktionellen Analysen verwendet.

Mutant	Klon	Morph. Beurteilung	PCR_{Hygr}	PCR_{Double}	PCR_{GOI}	mRNA Expression
C450M-M408V K5	I2	+	+	-	+	+
	I3	+	+	-	+	+
	I4	o	+	-	n. a.	n. a.
	I5	+	+	+	n. a.	n. a.
	I7	+	+	-	n. a.	n. a.
	I10	o	+	-	n. a.	n. a.
	I12	++	+	-	n. a.	-
C450M-M408V K6	I1	++	+	-	+	+
	I3	+	+	+	n. a.	n. a.
	I6	+	+	-	+	+
	I10	+	+	+	n. a.	n. a.
	II2	+	+	-	n. a.	+
	II4	+	+	-	n. a.	n. a.
	II11	+	+	-	n. a.	n. a.
F159A-M408V	I1	+	+	-	n. a.	-
	I3	++	+	-	+	+
	I4	o	+	+	n. a.	n. a.
	I5	o	+	+	n. a.	n. a.
	I6	+	+	-	n. a.	n. a.
	II8	+	+	-	+	+
	II10	++	+	-	n. a.	n. a.

Die Zellmorphologie der generierten Klone wurde mikroskopisch beurteilt, indem mit der untransfizierten T-REx™293-Zelllinie verglichen wurde: angemessen (o), gut (+) und sehr gut (++). Die erwarteten Fragmentlängen nach den Validierungs-PCRs wurden mit + markiert. PCR_{Double} sollte negativ verlaufen (-), da ein Produkt nur resultierte, wenn der Vektor mehrfach integriert wurde. Die relative mRNA-Expression wurde mit Hilfe der ΔΔCt-Quantifizerungsmethode nach *Real Time* PCR ermittelt. Die grün markierten Klone wurden erfolgreich validiert und wiesen weniger als 20 % Abweichung von der Wildtypexpression auf (+). Nicht alle generierten Klone sind tabellarisch gelistet und nicht für alle Klone wurden alle Validierungsschritte durchgeführt. Wies ein Klon eine Mehrfachintegration in PCR_{Double} auf (z. B. C450M K5 I5), wurden diese sofort aussortiert. n. a.: nicht analysiert.

Tabelle 49 fasst die Ergebnisse der Validierungs-PCR und der mRNA-Expressionsanalyse sowie die morphologische Beurteilung der einzelnen HEK293-Zellklone zusammen.

Um sicherzustellen, dass die ausgewählten Klone die zu untersuchenden Mutationen trugen, wurde das chromosomal-integrierte *OCT1*-Gen amplifiziert (Abbildung 15; PCR_{GOI}) und die Stelle der Mutationen mittels Kapillarsequenzierung validiert. Hierzu wurden die generierten C450M-Mutanten auf die gewünschte Mutation hin untersucht. Ebenfalls wurden die F159A-Mutanten auf die korrekte Mutation untersucht und zudem auf Abwesenheit der C450M-Mutation geprüft. Dies galt als letzter Validierungsschritt, um eine eindeutige Trennung der ursprünglich gemeinsam gemessenen Mutationen F159A-C450M in hOCT1 zu garantieren (Abbildung 16).

A

```
Wildtypreferenz   TGGCCGAATGGGAATCACCATTGCAATACAAATGATCTGCCTGGTGAATGCTGAG
C450M-Referenz    TGGCCGAATGGGAATCACCATTGCAATACAAATGATCATGCTGGTGAATGCTGAG
F159A-Referenz    TGGCCGAATGGGAATCACCATTGCAATACAAATGATCTGCCTGGTGAATGCTGAG
C450M K6 I6       TGGCCGAATGGGAATCACCATTGCAATACAAATGATCATGCTGGTGAATGCTGAG
C450M K6 I1       TGGCCGAATGGGAATCACCATTGCAATACAAATGATCATGCTGGTGAATGCTGAG
C450M K5 I2       TGGCCGAATGGGAATCACCATTGCAATACAAATGATCATGCTGGTGAATGCTGAG
C450M K5 I3       TGGCCGAATGGGAATCACCATTGCAATACAAATGATCATGCTGGTGAATGCTGAG
                                                       Codon 450
                                                       ATG: M
                                                       TGC: C
```

B

```
Wildtypreferenz   CTGGA*AG*CTGGACCTCTTTCAGTCCTGTTTGAATGCGGGCTTCTTGTTTGGCT
C450M-Referenz    CTGGA*AG*CTGGACCTCTTTCAGTCCTGTTTGAATGCGGGCTTCTTGTTTGGCT
F159A-Referenz    CTGGA*AG*CTGGACCTCTTTCAGTCCTGTTTGAATGCGGGCGCCTTCTTTGGCT
F159A I3          CTGGA*AG*CTGGACCTCTTTCAGTCCTGTTTGAATGCGGGCGCCTTCTTTGGCT
F159A II8         CTGGA*AG*CTGGACCTCTTTCAGTCCTGTTTGAATGCGGGCGCCTTCTTTGGCT
                                                       Codon 159
                                                       GCC: A
                                                       TTC: F
```

C

```
Wildtypreferenz   GAATGGGAATCACCATTGCAATACAAATGATCTGCCTGGTGAATGCTGAGCTGTA
C450M-Referenz    GAATGGGAATCACCATTGCAATACAAATGATCATGCTGGTGAATGCTGAGCTGTA
F159A-Referenz    GAATGGGAATCACCATTGCAATACAAATGATCTGCCTGGTGAATGCTGAGCTGTA
F159A I3          GAATGGGAATCACCATTGCAATACAAATGATCTGCCTGGTGAATGCTGAGCTGTA
F159A II8         GAATGGGAATCACCATTGCAATACAAATGATCTGCCTGGTGAATGCTGAGCTGTA
                                                  Codon 450
                                                  ATG: M
                                                  TGC: C
```

Abbildung 16: Nachweis gewünschter Mutationen in den generierten HEK293-Zelllinien mittels Kapillarsequenzierung.

Um sicherzustellen, dass die ausgewählten Klone die zu untersuchenden Mutationen tragen, wurden die Stellen der Mutationen mittels Kapillarsequenzierung nach Sanger analysiert. Dargestellt ist der digitalisierte ermittelte Basencode. Die Referenzen sind rot hinterlegt. **A** Alle C450M-Klone tragen nachweislich die Mutation, erkennbar am neuen Codon ATG an Stelle 450. **B** Alle F159A-Klone tragen nachweislich die Mutation, erkennbar am Codon GCC an Stelle 159. An Position 160 ist im F159A-Mutanten ebenfalls anderes Codon zu sehen (TTC statt TTG). Hierbei handelt es sich um einen *Single Nucleotide* Polymorphismus, dieser ist für die Analysen ohne Effekt und daher vernachlässigbar. **C** Keines der F159A-Klone trägt die ursprüngliche Hintergrundmutation C450M (Verbleib des Codons TGC an Stelle 450). Für alle dargestellten Klone inklusive dem Wildtyp gilt das Vorhandensein der Mutation M408V. Die Grafik wurde mit Hilfe der Clone Manager 6 Software erstellt.

3.3.2 Vergleich der Auswirkungen von F159A und C450M auf die Transportaktivität von hOCT1

Um zu verstehen, welche Aminosäuremutation den starken Anstieg von V_{max} und K_M im Mutanten hOCT1-F159A-C450M bewirkte (Kapitel 3.2.4), wurden wie in den Experimenten

zuvor (Kapitel 3.2) konzentrationsabhängige Transportexperimente durchgeführt. Die neu generierten Klone mit den Einzelmutationen F159A oder C450M wurden auf deren Transport von Fenoterol und Sumatriptan getestet. Es wurde die konzentrationsabhängige Aufnahme der beiden Substrate gemessen (Abbildung 17; A und B) und zudem K_M- und V_{max}-Werte berechnet (Tabelle 50).

Für beide Substrate wurde deutlich, dass der Haupteffekt für die Steigerung von V_{max} und K_M auf die Mutation F159A zurückzuführen ist. Beide untersuchten Bakterienklone des Mutanten C450M verhielten sich identisch und unterschieden sich nicht vom Transportverhalten des Wildtyps. Zwar sind die Absolutwerte des Wildtyps für K_M und V_{max} verglichen mit den Experimenten zu den ursprünglich untersuchten Mutanten (Tabelle 46) teilweise diskrepant, die Tendenz zeigt aber deutlich den starken Effekt der Mutation F159A. C450M hingegen zeigte ein nahezu gleichförmiges Transportverhalten. Besagte minimale Unterschiede zu den vorigen Wildtyp-Werten sind wahrscheinlich artefaktbedingt, da Transportexperimente trotz aller Standardisierung und Genauigkeit oft von vielen unbeeinflussbaren Faktoren abhängen.

Zusätzlich zeigte die vergleichende Untersuchung von den Mutanten C450M K5 und K6, dass die Verwendung verschiedener Bakterienklone mit gleicher Mutation keine wesentliche Veränderung der Transportparameter zeigt (Abbildung 18). Aus diesem Grund stellt die Kurve für C450M in Abbildung 17 einen Mittelwert der beiden Bakterienklone dar.

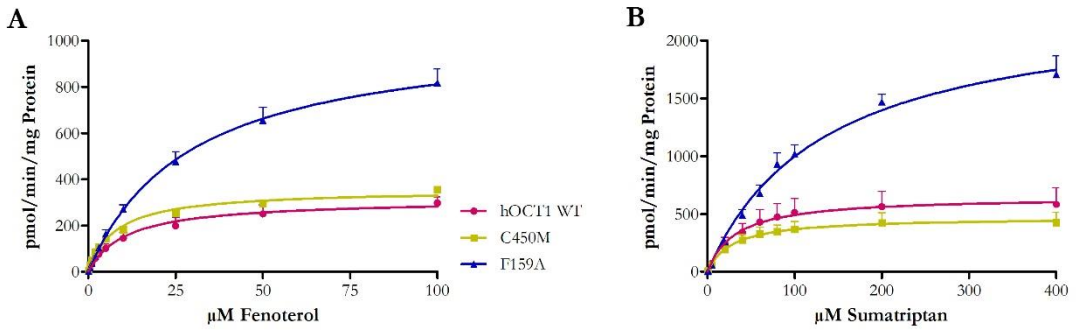


Abbildung 17: Effekte der Mutationen F159A und C450M auf den Transport von Fenoterol und Sumatriptan.

Stabil transfizierte HEK293-Zellen, die den *hOCT1*-Wildtyp und die Mutanten F159A und C450M überexprimierten, wurden zwei Minuten lang mit aufsteigenden Konzentrationen von Fenoterol (**A**) und Sumatriptan (**B**) inkubiert. Die OCT1-vermittelte Aufnahme wurde berechnet, indem die gemessene Substrataufnahme der Negativkontrolle (pcDNA5-Vektor) von der gemessenen Aufnahme der OCT1-überexprimierenden Zellen subtrahiert wurde. Abgebildet sind die Mittelwerte und der Standardfehler von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Tabelle 50: **K_M- und V_{max}- Werte hOCT1 Wildtyp und transfizierte Mutanten nach Substraten.**

		Fenoterol	Sumatriptan
K_M [µM]	Wildtyp	10,4 (± 3,8)	27,3 (± 0,9)
	F159A	21,4* (± 1,1)	117,0*** (± 7,5)
	C450M	5,8 (± 0,9)	24,5 (± 2,2)
V_{max} [pmol/min/ mg Protein]	Wildtyp	318,3 (± 25,8)	652,5 (± 162,1)
	F159A	1046,4*** (± 76,2)	2298,3*** (± 195,3)
	C450M	359,9 (± 7,6)	475,7 (± 96,3)

* = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001 Signifikanzniveau in der ANOVA mit Tukey's Post-Hoc-Analyse: Unterscheidung bezüglich hOCT1.

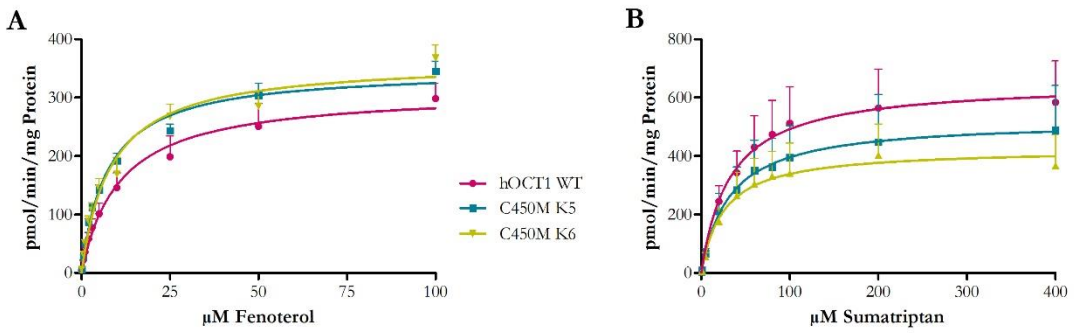


Abbildung 18: Vergleich der C450M-Bakterienklone K5 und K6.

A und **B** zeigen die beiden Bakterienklone 5 und 6 im Transportverhalten verglichen miteinander und mit dem hOCT1-Wildtyp als Referenz. Sie unterscheiden sich nicht voneinander, daher wurde aus beiden Klonen ein Mittelwert repräsentativ für C450M gebildet (Abbildung 17).

3.4 Bedeutung des *Unstirred Water Layer* für die beobachteten Effekte der Mutationen auf den K_M-Wert

In diesem Abschnitt soll das Phänomen des sogenannten *Unstirred Water Layer* näher betrachtet werden. Als *Unstirred Water Layer* bezeichnet man eine etwa 1500 µm dicke Flüssigkeitsschicht oberhalb der adhärenten HEK293-Zellen, in welcher die Konzentration der zu messenden Substrate binnen weniger Sekunden durch die Transportaktivität der OCT1 abnimmt (Shibayama et al. 2015). Dieser Konzentrationsabfall kann durch eine Diffusion aus entfernteren oberen Schichten binnen zwei Minuten (Dauer des Transportexperimentes) nicht ausgeglichen werden. Dadurch steht den Transportern schon

nach kurzer Zeit weniger Substrat zur Verfügung als direkt zu Beginn der Inkubation. Aufgrund dieses Artefaktes während des Experimentes wäre zu vermuten, dass die dadurch ermittelten Transportparameter (insbesondere K_M) verfälscht würden. Das hieße konkret: man ermittelt K_M falsch zu hoch, schätzt die Affinität also zu gering. Der Grund ist, dass die tatsächliche Konzentration direkt im Bereich der adhärenten Zellen nach kurzer Zeit faktisch geringer ist als die Konzentration, in der man das Substrat auf die Zellen gegeben hat.

Um diesen erwiesenen Effekt in der Ermittlung von K_M und V_{max} zu berücksichtigen wurde eine Formel aufgestellt. Diese ermöglicht es anhand des apparenten K_M-Wertes und des apparenten V_{max}-Wertes einen korrigierten reellen K_M-Wert zu ermitteln. Der Bias durch den *Unstirred Water Layer* in der Ermittlung von K_M würde dadurch eliminiert. In dieser Arbeit wurden alle K_M-Angaben in dieser korrigierten Form wiedergegeben. Die Umrechnung des gemessenen K_M-Wertes in den korrigierten erfolgte nach folgender Formel (Shibayama et al. 2015):

$$\mathrm{K}_M app = K_M real + \frac{V_{max}\delta}{2D}$$

K_M app = Gemessener K_M [µM]

K_M real = Korrigierter K_M nach Theorie des *Unstirred Water Layer* [µM]

V_{max} = Gemessene maximale Transportkapazität

δ = Dicke des Unstirred Water Layer = 1500 µm (Korjamo et al. 2009)

D = Diffusionskoeffizient der Substanz. Es wurde näherungsweise angenommen, dass der Diffusionskoeffizient der hier analysierten Substanzen ähnlich dem Koeffizienten für Glukose ist ($D = 6*10^{-6}$ cm²/sec; Avdeef et al. 2004).

Konkret für die Zwecke dieser Arbeit ließ sich die Formel wie folgt umstellen und auflösen:

$$K_M real = K_M app - \frac{V_{max} * \delta * F}{\mathrm{T}}$$

K_M app = Gemessener K_M [µM]

K_M real = Korrigierter K_M nach Theorie des *Unstirred Water Layer* [µM]

V_{max} = Gemessene maximale Transportkapazität [pmol/min/mg Protein]

δ = 0,15 cm

F = Umrechnungsfaktor für V_{max} -> mg/cm² = 0,035 mg/cm²

T = Zusammengefasster Umrechnungsfaktor, bestehend aus 2*D (= Diffusionskoeffizient der Substanz ~ Glukose Koeffizient = $6*10^{-6}$ cm²/sec) und Faktoren zum Umrechnen von Einheiten (z. B. V_{max} [pmol/min/mg Protein] in µmol/min/mg Protein und D [cm²/sec] in cm²/min) = 0,72

Die Effekte des *Unstirred Water Layer* zeigten eine nur sehr begrenzte Auswirkung auf die beobachteten Ergebnisse der untersuchten Mutationen. In Abbildung 19 ist die Veränderung im K_M-Wert durch die Korrekturformel exemplarisch am Substrat Fenoterol dargestellt. Die Anwendung führt im Falle einer starken Auswirkung zu einer Halbierung des Wertes. Für die Grundaussage darüber, welche Veränderungen die einzelnen Mutationen auf die Affinität des Transporters zu den Substraten herbeiführen, hat die Formel jedoch keine Auswirkung. Die Erhöhung des K_M-Wertes bei dem Mutanten F159A-C450M beispielsweise ist so stark, dass es für diese Arbeit keinen Unterschied macht, ob diese Erhöhung 12- oder 13-fach ist. Daher wurden in dieser Arbeit stets die mit der Formel korrigierten K_M-Werte angegeben. Aus Gründen der Vollständigkeit wurde diese Korrektur hier trotzdem erläutert.

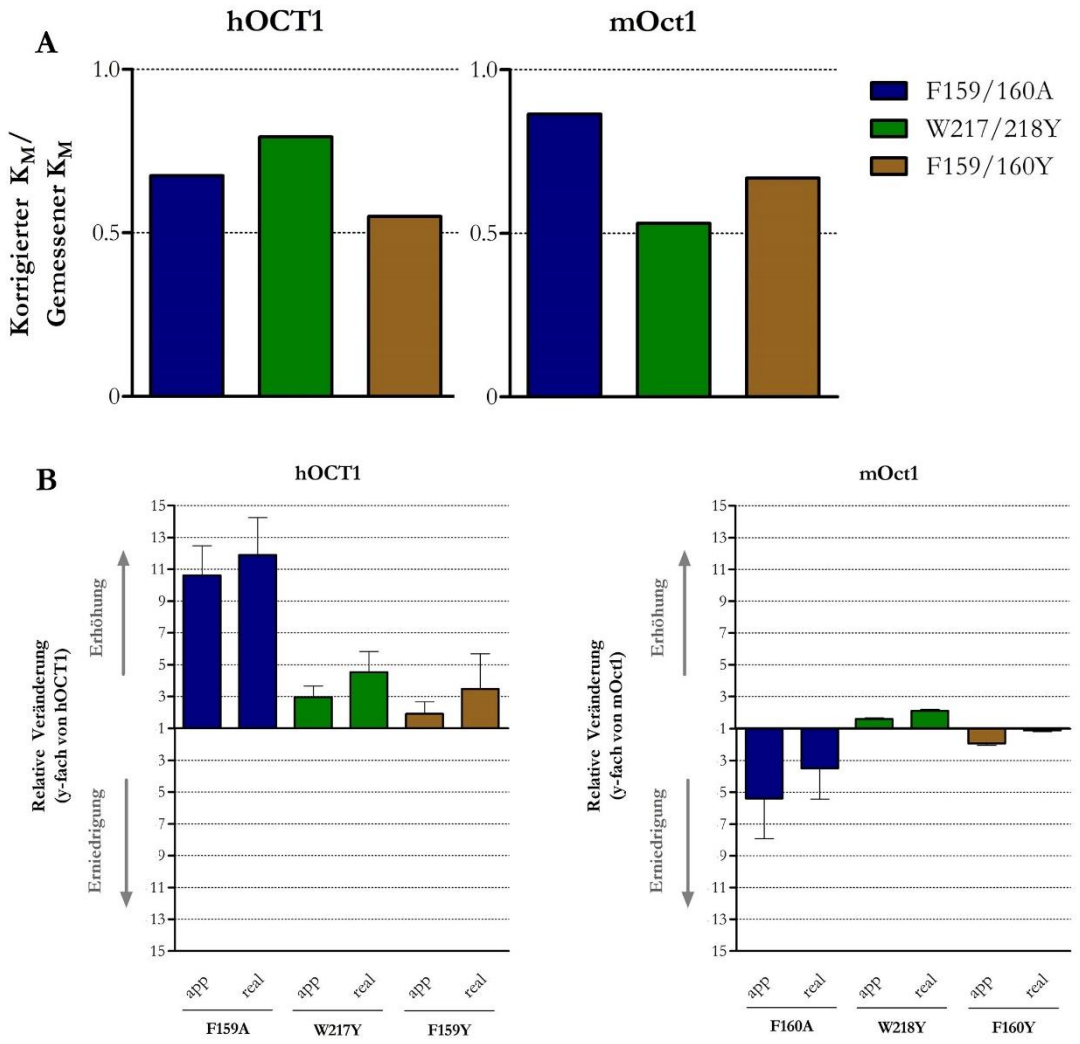


Abbildung 19: Auswirkungen der Formel zur Elimination des *Unstirred Water Layer*-Fehlers am Beispiel von Fenoterol.

Die Formel zur Elimination des Messfehlers aufgrund des *Unstirred Water Layer* führt zu Veränderungen in den K_M-Werten. Das Verhältnis vom korrigierten K_M zum gemessenen K_M ist in **A** dargestellt. Die Umrechnung führt höchstens zu einer Halbierung des K_M. **B** zeigt die Veränderung des K_M der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. Der Mutant F159/160A bezeichnet hier den mit der Hintergrundmutation C450/451M. app: gemessener K_M; real: korrigierter K_M

4 Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind in vielerlei Hinsicht interessant und werfen diverse Fragen auf, die man zur weiteren Klärung der Struktur-Funktions-Beziehung diskutieren kann. Vor allem die Ergebnisse aus Kapitel 3.1, die Ähnlichkeiten zwischen Ratte und Mensch zeigen, welche sich stark von der Maus unterscheiden, eröffnen möglicherweise ein neues Feld bedeutender Aminosäuren, die man im näheren Studium der Transporterfunktion als wesentliche Unterscheidungsmerkmale zwischen den Spezies betrachten sollte.

Die wichtigen Aminosäuren in rOct1 entpuppten sich teilweise auch in mOct1 und hOCT1 als Schlüsselaminosäuren bzgl. Substratbindung und Translokation, insbesondere F159/160 und D474/475, weniger W217/218. Gerade hier zeigte sich der wesentliche Unterschied, dass Effekte von Mutationen dieser Aminosäuren zwar vorhanden waren, sich aber zwischen Maus und Mensch stark unterschieden haben.

Im Folgenden wird auf die Ergebnisse und deren potenzielles Zustandekommen näher eingegangen. Kapitel 4.1 diskutiert mögliche Gründe für die Ähnlichkeit in der Transportcharakteristik von Mensch und Ratte, Kapitel 4.2 geht auf die Rolle der rOct1-Schlüsselaminosäuren in Maus und Mensch ein und die Kapitel 4.3 und 4.4 beschäftigen sich jeweils mit den zugrunde liegenden Mechanismen der eindrucksvollen Effekte von D474/475 und F159/160 im Einzelnen.

4.1 Funktionelle Ähnlichkeit von rOct1 und hOCT1 im Transport des Substrates Ranitidin – eine Ausnahme unter vielen Substraten

Ranitidin zeigte als Substrat für die drei Spezies Ratte, Maus und Mensch unterschiedlich hohe V_{max}-Werte. Dabei unterschied sich mOct1 signifikant von rOct1 und hOCT1, die trotz ihrer strukturellen Unterschiede (nur 77% übereinstimmende Aminosäuren zwischen rOct1 und hOCT1) einen nahezu identischen Transport von Ranitidin zeigten (Kapitel 3.1). Im Gegensatz dazu beträgt die Strukturhomologie zwischen rOct1 und mOct1 97 % (Abbildung 20), dennoch unterscheiden sich V_{max} und K_M zwischen Maus und Ratte um das Doppelte. Diese Beobachtung ist nach aktuellen Kenntnissen einmalig, denn bei den bisher untersuchten Substraten unterschied sich auch in dieser Arbeit hOCT1 von mOct1 (Tabelle 46 und Tabelle 47; „Wildtyp“) und rOct1. Maus und Ratte zeigten zuvor aber einen nahezu identischen Transport (Meyer 2016).

rOct1 und hOCT1 weisen offensichtlich ähnliche Raten im Transport von Ranitidin auf, die sich von mOct1 unterscheiden. Diese Unterschiede sind jedoch nicht durch Unterschiede in der Expression des OCT1 an der Zellmembran bedingt. Untersuchungen an den gleichen Zellen mit anderen Substraten, z. B. Fenoterol, TEA^+ und MPP^+, zeigten erwartete Unterschiede zwischen mOct1 und hOCT1, wohingegen sich der Transport von rOct1 an den der Maus annäherte (Meyer 2016).

Aus diesem Grund müssen die Unterschiede in den Transportraten durch Unterschiede in der Proteinstruktur bedingt sein. Daher liegt es nahe, nach identischen Aminosäuren bei rOct1 und hOCT1 zu suchen, die sich jedoch von mOct1 unterscheiden. Es gibt insgesamt elf Aminosäuren, die bei rOct1 und hOCT1 identisch sind, sich aber von mOct1 unterscheiden (Abbildung 20): vier Aminosäuren des extrazellulären Loops zwischen TMD 1 und 2, drei Aminosäuren des intrazellulären Loops zwischen TMD 6 und 7 sowie jeweils eine Aminosäure in TMD 3 und 5. Darüber hinaus gehören dazu jeweils eine Aminosäure am Anfang und am Ende der Peptidkette.

Der Grund für den beobachteten Effekt liegt aller Wahrscheinlichkeit nach in genau diesen Aminosäuren. Besonders TMD 3 ist an der Ausbildung der nach außen geöffneten Bindetasche beteiligt (Ciarimboli 2008; Egenberger et al. 2012) und daher könnte L189 in mOct1 bzw. V188/V189 in hOCT1/rOct1 für den Effekt mitverantwortlich sein.

Die Beobachtung, dass mOct1 Ranitidin besser transportiert als rOct1 und hOCT1, liegt zudem möglicherweise in der geringeren Affinität (und damit im höherem K_M-Wert) von

mOct1 zu Ranitidin begründet. Substrate von OCT1, die eine hohe Affinität zum Transporter haben, neigen zu einer geringeren maximalen Transportgeschwindigkeit V_{max} (Severance et al. 2017). Die Erklärung dafür ist die stärkere Bindung des Substrates und die daraus resultierende erschwerte Abgabe des Substrates nach intrazellulär.

Nach dieser Theorie läge einer der wichtigen Bindungspartner für Ranitidin bei einer der elf Aminosäuren, die bei mOct1 einen polaren Rest (geringe Affinität zu Ranitidin) und bei hOCT1 und rOct1 einen unpolaren Rest hat (hohe Affinität zu Ranitidin). Diese Theorie gilt allerdings nur, wenn Ranitidin mit seinem organischen Anteil an die gesuchte Aminosäure bindet. An Position 79 befindet sich in mOct1 ein polares Serin, wohingegen rOct1 und hOCT1 ein unpolares Prolin aufweisen.

Allerdings kommt S79/P79 für die Bindung von Ranitidin wahrscheinlich nicht in Frage, da nichts über die Beteiligung der extrazellulären Peptidkette an Substratbindung bekannt ist. Proline als Aminosäurerest können jedoch alpha-Helices brechen (Nilsson et al. 1998). Es ist in Erwägung zu ziehen, dass im Falle von hOCT1 und rOct1 die Insertion eines Prolins auch im Bereich der extrazellulären Peptidkette die Auflösung einer alpha-Helix bedingt.

Ähnliche Argumente könnten für S120 in mOct1 gelten, welches in hOCT1/rOct1 die Aminosäure G119/120 darstellt, denn auch hier stützen die Polaritätsverhältnisse die Beobachtungen des Experimentes. Bekannt ist jedoch, dass beim Transport von Ranitidin der organische Rest von F159 zumindest bei hOCT1 eine wesentliche Rolle zu spielen scheint (Kapitel 3.2.4). Ranitidin bindet also auch in hOCT1 mit seinem organischen Rest an die wichtige Aminosäure von rOct1 (Volk et al. 2009). Deshalb ist die Vermutung mit den Polaritätsverhältnissen eher unwahrscheinlich, aber möglich.

Da Ranitidin auch polare Anteile in seiner Struktur enthält, ist der geschilderte Mechanismus auch andersherum möglich. Demnach läge einer der wichtigen Bindungspartner für Ranitidin bei einer der elf Aminosäuren, die bei mOct1 einen unpolaren Rest (geringe Affinität zu Ranitidin) und bei hOCT1 und rOct1 einen polaren Rest hat (hohe Affinität zu Ranitidin). Diese Theorie gilt dann, wenn Ranitidin mit seinem anorganischen, polaren Anteil an die gesuchte Aminosäure bindet. P554 (Prolin) in mOct1 wäre ein solcher unpolarer Bindungspartner, der in rOct1 und hOCT1 durch S554/552 (Serin) vertreten ist. Es ist jedoch sehr unwahrscheinlich, dass der intrazelluläre Carboxy-Terminus eine so wichtige Rolle bei der Bindung von Ranitidin spielt, zumal eine Beteiligung dieses Peptidbereiches in keiner bisherigen Abfassung über OCT1 behandelt wurde. Ein weiterer unpolarer Partner zur Bindung von Ranitidin könnte R329 (Arginin) sein, der als L328/329 (Lysin) in hOCT1 bzw. rOct1 einen polaren Partner bildet.

Die Beispiele von insgesamt elf Aminosäuren erlauben einen gedanklichen Ansatz für weitere Experimente. In diesen Experimenten könnte man gezielt die genannten Aminosäuren in mOct1 zu den Aminosäuren mutieren, die in rOct1 bzw. hOCT1 vertreten sind. Ist eine dieser Aminosäuren für Bindung und Transport von Ranitidin mitverantwortlich, so werden sich die Charakteristika der Kinetik vermutlich an rOct1 und hOCT1 angleichen.

Eine interessante und wichtige Beobachtung in diesem Teil der Arbeit ist die Tatsache, dass offensichtlich nur Ranitidin die funktionelle Diskrepanz zwischen mOct1 einerseits und hOCT1 und rOct1 andererseits offenlegt. Es handelt sich hierbei also anscheinend um einen substratspezifischen Effekt. Ähnlich wie die Verschiedenheit der Struktur von OCT1 zwischen Maus und Mensch/Ratte unterschiedliche Transportraten bedingen kann, kann auch die Struktur von Ranitidin selbst diese Unterschiede verursachen.

Die Beobachtung in dieser Arbeit lässt sich möglicherweise durch die Größe der Ringstrukturen im Molekül begründen. Betrachten wir Ranitidin genauer, so ist im Molekül als einzige Ringstruktur ein Fünfring (Furan) auszumachen. Die bisher untersuchten Substrate zur Charakterisierung der drei Wildtypen (Meyer 2016) zeigten bis auf wenige Ausnahmen einen Sechsring. Bei den Ausnahmen handelt es sich beispielsweise um Metformin, welches gar keine organische Ringstruktur aufweist. Die Ergebnisse in entsprechender Arbeit zeigen für dieses Substrat ebenfalls keine signifikante Unterscheidung von Maus oder Ratte zum Menschen, wie sie die Struktur suggerieren würde und wie sie für andere Substrate gezeigt wurde. Weitere Untersuchungen von Substraten mit unterschiedlicher Ringgröße im Molekül könnte einen Einfluss dieser möglicherweise aufklären.

Insgesamt ist also die strukturelle Homogenität von rOct1 und mOct1 nicht immer ausschlaggebend für die beobachtete Transportfunktion. Es scheint, als können einzelne Aminosäureunterschiede oder Strukturunterschiede in Substraten einen sehr hohen Einfluss auf die Transportkinetik haben. Diese These wurde anhand von Mutanten von hOCT1 und mOct1 in dieser Arbeit untersucht und für die Aminosäuren D474/475 und F159/160 bestätigt. Genauere Aussagen zum Transport von Ranitidin lassen sich mit den Ergebnissen aus Kapitel 3.1 noch nicht herausarbeiten.

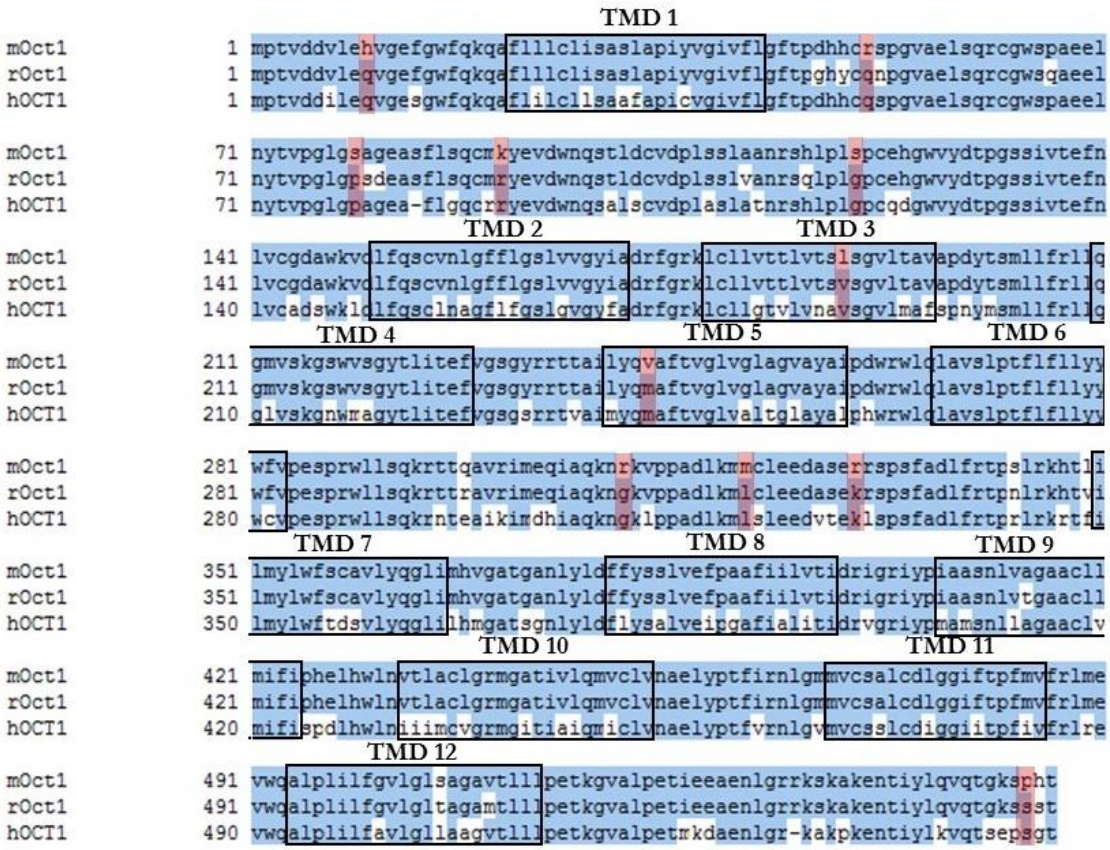


Abbildung 20: Primärstruktur von mOct1, rOct1 und hOCT1.

Schematisch abgebildet ist die Primärstruktur von mOct1, rOct1 und mOct1 im Format des gebräuchlichen Buchstabencodes für Aminosäuren. Dabei sind strukturanaloge Aminosäuren untereinander angeordnet. Blau markiert sind die Aminosäuren, die mehrheitlich übereinstimmen. Unmarkierte Aminosäuren unterscheiden sich von diesen. Rot hinterlegt sind jene elf Aminosäuren, welche sich bei rOct1 und hOCT1 gleichen, aber von mOct1 unterscheiden. Mit schwarzen Kästen markiert sind die zwölf Transmembrandomänen (TMD 1 bis 12). Die Grafik wurde mit Hilfe des BLOSUM62-Algorithmus der Clone Manager 6 Software erstellt.

4.2 Die Rolle der in rOct1 ermittelten Schlüsselaminosäuren für Substratbindung und -translokation in mOct1 und hOCT1

Mutationen analoger Aminosäuren in den Transportern der Spezies Mensch und Maus zeigten grundsätzlich unterschiedliche Veränderungen im Transportverhalten. Ein wesentliches Ziel dieses Projektes war der Vergleich des Transportverhaltens der Substrate Ranitidin, Fenoterol, Sumatriptan, TEA^+ und MPP^+ der beiden Spezies zueinander. Während Effekte der Mutationen in hOCT1 substratunspezifisch den Transport aller fünf Substrate in gleicher Art und Weise beeinflussten (Kapitel 3.2.1; Tabelle 46; D474N und F159A-C450M), zeigten Veränderungen der Aminosäuren in mOct1 substratspezifischere Effekte (Kapitel 3.2.2; Tabelle 47; D475N für TEA^+ und MPP^+). Besonders wenn ein Effekt

durch eine Mutation deutlich wurde, konnte interspezifisch keine Ähnlichkeit festgestellt werden. F159/160A zeigte gegensätzliche Effekte: bei hOCT1 eine Erhöhung der Transportkapazität im extremen Fall bis auf das 9-fache, bei mOct1 im extremen Fall eine Verringerung der Transportkapazität um das 11-fache. D474/475N bewirkte einen Verlust eines sättigbaren Transportes für nahezu alle Substrate, jedoch nicht für die radioaktiv gemessenen Substrate bei mOct1. Andererseits bewirkten die Mutationen W217/218Y keine wesentlichen Effekte. Dies galt für beide untersuchten Spezies.

Diese Ergebnisse bestätigen wesentliche Grundaussagen voriger Arbeiten (Meyer 2016), dass eine Übertragbarkeit der Ergebnisse am Tiermodell auf den OCT1 in Menschen nicht angebracht ist. Alles in allem scheint der Transport von Substraten über OCT1 ein Mechanismus zu sein, der von vielen Faktoren abhängt, die sich bei Maus und Mensch wesentlich unterscheiden.

Die geschilderten Unterschiede der Effekte bei Maus und Mensch implizieren, dass ebenfalls eine unmittelbare Übertragbarkeit der Ergebnisse an rOct1 für die Aminosäuren F160 (Volk et al. 2009) und W218 (Popp et al. 2005) auf hOCT1 sowie Rückschlüsse auf die klinische Relevanz nicht möglich sind. Die Veränderung von D475 in rOct1 bewirkte in entsprechenden Arbeiten (Gorboulev et al. 1999) eine signifikante Reduktion des Transportes verschiedener Substrate, jedoch auch nicht in dem Ausmaße der vorliegenden Arbeit.

Aufgrund der Relevanz des Transporters im Rahmen der Elimination von Pharmaka stellt sich daher Frage, ob einige Behauptungen zur Wichtigkeit der Aminosäuren in rOct1 für hOCT1 oder mOct1 bestätigt werden konnten. Im Folgenden werden die Ergebnisse durch die W217/218Y-Mutation diskutiert. Auf die Effekte der Mutation der Aminosäuren D474/475 (Kapitel 4.3) und F159/160 (Kapitel 4.4) und die möglicherweise zugrunde liegenden Mechanismen wird aufgrund ihrer eindrücklichen Ergebnisse gesondert eingegangen.

Interessanterweise unterscheidet sich der Transport des W217/218Y-Mutanten in dieser Arbeit nur in einem Fall signifikant vom Wildtyp (Tabelle 47; V_{max}; W218Y; Sumatriptan). In einer Arbeit von 2005 wurden mehrere Aminosäuren in der TMD 4 untersucht, um eine Relevanz der Aminosäuren für Substratbindung und -transport festzustellen. W217 spielt in hOCT1 eine Rolle in der polaren Bindung von Substraten (Chen EC et al. 2017). Zu W218 in rOct1 zeigte man, dass die K_M-Werte bei der Aufnahme von TEA^+ und MPP^+ verringerten, sobald Tryptophan durch verschiedene Aminosäuren ersetzt wurde (Popp et al. 2005). Besonders der Austausch durch Tyrosin (Y) zeigte diesen Effekt. Man vermutete,

dass die Hydroxylgruppe eine affinere Bindung zu den organischen Kationen ermöglicht. Gleichzeitig wurde die Transportkapazität in den meisten Fällen, vor allem aber durch W218Y verringert. Dieser Effekt war bei TEA^+ stärker als bei MPP^+. Trotzdem wurde die Relevanz von W218 sowohl für TEA^+ als auch MPP^+ durch rOct1 durch entsprechende Messungen postuliert.

Für hOCT1 und mOct1 kann die Hypothese der Affinitätserhöhung nicht bestätigt werden, da TEA^+ und MPP^+ überwiegend mit geringerer Affinität gebunden wurden. Zwar wurden Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp festgestellt – in Einzelmessungen zeigte sich teilweise ein geringerer K_M-Wert – diese sind aber in nahezu allen Fällen statistisch nicht signifikant. Auch der stärkere Effekt von W217Y auf TEA^+ konnte in dieser Arbeit für hOCT1 festgestellt werden. Dieser Effekt war ebenfalls nicht signifikant.

Diese fehlende Signifikanz ist möglicherweise auf hohe Schwankungen der Messergebnisse zurückzuführen, daher sind die Ergebnisse zu W217/218Y in dieser Arbeit kritisch zu hinterfragen. Dass kleine signifikante Effekte möglich sind, zeigt die hochsignifikante Verringerung von V_{max} bei der Aufnahme von Sumatriptan durch mOct1. Diese Beobachtung stützt eine Beteiligung von W218 in mOct1. Dieses Daten beruhen auf Messergebnissen mit geringerem Standardfehler. Aber auch dieses Ergebnis zeigt, dass keine großen Veränderungen des Transportes zu erwarten sind. Für eine bessere Interpretation wäre es notwendig, die Experimente unter standardisierten Bedingungen zu wiederholen. Aufgrund der Schwankungen der Messergebnisse können keine endgültigen Aussagen zu W217/218Y in hOCT1 und mOct1 getroffen werden.

Vermutlich haben Mutationen dieser Aminosäure einen Effekt, denn in Einzelexperimenten kann man deutliche Veränderungen in K_M und V_{max} feststellen. Diesen Effekt zu diskriminieren gelang in der hiesigen Arbeit nicht. Die Argumentation aus Popp *et al.*, dass W218Y durch die neue Hydroxylgruppe eine Affinitätssteigerung herbeiführt, erscheint durchaus sinnvoll. Die Mutationen W218F und W218L zeigten keine Auswirkungen auf K_M.

Im Gegensatz zu W217/W218 sind die Aminosäuren D474/475 und F159/160 auch beim Menschen und der Maus relevant für den Transport von Substraten. Trotz der Unterschiede im Transportverhalten durch analoge Mutationen sind sie sehr wahrscheinlich am Transport beteiligt. Deshalb werden die Effekte der Mutation dieser zwei Aminosäuren im Folgenden diskutiert. Für W217/218 kann diese Relevanz empirisch nicht bestätigt werden. Theoretisch und anhand einiger Einzelergebnisse ist eine Relevanz dieser Aminosäure jedoch möglich.

4.3 Aspartat in Position 474/475 ist nicht immer essentiell für den Substrattransport über die Zellmembran

Die Aminosäure Aspartat 474/475 befindet sich sowohl in rOct1 als auch in hOCT1 und mOct1 im Bereich der elften Transmembranhelix. Die Tertiärstruktur abgeleitet von *LacY* impliziert Beteiligung dieser Aminosäure an der Substratbindetasche (Gorboulev et al. 1999). Auch der Phosphat-Transporter des *Piriformospora indica* als Homologiemodell untermauert die Beteiligung des Aminosäurerestes an der Bindetasche (Chen EC et al. 2017).

Die Aminosäure Aspartat an Position 474/475 ist auch in hOCT1 und mOct1 von großer Bedeutung für den Transport der meisten Substrate. Dabei spielt die Beteiligung an der Substratbindetasche eine wichtige Rolle. Die Untersuchungen in dieser Arbeit bestätigen vorige Untersuchungen an D475 von rOct1 (Gorboulev et al. 1999). Gorboulev *et al.* zeigten, dass die Mutation D475E (Aspartat zu Glutamat) eine Verringerung von V_{max} für TEA^+ und MPP^+ und eine K_M-Wert Erniedrigung auf ein Achtel des Wildtyps für TEA^+ bewirkt. Dieser Mutant führte zu drastischen Veränderungen in der Substrataffinität und Transportkapazität in der zitierten Abhandlung. Der Mutant D474/475N in dieser Arbeit zeigte auch überwiegend deutliche Einbußen im Transport verschiedener Substrate, denn die Mutation führte in fast allen Fällen zu einem kompletten Funktionsverlust des OCT1.

Der beobachtete Transportverlust von D474/475N (außer von TEA^+ und MPP^+ durch mOct1-D475N) ist wahrscheinlich nicht auf eine mangelnde Expression auf der Zelloberfläche zurückzuführen. In Gorboulev *et al.* wurde für D475N im Expressionsmodell der Oozyte ein kompletter Transportverlust festgestellt. Dieser war darauf zurück zu führen, dass das Expressionsmodell diesen mutierten Transporter nicht auf der Plasmamembran exprimierte. Die Arbeitsgruppe wies das Fehlen des Transporters mittels *Western Blot* nach. Es wäre also möglich, dass auch in unseren Händen hOCT1 und mOct1 nicht an der Oberfläche der Plasmamembran von HEK293-Zellen exprimiert wurden. In laborinternen Untersuchungen wie auch in der Arbeit zu rOct1 (Gorboulev et al. 1999) wurde mit Hilfe immunhistochemischer Verfahren bewiesen, dass HEK293-Zellen den Transporter mit D474/475N-Mutation an der Plasmamembran exprimieren, sodass man an dieser Stelle eine mangelnde Expression auch in der vorliegenden Arbeit ausschließen kann.

Es ist zudem möglich, dass man in den Experimenten keine Sättigung des Transportes beobachten kann, weil in den Versuchen nicht lange genug inkubiert wurde. Dies würde dazu führen, dass das Plateau von V_{max} nicht erreicht werden kann. Um dieses Problem

auszuräumen, müssten weitere Messungen durchgeführt werden, die die untersuchten Substrate bei höheren Konzentrationen erfasst.

Des Weiteren kann die Mutation D474/475N zu einem Verlust der erforderlichen Beweglichkeit korrespondierender TMDs zueinander führen. Die Glykosylierung des Proteins im Golgi-Apparat ist von der Konformation abhängig (Gorboulev et al. 1999), die durch Bindung endogener Kationen stabilisiert werden kann. Eine Veränderung der Konformation könnte diesen Mechanismus unterbinden, das Glykosylierungsmuster verändern und den betrachteten Verlust der Transportfähigkeit bewirken.

All die bisherigen Begründungen lassen sich dadurch widerlegen, dass der Transport von TEA^+ und MPP^+ durch den murinen Transporter deutlich messbar war. Die Mutation D475N bewirkte eine hochsignifikante K_M-Wert Erhöhung auf das 33-fache für TEA^+ und das knapp 7-fache für MPP^+, wobei V_{max} für beide Substrate ebenfalls hochsignifikant erhöht wurde. Es entstand ein Transporter mit *high capacity – low affinity* Charakteristik. Diese Beobachtungen sind in der Form neuartig. In bisherigen Untersuchungen zu D475 in rOct1 wurde Aspartat hauptsächlich durch Glutamat ersetzt, was mit einer Affinitätserhöhung und Senkung der Transportkapazität für TEA^+ und MPP^+ einherging. Es stellt sich die Frage, weswegen wir bei mOct1 die sättigbare Aufnahme der Substrate TEA^+ und MPP^+ messen konnten.

Es könnte sich um ein Artefakt handeln, weil die Aufnahme beider Substrate mittels Szintillationszählung quantifiziert wurde. In einem solchen Falle müsste man davon ausgehen, dass auch Ranitidin, Fenoterol und Sumatriptan aufgenommen würden, mittels Massenspektrometrie jedoch nicht ausreichend detektiert worden wären. Dagegen spricht jedoch, dass die Aufnahme von TEA^+ und MPP^+ durch hOCT1-D474N ebenfalls keine Aufnahme mit typischer Kinetik zeigt. Zudem konnte in der Regel eine gewisse Menge des Substrates gemessen werden. Die Beeinflussung der Detektion durch die Aufarbeitung für die Szintillationszählung, z. B. durch die Lyse der Zellen in 0,1N NaOH/0,1 % SDS, ist eher unwahrscheinlich. Man hätte noch geringere oder gar keine Konzentrationen gemessen. Die Verwendung des Puffers zur Lyse der Zellen und die Messung der Strahlung von ^3H- oder ^{14}C-markierten Substraten in einem Szintillationszähler, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurde, war ein Standardverfahren in vorigen Arbeiten zu rOct1 (Gorboulev et al. 1999; Meyer 2016; Popp et al. 2005; Seitz et al. 2015; Volk et al. 2009). Es gab bisher keinen Anhalt für Artefakte, weswegen auch aus diesem Grund ein solches ausgeschlossen werden kann. Wir können also davon ausgehen, dass mOct1-D475N im Gegensatz zu hOCT1-D474N beide Substrate aufnimmt.

Der Effekt des Mutanten D474/475N ist aussagekräftiger als der des Mutanten D474/475E. Der Austausch einer negativ geladenen Aminosäure (Aspartat/D) durch eine neutrale (Asparagin/N) erlaubt uns, mehrere Aussagen zu treffen. Zum einen ist OCT1 von der negativen Ladung an Position 474/475 abhängig. Zum anderen erlaubt uns dieser Aminosäuren-*knock out* festzustellen, dass die Maus einen Alternativmechanismus für den Transport von TEA^+ und MPP^+ besitzt. Trotz der Elimination der negativen Ladung werden die positiv geladenen Substrate transportiert. Für die Erkenntnisse und weitere Untersuchungen hat sich die Mutation D474/475N eher bewährt als die D474/475E Mutation, denn diese konnte bisher nicht diskriminieren, dass die Maus für den Transport der beiden genannten Kationen keine negative Ladung im Bereich 475 benötigt. Damit ist die Aufgabe von D474/475 in hOCT1 bzw. mOct1 besser verstanden.

Die Beobachtung, dass die Mutation ein- und derselben Aminosäure zu unterschiedlichen Effekten führt, ist für zukünftige Untersuchungen von hoher Relevanz. Ein Austausch von D475N zeigte andere Auswirkungen als der Austausch D475E. Sowohl in laborinternen Untersuchungen an hOCT1 und mOct1 (Meyer 2016) wie auch in vorigen Experimenten an rOct1 (Gorboulev et al. 1999) zeigte sich, dass die Mutation D474/475E zu einer Verringerung von V_{max} und einer Affinitätssteigerung für TEA^+ führt. Begründet wurde dies in der erhöhten Affinität und einer stärkeren Bindung des Substrates. Dadurch kommt es zu einer langsameren Abgabe des Substrates nach intrazellulär. Der D475E-Effekt zeigt deutlich, dass D475 in rOct1 eine Schlüsselrolle einnimmt. Die Erkenntnis, dass D475E die Affinität zu TEA^+ erhöht, sagt jedoch wenig über die absolute Abhängigkeit des Transporters vom Aspartat (D) aus. Betrachtet man den Rest der beiden Aminosäuren Aspartat (D) und Glutamat (E), unterscheiden sich diese lediglich in einer Methylgruppe, also in ihrer Länge. Die endständige Carboxylgruppe bleibt. Daher ist es nicht verwunderlich, dass der Effekt im Vergleich zur D474/475N-Mutation nur einen weniger starken Effekt zeigte. Hier wird die Carboxylgruppe entfernt.

Es ist bekannt, dass D474 in hOCT1 an der Bildung von ionischen Interaktionen zum Substrat beteiligt ist (Chen EC et al. 2017). Diese Aufgabe wird durch D474/475E wahrscheinlich nicht beeinträchtigt. Es kann vermutet werden, dass die Verlängerung der Aminosäure durch diese Mutation sterische Vorteile bei der Bindung der Substrate an die Carboxylgruppe bietet, diese aber Einbußen im Bereich der Transportgeschwindigkeit herbeiführt. Betrachtet man den Effekt der D474/475N-Mutation für alle hier gemessenen Substrate, erkennt man den starken Funktionsverlust in hOCT1 und mOct1. Im Falle von mOct1 passiert dies mit Ausnahme von TEA^+ und MPP^+.

mOct1 muss im Gegensatz zu hOCT1 eine alternative Aminosäure besitzen, die trotz der D475N-Mutation die Bindung und Translokation von TEA^+ und MPP^+ gewährleistet. Gleichzeitig muss diese Aminosäure das mutierte Aspartat in seiner Funktion als Bindungspartner oder Faktor einer Translokation ersetzen. Da der Transport nur durch mOct1 erfolgt, ist es äußerst wahrscheinlich, dass es sich um eine von 23% der Aminosäuren handelt, die sich zwischen hOCT1 und mOct1 unterscheiden. Es ist nicht möglich, mit den Ergebnissen dieser Arbeit eine Vermutung über die wichtigste Aminosäure zu treffen. Um die ersetzende Aminosäure herauszufinden, müsste man jede einzelne Aminosäure in mOct1 mutieren, die es in hOCT1 nicht gibt. Eine andere, zunächst einfachere Möglichkeit wäre es, die in der Einleitung erwähnten chimären OCT1-Konstrukte aus hOCT1 und mOct1 (Meyer 2016) mit der Mutation D474/475N zu versehen. Dies ermöglicht es festzustellen, mit welchen murinen Domänen ein Transport möglich ist. Fällt z. B. der Transport von TEA^+ und MPP^+ aus, wenn die TMDs 1-6 von hOCT1 stammen, kann man die Suche eingrenzen und davon ausgehen, dass die „ersetzende“ Aminosäure in diesen Domänen von mOct1 liegt. In einem nächsten Schritt könnte man die verbleibenden unterschiedlichen Aminosäuren mutieren und feststellen, welche den Transport im mOct1 gewährleistet.

Man kann schließen, dass D474 für den Menschen von elementarer Bedeutung bei allen untersuchten Substraten ist und dass es keinen Reservemechanismus gibt, der einen Transportverlust kompensieren kann. Dies scheint auch für die Substrate Ranitidin, Fenoterol und Sumatriptan bei der Maus zu gelten. Jedoch gibt es bei mOct1 Reservemechanismen, die es zu untersuchen gilt.

Zusammengefasst lässt sich auch hier sagen, dass der Modellorganismus Maus für Rückschlüsse auf den Menschen ungeeignet ist. Auch die Erkenntnisse an rOct1 zur Mutation D475N sind nicht in jedem Detail mit Ergebnissen dieser Arbeit vergleichbar. Lediglich die Aussage darüber, dass D474/475 ein wichtiger Teil ist, konnte in dieser Arbeit untermauert werden. Möchten wir aber vorausblickend die Transportkinetik eines Medikamentes im Patienten beurteilen, können wir das Mausmodell im Fall von OCT1 nicht verwenden. Diese Erkenntnis gab es schon früher (Meyer 2016) und wird durch die verschiedenen Aufnahmeverhalten bei der D474/475N-Mutation weiter bestätigt.

4.4 Mutationen von F159/160 beweisen die funktionellen Differenzen von Mensch und Maus

Die Aminosäure F159/160 ist ebenfalls von hoher Relevanz für den Transport vieler organischer Kationen. Die Mutation der Aminosäure Phenylalanin in Position 159 bzw. 160 zeigte in dieser Arbeit sehr speziesspezifische Veränderungen des Transportverhaltens. In erster Linie war es ein Unterschied, ob F zu A oder F zu Y mutiert wurde. Während F159A beim Menschen einen Wechsel des Transportmodus der Art *low capacity-high affinity* zu einem *high capacity-low affinity* Modus bewirkte, zeigte die Mutation F160A bei der Maus kaum eine Veränderung in der Substrataffinität. Nur für das Substrat Fenoterol kam es zu einer starken Erniedrigung der maximalen Transportrate. Dass die Wegnahme eines Benzolrings im Aminosäurerest eines großen Proteins derartige Effekte erzielt, zeigt in dieser Arbeit die immense Wichtigkeit von Phenylalanin 159 für Substratbindung und/oder -translokation von hOCT1. Diese Wichtigkeit wurde für rOct1 ähnlich beschrieben (Volk et al. 2009), denn in besagter Arbeit wurden durch F160A Veränderungen der Affinität zu TEA^+ und MPP^+ festgestellt. Auf die Rolle von F159/160 in hOCT1 und mOct1 wird im Folgenden näher eingegangen.

Der fehlende Effekt des F159/160Y-Mutanten auf K_M (Abbildung 11) ist darauf zurückzuführen, dass die Substrataffinität durch die Ergänzung des Benzolrings um eine Hydroxylgruppe nur wenig beeinflusst wird. Es hat sich trotzdem gezeigt, dass die Substrate Ranitidin, Sumatriptan und Fenoterol durch die F160Y Mutation in mOct1 mit 4- bis 7-fach geringerer Kapazität transportiert werden (Abbildung 11). Da sich hingegen die Substrataffinität nicht grundlegend verändert hat, verändert die Hydroxylgruppe am Benzolring die Interaktion mit den Substraten nicht. Denkbar ist, dass sich die Interaktion der TMDs zueinander verändert und dadurch V_{max} bei mOct1 sinkt. Die Folge ist eine verlangsamte Konformationsänderung von der *outward facing* zur *inward facing* Bindetasche mit verlangsamter Entlassung der Substrate in den Intrazellularraum. Ergebnisse aus Arbeiten an rOct1 zur Mutation F160A postulieren eine Lage der Aminosäure F160 im Inneren der nach außen geöffneten Bindetasche (Volk et al. 2009), die die Hypothese der veränderten Konformationsdynamik durch die Mutation F160Y in mOct1 stützen könnten.

Ein möglicher Mechanismus für die beobachtete V_{max}-Erniedrigung ist die Entstehung behindernder Wasserstoffbrückenbindungen durch die neue Hydroxylgruppe. Wasserstoffbrückenbindungen sind ein wesentlicher Faktor für die Entstehung der Tertiärstruktur eines Proteins (Hubbard und Kamran Haider 2001). Sie sind aber auch

wichtige Einflussfaktoren bei der Bindung des Liganden an den OCT1 (Chen EC et al. 2017). Das wiederum kann Veränderungen in der Substrataffinität bewirken.

Die Molekülgröße spielt bei den Translokationsmechanismen ebenfalls eine wichtige Rolle, denn nur drei der fünf Substrate zeigten eine Verringerung von V_{max} bei F160Y von mOct1. Ranitidin, Fenoterol und Sumatriptan sind größere und sperrigere Moleküle als TEA^+ und MPP^+. Ein Umklappen des Transporters nach innen könnte dadurch behindert werden.

Die Aminosäure F160 ist für mOct1 prinzipiell eher eine Schlüsselaminosäure für die Konformationsänderung bei der Substrattranslokation (für die Substrate Ranitidin, Fenoterol und Sumatriptan). Da sich die K_M-Werte weder bei der Mutation F160A-C451M noch bei F160Y vom Wildtyp unterschieden haben, spielt F160 eine geringere Rolle für die Affinität zu den Substraten. Auch der Mutant F160A-C451M macht sich durch die stark verminderte V_{max} von Fenoterol bemerkbar.

Beim Menschen verhält es sich anders: für den Transport von Substraten ist zwar F159 eine wichtige Aminosäure, im Gegensatz zur Maus ist der Effekt auf V_{max} in größerem Maße von dem Substituenten abhängig. Die Erhöhung von V_{max} für alle fünf gemessenen Substrate bei Elimination des Benzolrings (F159A) bis auf das 9-fache des Wildtyps impliziert, dass dieser die Konformationsänderung von der *Outward*-Konformation zur *Inward*-Konformation behindert oder aber die hohe Affinität V_{max} sinken lässt. Es gibt Evidenz, dass die Länge von Aminosäureresten bestimmter Transporter die Aufnahme von Substraten beeinflusst. Im L-Typ Aminosäure-Transporter 2 führt eine Seitenkettenverkürzung kritischer Aminosäuren zu einer Erhöhung, Seitenkettenverlängerung zu einer Verringerung der Substrataufnahme (Hinz et al. 2015). Ein ähnlicher Mechanismus kann somit auch hier vermutet werden.

Die Verringerung der Affinität von hOCT1 zu fast allen untersuchten Substraten durch F159A kann durch den fehlenden hydrophoben Bindungspartner zustande kommen. Alle untersuchten Substrate besitzen lipophile Ringstrukturen, bis auf TEA^+. Im Menschen wurde in dieser Arbeit mit Ausnahme von TEA^+ eine deutliche und signifikante Affinitätsverringerung festgestellt. Die fehlende organische Ringstruktur von TEA^+ begründet demnach wahrscheinlich, dass der affinitätsverringernde Effekt ausbleibt, weil durch die Mutation F159A keine essentielle Bindungsstelle für TEA^+ fehlt. Somit wird klar, dass F159 im Menschen im Gegensatz zur Maus eher für die Substratbindung verantwortlich ist. Gestützt wird diese Hypothese dadurch, dass die Mutation F159Y im Gegensatz zur Maus gar keinen Einfluss auf V_{max} und damit keinen Einfluss auf die Konformationsänderung hat.

Es stellen sich nun folgende Fragen: wie lässt sich das Messergebnis des F159A-Mutanten im Einzelnen begründen? Wie kann es passieren, dass die Veränderung des Proteins an einer Stelle (Phenylalanin zu Alanin) zu einem schnelleren Transport mit geringer Affinität kommt, und warum konnten wir dies nur beim Menschen beobachten? Warum sehen wir keine Veränderung für K_M bei TEA^+, obwohl sich V_{max} ebenfalls signifikant erhöht hat? Wieso sehen wir bei mOct1 eine starke Verminderung von V_{max} für den Transport von Fenoterol?

Alanin anstelle von Phenylalanin könnte ein schnelleres Umklappen des Transporters nach intrazellulär vereinfachen. Es gibt Untersuchungen in Membrankanälen, die die Relevanz der Länge von Aminosäureresten beweisen. Die Länge von Aminosäureresten in Transmembranproteinen kann die Transportgeschwindigkeit beeinflussen (Hinz et al. 2015). Man muss die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Ergebnisse dieser Arbeit kritisch hinterfragen, da es sich in besagter Arbeit um einen Kanal handelte und nicht um einen Transporter wie den OCT1. Ein ähnlicher Mechanismus sollte hier trotzdem in Betracht gezogen werden.

Für ein besseres Umklappen von F159A spricht, dass in dieser Arbeit die Mutation F160Y von mOct1 zu einer starken Verminderung von V_{max} führte. Wir betrachten hier eine andere Spezies, in der die F160A-Mutation keinen wesentlichen Einfluss hat. Trotzdem erkennt man auch hier, dass F159/160 ein ganz wichtiger Faktor auf die maximale Transportrate und der damit verbundenen Konformationsänderung von hOCT1 und mOct1 sein kann. Die Mutation zu F160Y zeigte eine starke Verminderung von V_{max} ohne den K_M wesentlich zu verändern (Abbildung 11).

Der *high capacity-low affinity* Transport durch F159A ist aller Wahrscheinlichkeit nach nicht durch den Effekt des *Unstirred Water Layer* bedingt. Es wurde in Kapitel 3.4 verdeutlicht, dass von Natur aus hohe V_{max}-Werte den dazugehörigen apparenten K_M falsch zu hoch einschätzen lassen (Abbildung 19). Eine hohe maximale Transportkapazität lässt gleich zu Beginn des Transportexperimentes eine Schicht über den adhärenten Zellen entstehen, die eine geringere Substratkonzentration aufweist als man hinzugegeben hat (Shibayama et al. 2015). Demnach wäre der hohe V_{max} von F159A für einen artifiziell hohen K_M-Wert verantwortlich. Diese Beobachtung spielt in den Experimenten der Arbeit jedoch gar keine Rolle (Kapitel 3.4). Eine von Shibayama *et al.* aufgestellte Formel, die den Effekt des *Unstirred Water Layer* eliminiert, zeigt die gleichen Tendenzen des F159A-Mutanten in ähnlich ausgeprägter Form. Sowohl V_{max} als auch K_M zeigen immer noch stark erhöhte Werte im Vergleich zum Wildtyp.

Für hOCT1 spielt die Veränderung der Substrataffinität durch F159A eine wichtigere Rolle als der zuvor beschriebene Vorgang des Umklappens. Der Effekt des *high capacity-low affinity* Transportes liegt daher in der verminderten Substrataffinität begründet. Das zunächst paradox erscheinende Phänomen lässt sich folgendermaßen erklären (Severance et al. 2017): durch die Bindung eines oder mehrerer Moleküle eines Substrates in der F159A-mutierten Bindetasche wechselt die Konformation des Transporters in eine nach intrazellulär gerichtete Form wie der Wildtyp. Da aber die Affinität zum aromatischen Substrat wesentlich geringer ist als beim Wildtyp, bindet dieses nur sehr schwach in der Bindetasche und erlaubt daher eine raschere Abgabe des Substrates nach intrazellulär. Beobachtungen zu ähnlicher Transportkinetik wurde an Bakterien festgestellt (Russell 1990), in welchen durch eine Mutation die erleichterte Diffusion von Substraten ermöglicht wurde.

Dieser Mechanismus kann jedoch nicht für das Substrat TEA^+ gelten. Die Erklärung ist in dieser Arbeit lediglich für die vier Substrate mit aromatischen Anteilen plausibel. Für den Transport von TEA^+ durch den F159A-Mutanten erhöht sich die maximale Transportgeschwindigkeit, die Affinität verändert sich nahezu gar nicht. Daher ist die Begründung der V_{max}-Erhöhung durch die Substrataffinitätsverminderung im Falle von TEA^+ nicht tragbar. Es muss hier daher ein alternativer Mechanismus vorliegen, der die Transportgeschwindigkeit erhöht. Eine denkbare Begründung wäre das zuvor beschriebene bessere Umklappen des Transporters nach intrazellulär. Weil TEA^+ ein relativ kleines Molekül ist, haben sterische Effekte eine Relevanz. Dies hätte den Effekt, dass der F159A-Mutant das Molekül zwar unverändert bindet (unveränderter K_M), es aber wegen der geringen Größe schneller ins Zytoplasma überführen kann (hoher V_{max}).

mOct1 besitzt für die Bindung aromatischer Substrate mit Ausnahme von Fenoterol einen alternativen Bindungspartner. F160 ist also für den Transport von Fenoterol sehr wichtig und unersetzlich. Für die anderen Substrate besitzt mOct1 einen anderen Bindungspartner, der F160 ersetzen kann, denn weder K_M oder V_{max} haben sich im Vergleich zum Wildtyp verändert (Abbildung 9). Der Mutant F160Y zeigt den Transportverlust für Ranitidin und Sumatriptan ebenfalls (Abbildung 11). Dieser Effekt kann aber auch mit der Entstehung von hinderlichen Wasserstoffbrückenbindungen zusammenhängen. Demnach hat mOct1 im Gegensatz zu hOCT1 – ähnlich wie für D474/475 beobachtet – *Escape*-Mechanismen für den Transport von Substraten, die von F159/160 abhängig sind.

Mensch-Maus-Chimäre (Meyer 2016) können helfen, den Mechanismus des *high capacity-low affinity* Transportes in hOCT1 aufzuklären und den Reservebindungspartner von mOct1 für die meisten Substrate aufzudecken. In diesen Chimären könnte man die

Domäne um F159/160 human wählen und andere Domänen nacheinander murin gestalten. Diese Konstrukte untersucht man auf die hier gemessenen Substrate: fällt beispielsweise trotz der humanen F159A-Mutation das Ergebnis für ein Konstrukt mit murinen Anteilen genauso aus wie für mOct1-F160A, kann man den Bereich eingrenzen, der im mOct1 das Phenylalanin ersetzt und dort durch gezielte Mutationen nach einer oder mehrerer ersetzender Aminosäuren suchen.

Interessant wäre in diesem Zusammenhang auch die Frage, ob dieser funktionelle Ersatz tatsächlich für alle hier untersuchten Substrate gleich gut funktioniert. Da sich der K_M für Fenoterol im Vergleich zum Wildtyp von mOct1 nicht veränderte, die maximale Transportgeschwindigkeit jedoch ca. 11-fach kleiner war, ist in diesem Falle von einer Störung der Substrattranslokation auszugehen. Diese war auch bei der F160Y-Mutation zu beobachten. Deswegen können wir im Falle von Fenoterol davon ausgehen, dass Phenylalanin für die Translokation in der Maus von elementarer Bedeutung ist.

Um die Frage endgültig beantworten zu können, welcher Mechanismus hinter dem beobachteten F159A-Effekt steckt, ist das Studium potenzieller 3D-Modelle des OCT1 vom Menschen nützlich. Sie erlauben eine Simulation der Translokation von Substraten mit und ohne Mutation. Solche *in-silico*-Methoden erlauben aufgrund von Wahrscheinlichkeitsberechnungen Prognosen in Bezug auf Konformationsänderungen. Dabei kann man zum einen Effekte durch Bindung von Substraten bestimmter Struktur beobachten. Zum anderen sieht man den Effekt durch Mutationen einzelner Aminosäuren (Chen EC et al. 2017). Gleichzeitig können wir durch das Studium der 3D-Modelle von mOct1 und rOct1 Unterschiede feststellen, die uns eine Aussage darüber erlauben, weswegen wir die Auswirkungen der F zu A Mutation in der Maus nicht sehen konnten.

Letztlich hilft für den endgültigen Beweis strukturelle Unterschiede erst die Entdeckung der Tertiärstruktur von OCT1 aller drei Spezies, die bis heute noch nicht gelungen ist. Eine Möglichkeit, sich der Problematik weiterhin zu nähern ist die Untersuchung des hOCT1-F159A-Mutanten auf die Aufnahme weiterer nachgewiesener Substrate ohne aromatische Anteile in der Molekülstruktur. Beobachtet man in diesen Fällen keine Verringerung der Affinität zum Substrat, kann man davon ausgehen, dass Phenylalanin ein wichtiger Bindungspartner für aromatische organische Kationen ist. Die Steigerung von V_{max} beruht dann auf einer geringeren Bindungskraft des Transporters zum Substrat. Die nichtaromatischen organischen Kationen hingegen besitzen dann einen anderen Mechanismus, der eine erhöhte Transportkapazität ermöglicht (Severance et al. 2017).

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen dem organischen Kationentransporter 1 des Menschen (hOCT1), der Maus (mOct1) und der Ratte (rOct1) besser zu verstehen. Dabei sollten auch Erkenntnisse gewonnen werden, ob das genauer untersuchte Transportverhalten von rOct1 auf hOCT1 und mOct1 übertragbar ist. Die Funktion von OCT1 als polyspezifischer Transporter ist Gegenstand aktueller Forschung, da er im Sinne der Pharmakokinetik auch relevant für die Distribution und Eliminierung von Xenobiotika ist. Wichtige Ziele sind dabei Erkenntnisse zu relevanten Aminosäuren für die Substratbindung und zur Struktur-Funktions-Beziehung des Transporters. In diesem Rahmen ist es außerdem wichtig, die Brücke von Ergebnissen an rOct1 zum ebenfalls häufig verwendeten Mausmodell zu schlagen und letztlich auch zu prüfen, ob sich diese Ergebnisse auf den Menschen übertragen lassen. Diese Arbeit war ein Teil dieses größeren Vorhabens und sollte klären, welche Speziesunterschiede die Aminosäuren D474/475, F159/160 und W217/218 im Einfluss auf das Transportverhalten aufweisen. Es ließen sich folgende Hauptergebnisse generieren:

1) In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich das Transportverhalten relevant zwischen rOct1, mOct1 und hOCT1 unterscheidet. Besonders interessant ist, dass der Ranitidin-Transport funktionelle Ähnlichkeiten zwischen rOct1 und hOCT1 zeigte, obwohl sich diese beiden Transporter in der Aminosäuresequenz stark voneinander unterscheiden. Der Transport dieser beiden Spezies unterschied sich aber von mOct1, obwohl die Struktur von rOct1 und mOct1 nahezu gleich ist (97 % Übereinstimmung der Aminosäuren). Es wurde hier also eine Ausnahmesituation festgestellt, die sich nicht mit Messungen anderer Substrate deckt. In vorigen Experimenten der Arbeitsgruppe waren rOct1 und mOct1 im Transportverhalten ähnlicher und hOCT1 zeigte einen größeren Unterschied im Vergleich dazu. Diese Ergebnisse sollten davor warnen, Unterschiede der Aminosäuresequenzen von OCT1 zwischen Spezies in direkter Korrelation mit funktionellen Aspekten zu sehen. Die Ergebnisse zeigen auch, dass man aus Erkenntnissen zum Transport eines Substrates von OCT1 nicht auf den Transport anderer Substrate schließen kann.
2) Es zeigte sich, dass analoge Mutationen wichtiger Aminosäuren in hOCT1 und mOct1 unterschiedliche Effekte erbrachten. Diese Effekte unterschieden sich wiederum von Ergebnissen an rOct1.

- Die Aminosäure D475 von rOct1 ist auch in hOCT1 und mOct1 wichtig für den Substrattransport und von hoher Bedeutung für dessen Kinetik. Allerdings ist der Transport durch hOCT1 komplett von D474 abhängig, wohingegen der Transport von einigen Substraten durch mOct1 auch ohne die negative Ladung von D475 erfolgen kann. Die Mutation D475N führte zu keinem Verlust des Transportes, sondern zu einem Wechsel zum Transportmodus der Art *high capacity-low affinity* für TEA^+ und MPP^+. Dies zeigt, dass mOct1 besagte Substrate anders transportiert als hOCT1.
- Phenylalanin auf Kodon 159 (Mensch) oder 160 (Maus) spielt eher beim Menschen als bei der Maus eine wichtige Rolle. Die Wegnahme des Benzolrestes durch eine Mutation von Phenylalanin zu Alanin führte bei hOCT1 zu drastischeren Veränderungen als bei mOct1. Das Phänomen des *high capacity-low affinity*-Transportverhaltens von hOCT1-F159A-C450M ist außerdem definitiv auf die F159A-Mutation zurückzuführen. Die Hintergrundmutation C450M hat keine Auswirkung auf die Transportcharakteristik von hOCT1.
- Die wichtige Rolle von W217/218 kann nicht sicher ausgeschlossen werden, denn die Ergebnisse zeigten keinen signifikanten Unterschied zum Wildtyp.

Die beiden Aminosäuren D474/475 und F159/160 sind damit in verschiedenen Spezies wichtig für den OCT1-Transport, aber unterschiedlich am Transportmechanismus beteiligt.

In Zusammenschau bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass rOct1, mOct1 und hOCT1 Unterschiede in deren Transportmechanismus aufweisen, was sich in der unterschiedlichen Transportstärke verschiedener Substrate widerspiegelt. Eine direkte Übertragung der Ergebnisse am Tiermodell Maus auf den Menschen ist somit nicht sinnvoll. Dies verbietet dem Kliniker in letzter Konsequenz, Ergebnisse aus Tiermodellen zur Kinetik von OCT1-Substraten auf sein zu behandelndes Patientenkollektiv zu übertragen.

6 Ausblick

Diese Arbeit liefert weitere Erkenntnisse zum OCT1 des Menschen und der Maus. Die Schlüsselrollen von rOct1 spiegeln sich im weitesten Sinne auch in hOCT1 und mOct1 wider, jedoch mit unterschiedlichen Auswirkungen. Folgende Aspekte wären in Zukunft näher zu untersuchen:

- Die Reservemechanismen von mOct1 für den Transport von TEA^+ und MPP^+ unabhängig von D475 können in Zukunft aufgedeckt werden. Hierfür wäre es sinnvoll, zur ersten Orientierung die chimären Mensch-Maus-OCT1-Konstrukte zu verwenden und anhand der Ergebnisse dann Experimente selektiv an Mutanten durchzuführen. Erkenntnisse diesbezüglich könnten Aminosäuren als wichtig identifizieren, die zuvor nicht für die Beteiligung im Substrattransport in mOct1 bekannt waren.
- Vollständigkeitshalber könnte man die Hintergrundmutation in mOct1-F160A-C451M ebenfalls untersuchen, um Effekte der C451M-Mutation auszuschließen.
- Für zukünftige Untersuchungen ist es sinnvoll, den Effekt der W217/218Y-Mutation mit hochgradiger Sorgfalt und Standardisierung ein weiteres Mal zu untersuchen. Für das Studium des Transporters von Maus und Mensch wären Erkenntnisse zu dieser Aminosäure wichtig, denn für rOct1 wurden dem Mutanten W218Y affinitätssteigernde Effekte zugesprochen.
- Zudem können die elf Aminosäuren mutiert werden, die sich zwischen rOct1 und hOCT1 gleichen und von mOct1 unterscheiden. Dies dient dazu herauszufinden, welche Aminosäure für den Transport von Ranitidin wichtig ist.

7 Literaturverzeichnis

Avdeef A, Nielsen PE, Tsinman O (2004): PAMPA - a drug absorption in vitro model 11. Matching the in vivo unstirred water layer thickness by individual-well stirring in microtitre plates. Eur J Pharm Sci 22, 365-374

Chen EC, Khuri N, Giacomini KM, Liang X, Stecula A, Chien HC, Yee SW, Huang Y, Sali A (2017): Discovery of Competitive and Noncompetitive Ligands of the Organic Cation Transporter 1 (OCT1; SLC22A1). J Med Chem 60, 2685-2696

Chen L, Shu Y, Liang X, Chen EC, Yee SW, Zur AA, Li S, Xu L, Keshari KR, Lin MJ, et al. (2014): OCT1 is a high-capacity thiamine transporter that regulates hepatic steatosis and is a target of metformin. Proc Natl Acad Sci U S A 111, 9983-9988

Ciarimboli G (2008): Organic cation transporters. Xenobiotica 38, 936-971

Dresser MJ, Gray AT, Giacomini KM (2000): Kinetic and selectivity differences between rodent, rabbit, and human organic cation transporters (OCT1). J Pharmacol Exp Ther 292, 1146-1152

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

Gorboulev V, Ulzheimer JC, Akhoundova A, Ulzheimer-Teuber I, Karbach U, Quester S, Baumann C, Lang F, Busch AE, Koepsell H (1997): Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters. DNA Cell Biol 16, 871-881

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

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 Pharmacol 73, 50-61

Gründemann D, Gorboulev V, Gambaryan S, Veyhl M, Koepsell H (1994): Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. Nature 372, 549-552

Hilgendorf C, Ahlin G, Seithel A, Artursson P, Ungell A-L, Karlsson J (2007): Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines. Drug Metab Dispos 35, 1333-1340

Hinz KM, Meyer K, Kinne A, Schulein R, Kohrle J, Krause G (2015): Structural insights into thyroid hormone transport mechanisms of the L-type amino acid transporter 2. Mol Endocrinol 29, 933-942

Hubbard RE, Kamran Haider M: Hydrogen Bonds in Proteins: Role and Strength. In: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester 2010, doi 10.1002/9780470015902.a0003011.pub2

Jardetzky O (1966): Simple allosteric model for membrane pumps. Nature 211, 969-970

Karbach U, Kricke J, Meyer-Wentrup F, Gorboulev V, Volk C, Loffing-Cueni D, Kaissling B, Bachmann S, Koepsell H (2000): Localization of organic cation transporters OCT1 and OCT2 in rat kidney. Am J Physiol Renal Physiol 279, F679-687

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

Kerb R, Brinkmann U, Chatskaia N, Gorbunov D, Gorboulev V, Mornhinweg E, Keil A, Eichelbaum M, Koepsell H (2002): Identification of genetic variations of the human organic cation transporter hOCT1 and their functional consequences. Pharmacogenetics 12, 591-595

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

Koepsell H (2011): Substrate recognition and translocation by polyspecific organic cation transporters. J Biol Chem 392, 95-101

Koepsell H, Keller T: Functional Properties of Organic Cation Transporter OCT1, Binding of Substrates and Inhibitors, and Presumed Transport Mechanism. In: Ciarimboli G, Gautron S, Schlatter E: Organic Cation Transporters: Integration of Physiology, Pathology, and Pharmacology. Springer, Heidelberg 2016, 49-72

Koepsell H, Lips K, Volk C (2007): Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. Pharm Res 24, 1227-1251

Korjamo T, Heikkinen AT, Monkkonen J (2009): Analysis of unstirred water layer in in vitro permeability experiments. J Pharm Sci 98, 4469-4479

Matthaei J, Kuron D, Faltraco F, Knoch T, Dos Santos Pereira JN, Abu Abed M, Prukop T, Brockmöller 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

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

Meyer M: Comparative characterization of human organic cation transporter OCT1 and its rodent orthologs. M. Sc. Mol. Med. Göttingen 2016

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

Moaddel R, Bighi F, Yamaguchi R, Patel S, Ravichandran S, Wainer IW (2010): Stereoselective binding of chiral ligands to single nucleotide polymorphisms of the human organic cation transporter-1 determined using cellular membrane affinity chromatography. Anal Biochem 401, 148-153

Neuhoff S, Ungell A-L, Zamora I, Artursson P (2003): pH-dependent bidirectional transport of weakly basic drugs across Caco-2 monolayers: implications for drug-drug interactions. Pharm Res 20, 1141-1148

Nilsson I, Saaf A, Whitley P, Gafvelin G, Waller C, von Heijne G (1998): Proline-induced disruption of a transmembrane alpha-helix in its natural environment. J Mol Biol 284, 1165-1175

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

Russell JB (1990): Low-affinity, high-capacity system of glucose transport in the ruminal bacterium Streptococcus bovis: evidence for a mechanism of facilitated diffusion. Appl Environ Microbiol 56, 3304-3307

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 Med 7, 56

Severance AC, Sandoval PJ, Wright SH (2017): Correlation between Apparent Substrate Affinity and OCT2 Transport Turnover. J Pharmacol Exp Ther 362, 405-412

Shibayama T, Morales M, Zhang X, Martinez-Guerrero LJ, Berteloot A, Secomb TW, Wright SH (2015): Unstirred Water Layers and the Kinetics of Organic Cation Transport. Pharm Res 32, 2937-2949

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. Anal Biochem 150, 76-85

Sugawara-Yokoo M, Urakami Y, Koyama H, Fujikura K, Masuda S, Saito H, Naruse T, Inui K, Takata K (2000): Differential localization of organic cation transporters rOCT1 and rOCT2 in the basolateral membrane of rat kidney proximal tubules. Histochem Cell Biol 114, 175-180

Takeda M, Khamdang S, Narikawa S, Kimura H, Kobayashi Y, Yamamoto T, Cha SH, Sekine T, Endou H (2002): Human organic anion transporters and human organic cation transporters mediate renal antiviral transport. J Pharmacol Exp Ther 300, 918-924

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

Tzvetkov MV, Saadatmand AR, Bokelmann K, Meineke I, Kaiser R, Brockmöller J (2012): Effects of OCT1 polymorphisms on the cellular uptake, plasma concentrations and efficacy of the 5-HT(3) antagonists tropisetron and ondansetron. Pharmacogenomics 12, 22-29

Tzvetkov MV, dos Santos Pereira JN, Meineke I, Saadatmand AR, Stingl JC, Brockmöller J (2013): Morphine is a substrate of the organic cation transporter OCT1 and polymorphisms in OCT1 gene affect morphine pharmacokinetics after codeine administration. Biochem Pharmacol 86, 666-678

Urakami Y, Okuda M, Masuda S, Saito H, Inui KI (1998): Functional characteristics and membrane localization of rat multispecific organic cation transporters, OCT1 and OCT2, mediating tubular secretion of cationic drugs. J Pharmacol Exp Ther 287, 800-805

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

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

Zamek-Gliszczynski MJ, Taub ME, Chothe PP, Chu X, Giacomini KM, Kim RB, Ray AS, Stocker SL, Unadkat JD, Wittwer MB, et al. (2018): Transporters in Drug Development: 2018 ITC Recommendations for Transporters of Emerging Clinical Importance. Clin Pharmacol Ther 104, 890-899

Zhang L, Dresser MJ, Gray AT, Yost SC, Terashita S, Giacomini KM (1997): Cloning and functional expression of a human liver organic cation transporter. Mol Pharmacol 51, 913-921

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Erstbetreuer Prof. Dr. rer. nat. Mladen V. Tzvetkov für seine zuverlässige, klar strukturierte und zu jeder Zeit hervorragende Betreuung. Mit seinen Ideen für weitere Teilziele der Promotion steigerte er den wissenschaftlichen Wert dieser Arbeit.

Außerdem danke ich dem gesamten Laborteam, insbesondere Tina Seitz, Ole Jensen, Karoline Jobst und meiner ersten Ansprechpartnerin Marleen Meyer für die exzellente Betreuung bei Herausforderungen in der praktischen Umsetzung der Forschungsziele.

Zuletzt danke ich meinem Kommilitonen und Mitdoktoranden Sawan Kumar Kakkar für seine moralische Unterstützung über die gesamte Zeit der Promotion hinweg.