

Aus dem Institut für Physiologie der Universität Tübingen

Abteilung Physiologie I

Abteilungsleiter: Professor Dr. F. Lang

**Funktionelle und pharmakologische Charakterisierung des  
humanen Natrium-/Carnitin-Cotransporters hOCTN2**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Ulrike Lükewille

aus Friedrichshafen

2002

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lang
2. Berichterstatter: Professor Dr. T. Rissler

*Meinen Eltern gewidmet*



<b>1</b>	<b><i>Einleitung</i></b>	<b>8</b>
<b>1.1</b>	<b>Die physiologische Rolle von Carnitin</b>	<b>8</b>
1.1.1	Struktur und Funktion	8
1.1.2	Biosynthese und Metabolismus von Carnitin	10
1.1.3	Transport und Aufnahme	11
<b>1.2</b>	<b>Das Carnitinmangelsyndrom</b>	<b>13</b>
1.2.1	Das primäre Carnitinmangelsyndrom	14
1.2.2	Das sekundäre Carnitinmangelsyndrom	15
<b>1.3</b>	<b>Die Familie der organischen Kationentransporter</b>	<b>17</b>
<b>1.4</b>	<b>Der humane organische Kationentransporter hOCTN2</b>	<b>20</b>
1.4.1	Struktur des hOCTN2	20
1.4.2	Vorkommen des hOCTN2 in den verschiedenen Geweben	22
1.4.3	Funktionelle und pharmakologische Eigenschaften	22
<b>1.5</b>	<b><i>Xenopus laevis</i> Oozyten in der Elektrophysiologie</b>	<b>23</b>
<b>1.6</b>	<b>Fragestellung der Arbeit</b>	<b>25</b>
<b>2</b>	<b><i>Material und Methoden</i></b>	<b>26</b>
<b>2.1</b>	<b>Verwendete Lösungen und Substanzen</b>	<b>26</b>
2.1.1	ND 96	26
2.1.2	ND 96 mit variiertem Natriumgehalt	26
2.1.3	ND 96-Oozytenaufbewahrungslösung	27
2.1.4	OR-2 (Oozyten-Ringer, kalziumfrei)	28
2.1.5	Kollagenase A	28
2.1.6	Weitere verwendete Substanzen	28
<b>2.2</b>	<b>Oozytenpräparation</b>	<b>29</b>
<b>2.3</b>	<b>Injektion der cRNA</b>	<b>30</b>
<b>2.4</b>	<b>Geneclamp Geräte und Software</b>	<b>32</b>
<b>2.5</b>	<b>Elektrophysiologie</b>	<b>32</b>
2.5.1	Zwei Elektroden Voltage Clamp Methode	32
2.5.2	Aufbau des Meßstandes	33
2.5.3	pH-sensitive Elektroden	34
<b>2.6</b>	<b>Flux Messungen mit <sup>3</sup>H-markiertem Carnitin</b>	<b>35</b>
<b>2.7</b>	<b>Durchführung der Experimente</b>	<b>35</b>

---

<b>2.8</b>	<b>Auswertung und Statistik</b>	<b>35</b>
<b>3</b>	<b>Versuche und Ergebnisse</b>	<b>37</b>
<b>3.1</b>	<b>Elektrogene Eigenschaften des hOCTN2</b>	<b>37</b>
<b>3.2</b>	<b>Allgemeine Charakterisierung des hOCTN2</b>	<b>39</b>
3.2.1	L-Carnitinkinetik	39
3.2.2	Stereospezifität	41
3.2.3	Na <sup>+</sup> -Abhängigkeit und -kinetik	42
3.2.4	pH-Abhängigkeit	44
<b>3.3</b>	<b>Pharmakologische Charakterisierung des hOCTN2</b>	<b>48</b>
3.3.1	Substratspezifität des hOCTN2 und induzierte Ströme	48
3.3.2	Hemmung des durch L-Carnitin induzierten Stroms	49
3.3.3	Messungen mit <sup>3</sup> H-markiertem Carnitin	54
<b>3.4</b>	<b>Vergleich mit anderen Mitgliedern aus der OCT-Familie</b>	<b>55</b>
<b>4</b>	<b>Interpretation und Diskussion</b>	<b>57</b>
<b>4.1</b>	<b>Fehlerdiskussion</b>	<b>57</b>
4.1.1	Expressionssystem	57
4.1.2	Oozyten und RNA	58
4.1.3	Lösungen	59
4.1.4	Geräte	59
4.1.5	Auswertung	59
<b>4.2</b>	<b>Techniken</b>	<b>60</b>
<b>4.3</b>	<b>Funktionelle Charakterisierung des hOCTN2</b>	<b>60</b>
4.3.1	Carnitinkinetik und Sterospezifität	61
4.3.2	Na <sup>+</sup> -Abhängigkeit	63
4.3.3	Elektrogenität	64
4.3.4	Einfluß des pH-Wertes	65
4.3.5	Vergleich mit anderen Mitgliedern aus der OCT-Familie	66
<b>4.4</b>	<b>Pharmakologische Charakterisierung des hOCTN2</b>	<b>66</b>
4.4.1	Substratspezifität	67
4.4.2	Wirkungen verschiedener Xenobiotika auf den Carnitintransport	67
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>71</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>73</b>

<b>7</b>	<b><i>Danksagung und Lebenslauf</i></b>	<b>84</b>
<b>7.1</b>	<b>Danksagung</b>	<b>84</b>
<b>7.2</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>85</b>

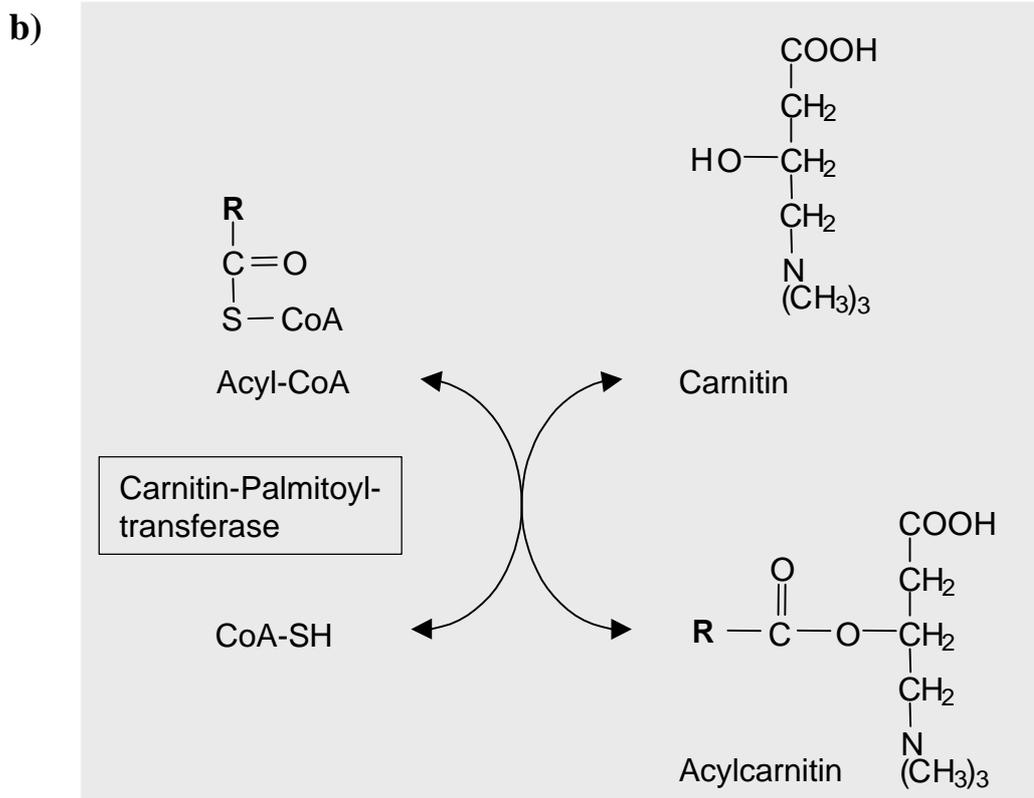
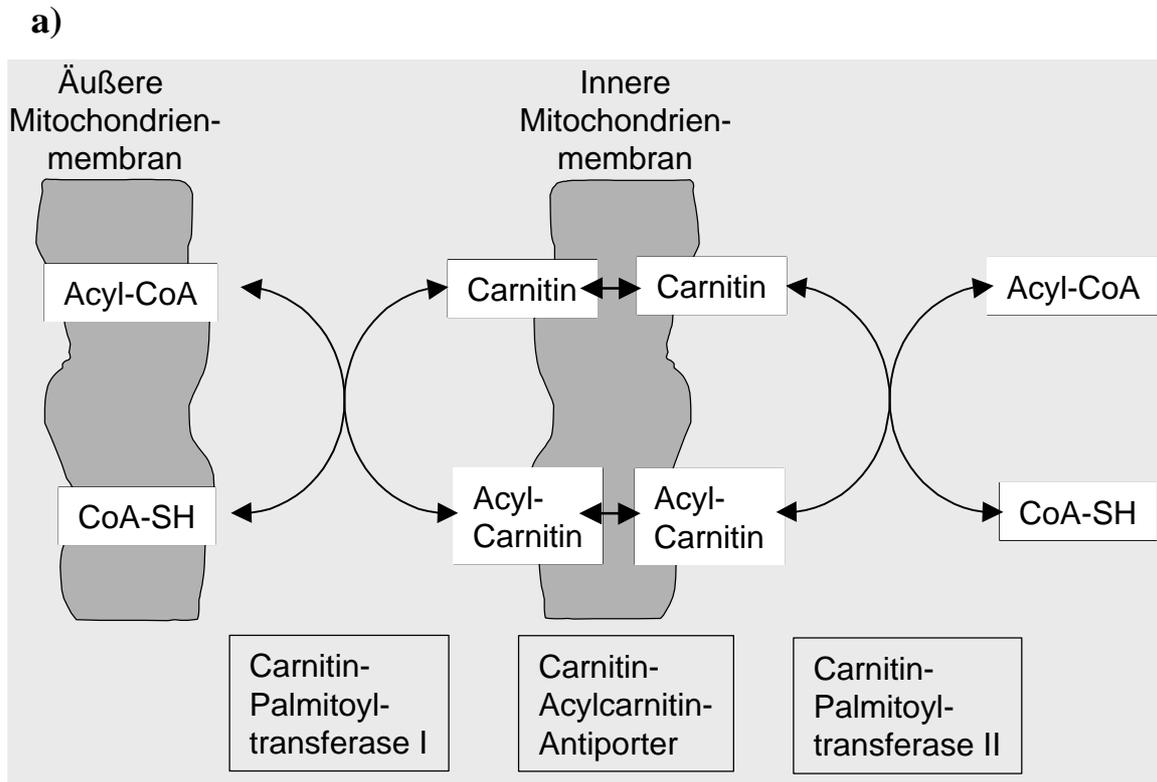
# 1 Einleitung

## 1.1 Die physiologische Rolle von Carnitin

### 1.1.1 Struktur und Funktion

Carnitin ( $\beta$ -Hydroxy- $\gamma$ -trimethylammoniumbutyrat) ist ein kleines wasserlösliches Molekül, das in der Natur als weit verbreiteter Bestandteil vieler höherer Organismen vorkommt (75). Erstmals wurde seine physiologische Rolle zu Beginn des 20sten Jahrhunderts als wichtiger Wachstumsfaktor für die Larve des Mehlwurms *Tenebrio molitor* beschrieben (7, 24). 1952 wurde die chemische Strukturformel von Carnitin aufgeklärt, einige Jahre später seine Rolle bei der  $\beta$ -Oxidation von langkettigen Fettsäuren (10).

Unter physiologischen Bedingungen existiert das Molekül als Zwitterion, wobei die positive Ladung der quartären Ammoniumgruppe durch die negative Ladung der ionisierten Carboxylgruppe neutralisiert wird (83, 105). Biologisch aktiv ist nur das L-Enantiomer (75). Carnitin hat zwei Hauptfunktionen im menschlichen Organismus: Die eine ist der Transport aktivierter langkettiger Fettsäuren (Acyl-CoA) als Carnitinester in den Matrixraum der Mitochondrien, wo aus den Fettsäuren durch  $\beta$ -Oxidation Energie gewonnen wird. Die zweite Hauptfunktion ist die Modulation der intrazellulären CoA-Homöostase. Da Acyl-CoA, das größtenteils im Zytoplasma durch intrazelluläre Lipolyse oder durch Aufnahme aus dem Extrazellulärraum entsteht, die innere Mitochondrienmembran nicht passieren kann, muß ein Transportsystem zwischengeschaltet werden: mit der *Carnitin-Acyltransferase I* (Synonym: *Carnitin-Palmitoyltransferase*) wird Acyl-CoA zum Acyl-Carnitin umgeestert und ein CoA freigesetzt. Acyl-Carnitin kann im Gegensatz zu Acyl-CoA mit Hilfe eines entsprechenden Transportsystems, der *Carnitin-Acylcarnitin-Translokase*, die innere Mitochondrienmembran passieren. An der Innenseite der mitochondrialen Innenmembran findet nun der umgekehrte Vorgang statt: Der Fettsäurerest des Acyl-Carnitins wird durch die *Carnitin-Acyltransferase II* auf CoA übertragen, wobei Acyl-CoA entsteht und freies Carnitin regeneriert wird (51) (Abb. 1).



**Abb. 1:** (a) Transport von aktivierten Fettsäuren in den Matrixraum der Mitochondrien. (b) zugehörige Strukturformeln. (Modifiziert nach Löffler, Petrides (51))

### 1.1.2 Biosynthese und Metabolismus von Carnitin

Im menschlichen Organismus wird Carnitin einerseits direkt über das Dünndarmepithel absorbiert, wobei Fleisch und Fisch die Hauptnahrungsquellen darstellen (66). Andererseits wird Carnitin durch endogene Synthese aus proteingebundenem Lysin und Methionin bereitgestellt (90). Allerdings besitzen nur Leber, Gehirn und Niere die vollständige Enzymausstattung für die Carnitinsynthese. Andere Gewebe wie Skelett- und Herzmuskel sind auf die Carnitinaufnahme aus dem Blut angewiesen. Die intrazelluläre Carnitinkonzentration ist üblicherweise 20- bis 50-mal höher als die des Plasmas (10, 75). Dies wird über einen aktiven Transportprozeß gegen einen Konzentrationsgradienten erreicht (24, 75). Die Niere ist entscheidend an der Homöostase physiologischer Plasmacarnitinkonzentrationen (30 - 50  $\mu\text{M}$ ) beteiligt. In der apikalen Membran des Epithels des proximalen Tubulus ist ein Reabsorptionssystem lokalisiert, das bei physiologischen Carnitinkonzentrationen über 90 % des glomerulär filtrierte Carnitins reabsorbiert (67). Die Nierenschwelle für die Carnitinausscheidung liegt mit 40  $\mu\text{mol/l}$  nahe der normalen Plasmacarnitinkonzentration (75).

Carnitin wird im Säugetierorganismus bis auf einen kleinen Anteil, den Darmbakterien verstoffwechseln, nicht metabolisiert (7). Im Gewebe und in physiologischen Flüssigkeiten liegt Carnitin in freier und in veresterter Form vor. Der Anteil des veresterten Carnitins kann in Abhängigkeit von äußeren Bedingungen wie Ernährung, Trainings- oder Gesundheitszustand deutlich variieren. Den größten Anteil der Carnitinerster nimmt Acetylcarnitin ein (23, 75). Sowohl endogene Substanzen, als auch viele Xenobiotika bilden mit Carnitin spezifische Konjugate, die über den Urin ausgeschieden werden können (25, 65). Damit kommt Carnitin eine wichtige Entgiftungsfunktion zu.

Da nur Acyl-CoAs, die reversibel mit Carnitin verestert sind, die innere Mitochondrienmembran durchdringen können, spiegelt sich das intramitochondriale Verhältnis von Acyl-CoA zu freiem CoA in dem extramitochondrialen Verhältnis von Acylcarnitin zu freiem Carnitin wieder. Das Verhältnis von Acylcarnitin zu freiem Carnitin ist ein sensibler Parameter für Veränderungen im mitochondrialen Stoffwechsel. Der Wert hierfür liegt normalerweise bei 0.25 und gilt als pathologisch, wenn er größer als 0.4 ist (8).

Die Funktionen von Carnitin im Stoffwechsel können folgendermaßen zusammengefaßt werden:

- $\beta$ -Oxidation langkettiger Fettsäuren in den Mitochondrien
- Entgiftung und Elimination selektiver Acyl-Reste
- Transport von Acyl-Einheiten in die Mitochondrien
- Modulation des CoA / Acyl-CoA Verhältnisses
- Reservoir für aktivierte Acetyl-Einheiten (im Flugmuskel einiger Insekten, möglicherweise auch in Herz und Spermium) (7).

### 1.1.3 Transport und Aufnahme

Die Analyse des Carnitintransportes in verschiedenen Geweben deutet auf die Anwesenheit heterogener Transportmechanismen hin. Leber und Gehirn haben ein niedrig-affines System ( $K_m = 5-10$  mM) mit hoher Transportkapazität, während Fibroblasten, Nieren-, Muskel- und Herzzellen einen hoch-affinen Transporter ( $K_m = 5-10$   $\mu$ M) mit niedriger Kapazität besitzen. Neuroblastomzellen sind mit einem Transporter mit intermediärer Affinität (100-200  $\mu$ M) ausgestattet (78). Diese Verteilung ist durchaus verständlich, wenn man den unterschiedlichen Energiebedarf der einzelnen Gewebe sowie ihre unterschiedliche Fähigkeit zur endogenen Carnitinsynthese bedenkt. Es ist noch nicht klar, ob die verschiedenen Eigenschaften auf unterschiedliche Carnitintransporter oder auf unterschiedliche funktionelle Eigenschaften desselben Transporters in den einzelnen Geweben zurückzuführen sind. Untersuchungen an Patienten mit primärer Carnitindefizienz (s.u.), bei denen gezeigt wurde, daß Carnitinsubstitution zu einem sofortigen Wiederauffüllen leerer Carnitinspeicher in Leber- aber nicht in Muskelzellen führte, deuten auf die Existenz mindestens zweier verschiedener Carnitintransporter hin (71). In den meisten Zellen ist der Großteil des Carnitintransportes  $\text{Na}^+$ -abhängig und sättigbar. Ein kleinerer Anteil, der  $\text{Na}^+$ -unabhängig aufgenommen wird, weist eine linearere Komponente auf, die als Diffusionsprozeß angesehen wird (78, 83). Auch die Tatsache, daß in vielen Zellen keine absolute Stereospezifität für L-Carnitin besteht, stellt normalerweise kein physiologisches Problem dar, weil D-Carnitin in der Natur nicht vorkommt. Es wurde aber beschrieben, daß oral zugeführtes DL-Carnitin Myasthenia-ähnliche Symptome verursacht (7).

Bislang konnte von den Molekülen, die für den transmembranären Carnitintransport verantwortlich sind, die Struktur des mitochondrialen Carnitincarriers (CAC), des bakteriellen Carnitintransporters (CaiT) und des hochaffinen plasmamembranständigen Carnitintransporters im Säugetierorganismus (OCTN2) aufgeklärt werden (10, 22, 41, 42, 44, 52, 90, 97). CAC wurde aus Mitochondrien der Rattenleber isoliert. Vermutlich ist CAC mit der Carnitintranslokase an der inneren Mitochondrienmembran identisch (42). CaiT wurde als Membranprotein bei *E. Coli* identifiziert; aufgrund seiner strukturellen und funktionellen Eigenheiten wird CaiT als Carnitintransporter in bakteriellen Membranen angesehen (41). OCTN2 ist ein hochaffiner Na<sup>+</sup>-abhängiger Carnitintransporter, der beim Menschen eine wichtige physiologische Rolle bei der Carnitinaufnahme in Niere, Skelettmuskel, Herz und Plazenta spielt (62, 90, 99).

**Tab. 1:** Unterschiedliche Mechanismen der Carnitinaufnahme in den einzelnen Geweben

Gewebe	Transportcharakteristiken	Referenzen
Darm	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Intermediäre Affinität</li> <li>• Na<sup>+</sup>-abhängig</li> <li>• Temperaturabhängig</li> <li>• Sättigbar</li> <li>• Aufnahme des größten Carnitinanteils im Jejunum</li> <li>• Hemmbar durch hohe Konzentrationen von D-Carnitin, Aceylcarnitin, Trimethylaminobutyrat</li> <li>• Zusätzlich Diffusionsprozeß nachweisbar</li> </ul>	29, 30, 73, 75, 83
Niere	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zwei verschiedene Transportsysteme: (a) hoch affin: <math>K_m = 17.4 \pm 3.9 \mu\text{M}</math>; (b) niedrig affin: <math>K_m = 15.0 \pm 6.0 \text{mM}</math></li> <li>• Na<sup>+</sup>-abhängig</li> <li>• Temperaturabhängig</li> <li>• Potentialabhängig</li> <li>• Stereospezifisch</li> </ul>	29, 39, 40, 49, 63, 69, 73, 75, 78, 88

Gewebe	Transportcharakteristiken	Referenzen
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sättigbar, 500 <math>\mu\text{M}</math> Carnitin, extrazellulär</li> <li>• Strukturspezifität für quartäre Nitrogen- und Carboxylgruppen</li> <li>• Hemmbar durch <math>\delta\text{-N}</math>-Trimethylaminovalerat, Acetyl-CL-Carnitin, D-Carnitin, Trimethyllysin, Cholin, <math>\beta</math>-Hydroxyutytrat, <math>\gamma</math>-Aminobutytrat, 2,4-Dinitrophenyl, Carbonylcyanid, niedrige Temperatur</li> <li>• Stimulation durch Glycinbetain</li> </ul>	
Muskel	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hoch affiner Transport</li> </ul>	63
Herz	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hoch affiner Transport, <math>K_m = 4.8 \pm 2.2 \mu\text{M}</math></li> <li>• Carnitinaufnahme 3-4 mal höher als in Fibroblasten</li> </ul>	9, 75
Fibroblasten	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hoch affiner Transport, <math>K_m = 7.0 \pm 0.4 \mu\text{M}</math> ; <math>\text{Na}^+</math>-abhängig, sättigbar</li> <li>• Niedrig affiner Transport, <math>\text{Na}^+</math>-unabhängig, nicht sättigbar</li> </ul>	9, 63, 78
Leber	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hoch affiner Transport, <math>K_m = 90 \mu\text{M}</math></li> <li>• Niedrig affiner Transport, <math>K_m = 5 \text{ mM}</math></li> </ul>	75, 78
Gehirn	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Niedrig affiner Transport</li> </ul>	75

## 1.2 Das Carnitinmangelsyndrom

Das Carnitinmangelsyndrom ist definiert als eine Verminderung der Plasma- oder Gewebecarnitinkonzentration auf ein Niveau unterhalb des Grenzwertes, der für die physiologische Funktion des Organismus notwendig ist. Im klinischen Alltag wird gewöhnlich der Plasmacarnitinspiegel als diagnostischer Parameter verwendet, obwohl dieser Wert nicht selbstverständlich Rückschlüsse auf die einzelnen Gewebekonzentrationen erlaubt (75).

Häufig wird das Carnitinmangelsyndrom erst dann klinisch manifest, wenn die Gewebecarnitinspiegel bereits auf 10 % - 20 % des Normwertes gefallen sind. Dabei muß man zwischen einem primären und einem sekundären Carnitinmangelsyndrom unterscheiden.

**Tab. 2:** Ätiologie des Carnitinmangelsyndroms (75)

### **Primäres Carnitinmangelsyndrom**

- Systemische Carnitindefizienz, Transportdefekt
- Muskelcarnitindefizienz, Transportdefekt

### **Sekundäres Carnitinmangelsyndrom**

- Genetisch bedingte metabolische Störungen
  - Enzymatische Funktionsstörungen der Fettsäureoxidation
  - Funktionsstörungen im Stoffwechsel der verzweigt-kettigen Aminosäuren
  - Glutarylacidurie I
  - Enzymatische Funktionsstörungen auf mitochondrialer Ebene
  - Andere genetische Defekte
- Erworbene Zustände
  - Verminderte Biosynthese
  - Verminderte Aufnahme
  - Verminderte gespeicherte Reserve/ gesteigerter Bedarf
  - Vermehrter Verlust
- Iatrogene Faktoren
  - Pharmaka (z.B. Pivalinsäure, Valproinsäure, Emetin)
  - Hämodialyse

#### **1.2.1 Das primäre Carnitinmangelsyndrom**

Das primäre Carnitinmangelsyndrom (OMIM Nr.212140) ist eine seltene autosomal rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung, bei der Mutationen des plasmamembranständigen Carnitintransporters vorliegen. In Abhängigkeit der gewebespezifischen Verteilung unterschiedlich hoher Carnitinspiegel, wird beim primären Carnitinmangelsyn-

drom zwischen (a) systemischer Carnitindefizienz (SCD) und (b) Muskelcarnitindefizienz (MCD) unterschieden (45, 52, 60, 68, 69, 73, 75, 78, 90, 94, 97, 98).

Die MCD manifestiert sich in einer milden bis schweren Muskelschwäche und einer Anhäufung von Lipiden im Skelettmuskel (68). Hierbei liegt eine starke Reduktion der Carnitinspiegel im Muskel vor, während die Plasmacarnitinkonzentrationen normal hoch sind. Wichtig ist, daß die MCD auf den Muskel beschränkt ist, und daß weder ein renales Carnitinleck noch eine Leberbeteiligung vorliegen. Ursächlich wird eine Veränderung in der Transportkinetik eines muskelspezifischen Carnitintransporters beschrieben (53). Anderen Hypothesen zufolge könnte die MCD auch die heterozygote Form der systemischen Carnitindefizienz (SCD) sein (75).

Die SCD äußert sich, wenn sie bereits in früher Kindheit auftritt, klinisch als hypoketotische hypoglykämische Enzephalopathie (oft durch Nahrungskarenz provoziert), als Reye-Syndrom oder als plötzlicher Kindstod. SCD kann auch erst im späteren Lebensalter auftreten, dann allerdings in Form einer Myopathie oder progressiven Kardiomyopathie (73, 75, 97). Die Patienten leiden unter einem massiven Carnitinverlust über die Niere; dies deutet auf einen renalen Transportdefekt hin (75, 97). Fibroblasten und Muskelzellen dieser Patienten zeigen den gleichen Transportdefekt wie die Nierenepithelzellen; die Carnitinaufnahme in die Leber scheint nicht betroffen zu sein. Die Plasma- und Gewebecarnitinspiegel betragen gewöhnlich weniger als 10 % des Normwertes. Die endgültige Diagnose wird gestellt, wenn die Fibroblasten der Patienten vernachlässigbar kleine Carnitintransportraten zeigen. Als Therapie wird eine hoch dosierte orale Carnitinsubstitution durchgeführt, so daß Carnitin durch passive Diffusion aufgenommen werden kann (75). Hierdurch verschwinden meistens die Symptome. Es konnte gezeigt werden, daß Patienten, die an einem primären Carnitinmangelsyndrom leiden, eine Punktmutation in der Basensequenz des organischen Kationen-/ Carnitintransporters hOCTN2 tragen. Diese Mutation verhindert eine korrekte Funktion von hOCTN2 und wird ursächlich für das primäre Carnitinmangelsyndrom verantwortlich gemacht (45, 52, 60, 78, 82, 90, 94, 97, 98).

### **1.2.2 Das sekundäre Carnitinmangelsyndrom**

Das sekundäre Carnitinmangelsyndrom hat seine Ursache in einer breitgefächerten Palette metabolischer Störungen (siehe auch Tabelle 2). Es manifestiert sich in einer Ab-

nahme der Carnitinspiegel im Plasma oder in den einzelnen Geweben und kann auf genetisch bedingte metabolische Störungen, erworbene Zustände oder iatrogene Faktoren zurückgeführt werden (75, 96).

Als häufigste Ursache des sekundären Carnitinmangelsyndroms sind Stoffwechseldefekte aufgrund einer Beeinträchtigung der  $\beta$ -Oxidation von Acyl-CoA-Zwischenprodukten in den Mitochondrien zu nennen. Dabei kommen sowohl Funktionsstörungen der Fettsäureoxidation als auch Defekte der Oxidation von Aminosäuren vor. Bei diesen Defekten betragen die Carnitinspiegel in Plasma und Gewebe 25 % bis 50 % des Normwertes und das Verhältnis von Acylcarnitin zu freiem Carnitin ist zugunsten eines absoluten oder relativen Anstiegs von Acylcarnitinen verschoben (75, 87). Pathognomonisch wird eine Anhäufung von Acyl-CoA-Zwischenprodukten nahe der Stelle des metabolischen Blocks beschrieben. Durch die Transesterifizierung dieser Acyl-CoAs mit Carnitin wird vermehrt Acylcarnitin gebildet und ungebundenes CoA freigesetzt (Abb.1). Das neugebildete Acylcarnitin wird aus den Mitochondrien heraustransportiert und über die Niere ausgeschieden (56, 87).

Neben zahlreichen hereditären Enzymdefekten kommt als Ursache für das sekundäre Carnitinmangelsyndrom auch eine Störung der Carnitinbiosynthese in Betracht, wie sie bei extrem unreifen Frühgeborenen und Patienten mit Leberzirrhose oder chronischen Nierenerkrankungen vorkommen kann. Eine andere häufige Ursache für dieses Syndrom ist eine Beeinträchtigung des Carnitinstoffwechsels durch verschiedene Pharmaka, wie *Valproinsäure*, *Emetin*, *Pivalinsäure*, *Quinidin* und viele andere (1, 36, 46, 92).

Die Energieproduktion in Herz- und Skelettmuskel wird durch die verminderte Fettsäureoxidation beeinträchtigt. Sobald der Organismus einer besonderen metabolischen Belastung wie Streß, Nahrungskarenz oder einer gewöhnlichen Virusinfektion ausgesetzt ist, kann sich der Energiemangel im Sinne einer Generalisierung schnell auf andere Organsysteme ausweiten (75, 87). Allen Enzymdefekten, die mit einem sekundären Carnitinmangelsyndrom assoziiert sind, liegt ein autosomal-rezessiver Vererbungsmodus zugrunde. Klinisch manifestiert sich das sekundäre Carnitinmangelsyndrom meist in akuten Stoffwechselentgleisungen mit beeinträchtigtem Bewußtseinszustand, der mit Komplikationen wie Konvulsionen, Apnoe oder Herzstillstand einhergehen kann. Die akute Enzephalopathie kann auch mit einer Leber- oder Herzbeteiligung vergesellschaftet sein.

Therapeutisch wird eine orale Carnitinsubstitution angestrebt. Hierdurch sollen einerseits die leeren Carnitinspeicher wieder aufgefüllt werden und andererseits die Elimination toxischer Metabolite und die Wiederherstellung normaler CoA-Spiegel erreicht werden (70). Allerdings sprechen nicht alle Patienten mit sekundärem Carnitinmangel-syndrom gleichermaßen gut auf diese Therapie an; nur bei einigen Patienten verringert sich die Häufigkeit der metabolischen Entgleisungen.

### **1.3 Die Familie der organischen Kationentransporter**

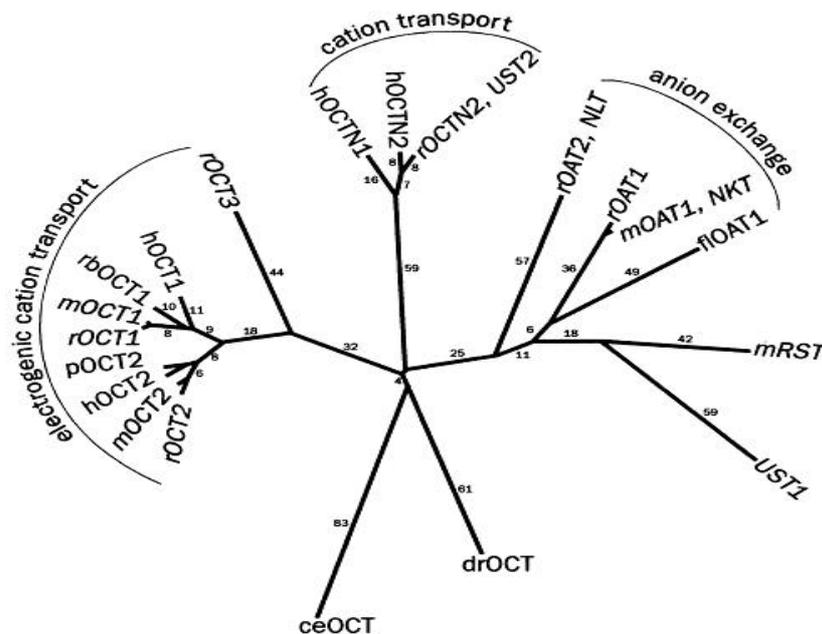
Die neu entdeckte Familie der organischen Kationentransporter (OCT) gehört zu der MFS-Oberfamilie (= major facilitator superfamily). Dazu werden außerdem (a) die P-Glykoproteine (= Multidrug-resistant Proteine), (b) die organischen Anionentransporter (OATP), (c) erleichterte Diffusionssysteme für Zucker, (d) erleichterte Diffusionssysteme für Citratzyklus-Zwischenprodukte, (e) die Phosphatester-/ Phosphat-Antiporter und (f) die Protonen-/Oligosaccharid-Symporter gezählt (43, 44).

Organische Moleküle, die eine oder mehrere primäre, sekundäre, tertiäre oder quartäre Ammoniumgruppe besitzen, haben eine zeitweise oder permanente positive Ladung und werden als organische Kationen bezeichnet. Zu dieser Gruppe werden endogene organische Kationen, wie Cholin, N<sup>1</sup>-Methylnicotinamid (NMN) und die Monoaminoneurotransmitter, wie Dopamin, Serotonin, Histamin und Noradrenalin, sowie viele Xenobiotika gerechnet. Pharmaka vieler klinischer Klassen, einschließlich Antihistaminika, Skelettmuskelrelaxantien, Antiarrhythmika und  $\beta$ -adrenerge Rezeptorblocker gehören ebenfalls zu den organischen Kationen (43, 44, 104). Die Homöostase organischer Kationen wird von ihrer endogenen Produktion, ihrer Absorption im Dünndarm und ihrer Ausscheidung in Darm, Leber und Niere bestimmt. Der Transport wird einerseits von substratspezifischen, Na<sup>+</sup>-abhängigen Transportern und andererseits von polyspezifischen Potential-abhängigen, aber Na<sup>+</sup>- und pH-unabhängigen Transportern vermittelt (43, 44). In Dünndarm, Leber und Niere sind diese Na<sup>+</sup>-unabhängigen Transporter für die Absorption und Ausscheidung organischer Kationen verantwortlich. Absorption und Ausscheidung erfolgen in zwei Schritten: Der erste Schritt besteht in einer Translokation der organischen Kationen aus dem Extra- in den Intrazellulärraum, meist unter Ausnutzung des Membranpotentials. Als zweiter Schritt folgt ein Transport der Kationen aus der Zelle heraus, diesmal aber gegen das Membranpotential (37, 38). Funktio-

nell sind verschiedene Transportsysteme in Dünndarm, Leber, Niere und ZNS bereits charakterisiert. Dazu zählen u.a.:

- organische Kationen-/Protonen-Antiporter, einige davon sind selektiv für bestimmte Moleküle, wie TEA, NMN oder Guanidin,
- ATP-getriebene P-Glykoproteine, die für die Elimination hydrophober organischer Kationen verantwortlich sind,
- ein elektrogener Transporter für Cholin,
- ein potential-abhängiges erleichtertes Diffusionssystem,
- ein organischer Kationen/organischer Kationen Austauscher (104).

Mit Hilfe von Expressionsklonierungsstudien wurde 1994 rOCT1, ein polyspezifischer organischer Kationentransporter der Ratte, als erstes Mitglied der neuen organischen Kationen Transporterfamilie identifiziert (32). Seither wurden mehrere organische Kationentransporter (OCT) verschiedener Spezies kloniert (12, 13, 27, 32, 43, 44, 79, 91, 100, 104). Transporter dieser Familie sind in epithelialen Geweben exprimiert, einschließlich Niere, Leber und Darm. Insgesamt wurden neunzehn verschiedene, zu rOCT1 homologe Genprodukte identifiziert (Abb. 2).



**Abb. 2:** Phylogenetischer Baum der zu rOCT1 homologen Transporter (44).

## **Transporter vom Typ OCT1 und OCT2**

Transporter vom Typ OCT1 und OCT2 funktionieren bei allen untersuchten Spezies offenbar in derselben Weise. Sie scheinen elektrogene, erleichterte Diffusionssysteme für kleine organische Kationen zu sein, die unabhängig von  $\text{Na}^+$ - und Protonengradienten arbeiten und für die Aufnahme organischer Kationen in die Zellen verantwortlich sind. Es konnte aber auch gezeigt werden, daß diese Transporter bei einer Akkumulation organischer Kationen in Epithelzellen in der Lage sind, ihre Transportrichtung umzukehren (11, 12, 13, 27, 32, 43, 44, 104). Beide Transporter sind beim Menschen am ersten Schritt der Kationenaufnahme, bzw. -ausscheidung beteiligt (44).

Bei Ratten wurde mRNA des rOCT1 in Niere, Leber und Darm gefunden, während beim Menschen hOCT1 vorwiegend in der Leber transkribiert wird (27, 44, 104). Die Expression des OCT2 ist stärker gewebespezifisch: Northern Blot Analysen zufolge, findet man rOCT2 und hOCT2 hauptsächlich in der Niere. Hier vermittelt hOCT2 den ersten Schritt der Kationenreabsorption (27). Außerdem konnte auch in Neuronen die Expression von hOCT2 nachgewiesen werden, wo dieser Transporter möglicherweise die interstitielle Konzentration von Monoaminoneurotransmittern reguliert (11, 43).

## **hOCTN1 und hOCTN2**

Die Charakterisierung der OCTN-Unterfamilie ist noch ziemlich unvollständig. Ihre Mitglieder arbeiten eventuell mit einem anderen Transportmechanismus als die Transporter vom klassischen OCT-Typ.

OCTN1 ist ein multispezifischer und pH-abhängiger organischer Kationentransporter, der vermutlich als Protonen/organischer Kationen-Antiporter in der apikalen Membran renaler Epithelien und in anderen Geweben vorkommt (91, 100). Er kann durch verschiedene Pharmaka wie Cimetidin, Quinidin, Procainamid, Pyrilamid, Quinin und Verapamil gehemmt werden (100). hOCTN2 ist ein hochaffiner  $\text{Na}^+$ -Carnitin-Cotransporter/ Organischer Kationentransporter (90, 98).

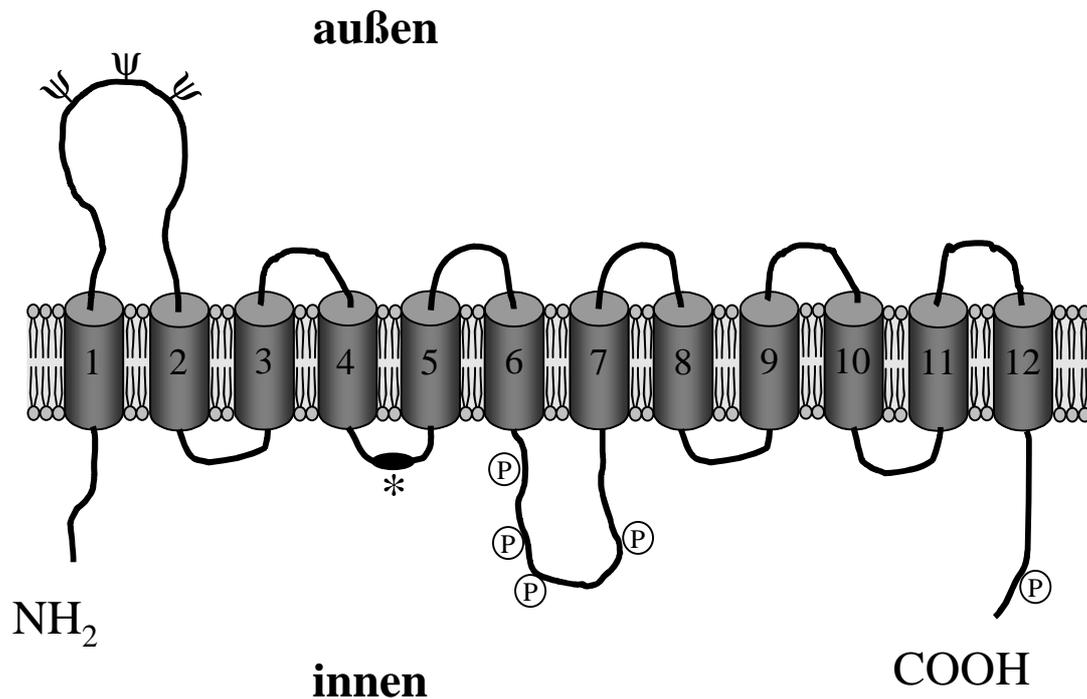
Organische Kationentransporter sind polyspezifisch und haben daher überlappende Substratspezifitäten. Die OCTs sind für die Aufnahme und Ausscheidung vieler Xenobiotika verantwortlich und auch selbst ein möglicher Angriffsort von Pharmaka. Für die

Vorhersage der pharmakokinetischen Eigenschaften neuentwickelter Pharmaka ist daher die z.T. noch ausstehende funktionelle Charakterisierung der einzelnen OCTs wichtig. Ebenso ist der Regulationsmechanismus der organischen Kationentransporter bisher noch kaum verstanden. Es wird diskutiert, daß der organische Kationentransport als Reaktion auf spezifische Substrate in OK-Zellen hochreguliert werden kann (14). Andere Studien haben ergeben, daß sowohl in Rattenleberzellen, als auch in Kaninchennierenzellen Proteinkinase C an der Regulation der organischen Kationentransporter beteiligt ist (27, 31, 32, 64).

## **1.4 Der humane organische Kationentransporter hOCTN2**

### **1.4.1 Struktur des hOCTN2**

Kürzlich wurde hOCTN2, ein neues Mitglied der organischen Kationentransporterfamilie aus einer humanen plazentaren Trophoblastenzelllinie kloniert und seine Aminosäuresequenz identifiziert (99). Die cDNA kodiert für ein Protein, das aus 557 Aminosäuren besteht und vermutlich zwölf transmembranäre Domänen besitzt. Es wird angenommen, daß hOCTN2 ähnlich konfiguriert ist wie andere bereits bekannte mammalische Transporter mit zwölf Transmembrandomänen. Das Amino- und das Carboxylende liegen auf der zytoplasmatischen Seite der Membran. Eine lange extrazelluläre Schleife, aus 107 Aminosäuren bestehend, ist zwischen den ersten beiden Transmembrandomänen lokalisiert. Diese Schleife enthält drei mögliche Stellen für N-Glykosylierung (90, 99). Außerdem besitzt das Molekül fünf (99) (bzw. sechs (90)) potentielle Stellen für Proteinkinase C-abhängige Phosphorylierung und eine für Proteinkinase A-abhängige Phosphorylierung. An der intrazellulären Schleife zwischen vierter und fünfter Transmembrandomäne enthält das Protein ein ATP/GTP-Bindungsmotiv. hOCTN2 hat eine molekulare Masse von 63 kDa (90, 99).



**Abb. 3:** Modell der Membran-Topologie des hOCTN2. Das Protein besitzt zwölf transmembranäre Domänen mit drei potentiellen Stellen für N-Glykosylierung ( $\psi$ ), fünf mögliche Stellen für Proteinkinase C-abhängige Phosphorylierung (P) sowie ein mögliches ATP/ GTP-Bindungsmotiv (\*).

Auf der Ebene der Aminosäuresequenz ist hOCTN2 mit einer Übereinstimmung von 77% am nächsten mit hOCTN1 verwandt. hOCTN2 zeigt mit anderen bekannten Mitgliedern der organischen Kationentransporterfamilie (hOCT1, hOCT2 und rOCT3) 34-37 % Übereinstimmung. Interessanterweise besitzt hOCTN1 ebenso ein ATP/GTP-Bindungsmotiv. Möglicherweise bilden hOCTN1 und hOCTN2 zusammen mit rOCTN2 (= UST2) eine eigene Untergruppe in der organischen Kationentransporterfamilie (44, 99). Andere Autoren schreiben dem Rattenklon des Carnitintransporters aus phylogenetischer Sicht eine Mittelstellung zwischen organischen Kationen- und Anionentransportern zu.

Das *octn2*-Gen (ca. 30 kb) liegt auf dem humanen Chromosom 5q31. Es besteht aus zehn Exons und neun Introns und wurde bereits im Rahmen des Human Genome Projects sequenziert (88, 99).

### 1.4.2 Vorkommen des hOCTN2 in den verschiedenen Geweben

Northern Blot Analysen haben ergeben, daß der plasmamembranständige (48) Carnitintransporter hOCTN2 stark in Herz, Plazenta, Skelettmuskel, Niere und Pankreas expriert ist, während die Expression vergleichsweise schwach ist in Leber, Gehirn und Lunge (44, 99). In situ Hybridisierungen zeigen eine mRNA Lokalisation speziell im Glomerulum der Niere, im proximalen und distalen Nierentubulus, im Myokard, in der Lamina fibrosa der Herzklappen und in den Herzkranzgefäßen, in der Plazenta, im cerebralen Kortex, in den Pyramidalzellen des Cornu ammonis, und besonders in den Körner- und Purkinjezellen des Kleinhirns (98) sowie in Fibroblasten und Lymphoblasten (48). Andere Autoren schlagen eine etwas andere Gewebeverteilung von hOCTN2 vor. Vor allem hat diese Autorengruppe Unterschiede in der Gewebeverteilung bei fetalen und adulten Geweben beobachtet (90). Für die Gewebe mit niedriger Expression von hOCTN2 wurde in der Literatur ein niedrig affiner Transportmechanismus mit Halbsättigungskonzentrationen von 0.2 -10 mM beschrieben (10, 69, 88, 90), der vermutlich nicht identisch mit hOCTN2 ist.

### 1.4.3 Funktionelle und pharmakologische Eigenschaften

hOCTN2 ist ein hochaffiner  $\text{Na}^+$ -abhängiger Carnitintransporter und  $\text{Na}^+$ -unabhängiger organischer Kationentransporter (82). Carnitin und organische Kationen haben möglicherweise nicht dieselbe Bindungsstelle am Transportprotein. Vielmehr scheint die  $\text{Na}^+$ -unabhängige Bindung kationischer Substrate an einem Teil des Transporters zu erfolgen, der nur teilweise mit der  $\text{Na}^+$ /Carnitinbindungsstelle überlappt (82, 98). Die funktionelle Bedeutung des hOCTN2 als organischer Kationentransporter ist noch unklar (98). Nach bisherigem Kenntnisstand ist dies aber das erste Beispiel einer eindeutigen räumlichen Trennung von Bindungsstellen für unterschiedliche Substrate an einem organischen Kationentransporter (82).

Die Carnitinaufnahme ist sättigbar und ein Austausch von  $\text{Na}^+$ -Ionen gegen andere monovalente Kationen wie  $\text{K}^+$  oder Cholin hebt den Carnitintransport auf, während eine schwache Transportaktivität erhalten bleibt, wenn  $\text{Na}^+$  gegen  $\text{Li}^+$ -Ionen ausgetauscht werden (5, 52, 78, 81, 88, 90, 99). Eine signifikante Hemmung des Carnitintransportes durch hOCTN2 wird durch folgende Substanzen verursacht: D-Carnitin, Acetyl-DL-

Carnitin,  $\gamma$ -Butyrobetain, Palmitoylcarnitin, Betain, Octanoylcarnitin, Verapamil (1, 5, 36, 46, 78, 81, 88, 90, 92).

## 1.5 *Xenopus laevis* Oozyten in der Elektrophysiologie

*Xenopus laevis*, der südafrikanische Krallenfrosch, gehört der einzigen der sechs *Xenopus* Spezies an, die als Labortier verwendet wird. Alle *Xenopus* Frösche sind Aerobier, die allerdings vollständig im Wasser leben (34). Sie sind an ihrer Dorsalseite normalerweise schwärzlich pigmentiert, aber ihre Haut enthält Chromatophoren, sodaß sie sich durch Farbwechsel ihrer Umwelt rasch anpassen können (26).

Erstmals wurden *Xenopus laevis* Frösche experimentell zur Schwangerschaftstestung eingesetzt. Dazu wurde weiblichen Fröschen der Urin fraglich schwangerer Frauen injiziert; im positiven Fall löste das im Urin schwangerer Frauen enthaltene HCG bei den Fröschen eine Eiablage aus. Obwohl *Xenopus laevis* Frösche heute nicht mehr zu diesem Zweck verwendet werden, sind sie in der Entwicklungsbiologie immer noch ein häufig gebrauchtes Tiermodell (19). Am meisten Verwendung finden in der modernen Forschung aber die Oozyten der *Xenopus laevis*. Bereits 1971 zeigten Gurdon *et al.*, daß die Oozyten exogene mRNA nach Mikroinjektion im Zytoplasma als Proteine exprimieren (33). In den folgenden Jahren konnten anhand der Oozyten die molekularen Mechanismen second-messenger vermittelter Neurotransmitterantworten aufgeklärt werden. Zu Beginn der 80er Jahre gelang die Expression von funktionellen Neurotransmitterrezeptoren und Ionenkanälen in Oozyten (4, 89). Gegenwärtig dienen Oozyten vielen Arbeitsgruppen als Modell für neurotransmitter- und spannungsabhängige Ionenkanäle und Transporter. Besonders interessant ist hierbei die Aufklärung von Struktur-/ Funktionsbeziehungen von Membranproteinen durch den Vergleich von Wildtypen und Mutanten (17).

Zwei Eigenschaften haben die *X. laevis* Oozyten zu einem attraktiven Experimentiersystem gemacht – der große Durchmesser von 1.3 mm und die maternale Reserve einer großen Menge an Enzymen, Proteinen und Organellen für die embryonale Entwicklung, die auch der Expression exogener mRNA zugute kommt. Die Oozyten können auch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen und Glykosylierungen vieler fremder Proteine korrekt ausführen (15).

Aufgrund dieser morphologischen und funktionellen Vorteile können die meisten modernen elektrophysiologischen Methoden an Oozyten angewendet werden. Bei dem einfachsten Versuchsaufbau, der Current Clamp Methode, wird mit einer einzelnen intrazellulären Mikroelektrode das Membranpotential gegen eine geerdete Referenzelektrode im Bad gemessen. Häufiger angewendet wird die Voltage Clamp Methode, mit der auch bei der vorliegenden Arbeit gemessen wurde. Hierbei arbeitet man mit zwei intrazellulären Mikroelektroden, von denen die eine das Membranpotential der Zelle auf einen festgelegten Wert klemmt und die andere direkt den fließenden Strom mißt (Kap.2.5.1.). Außerdem können an devitellinisierten Oozyten mit der Patch Clamp Methode Messungen an einzelnen Ionenkanälen durchgeführt werden.

Man unterscheidet nach Dumont sechs unterschiedliche Reifestadien der Oozyten (21). Für Mikroinjektionsstudien werden gewöhnlich nur die ganz ausgewachsenen Oozyten des Reifestadiums VI verwendet. Diese sind auf natürliche Weise am Ende der G<sub>2</sub>-Phase des Zellzyklus arretiert (77) und werden von innen nach außen von folgenden vier Zellschichten umgeben: der Vitellinmembran, einer Lage aus Follikelzellen, der Theka und einer Epithelschicht. Für unsere Zwecke wurden nur sogenannte defollikulierte Oozyten verwendet, bei denen die drei äußeren Zellschichten entfernt worden waren. Die Defollikulierung kann entweder mechanisch oder enzymatisch erfolgen. Voll ausgewachsene Oozyten haben ein sehr charakteristisches Aussehen: der schon äußerlich sichtbaren Halbierung in eine schwarze animalische und eine weiße vegetative Hemisphäre entspricht eine zytoplasmatische Polarisierung. Die melaninhaltige animalische Hemisphäre enthält den Zellkern und den größten Teil der Mikrovilli, des endoplasmatischen Retikulums und des Zytoskeletts. Funktionell stellt sie den Eintrittsort für das Spermium dar und weist eine höhere Dichte an Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Cl<sup>-</sup>-Kanälen auf als die helle vegetative Hemisphäre, die mehr RNA enthält und deren laterale Membranmobilität größer zu sein scheint (17). Die vollständige Bedeutung der asymmetrischen Organisation der Oozyte ist jedoch bis heute noch nicht aufgeklärt.

Auch wenn die *Xenopus*-Oozyten viele günstige Eigenschaften für die Untersuchung von Membranproteinen nach Injektion exogener cRNA haben, gibt es dennoch einige mögliche Fehlerquellen zu bedenken: obwohl die Oozyten normalerweise fremde RNA problemlos exprimieren, gibt es posttranslationale Modifikationsschritte wie Glykosylierung und Phosphorylierung, die gewebespezifisch ablaufen und in einigen Fällen

nachgewiesenermaßen unkorrekt ausgeführt wurden (85). Die Defollikulierung verursacht an der Vitellinmembran kleine Defekte, die sich wie unspezifische Ionenkanäle verhalten können, nach Stunden bis Tagen aber wieder verheilen (18, 47, 72). Einen anderen Unsicherheitsfaktor stellt die Verwendung unterschiedlicher Oozyten- und RNA-Präparationen dar, der vermieden werden kann, wenn man möglichst viele verschiedene Oozyten- und RNA-Batches vergleicht.

## 1.6 Fragestellung der Arbeit

Folgende Aspekte des Carnitintransportes durch hOCTN2 sollten mit elektrophysiologischen Messungen und Flux Messungen mit  $^3\text{H}$ -markiertem Carnitin an hOCTN2 exprimierenden *Xenopus laevis* Oozyten im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden:

1. Allgemeine und funktionelle Charakterisierung des Carnitintransportes durch hOCTN2: Carnitinaffinität, Sättigung des Transportes, Stereospezifität, Natriumabhängigkeit und Natriumstöchiometrie, Spannungsabhängigkeit, Einfluß des extra- und intrazellulären pH-Wertes und Transportmechanismus.
2. Pharmakologische Charakterisierung des humanen organischen Kationentransporters hOCTN2: Substratspezifität, Hemmung des Carnitintransportes durch verschiedene Pharmaka.
3. Vergleich der Substratspezifität von hOCTN2 mit zwei anderen Mitgliedern der Organischen Kationentransporter Familie (rOCT1 und hOCT2).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Lösungen und Substanzen

ND 96 war die Grundlösung für alle Versuche und für die Präparation der Oozyten. Für bestimmte Versuche wurde sie variiert.

#### 2.1.1 ND 96

**Tab. 3:** Zusammensetzung der ND 96-Lösung

Substanz	Konzentration (mM)
NaCl	96
KCl	2
CaCl <sub>2</sub>	1.8
MgCl <sub>2</sub>	1
Tris-HEPES	5
pH	7.4

Tris-HEPES ist Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan-N-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethan-sulfonat (pKs 7.4) und diente als Puffer.

#### 2.1.2 ND 96 mit variiertem Natriumgehalt

Für die Versuche zur Untersuchung der Abhängigkeit des Carnitintransportes von der extrazellulären Natriumkonzentration wurde die Grundlösung ND 96 verändert. Dabei wurde Natriumchlorid durch äquimolare Mengen NMDG (N-Methyl D-Glucamin) ersetzt. NMDG muß mit 37 %iger Salzsäure titriert werden. Für diese Versuche wurden alle Lösungen auf 130 mM Natriumchlorid bezogen, um bei allen hier verwendeten Lösungen eine einheitliche Osmolarität zu erreichen.

**Tab. 4:** ND 96 mit variiertem Natriumgehalt

Lösung	Natriumchlorid (mM)	NMDG (mM)
ND 96-0	0	130
ND.96-1	1	129
ND.96-5	5	125
ND 96-10	10	120
ND 96-40	40	90
ND 96-70	70	60
ND 96-130	130	0

### 2.1.3 ND 96-Oozytenaufbewahrungslösung

**Tab. 5:** Zusammensetzung der Oozytenaufbewahrungslösung

Substanz	Konzentration
NaCl	96 mM
KCl	2 mM
CaCl <sub>2</sub>	1.8 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
Tris-HEPES	5 mM
Natriumpyruvat	2.5 mM
Theophyllin	0.5 mM
Gentamycin	50 µg/l
pH	7.4

Theophyllin hemmt die weitere Reifung der Oozyten über eine Verminderung der Proteinbiosynthese und durch Veränderungen der Zellmembran (61). Das Antibiotikum Gentamycin wurde der Aufbewahrungslösung zugesetzt, um Infektionen zu verhindern.

### 2.1.4 OR-2 (Oozyten-Ringer, kalziumfrei)

**Tab. 6:** Zusammensetzung der OR-2-Lösung

Substanz	Konzentration (mM)
NaCl	82.5
KCl	2
MgCl <sub>2</sub>	1
Tris-HEPES	5
PH	7.4

Die kalziumfreie OR-2-Lösung wurde während der Defollikulierung mittels Kollagenase verwendet, da Kalzium Proteasen aktiviert, die zu einer Schädigung der Oozyten führen. (54, 76).

### 2.1.5 Kollagenase A

Es wurden je nach Aktivität 1-3 g Kollagenase/ 1 OR-2 verwendet. Bezogen wurde die Kollagenase von Fa. Böhlinger, Mannheim.

### 2.1.6 Weitere verwendete Substanzen

**Tab. 7:** Substanzen und Lösungsmittel

Substanz	Nomenklatur
3-Aminobezoesäure-ethylester	
Acetyl-L-Carnitin	(R)-3-Acetoxy-4-(trimethylammonium)2-Propylpentansäure
N-Acetylcarnitin	
Betain	Betainhydrochlorid
Cholin	(2-Hydroxyl)trimethylammonium
DMSO	Dimethylsulfoxide
D-Carnitin	(+)- $\beta$ -Hydroxy- $\gamma$ -(trimethylammonium)butyrat
L-Carnitin	(-)- $\beta$ -Hydroxy- $\gamma$ -(trimethylammonium)butyrat

Substanz	Nomenklatur
Emetin	(+)Emetindihydrochlorid
GABA	$\gamma$ -Amino-n-Buttersäure
DL- $\beta$ -Hydroxybuttersäure	
Methansulfonat	
Palmitoyl-DL-Carnitinchlorid	
Pivalinsäure	Trimethyllessigsäure
Quinidin	Quinidinhydrochlorid
Taurin	2-Aminoethansulfonsäure
TEA	Tetraethylammoniumchloride
Valproinsäure	2-Propylpentansäure
Verapamil	5-(N-(3,4-Dimethoxyphenethyl)-N-methylamino)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-isopropylvaleronitril

Die zugehörigen Strukturformeln sind im Kapitel Ergebnisse dargestellt. Alle Substanzen wurden von den Firmen Sigma (München), Serva (Heidelberg), Merck (Darmstadt) und Roth (Karlsruhe) bezogen.

Die verwendeten Substanzen wurden als frische Stammlösungen angesetzt und zu den Experimentierlösungen pipettiert, um die erwünschte Endkonzentration zu erreichen. Alle Lösungen wurden mit NaOH oder HCl auf den entsprechenden pH-Wert titriert. Für die Versuche mit variiertem Natrium-Gehalt wurde KOH anstelle von NaOH verwendet. Die Osmolarität der Versuchslösungen betrug jeweils etwa 200-220 mosmol/l. Bei in DMSO gelösten Substanzen lag die Endkonzentration von DMSO unter 0.5 %.

## 2.2 Oozytenpräparation

Die Oozyten wurden aus den Ovarien von weiblichen *Xenopus laevis* Fröschen entnommen. Da die Ovarien eines ausgewachsenen *Xenopus*-Weibchens über 30 000 reife Oozyten enthalten, genügt meist die Entnahme eines Teils eines Ovars. Hierzu wurde ein Frosch für 15-20 min in einer 0.1 %igen 3-Aminobezoesäureethylester-Lösung anästhesiert. Sobald der Frosch vollständig betäubt war, wurde er mit dem Rücken auf ein Eisbett gelegt, um die Narkose aufrecht zu erhalten und um Blutungen zu minimie-

ren. Nachdem die Bauchhaut des Frosches mit 70 %igem Ethylalkohol desinfiziert und von Schleim befreit worden war, wurde unter semisterilen Bedingungen oberhalb der Inguinalfalte ein ca. 1 cm langer Schnitt durch Haut, Faszie und Muskelschicht gelegt, bis man in den Peritonealraum gelangte. Die Ovarialsäckchen, die aus mehreren Lappen bestehen und den gesamten Unterbauch ausfüllen, wurden vorsichtig mit anatomischen Pinzetten mobilisiert, und je nach Anzahl der benötigten Oozyten läppchenweise oder im Ganzen abgesetzt. Die Wunde wurde mit resorbierbarem chirurgischen Nahtmaterial (Ethicon) schichtweise verschlossen. Der Frosch wurde bis zum vollständigen Erwachen aus der Narkose in einen Behälter mit wenig Leitungswasser gesetzt, wobei der Kopf über Wasser sein mußte, um ein Ertrinken des Tieres zu verhindern. Die Operation kann problemlos unter semisterilen Bedingungen durchgeführt werden, weil die Haut der *Xenopus laevis* Frösche Peptide mit antimikrobieller Aktivität absondert, die Wundinfektionen zuverlässig verhindern (6, 105).

Die entnommenen Ovarialsäckchen, die Oozyten aller Reifestadien enthalten, wurden in kalziumfreie OR-2 Lösung gelegt und vorsichtig mit feinen Pinzetten in möglichst kleine Einheiten zerteilt, um die spätere Separation mittels Kollagenaseverdau zu erleichtern. Anschließend wurde der detritushaltige Überstand abgegossen. Die Oozyten wurden zur weiteren Defollikulierung für 30-60 Minuten mit 15 ml Kollagenaselösung (15 mg Kollagenase A auf 15 ml OR-2) unter ständiger Bewegung bei 35°C inkubiert. Nachdem man sich durch Kontrolle unter der Stereolupe davon überzeugt hatte, daß der Großteil der Oozyten vereinzelt und defollikuliert war, wurde die Kollagenasebehandlung durch mehrfaches Spülen mit ND 96-Lösung beendet. Reife einwandfreie Oozyten des Stadiums V und VI mit gleichmäßiger Färbung (21) wurden unter der Stereolupe aussortiert und in kleinen Mengen von ca. 30 Zellen pro Petrischale bis zur weiteren Verarbeitung bei 12-16°C unter ständiger Bewegung im Inkubator in antibiotikahaltiger ND 96-Lösung aufbewahrt. Die ständige Bewegung im Schüttler verhinderte Deformationen und Verklebungen. Unmittelbar vor Injektion der cRNA wurden die Oozyten erneut sortiert.

### **2.3 Injektion der cRNA**

Die cRNA für hOCTN2 wurde von Angelika Bröer und Birgitta Noll, Physiologisches Institut Tübingen, hergestellt. Der cDNA-Klon wurde von Angelika Bröer aus einer

HeLa-Zellkultur mittels PCR kloniert und in einen Oozytenexpressionsvektor eingesetzt. Die cRNA für rOCT1 und hOCT2 waren die freundliche Gabe von Hermann Koepsell, Anatomisches Institut der Universität Würzburg.

Die cRNA wurde mit Hilfe eines in drei Ebenen beweglichen Mikromanipulators und eines vollautomatischen Nanoliterinjektors (Fa. WPI, Sarasota, Fa., USA) unter dem Stereomikroskop direkt ins Zytoplasma der Oozyte injiziert. Wegen der Empfindlichkeit der cRNA für unspezifische RNAsen wurde dabei mit Latexhandschuhen gearbeitet und der Arbeitsplatz desinfiziert.

Mit Hilfe eines Mikroelektrodenpullers (DMZ Universal-Puller der Firma Zeits, Augsburg) wurden aus Glaskapillaren (Fa. WPI, Sarasota, Fa, USA) Injektionsnadeln mit sehr langer Spitze gezogen. Nachdem unter dem Stereomikroskop die Spitze abgebrochen worden war, so daß die Nadelspitze einen Öffnungsdurchmesser von 20-40  $\mu\text{m}$  hatte, wurde die Nadel mit Paraffinöl befüllt, um eine Abdichtung zwischen dem Metallkolben des Nanoliterinjektors und der Nadelspitze zu erreichen. Die bereits auf 2  $\mu\text{l}$  vorproportionierte cRNA-Lösung wurde nach dem Auftauen kurz in einer Mikrozentrifuge (Fa. Qualitron, 6400 rpm, 2000xg) zentrifugiert, auf eine sterile Petrischale pipetiert und durch Zurückfahren des Metallkolbens des Nanoinjektors luftblasenfrei in die Injektionsnadel aufgezogen. Die am Vortag präparierten Oozyten wurden erneut sortiert und in eine mit ND 96 gefüllte Petrischale gelegt. Der Boden der Petrischale war mit einem Polypropylennetz ausgekleidet, damit die Oozyten bei der Injektion fixiert waren. Die von dem Mikromanipulator gehaltene Injektionsnadel wurde in einem Winkel von ca. 45° an die Oozyte herangeführt, die Spitze der Nadel vorsichtig eingestochen und eine Menge von 50 nl cRNA/Oozyte injiziert. Die Konzentration der Injektionslösung lag zwischen 300-500 ng RNA/ $\mu\text{l}$  Lösung, so daß pro Oozyte 15-25 ng cRNA injiziert wurden.

Nach der Injektion wurden die Oozyten in antibiotikahaltiger ND 96 in Gewebekulturplatten vereinzelt bei 15 °C unter ständiger Bewegung im Inkubator aufbewahrt. Nach 3-10 Tagen hatten die Zellen den Carnitincarrier genügend exprimiert, so daß ausreichend große Ströme bzw. Aufnahmezeiten meßbar waren.

## 2.4 Geneclamp Geräte und Software

Der elektrophysiologische Meßplatz bestand aus folgenden Geräten:

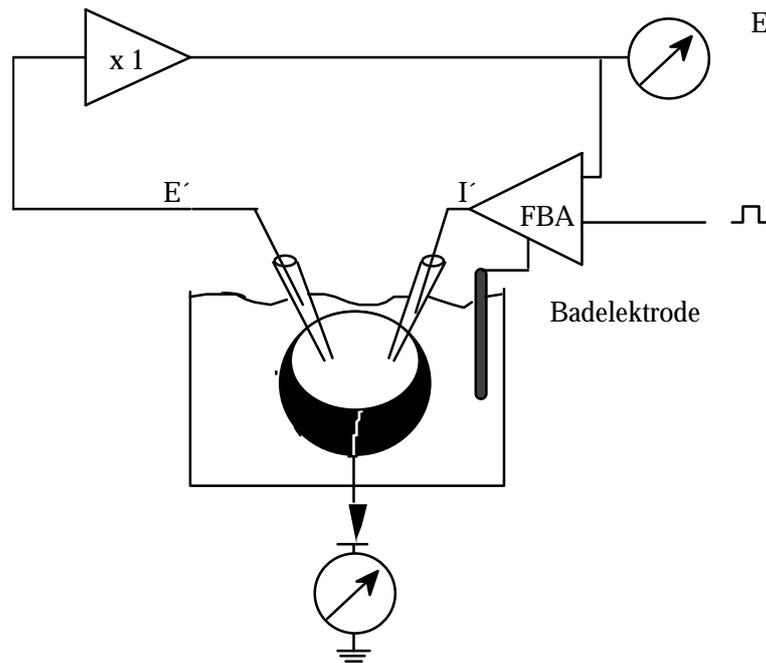
- 500 – Verstärker mit HS – 2A Headstages und VG – 2A x100 Virtual Ground Bath Clamp der Fa. Axon Instruments, Foster City, USA
- Oszilloskop HM 205-3 der Fa. Hameg, Frankfurt/ Main
- DA-Wandler MacLab/4e von AD Instruments
- Apple Macintosh Performa 450

Als Software wurde *Chart* (Version 3.5.7.) von AD Instruments (MacLab) eingesetzt.

## 2.5 Elektrophysiologie

### 2.5.1 Zwei Elektroden Voltage Clamp Methode

Bei der Zwei-Elektroden Voltage-Clamp Methode wird das Membranpotential der Oozyte auf einen vorgegebenen Wert geklemmt (84, 86). Mit der ersten intrazellulären Elektrode  $E'$  wird das aktuelle intrazelluläre Potential aufgezeichnet, indem sie das Membranpotential gegen eine geerdete extrazelluläre Referenzelektrode, die sogenannte Agarbrücke, mißt (3). Das aktuell gemessene Membranpotential wird über den Rückkopplungsverstärker (Gene Clamp Amplifier, Axon Instruments) (FBA) mit dem Sollwert verglichen und über die zweite intrazelluläre Elektrode  $I'$  wird jeweils soviel Strom appliziert, daß der vorgegebene Wert aufrecht erhalten wird (2, 20, 35, 77). Wird nun eine Substanz elektrogen über die Membran transportiert, ist der Strom, der vom Rückkopplungsverstärker zu applizieren ist, um das geänderte Membranpotential wiederaufzubauen, der gemessene Parameter.



**Abb. 4:** Schematische Darstellung der Meßanordnung für Two-Electrode-Voltage-Clamp. Hierbei sind:  $I$  der gemessene Strom, und  $I'$  die Elektrode, über die der Strom zur Aufrechterhaltung der vorgegebenen Spannung appliziert wird.  $E'$  ist die Elektrode, die das Membranpotential  $E$  mißt. FBA (Feed-Back-Amplifier) ist der Rückkopplungsverstärker, der gleichzeitig Spannung und Strom mißt und den Haltestrom appliziert (35).

### 2.5.2 Aufbau des Meßstandes

Die Oozyte befand sich während des Experimentes in einer speziell konstruierten Meßkammer mit einem Füllungsvolumen von 3.5 ml, die kontinuierlich über eine Schwerkraftperfusion (Flußrate 20 ml/min) und eine Absaugpumpe (Fa. Neuberger) mit Experimentierlösung durchspült wurde. Auf diese Weise konnte innerhalb von 10-15 Sekunden der Inhalt der Meßkammer komplett ausgetauscht werden. Mit Hilfe von Mikromanipulatoren wurden die intrazellulären Mikroelektroden unter visueller Kontrolle durch ein Stereomikroskop in die Oozyte eingestochen. Die intrazellulären Mikroelektroden wurden aus Borosilikatglaskapillaren (Fa. Clark, Typ GC150TF-15, Außendurchmesser 1.5 mm) im Mikroelektrodenpuller (DMZ Universal-Puller der Firma Zeits, Augsburg) zu dünnwandigen Elektrodenpipetten ausgezogen und mit 3 M KCl gefüllt. Über die KCl-Füllung wurde der elektrische Kontakt zu den chloridierten Silberdrahtelektroden hergestellt, die über die HS-2A-Headstages (Fa. Axon Instruments) mit dem Rückkopplungsverstärker (GeneClamp 500 Amplifier, Axon Instruments) in

Verbindung standen. Alle verwendeten intrazellulären Mikroelektroden hatten einen Widerstand zwischen 0.3 und 3 M $\Omega$  (58, 77). Die extrazelluläre Referenzelektrode, ein Ag-AgCl<sub>2</sub>-Draht, stand über eine Brücke aus 3 % Agar und 3 M KCl-Lösung mit dem Bad in Verbindung und hatte die Aufgabe das Potential der Badlösung auf 0 mV zu klemmen (3).

Der Experimentiertisch war durch luftgefüllte Stoßdämpfer gegen äußere Erschütterungen geschützt und befand sich zur Abschirmung gegen äußere elektrische Störeinflüsse innerhalb eines Faraday'schen Käfigs (63). Alle Daten wurden mit 10 Hz gefiltert und mit einer Samplingrate von 100 Datenpunkten pro Minute über ein MacLab-Interface in einem Macintosh-Computer aufgenommen und ausgewertet.

### **2.5.3 pH-sensitive Elektroden**

Um pH-sensitive Elektroden herzustellen, wurden Borosilikatglaskapillaren (Fa. Clark, Typ GC150TF-15, Außendurchmesser 1.5 mm) mit dem Mikroelektrodenpuller (DMZ Universal-Puller der Firma Zeits, Augsburg) zu dünnwandigen Elektrodenpipetten ausgezogen. Sie wurden für 15 Minuten bei 200 °C gehärtet und anschließend innen mit Silandampf silanisiert (Hexamethyldisilazane, Fluka Chemicals). Danach wurde eine ca. 300  $\mu$ M lange Säule eines H<sup>+</sup>-Cocktails (Hydrogen Ionophore II-Cocktail A, Fluka Chemicals) in die Elektrodenspitze instilliert und die Elektrode retrograd mit 100 mM KCl Lösung befüllt. Die KCl Lösung war mit 10 mM HEPES auf pH 7.0 gepuffert. Um die Elektroden zu kalibrieren, wurden Lösungen mit pH 6.0, 7.0 und 8.0 verwendet. Es wurden nur Elektroden verwendet, die einen linearen Anstieg von >50 mV pro pH-Einheit im Kalibrierungsbereich zeigten und vor und nach dem Einstechen in die Oozyte eine stabile Kalibrierung aufwiesen. Die Signale wurden mit einem Elektrometer (WPI, Modell FD 223) aufgenommen. Der intrazelluläre pH-Wert der Oozyte wurde anhand der Kalibrierungskurve der pH-sensitiven Elektrode als die Differenz zwischen dem Membranpotential in Millivolt, das mit einer 3 M KCl- Elektrode gemessen wurde, und dem gleichzeitig mit der pH-Elektrode aufgezeichneten Potential berechnet (93, 95).

## 2.6 Flux Messungen mit $^3\text{H}$ -markiertem Carnitin

Für die Flux Messungen mit  $^3\text{H}$ -markiertem Carnitin wurden pro Messung Gruppen von sieben cRNA- oder sieben nicht- injizierten Oozyten je zweimal mit 4 ml ND 96 Lösung gewaschen. Sie wurden dann bei Raumtemperatur in einem 5 ml Polypropylen Gefäß (Fa. Eppendorf) inkubiert, das 100µl ND 96 Lösung enthielt, in welcher 10 kBp  $^3\text{H}$ -Carnitin (Biotrend, Köln) gelöst waren. Zusätzlich wurden der Inkubationslösung unmarkierte Testsubstanzen in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt (Kap. 3.3.3). Der Transport wurde nach der gewünschten Zeit abgebrochen, indem die Oozyten dreimal mit 4 ml eiskalter ND 96 Lösung gewaschen wurden. Die einzelnen Oozyten wurden in Szintillationsröhrchen transferiert und durch Zugabe von 200 µl 10 % SDS lysiert. Nach der Lysierung wurden 3 ml Szintillationslösung zugegeben und die Radioaktivität durch Flüssigszintillationszählung im Szintillator bestimmt.

## 2.7 Durchführung der Experimente

Die Experimente wurden 3-10 Tage nach Injektion der cRNA bei Zimmertemperatur durchgeführt. Alle Messungen wurden an verschiedenen Oozytenpräparationen und an verschiedenen Tagen wiederholt. Dabei ergaben sich keine qualitativen Unterschiede, lediglich die Größe der maximalen Ströme bzw. der Aufnahme variierte in Abhängigkeit des Zeitpunktes der cRNA-Injektion und der jeweiligen Oozytenpräparation. Die Kontrollgruppen wurden immer in jeweils gleichen Zeitabständen gemessen.

Für die elektrophysiologischen Messungen wurde das Membranpotential der Oozyten auf -60 bzw. -90 mV geklemmt. Bei einzelnen Versuchen wurde das Membranpotential zwischen -10 und -90 mV variiert.

## 2.8 Auswertung und Statistik

Alle Konzentrations-Wirkungskurven wurden mit einer einfachen Michaelis-Menten-Gleichung oder der Hill-Gleichung berechnet.

(1) Michaelis-Menten -Gleichung

$$I = I_{\text{max}} * \frac{C}{C + K_m}$$

wobei  $I$  der gemessene Strom,  $I_{\max}$  der maximale Strom,  $C$  die gegebene Substratkonzentration und  $K_m$  die Substratkonzentration bei halbmaximalem Strom ist (62).

(2) Hill-Gleichung

$$I = I_{\max} * \frac{C^n}{C^n + K_m^n}$$

Der Hill-Koeffizient  $n$  gibt Hinweise auf die Anzahl von Substratbindungsstellen am Enzym bzw. Transporter. Dies gilt jedoch nur für den Fall einer starken kooperativen Bindung des Substrates. Für die Kinetiken muß deshalb angenommen werden, daß die nächst höhere natürliche Zahl zu  $n$  lediglich die minimale Zahl an möglichen Bindungsstellen angibt (80).

Alle Werte sind als arithmetisches Mittel (Mean)  $\pm$  dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM: Standard error of the mean) angegeben. "n" gibt die Anzahl der voneinander unabhängigen Messungen an. Die Werte wurden mit dem gepaarten und ungepaarten Student t-Test auf Signifikanz geprüft, und nur Werte mit  $p < 0.05$  wurden als signifikant angesehen.

### 3 Versuche und Ergebnisse

#### 3.1 Elektrogene Eigenschaften des hOCTN2

*Xenopus*-Oozyten wurde die cRNA des Na<sup>+</sup>-abhängigen Carnitintransporters/ organischen Kationentransporters hOCTN2 injiziert. Kontrolloozyten wurde die gleiche Menge RNase freies Wasser injiziert. Pro Oozyte wurde jeweils eine Menge von 50 nl injiziert. Die Konzentration der cRNA betrug 450 ng/μl Injektionslösung (22.5 ng/ Oozyte). Die Messungen wurden 3-10 Tage nach der Injektion durchgeführt.

Perfusion mit 1 mM L-Carnitinlösung für eine Dauer von 30 Sekunden bewirkte bei hOCTN2 injizierten Zellen im Currentclamp-Modus eine Depolarisation von  $5.2 \pm 0.7$  mV, jedoch nicht in Kontrolloozyten ( $n = 5$ ). Parallel dazu zeigte sich im Voltageclamp-Modus bei einem Haltepotential von  $-60$  mV ein einwärts gerichteter Strom von  $10.3 \pm 0.9$  nA ( $n = 5$ ). Kontrolloozyten zeigten unter diesen Bedingungen lediglich einen Stromfluß von  $0 \pm 0$  nA über die Membran ( $n = 5$ ) (Tab.8).

**Tab. 8:** Gemessene L-Carnitinströme bei hOCTN2-injizierten Oozyten und Kontrollzellen

	<b>HOCTN2</b>	<b>Kontrollzellen</b>
Stromstärke (nA)	$10.3 \pm 0.9$	$0 \pm 0$
Zellzahlen (n)	5	5

Der durch L-Carnitin induzierte Strom zeigte außerdem eine Spannungsabhängigkeit. Diese war bei niedrigen L-Carnitinkonzentrationen ( $30 \mu\text{M}$ ) stärker ausgeprägt, als bei höheren L-Carnitinkonzentrationen ( $1 \text{mM}$ ).

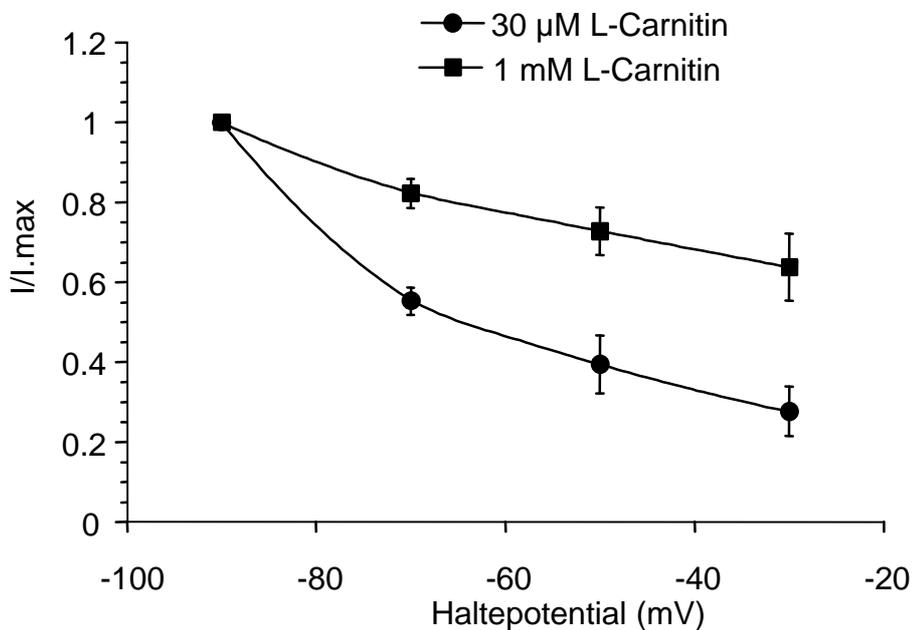
Um die Spannungsabhängigkeit zu untersuchen, wurde an derselben Zelle der L-Carnitin induzierte Strom jeweils bei verschiedenen Haltepotentialen gemessen. Dazu wurde das Membranpotential beginnend bei  $-90$  mV im Bereich von  $-90$  mV bis  $-30$  mV in Schritten von  $20$  mV verändert. Bei einigen Oozyten wurde das Haltepotential in umgekehrter Reihenfolge verändert, um einen Sättigungseffekt auszuschließen. In beiden Fällen ließ sich aber derselbe Effekt beobachten. Die Oozyten wurden bei jedem

neuen Haltepotential nach Erreichen eines stabilen Membranpotentials jeweils für 30 Sekunden mit 30  $\mu\text{M}$  bzw. 1 mM L-Carnitinlösung umspült, bevor sie wieder mit der Standardexperimentierlösung ND 96 perfundiert wurden. Es wurden für jede Konzentration  $n = 6$  Oozyten gemessen.

Der Betrag der L-Carnitin induzierten Ströme wurde bei allen Zellen auf den jeweiligen Wert bei  $-90$  mV normiert, um die einzelnen Zellen miteinander vergleichen zu können. Der Wert des L-Carnitin induzierten Stromes bei  $-90$  mV entspricht also 1. Die Werte wurden nach der folgenden Formel berechnet:

$$I_{\text{Norm}} = \frac{I_{\text{(Membranpotential)}}}{I_{\text{(Carnitin (-90 mV))}}}$$

Die Größe der L-Carnitin induzierten Ströme nahm mit zunehmender Depolarisierung der Oozyten ab, wobei der Effekt bei niedrigerer L-Carnitinkonzentration stärker ausgeprägt war.



**Abb. 5:** Spannungsabhängigkeit der L-Carnitin induzierten Ströme. Bei höheren L-Carnitinkonzentrationen war die Spannungsabhängigkeit stärker ausgeprägt.

**Tab. 9:** Vergleich des Einflusses verschiedener L-Carnitinkonzentrationen auf die Spannungsabhängigkeit. Die einzelnen Werte sind jeweils auf  $-90$  mV normiert. (n = 6)

Haltepotential (mV)	I/I max. (30 $\mu$ M) (n=6)	I/I max. (1mM) (n=6)
-90	$1.000 \pm 0.000$	$1.000 \pm 0.000$
-70	$0.553 \pm 0.035$	$0.823 \pm 0.036$
-50	$0.395 \pm 0.072$	$0.728 \pm 0.060$
-30	$0.277 \pm 0.062$	$0.637 \pm 0.840$

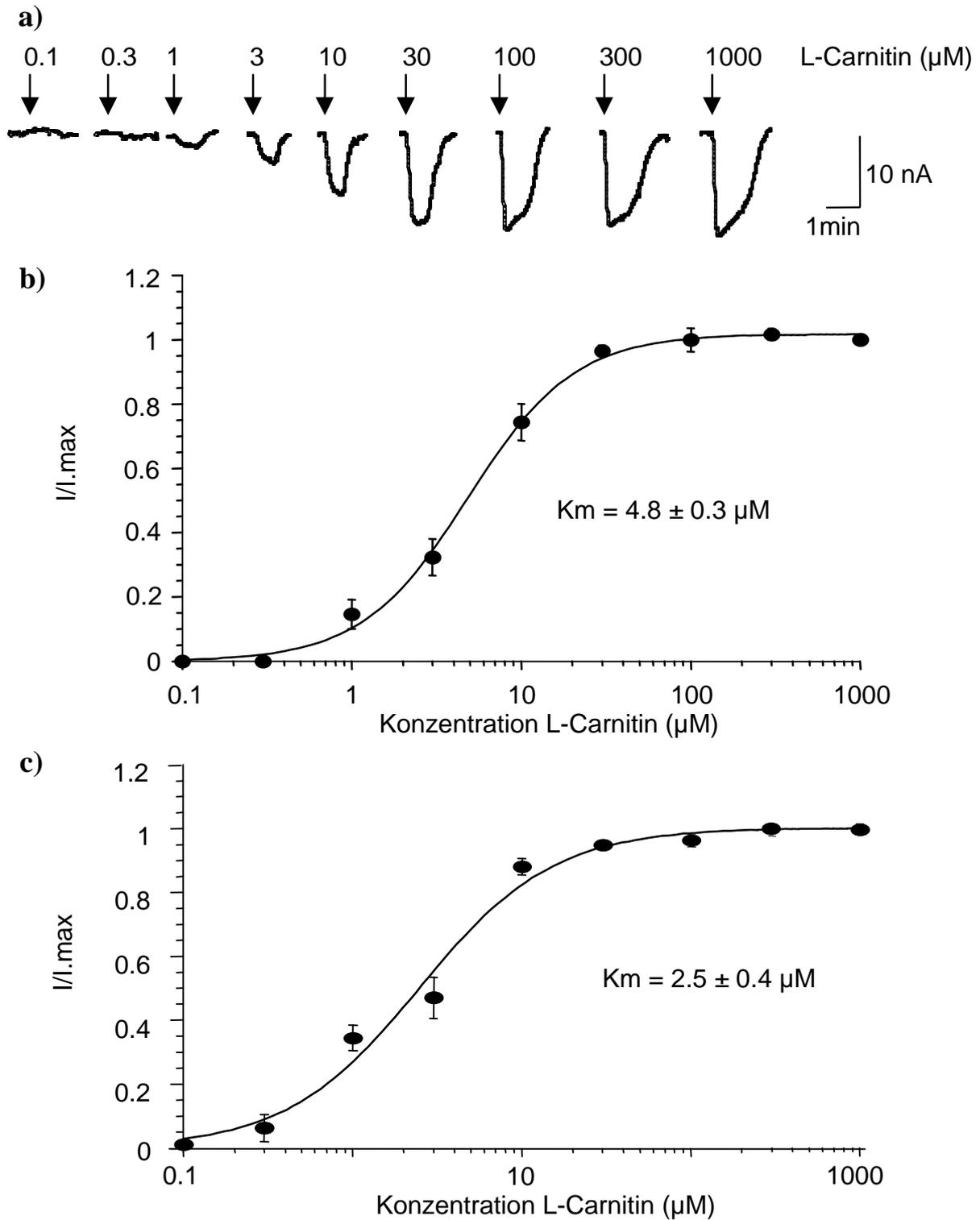
## 3.2 Allgemeine Charakterisierung des hOCTN2

### 3.2.1 L-Carnitinkinetik

Mit diesem Experiment sollte die Konzentrationsabhängigkeit und Sättigungscharakteristik des L-Carnitintransportes durch hOCTN2 genauer untersucht werden.

Das Experiment wurde an allen Zellen nacheinander bei zwei verschiedenen Haltepotentialen ( $-60$  mV und  $-90$  mV) wiederholt. Die Badlösung (ND 96) wurde jeweils für 30 Sekunden gegen Lösungen mit unterschiedlichem L-Carnitingehalt ausgetauscht, wobei die L-Carnitinkonzentration zwischen  $0.1$  und  $1000$   $\mu$ M variiert wurde.

Die durch L-Carnitin induzierten Ströme ergaben sigmoidale Konzentrations-Wirkungskurven, die mit Hilfe der Hill-Gleichung berechnet worden waren. Der induzierbare Strom war sättigbar und zeigte eine apparente L-Carnitinaffinität von  $4.9 \pm 0.3$   $\mu$ M bei einem Membranpotential von  $-60$  mV und eine apparente Affinität von  $2.5 \pm 0.4$   $\mu$ M bei einem Membranpotential von  $-90$  mV (n = 8). Der Hill-Koeffizient lag für die bei  $-60$  mV gemessene Kinetik bei  $1.3 \pm 0.1$  und bei  $1.1 \pm 0.2$  für die bei  $-90$  mV gemessene Kinetik. Daraus kann man schließen, daß pro Transportzyklus ein L-Carnitinmolekül transportiert wird. Der Signifikanztest mit dem gepaarten t-Test ergab keinen signifikanten Unterschied für die Km-Werte bei  $-60$  mV und  $-90$  mV. Um eine Vergleichbarkeit der einzelnen Zellen zu erreichen, wurde der Betrag des L-Carnitin induzierten Stromes bei jeder einzelnen Zelle auf den Wert des durch die höchste L-Carnitinkonzentration induzierten Stromes normiert.



**Abb. 6:** L-Carnitinkinetik. (a) Originalaufzeichnungen des L-Carnitin induzierten einwärtsgerichteten Stromes bei  $-60 \text{ mV}$ . (b) Zugehörige konzentrationsabhängige Kurve für L-Carnitin bei  $-60 \text{ mV}$ . (c) Konzentrationsabhängige Kurve für L-Carnitin bei  $-90 \text{ mV}$ .

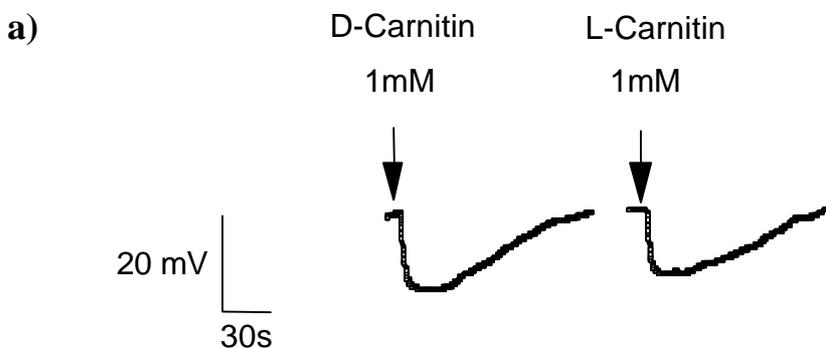
**Tab. 10:** Vergleich der L-Carnitinkinetiken bei zwei verschiedenen Haltepotentialen

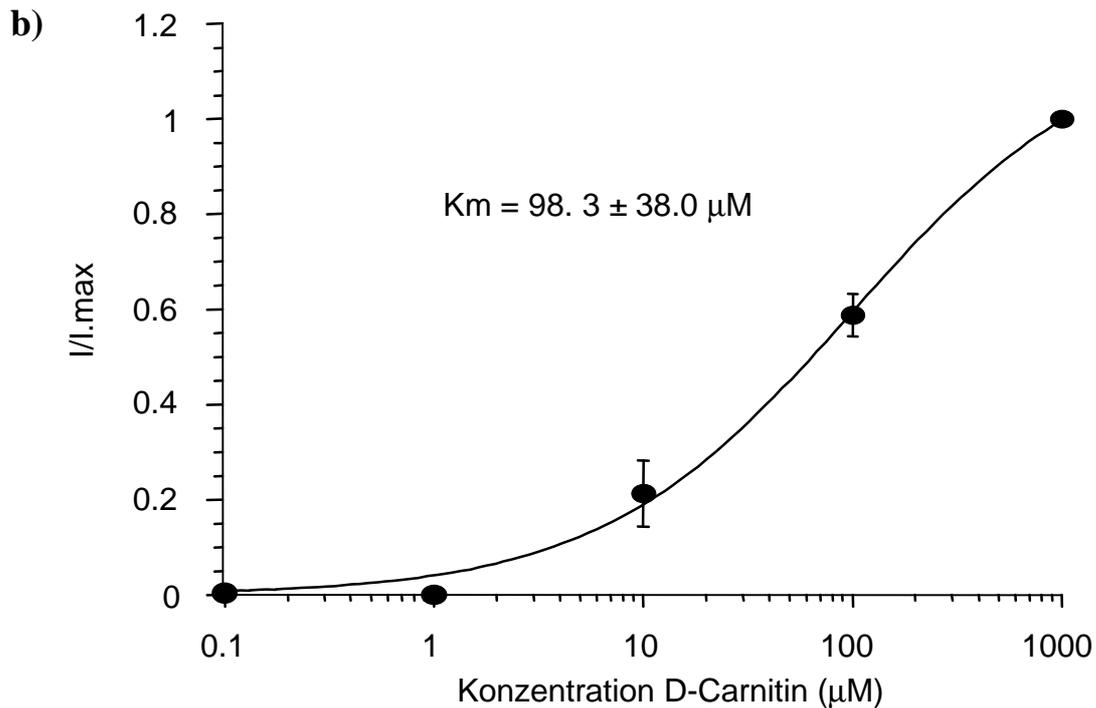
	apparente Affinität ( $\mu\text{M}$ )	Hill-Koeffizient
-60 mV (n=7)	$4.9 \pm 0.3$	$1.3 \pm 0.1$
-90 mV (n=7)	$2.5 \pm 0.4$	$1.1 \pm 0.2$

### 3.2.2 Stereospezifität

Um zu untersuchen, ob der Carnitintransport durch hOCTN2 stereospezifisch ist, wurde das gleiche Experiment wie in Kapitel 3.2.1 hier noch einmal mit D- statt L-Carnitin bei einem Haltepotential von  $-60$  mV wiederholt. In der schon beschriebenen Weise wurde eine Kinetik für D-Carnitin im Konzentrationsbereich von  $0.1$  bis  $1000$   $\mu\text{M}$  erstellt.

Biologisch aktiv ist zwar nur das L-Enantiomer (75), in der Literatur sind allerdings Fälle von Intoxikationen mit dem D-Isomer beschrieben (Kap. 1.1.1). Es konnte gezeigt werden, daß der Transport stereospezifisch für L-Carnitin ist. Die maximalen Ströme für beide Stereoisomere waren ähnlich groß;  $1$  mM D-Carnitin verursachte einen einwärtsgerichteten Strom von  $14.8 \pm 0.4$  nA, verglichen mit  $12.8 \pm 0.8$  nA für  $1$  mM L-Carnitin bei denselben Oozyten. (n = 5). Die Affinität für D-Carnitin war jedoch mit einem apparenten  $K_m$ -Wert von  $98.3 \pm 38.0$   $\mu\text{M}$  erheblich niedriger als für L-Carnitin ( $K_m = 4.9 \pm 0.3$   $\mu\text{M}$ ). Der Hill-Koeffizient lag für die D-Carnitinkinetik bei  $0.7 \pm 0.1$ . Es wurde also pro Transportzyklus vermutlich ein D-Carnitinmolekül transportiert.





**Abb. 7:** D-Carnitinkinetik bei  $-60$  mV. (a) Originalaufzeichnung eines D-Carnitin und eines L-Carnitin induzierten Stromes (b) Die konzentrationsabhängige Kurve für D-Carnitin induzierte Ströme wurde durch Fitting der Daten mit der Hill-Gleichung erhalten.

**Tab. 11:** Vergleich der Transporteigenschaften von D- und L-Carnitin

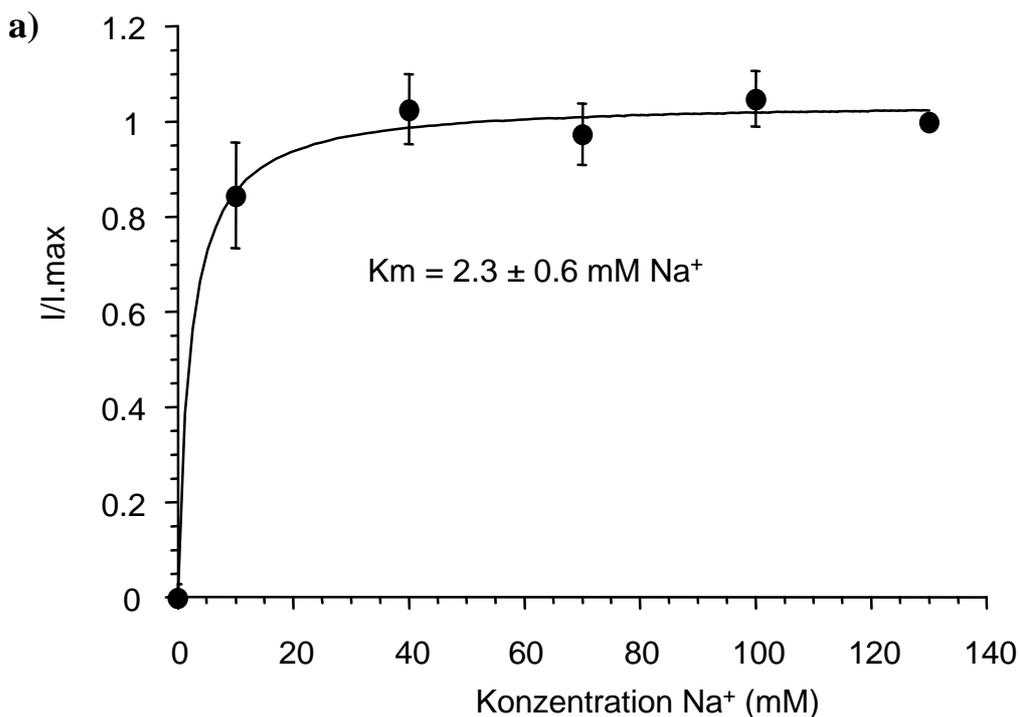
	Affinität ( $\mu\text{M}$ )	Hill-Koeffizient	$I_{\text{max}}$ (nA) bei 1mM
L-Carnitin ( $-60$ mV)	$4.9 \pm 0.3$	$1.3 \pm 0.1$	$12.8 \pm 0.8$
D-Carnitin ( $-60$ mV)	$98.3 \pm 38.0$	$0.7 \pm 0.1$	$14.8 \pm 0.4$

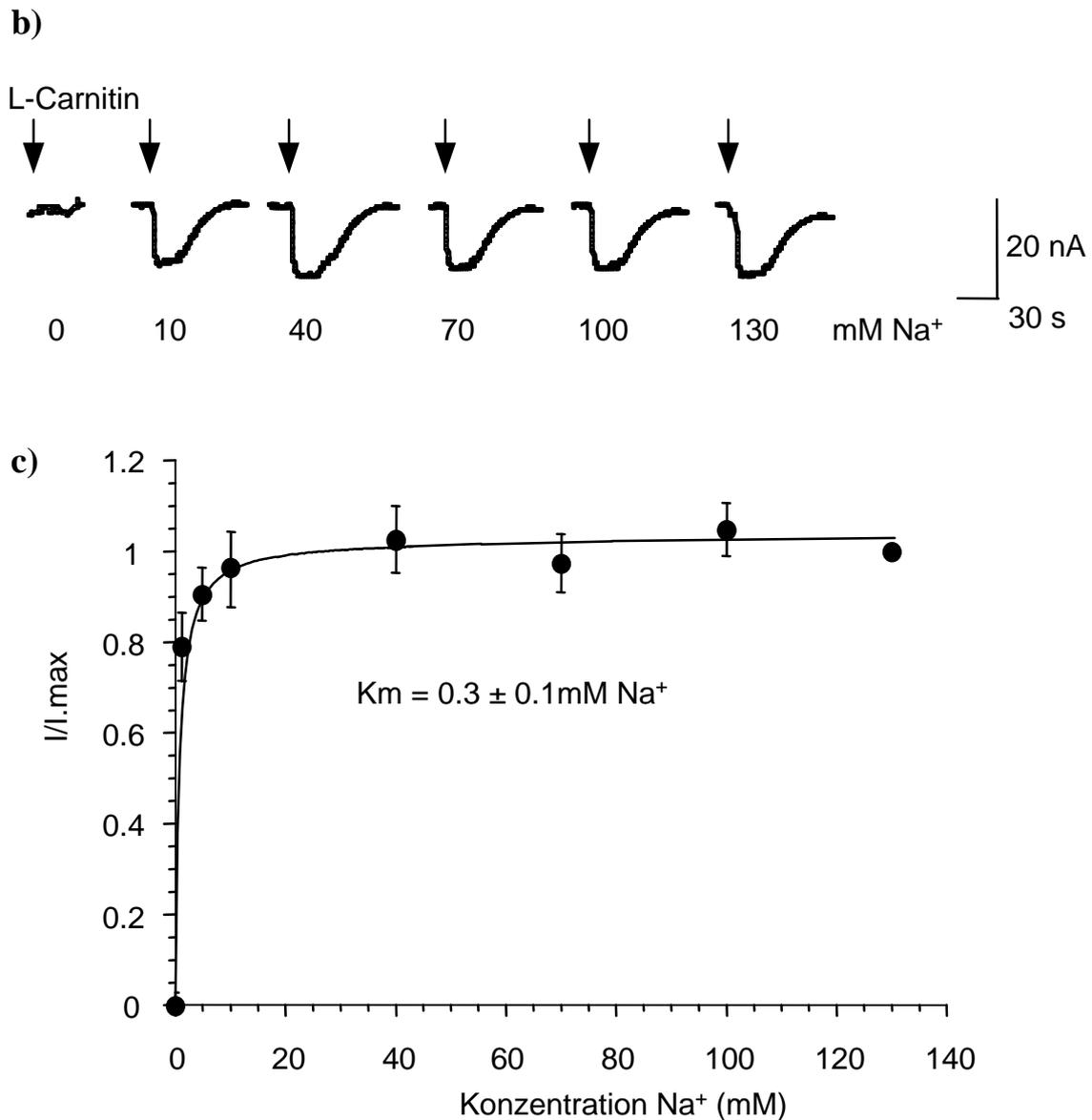
### 3.2.3 $\text{Na}^+$ -Abhängigkeit und -kinetik

Da bekannt ist, daß hOCTN2 ein  $\text{Na}^+$ -abhängiger Carnitintransporter ist, sollte genauer untersucht werden, in welcher Weise der Carnitintransport durch  $\text{Na}^+$ -Ionen beeinflusst werden kann. Dazu wurde die  $\text{Na}^+$ -Konzentration in der extrazellulären Lösung zwischen  $0$  mM und  $130$  mM schrittweise erhöht (Kap. 2.1.2). Die Oozyten wurden, bei  $\text{Na}^+$ -freier Lösung beginnend, solange mit der neuen Badlösung umspült, bis sie sich auf ein stabiles Membranpotential eingestellt hatten. Danach wurde für  $30$  Sekunden der

jeweils in ihrer  $\text{Na}^+$ -Konzentration variierten Badlösung 1 mM L-Carnitin zugesetzt, um den Einfluß der veränderten  $\text{Na}^+$ -Konzentration auf den L-Carnitin induzierten Strom zu testen. Das Experiment wurde an jeder Oozyte nacheinander bei zwei verschiedenen Haltepotentialen ( $-60$  mV und  $-90$  mV) durchgeführt ( $n = 6$ ).

Es zeigte sich, daß der L-Carnitintransport strikt  $\text{Na}^+$ -abhängig war und einer hyperbelförmigen Kurve folgte. In Abwesenheit von  $\text{Na}^+$ -Ionen in der Badlösung war der L-Carnitin induzierte Strom vollständig aufgehoben, während er bei  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen von 10 mM bereits den maximalen Wert erreichte. Die apparente  $\text{Na}^+$ -Affinität betrug  $2.3 \pm 0.6$  mM bei einem Haltepotential von  $-60$  mV und  $2.1 \pm 1.8$  mM bei einem Haltepotential von  $-90$  mV. Der Hill-Koeffizient lag unter beiden Bedingungen bei  $0.4 \pm 0.2$ , was einen Cotransport von einem  $\text{Na}^+$ -Ion pro transportiertem L-Carnitinmolekül vermuten läßt. Der Unterschied zwischen beiden Kurven war nicht signifikant ( $p > 0.05$ ). Der Betrag der L-Carnitin induzierten Ströme jeder Oozyte wurde immer auf den Wert bei der maximalen  $\text{Na}^+$ -Konzentration normiert. Da die Affinität für  $\text{Na}^+$  offensichtlich sehr hoch ist und mit den verwendeten  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen im niedrigen Bereich keine ausreichend zuverlässige Bestimmung des  $K_m$ -Wertes möglich war, wurde die  $\text{Na}^+$ -Kinetik nochmals bei  $-60$  mV und mit mehreren niedrigen  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen wiederholt. Dabei ergab sich eine apparente  $\text{Na}^+$ -Affinität von  $0.3 \pm 0.1$  mM bei einem Hill-Koeffizienten von  $0.6 \pm 0.2$  ( $n = 5$ ; Abb.8).





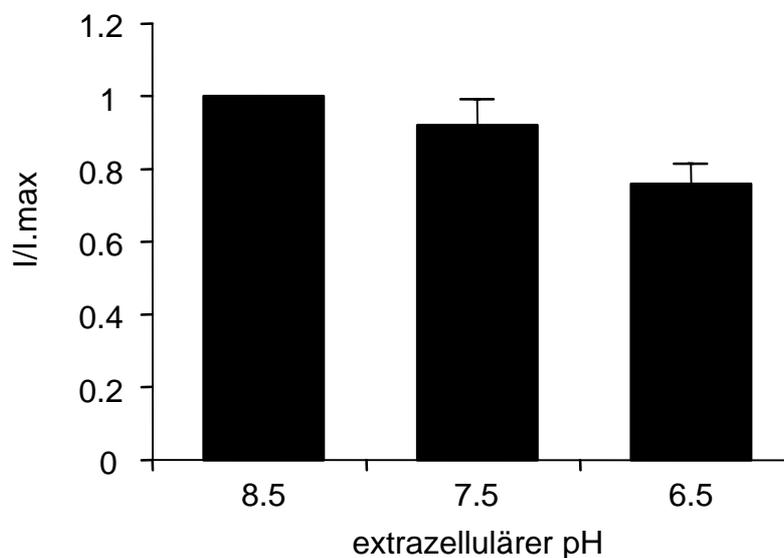
**Abb. 8:** Natriumkinetik. (a) Natriumabhängigkeit der L-Carnitin induzierten Ströme bei  $-60$  mV. (b) Originalaufzeichnung der L-Carnitin induzierten Ströme bei verschiedenen Natriumkonzentrationen ( $-60$  mV). (c) Natriumkinetik bei  $-60$  mV mit zusätzlichen Werten für niedrige Konzentrationen.

### 3.2.4 pH-Abhängigkeit

Weiterhin wurde geprüft, ob die Funktion des hOCTN2 pH-abhängig ist und eventuell den Transport von Protonen beinhaltet. Denn für OCTN1, den nächsten Verwandten zum hOCTN2 aus der OCT-Familie (Kapitel 1.3), wird ein Protonen/organische Kationen-Antiport Mechanismus postuliert (67).

### Einfluß des extrazellulären pH-Wertes

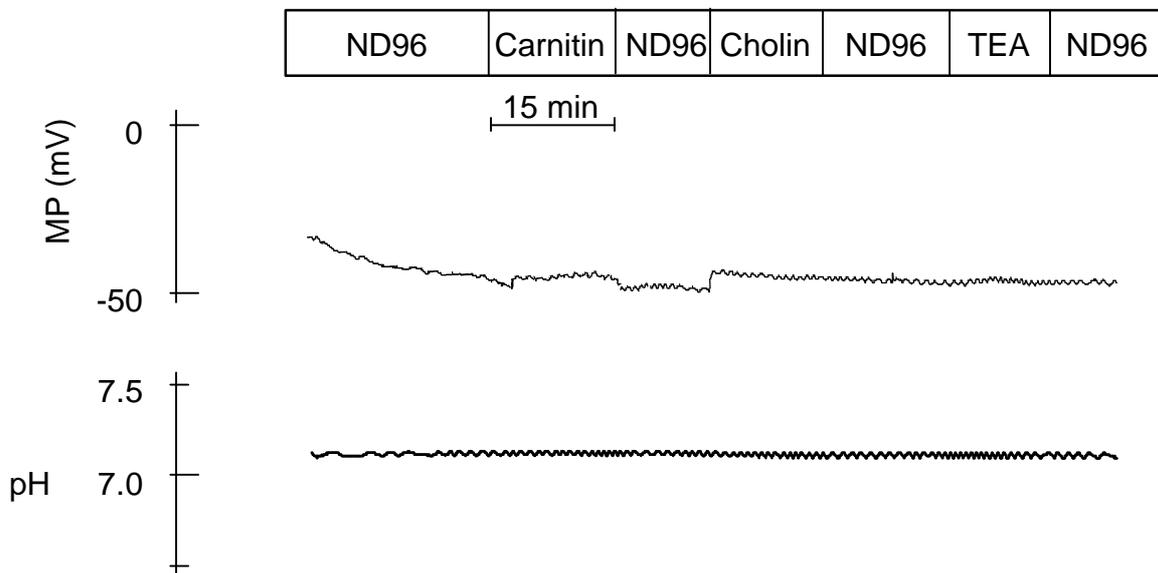
Zunächst wurde der Einfluß des extrazellulären pH-Wertes auf den L-Carnitin induzierten Strom untersucht. Die Zellen wurden nacheinander mit ND 96 Lösungen perfundiert, deren pH-Werte durch Titration mit KOH bzw. HCl verändert worden waren. Es wurden Lösungen mit pH 8.5, pH 7.5 und pH 6.5 verwendet. Bei jedem pH-Wert wurde nach dem Erreichen eines stabilen Äquilibriumms für die Dauer von 30 Sekunden in 1 mM L-Carnitin puls gegeben. Es zeigte sich, daß die Größe der Carnitin induzierten Ströme mit der extrazellulären Ansäuerung abnahm. Der Unterschied zwischen pH 8.5 und pH 6.0 betrug  $45.1 \pm 5.4 \%$  ( $n = 5$ ); wobei die gemessenen Ströme  $-17.7 \pm 2.3$  nA (bei pH 8.5) und  $-9.5 \pm 2.1$  nA (bei pH 6.5) betragen. Dieser Versuch wurde bei einem Haltepotential von  $-60$  mV durchgeführt. Der Betrag der L-Carnitin induzierten Ströme einer Zelle wurde jeweils auf den Wert bei pH 8.5 normiert, um die Zellen untereinander vergleichen zu können.



**Abb. 9:** Einfluß des extrazellulären pH-Wertes: eine Verminderung des pH-Wertes der Lösung bewirkte eine Abnahme der L-Carnitin induzierten Ströme (1 mM).

### Messungen mit der intrazellulären pH-Elektrode

Durch Messungen mit der intrazellulären pH-Elektrode wurde untersucht, ob Substrat induzierte Ströme mit einer Veränderung des intrazellulären pH-Wertes einhergehen. Weder L-Carnitin, noch Cholin noch TEA in jeweils 1 mM Konzentrationen lösten nach 15 minütiger Perfusion Veränderungen des intrazellulären pH-Wertes aus. Hingegen bewirkten sowohl L-Carnitin, als auch Cholin, wie oben beschrieben, eine leichte Depolarisation des Membranpotentials.



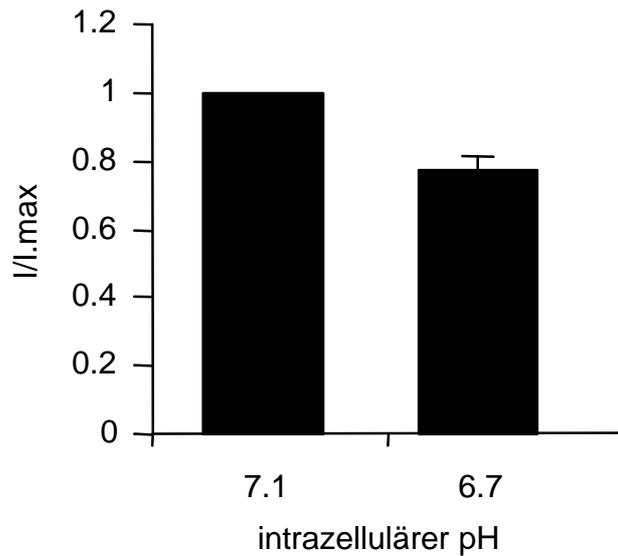
**Abb. 10:** Effekte von Carnitin, Cholin und TEA auf das Membranpotential (MP) und den intrazellulären pH-Wert. (Originalaufzeichnungen).

### Intrazelluläre Ansäuerung mit Bicarbonat

Bei dem folgenden Experiment wurden die Oozyten mit Bicarbonat intrazellulär angesäuert, um zu prüfen, ob ein Anstieg der intrazellulären Protonenkonzentration zu einer Stimulation des L-Carnitinstromes, d.h. zu einer Stimulation eines möglichen Protonen/Carnitin- bzw. Protonen/Kationentransportes führt.

Die Oozyten wurden für 10 Minuten mit 25 mM Bicarbonat-Lösung umspült.  $\text{H}_2\text{CO}_3$  dissoziiert in der Lösung zu  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{CO}_2$ . Das entstandene  $\text{CO}_2$  diffundiert in die Oozyte und bildet intrazellulär  $\text{H}_2\text{CO}_3$  mit  $\text{H}_2\text{O}$ . Da dieses nicht stabil ist, zerfällt es erneut

in  $\text{H}^+$  und  $\text{HCO}_3^-$ . Die freigesetzten  $\text{H}^+$ -Ionen bewirken eine intrazelluläre Ansäuerung (109). Nach 10 minütiger Perfusion mit 25 mM Bikarbonatlösung war der pH-Wert von ursprünglich  $\text{pH } 7.12 \pm 0.03$  auf  $\text{pH } 6.73 \pm 0.04$  abgefallen. Der L-Carnitin induzierte Strom (1 mM für 30 Sekunden) wurde um  $22.3 \pm 4.5 \%$  gehemmt ( $n = 4$ ).



**Abb. 11:** Intrazelluläre Ansäuerung mit 25 mM  $\text{HCO}_3^-$  von pH 7.1 auf 6.7 führte zu einer Abnahme der L-Carnitin induzierten Ströme.

### Transstimulation mit Cholin

Um zu testen, ob  $\text{Na}^+$ /Carnitin im Austausch gegen ein intrazelluläres Kationen transportiert wird, wurde als Ausgangswert der L-Carnitin (1 mM für 30 Sekunden) induzierte Strom bestimmt. Die Oozyten wurden dann für 10 Minuten oder über Nacht mit 1 mM Cholin vorinkubiert, um die intrazelluläre Konzentration an organischen Kationen zu erhöhen; dann wurde wieder der L-Carnitin induzierte Strom gemessen. Nach Transstimulation mit Cholin wurde in hOCTN2 exprimierenden Oozyten keine Veränderung der L-Carnitin induzierten Ströme beobachtet ( $n = 4$ ). Dies deutet darauf hin, daß kein Kationenantiport stattfindet.

## 3.3 Pharmakologische Charakterisierung des hOCTN2

### 3.3.1 Substratspezifität des hOCTN2 und induzierte Ströme

Nach der allgemeinen Charakterisierung des hOCTN2 sollte untersucht werden, ob dieser Transporter weitere Substrate akzeptiert. Dazu wurden verschiedene Substanzen getestet, die in vier Gruppen eingeteilt werden können: (1) Vorstufen der Carnitinbiosynthese (Methionin, Lysin, Betain), (2) Derivate und Strukturanaloga von Carnitin (D-Carnitin, Palmitoyl-DL-Carnitin,  $\beta$ -Hydroxybutyrat, GABA), (3) Pharmaka, die systemische Carnitineffizienz auslösen können (Emetin, Quinidin, Valproinsäure, Pivalinsäure, Verapamil) und (4) Substrate anderer OCTs (TEA, Cholin).

Es wurde bei hOCTN2 exprimierenden Zellen ( $n = 6$ ), sowie bei Kontrolloozyten ( $n = 5$ ) untersucht, durch welche Substanzen Ströme induziert werden können. Die Zellen wurden jeweils für 30 Sekunden mit einer 500  $\mu\text{M}$  Lösung der zu untersuchenden Substanz umspült und die induzierten Ströme aufgezeichnet. Einzig von Palmitoyl-DL-Carnitin wurde eine 100  $\mu\text{M}$  Lösung verwendet, da höhere Konzentrationen offensichtlich destabilisierende Wirkungen auf die Oozyten hatten. Bei allen verwendeten Lösungen wurde der pH-Wert mit KOH bzw. HCl auf pH 7.4 eingestellt.

Nur D-Carnitin ( $12.8 \pm 0.8 \text{ nA}$ ) und L-Lysin ( $-7.0 \pm 0.9 \text{ nA}$ ) waren aus den ersten beiden Gruppen in der Lage, bei hOCTN2-injizierten Oozyten signifikante Ströme zu verursachen. Aus der Gruppe der Pharmaka, die als Auslöser von systemischer Carnitineffizienz bekannt sind, die also potentielle Blocker des Carnitintransporters sind, konnten nur durch Verapamil ( $-7.6 \pm 1.4 \text{ nA}$ ), Quinidin ( $-3.7 \pm 1.4 \text{ nA}$ ) und Emetin ( $-2.3 \pm 1.1 \text{ nA}$ ) signifikante Ströme induziert werden. TEA ( $-3.1 \pm 0.9 \text{ nA}$ ) und Cholin ( $-4.0 \pm 1.3 \text{ nA}$ ), beides klassische Substrate anderer Mitglieder der OCT-Familie, lösten ebenfalls bei hOCTN2 signifikante Ströme aus. Keine Ströme waren bei Taurin, Valproinsäure, Palmitoyl-DL-Carnitin und Pivalinsäure nachweisbar.

**Tab. 12:** Vergleich der durch verschiedene Substanzen induzierten Ströme bei hOCTN2 injizierten Zellen und Kontrolloozyten

	Mittelwert des induzierten Stromes (nA)	
	hOCTN2 (n=6)	Kontrollzellen (n=5)
L-Carnitin	-12.1 ± 0.4	0 ± 0
D-Carnitin	-14.8 ± 1.0	0 ± 0
Cholin	-4.0 ± 1.3	0 ± 0
TEA	-3.1 ± 0.9	-1.3 ± 1.3
Betain	-2.3 ± 1.2	-0.5 ± 0.8
Lysin	-7.0 ± 1.4	-1.9 ± 0.2
Methionin	-3.9 ± 0.8	-1.1 ± 0.7
Emetin	-5.7 ± 1.3	-5.6 ± 3.3
Verapamil	-7.6 ± 1.4	-6.5 ± 4.0
β-Hydroxybutyrat	-2.1 ± 0.6	-2.8 ± 0.3
Quinidin	-6.5 ± 0.9	-2.3 ± 1.9
Taurin	0 ± 0	0 ± 0
Valproinsäure	0 ± 0	0 ± 0
Pivalinsäure	0 ± 0	0 ± 0
Palmitoyl-DL-Carnitin	0 ± 0	0 ± 0

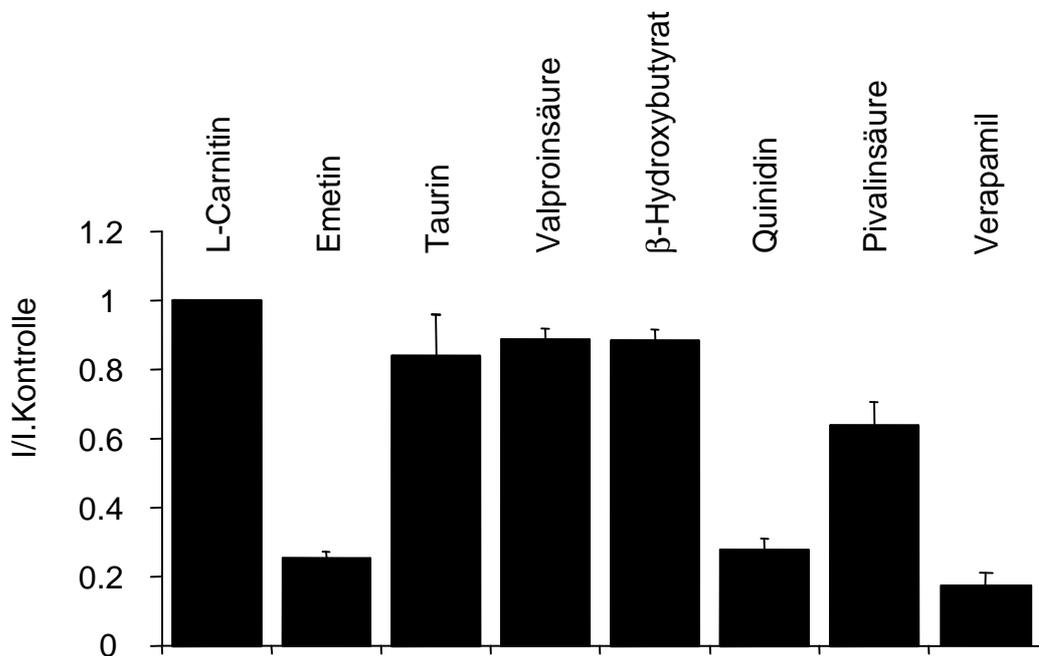
### 3.3.2 Hemmung des durch L-Carnitin induzierten Stroms

Das sekundäre Carnitinmangelsyndrom kann, wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben, u.a. durch verschiedene Pharmaka ausgelöst werden. In diesem Zusammenhang sollte der Hemmeffekt verschiedener Substanzen auf den Carnitintransport durch hOCTN2 untersucht werden.

Als Referenzwert wurde bei allen hOCTN2 injizierten Oozyten (n = 4) zunächst durch Perfusion mit 30 µM L-Carnitinlösung (30 Sekunden) ein Strom induziert. Nachdem die Carnitinlösung vollständig gegen ND 96 ausgetauscht war und sich wieder ein stabiler

Haltestrom eingestellt hatte, wurden die Oozyten für 10 Sekunden mit einer 500  $\mu\text{M}$  Lösung der zu testenden Substanz umspült. Direkt im Anschluß wurde für weitere 30 Sekunden auf eine Lösung umgeschaltet, die sowohl 500  $\mu\text{M}$  der Substanz als auch 30  $\mu\text{M}$  L-Carnitin enthielt. Nach erneutem Erreichen eines stabilen Stromes unter Perfusion mit ND 96, wurde nochmals ein 30  $\mu\text{M}$  L-Carnitinpuls (30 Sekunden) gegeben, um zu prüfen, ob der zuvor beobachtete Hemmeffekt durch Auswaschen reversibel war. Von Hauptinteresse war bei diesem Experiment jedoch der Hemmeffekt der verschiedenen Substanzen auf den L-Carnitinstrom.

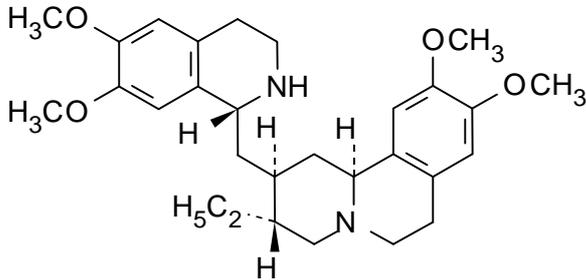
Ein deutliche Hemmung des Carnitinstromes wurde mit abnehmender Stärke durch folgende Substanzen hervorgerufen: Emetin > Verapamil > Quinidin > Pivalinsäure. Wobei die stärksten Inhibitoren das Antiemetikum Emetin (mit  $74.6 \pm 1.8 \%$ ) und der L-Typ Kalziumkanalblocker Verapamil (mit  $72.3 \pm 3.3 \%$ ) waren. Die Hemmung des Carnitinstromes durch das Antibiotikum Pivalinsäure war klein aber signifikant ( $36.3 \pm 6.8 \%$ ). Eine nur leichte, nicht signifikante Inhibition konnte bei Valproinsäure,  $\beta$ -Hydroxybutyrat und Taurin beobachtet werden (jeweils  $n = 4$ ).

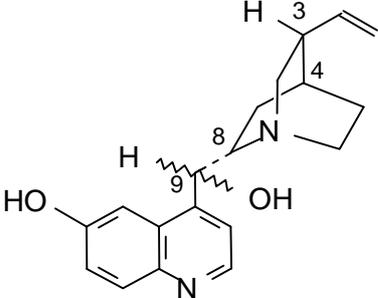
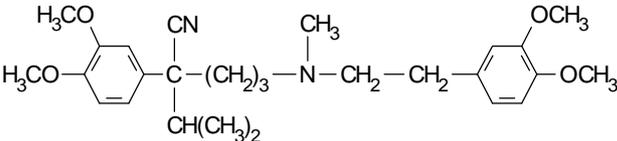
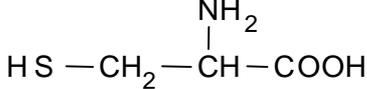
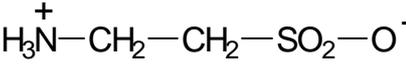


**Abb. 12:** Hemmung der L-Carnitin induzierten Ströme (30  $\mu\text{M}$ ) durch verschiedene Substanzen (500  $\mu\text{M}$ )

Tab. 13: Substratspezifität von hOCTN2

Substanz	Strukturformel	Strom (nA)/ Hemmung des Carnitinstromes/ Aufnahme
L-Carnitin	$\begin{array}{c} \text{OH} \\   \\ (\text{H}_3\text{C})_3\text{N}^+ - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{COO}^- \end{array}$	-12.1 ± 0.4 nA n.a. n.a.
Cholin	$[(\text{H}_3\text{C})_3\text{N}^+ - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{OH}]^- \text{OH}$	-4.0 ± 1.3 nA n.t. n.t.
TEA	$\begin{array}{c} \text{C}_2\text{H}_5 \\   \\ \text{H}_5\text{C}_2 - \text{N} - \text{C}_2\text{H}_5 \\   \\ \text{C}_2\text{H}_5 \end{array}$	3.1 ± 0.9 nA n.t. n.t.
L-Lysin	$\text{H}_2\text{N} - (\text{CH}_2)_4 - \begin{array}{c} \text{NH}_2 \\   \\ \text{CH} - \text{COOH} \end{array}$	-7.0 ± 1.4 nA n.t. n.t.
L-Methionin	$\text{H}_3\text{CS} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \begin{array}{c} \text{NH}_2 \\   \\ \text{CH} - \text{COOH} \end{array}$	-3.9 ± 0.8 nA n.t. n.t.
Betain	$(\text{H}_3\text{C})_3\text{N}^+ - \text{CH}_2 - \text{COO}^-$	-2.2 ± 1.9 nA n.t. 97.4 ± 6.6 %
β-Hydroxybutyrat	$\text{H}_3\text{C} - \text{CH}_2 - \begin{array}{c} \text{OH} \\   \\ \text{CH} - \text{C} \\ // \quad \backslash \\ \text{O} \quad \text{OH} \end{array}$	0 nA 11.7 ± 2.9 % n.t.

Substanz	Strukturformel	Strom (nA)/ Hemmung des Carnitinstromes/ Aufnahme
$\gamma$ - Aminobuttersäure (GABA)	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$	0 nA n.t. n.t.
Palmitoyl-DL- carnitin	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{CH}_2-\overset{\text{COOH}}{\text{CH}_2}-\overset{\text{CH}_2}{\text{CH}_2}-\overset{\text{N}(\text{CH}_3)_3}{\text{N}}$	0 nA 0 % n.t.
Emetin		$-2.3 \pm 1.1 \text{ nA}$ $74.6 \pm 1.8 \%$ $84.2 \pm 8.7 \%$
Pivalinsäure (2,2-Dimethyl propionyl Säure)	$\text{H}_3\text{C}-\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{CH}_3}{\text{C}}}-\text{COOH}$	$-0.5 \pm 0.6 \text{ nA}$ $25.4 \pm 6.8 \%$ $9.8 \pm 28.9 \%$
Valproinsäure (2-Propylpentan säure)	$\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{\text{C}_3\text{H}_7}{\text{CH}}-\text{COOH}$	0 nA $11.3 \pm 3.0 \%$ n.t.

Substanz	Strukturformel	Strom (nA)/ Hemmung des Carnitinstromes/ Aufnahme
Quinidin		-3.7 ± 1.4 nA 72.4 ± 3.4 % 84.2 ± 7.6 %
Verapamil		0 nA 72.3 ± 3.3 % n.t.
Cystein		n.t. n.t. 95.9 ± 2.8 % *
Taurin		0 nA 16.2 ± 11.8 % n.t.

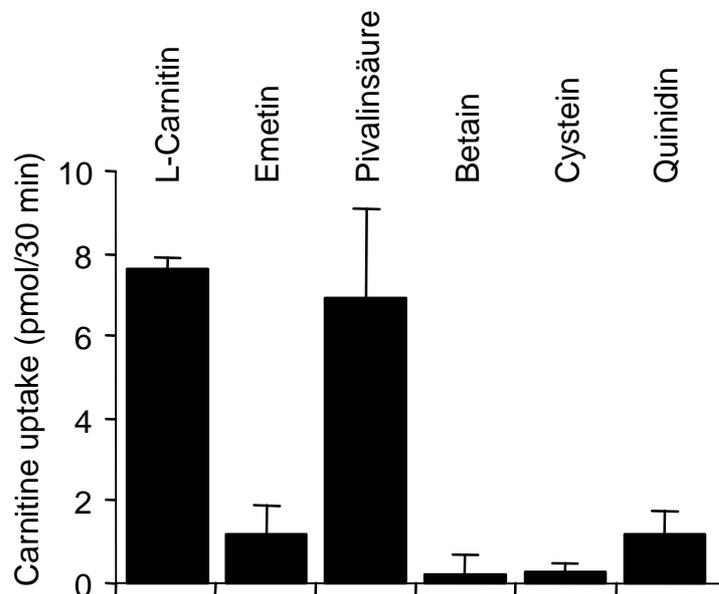
### 3.3.3 Messungen mit $^3\text{H}$ -markiertem Carnitin

Um zu testen, ob die Hemmung des L-Carnitin induzierten Stromes auch tatsächlich mit einer Hemmung des L-Carnitintransportes einhergeht, wurden Flux-Messungen mit  $^3\text{H}$  markiertem L-Carnitin durchgeführt und verschiedene Substanzen auf ihre Fähigkeit den Transport zu hemmen, geprüft.

#### Hemmung durch verschiedene Substrate

Wie in Kapitel 2.6 beschrieben, wurde mittels Flux-Messungen die prozentuale Hemmung der Aufnahme von  $50\ \mu\text{M}$  L-Carnitin durch jeweils  $500\ \mu\text{M}$  der Testsubstanz bestimmt.

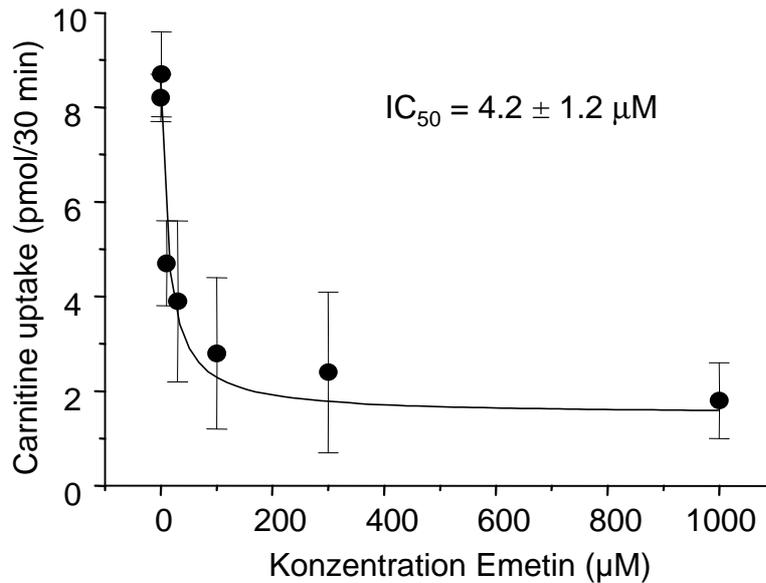
Eine starke Hemmung der Carnitinaufnahme ließ sich durch Zugabe von Emetin, Quinidin, Betain und Cystein beobachten, während eine Inkubation mit Pivalinsäure nur zu einer mäßigen Hemmung führte ( $n = 7$ ).



**Abb. 13:** Hemmung und Aufnahme von  $^3\text{H}$ -markiertem L-Carnitin ( $50\ \mu\text{M}$ ) durch verschiedene Substanzen ( $500\ \mu\text{M}$ ).

### IC<sub>50</sub> Wert für Emetin

Da Emetin eine wichtige Rolle bei der Entstehung von sekundärer Carnitindefizienz spielt (46, 75), wurde der IC<sub>50</sub> Wert, also die halbmaximale Hemmkonzentration bestimmt. Dieser Wert betrug  $4.2 \pm 1.2 \mu\text{M}$  ( $n = 7$ )



**Abb. 14:** Der IC<sub>50</sub>-Wert für Emetin wurde mit Uptake Messungen mit <sup>3</sup>H-markiertem L-Carnitin bestimmt.

### 3.4 Vergleich mit anderen Mitgliedern aus der OCT-Familie

In Kapitel 3.3.1 konnte bereits gezeigt werden, daß hOCTN2 eine mäßige Transportaktivität für die klassischen OCT-Substrate TEA und Cholin aufweist. Umgekehrt sollte nun untersucht werden, ob rOCT1 und hOCT2 ebenfalls Carnitin als Substrat akzeptieren.

Bei rOCT1- und hOCT2-injizierten Oozyten ( $n = 4$ ) wurde analog zu Kapitel 3.1.1 die Substratspezifität analysiert. Bei beiden Transportern konnten keine nennenswerten Ströme durch L-Carnitin induziert werden während, wie bereits mehrfach beschrieben, signifikante Einwärtsströme durch Cholin und TEA hervorgerufen werden konnten.

**Tab. 14:** Substratspezifitäten für hOCTN2, rOCT1 und hOCT2

	<b>Mittelwert des induzierten Stroms (nA)</b>			
	<b>Kontrollen</b> (n = 5)	<b>hOCTN2</b> (n = 6)	<b>rOCT1</b> (n = 3)	<b>hOCT2</b> (n = 4)
L-Carnitin	0 ± 0	-12.1 ± 0.4	-2.0 ± 0.5	-1.1 ± 0.5
D-Carnitin	0 ± 0	-14.8 ± 1.0	-1.7 ± 0.9	-3.6 ± 0.8
Cholin	0 ± 0	-4.0 ± 1.3	-12.1 ± 1.5	-36.3 ± 5.9
TEA	-1.3 ± 1.3	-3.1 ± 0.9	-9.8 ± 1.7	-18.7 ± 2.8
Betain	-0.5 ± 0.8	-2.3 ± 1.2	-1.0 ± 0.5	-1.9 ± 0.9
Emetin	-5.6 ± 3.3	-5.7 ± 1.3	-2.5 ± 0.5	-6.4 ± 0.3
Verapamil	-6.5 ± 4.0	-7.6 ± 1.4	-4.8 ± 1.1	-14.6 ± 1.4

## 4 Interpretation und Diskussion

### 4.1 Fehlerdiskussion

#### 4.1.1 Expressionssystem

Wie in der Einleitung dargelegt, werden zahlreiche elektrophysiologische Studien an Transportern und Ionenkanälen an *Xenopus laevis* Oozyten durchgeführt. Prinzipielle Fehlerquellen liegen in Fehlinterpretationen des Meßergebnisses, da endogene *Xenopus*-Proteine vorhanden sein könnten, die den humanen nicht entsprechen und etwa als Kanäle, Transporter, oder Aktivatoren der exprimierten Transporter agieren könnten. So wurde beispielsweise in *Xenopus laevis* Oozyten ein endogenes Carnitintransportsystem beschrieben, das sich aber in seiner Transportkapazität und seinen Eigenschaften deutlich von dem exogen exprimierten Carnitintransportsystem unterscheidet (86).

Als weitere mögliche Fehlerquelle können posttranslationale Modifikationsschritte und Regulationszustände des Transportproteins nicht denen mammalischer Zellen entsprechen (85). Ob sich die intrazellulären Signalwege in *Xenopus* Oozyten von denen in mammalischen Zellen unterscheiden, läßt sich nicht mit letzter Sicherheit sagen.

Ein weiterer Störfaktor wird möglicherweise durch die Bipolarität der Oozyten verursacht (5). So befindet sich in der vegetativen Hemisphäre der Oozyte natürlicherweise ein Großteil der RNA. Außerdem ist die laterale Membranmobilität in diesem Bereich der Oozyte wesentlich größer (5, 17). Auch die Verteilung von membranständigen Transportern, Kanälen und Rezeptoren ist in beiden Hemisphären unterschiedlich (5). Dabei ist auch unklar, inwiefern Oozyten Proteine einem Sorting-Mechanismus unterwerfen und welchen Einfluß die Injektionsstelle auf die Expressionsrate der injizierten RNA hat (5, 85). Bei den elektrophysiologischen Untersuchungen ist anzunehmen, daß die gemessenen Ströme in jedem Fall von der räumlichen Verteilung der Transporterproteine unabhängig sind, da bei der Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp Methode nicht ein einzelnes Areal der Zellmembran gemessen wird, sondern immer die fließenden Ströme über der gesamten Membran (5, 15, 17). Insofern wurde der Injektionsort der cRNA zufällig gewählt.

Die Vorteile liegen in einer klaren Trennung zwischen Transportphänomenen und Artefakten, da durch die cRNA-Injektion die exprimierten Proteine in einer sehr hohen Dichte vorhanden sind. Dies bietet für eine enge Fragestellung beste Untersuchungsmöglichkeiten. Das leichte und rasche Austauschen von Lösungsbestandteilen bzw. Verändern von Konzentrationen ermöglicht ein präzises Studium der verschiedenen Abhängigkeiten. Hinzu kommt eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

Als Nachteil muß gewertet werden, daß die gemessenen Ströme nur bedingt quantitative Aussagen ermöglichen, da sie jeweils von der injizierten cRNA-Konzentration abhängen. Auch dürfen die Ergebnisse nicht ohne weiteres auf mammalische Zellen übertragen werden, da das dortige Umfeld des Transportproteins in Oozyten nicht simuliert werden kann.

Wenn man die einzigartige Fähigkeit von *Xenopus laevis* Oozyten exogene RNA zu exprimieren und die Vorteile, die sich daraus bei der Untersuchung membranständiger Proteine bieten, mit den oben beschriebenen Nachteilen und Unsicherheitsfaktoren vergleicht, scheinen die *Xenopus* Oozyten ein geeignetes Modell zum Studium von exogen exprimierten Transportern und Kanälen zu sein (17).

#### 4.1.2 Oozyten und RNA

Es gab deutliche Unterschiede in der Qualität der Oozyten, die sich in der Größe ihres Ausgangsmembranpotentials und des basalen Leckstromes ausdrückten. Die Qualität war abhängig vom präparierten Frosch, der Präparation selbst und dem Alter der Oozyten.

Desweiteren ergaben sich Unterschiede aus der Injektion der cRNA. Die Menge der injizierten cRNA und deren Qualität konnten leicht schwanken. Dies hatte allerdings nur Einfluß auf die Expressionsrate, andere Veränderungen konnten nicht beobachtet werden. Die Expression der cRNA konnte durch mehrere Faktoren beeinflußt werden: Temperatur des Oozyteninkubators, Schwankungen in der Zusammensetzung der Aufbewahrungslösung und Unterschiede in den Oozyten selbst.

Um allzu große Unterschiede zu vermeiden, wurden in der Regel nur Oozyten verwendet, die einen Mindeststrom von mehr als 10 nA zeigten. Die Experimente einer Serie wurden nicht alle an einer Präparation durchgeführt, sondern die Oozyten stammten von unterschiedlichen Fröschen und Präparationen.

### 4.1.3 Lösungen

Die genaue Zusammensetzung der Lösungen wurde mit ionenselektiven Elektroden für Kalium, Chlorid und Kalzium überprüft und Schwankungen größer als 1 % wurden nicht toleriert. Ebenso wurden die Gesamtmolarität und der pH-Wert der Lösungen regelmäßig kontrolliert. Nicht ausgeschlossen werden konnten Verunreinigungen der Testsubstanzen durch den Herstellungsprozeß.

Die Testchemikalien wurden z.T. in Stammlösungen aufbewahrt, die sich unter dem Einfluß von Temperatur und Licht verändern konnten. Dies wurde vermieden durch regelmäßiges frisches Ansetzen der Stammlösungen und ihre Aufbewahrung im Kühl- oder Gefrierschrank, bzw. in lichtgeschützten Behältnissen.

### 4.1.4 Geräte

Eventuelle elektrische Störungen, ausgehend von anderen Geräten, konnten weitestgehend durch einen Faradayschen Käfig abgeschirmt werden (63).

Außerdem konnte die Beschichtung der Silberdrahtelektrode beschädigt sein, was jedoch durch regelmäßiges Chloridieren korrigiert wurde. Der Widerstand der Elektroden konnte durch Verstopfen der Elektrodenspitze zunehmen, dies wurde jedoch vor und nach jedem Experiment durch Messen des Elektrodenwiderstands in der Badlösung kontrolliert.

### 4.1.5 Auswertung

Verschiedene Einflüsse, etwa die Eigenschaften der Membran der einzelnen Oozyte oder die Flußrate, führten teilweise zu leichten Schwankungen oder Veränderungen des basalen Stromes. Deshalb wurde als Ausgangswert für das Ausmessen der Ströme ein Mittelwert des basalen Stromes vor und nach dem Experiment genommen. Bei der Analyse sich ergebende Hill-Koeffizienten müssen mit Vorsicht interpretiert werden, da diese von der Qualität des Kurvenfittings abhängig sind. Nur signifikante Veränderungen bei guten Fittings wurden als signifikant betrachtet ( $p = 0.05$ ).

## 4.2 Techniken

Zusätzlich zu den elektrophysiologischen Experimenten wurden außerdem einige Experimente mit Flux Messungen mit  $^3\text{H}$ -markiertem L-Carnitin durchgeführt. Der Vorteil dieser ergänzend verwendeten Technik lag darin, daß sie sensitiver ist und direkt auf den Transport schließen läßt, während mit der Voltage Clamp Methode lediglich die durch den Transport bestimmter Substanzen induzierten Ströme gemessen werden können. Quantitative Aussagen sind also mit der Voltage Clamp Methode, wie bereits oben dargelegt, nur bedingt möglich.

## 4.3 Funktionelle Charakterisierung des hOCTN2

Der humane organische Kationentransporter (hOCTN2) wurde als ein strukturanaloges Molekül zu hOCTN1 aus menschlichen Nierenzellen isoliert und zunächst als ein hochaffiner  $\text{Na}^+$ /Carnitin Cotransporter beschrieben (90, 99). Damit ist hOCTN2 das erste Mitglied der OCT-Familie, bei dem eine  $\text{Na}^+$ -abhängige Transportfunktion nachgewiesen werden konnte (62, 81, 90, 99, 101). Kürzlich wurde entdeckt, daß hOCTN2 neben seiner Funktion als  $\text{Na}^+$ -abhängiger Carnitintransporter außerdem in der Lage ist,  $\text{Na}^+$ -unabhängig organische Kationen zu transportieren (82, 98). Nach bisherigem Kenntnisstand ist hOCTN2 der einzige Transporter, der gleichzeitig bestimmte Substrate  $\text{Na}^+$ -abhängig und andere  $\text{Na}^+$ -unabhängig transportieren kann (82, 98).

Durch jüngste Arbeiten wurde ein direkter Zusammenhang zwischen Mutationen des OCTN2 und dem Primären Carnitinmangelsyndrom hergestellt (45, 60, 82, 97). Zwar wurde auch schon in früheren Studien vermutet, daß das Primäre Carnitinmangelsyndrom durch den Defekt eines membranständigen Carnitintransporters ausgelöst wird, ohne jedoch den genauen molekularen Mechanismus zu kennen (68, 73, 75, 78). Jetzt wurden sowohl bei der juvenilen viszeralen Steatosis- (jvs) Maus (52, 68, 102), dem Tiermodell für Primäre Carnitindefizienz, als auch bei Patienten, die an dieser Krankheit leiden (45, 60, 82, 97), Mutationen in dem Gen, das für OCTN2 kodiert, nachgewiesen. Es besteht ein allgemeiner Konsens darüber, daß OCTN2 im Säugetierorganismus eine wichtige Rolle im Carnitinstoffwechsel spielt. Trotzdem bedürfen viele Aspekte der genauen Funktionsweise von hOCTN2 noch einer vollständigen Aufklärung. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die weitere Charakterisierung der funktionellen Eigen-

schaften von hOCTN2, sowie die Untersuchung des Einflusses bestimmter Pharmaka auf den Carnitintransport durch hOCTN2.

#### 4.3.1 Carnitinkinetik und Sterospezifität

An hOCTN2 exprimierenden *Xenopus laevis* Oozyten wurden einige funktionelle Eigenschaften des Carnitintransportes durch hOCTN2 mit der Voltage-Clamp Methode untersucht. In Übereinstimmung mit bereits publizierten Ergebnissen konnte gezeigt werden, daß der Carnitintransport durch hOCTN2  $\text{Na}^+$ -abhängig, elektrogen und sättigbar ist (39, 62, 81, 90, 101).

Frühere Arbeiten, die vor der molekularen Identifizierung von hOCTN2 entstanden waren, beschreiben die Existenz eines hoch affinen Carnitintransporters in der Plasmamembran vieler Gewebe (5, 30, 40, 78, 101). Die in diesen Arbeiten beschriebenen kinetischen Eigenschaften des Carnitintransporters stimmen weitgehend mit den über hOCTN2 erhobenen Daten überein (39, 62, 82, 90, 98, 101). Tabelle 15 zeigt eine Auflistung der Ergebnisse einiger Arbeitsgruppen. Die gefundene Gewebeverteilung von hOCTN2 stützt ebenfalls die These, daß es sich bei diesen Arbeiten um hOCTN2 vermittelten Carnitintransport handelt (44, 88, 90, 98, 99).

Diese mit anderen Methoden durchgeführten Experimente wurden durch die elektrophysiologischen Versuche dieser Arbeit in vielen Punkten bestätigt (Kapitel 3.2.1). Hier konnte jedoch erstmals gezeigt werden, daß der  $\text{Na}^+$ -gekoppelte Carnitintransport elektrogen ist. Wie erwartet, war der L-Carnitintransport durch hOCTN2 hochaffin und sättigbar. Die Auswertung ergab einen Hill-Koeffizienten von etwa 1 für beide Kinetiken, was für den Transport eines Carnitinmoleküls pro Transportzyklus spricht. Daher kann man vermuten, daß das Transportprotein eine einzelne Bindungsstelle für Carnitin besitzt.

Gestützt auf den Nachweis einer geringeren Affinität von hOCTN2 zu D-Carnitin als zu L-Carnitin (Kapitel 3.2.2), konnte außerdem die bereits von anderen Arbeitsgruppen beschriebene Stereospezifität von hOCTN2 für das L-Isomer bestätigt werden (62, 90). Mit elektrophysiologischen Methoden lassen sich allerdings keine eindeutigen quantitativen Aussagen über maximale Transportraten treffen. Dazu wird auf die mit radioaktiv markiertem Carnitin durchgeführten Uptake Studien verwiesen (39, 62, 82, 90, 98, 101).

**Tab. 15:** Vergleich der Halbsättigungskonzentrationen für die verschiedenen untersuchten hochaffinen Carnitrintransporter

	<b>K<sub>m</sub>-Wert (L-Carnitin) (<math>\mu</math>M)</b>	<b>K<sub>m</sub>-Wert (Natrium) (mM)</b>	<b>Methode/ untersuchtes Gewebe</b>	<b>Referenz</b>
hOCTN2	$4.9 \pm 0.3$	$0.3 \pm 0.1$	Voltage Clamp Messungen an <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	eigene Daten
	4.34	k.A.	<sup>3</sup> H-Carnitin Flux Messungen an human embryonic kidney (HEK)293 Zellen	90
	$6.6 \pm 1.9$	k.A.	<sup>3</sup> H-Carnitin Flux Messungen an Human Hepatoma HLF Zellen (Leber)	101
	$14 \pm 1$	$10 \pm 1$	<sup>3</sup> H-Carnitin Flux Messungen an HPCT Zellen (proximaler Nierentubulus)	39
	$5.0 \pm 0.3$	$8.5 \pm 1.4$	<sup>3</sup> H-Carnitin Flux Messungen an HeLa Zellen	82
	$14.8 \pm 1.8$	k.A.	<sup>3</sup> H-Carnitin Flux Messungen an HRPE Zellen	98
	4.3	8.5 $\mu$ M	<sup>3</sup> H-Carnitin Flux Messungen an HEK293 Zellen	62
Hochaffine L-Carnitin-Transporter	$7.0 \pm 0.4$	k.A.	<sup>3</sup> H-Carnitin Flux Messungen an humanen Fibroblasten	78
	$17.4 \pm 3.9$	k.A.	renale Bürstensaummembran-Vesikel der Ratte	88
	149	k.A.	Expression von Nierenkortex RNA in <i>Xenopus</i> Oozyten	5

	<b>K<sub>m</sub>-Wert (L-Carnitin) (<math>\mu</math>M)</b>	<b>K<sub>m</sub>-Wert (Natrium) (mM)</b>	<b>Methode/ untersuchtes Gewebe</b>	<b>Referenz</b>
	6-7	k.A.	<sup>3</sup> H-Carnitin Flux Messungen an isolierten Enterozyten von Meer-schweinchen	30
	90	k.A.	<sup>14</sup> C-Carnitin Flux Messungen, Ratten-Nierenkortex Schnitten	40
	206 - 316	k.A.	<sup>14</sup> C-Carnitin Flux Messungen, Ratten-Dünndarm,	83

### 4.3.2 Na<sup>+</sup>-Abhängigkeit

Aufgrund der Beobachtung, daß in den meisten Geweben eine hohe Expressionsrate des hOCTN2 vorhanden ist, von denen schon früher berichtet wurde, daß sie über einen Na<sup>+</sup>-abhängigen, carriervermittelten Carnitrintransportmechanismus verfügen, wurde vermutet, daß auch hOCTN2 Carnitin Na<sup>+</sup>-abhängig transportiert (10, 88, 90, 98). OCTN2 bleibt bis heute das einzige Mitglied der OCT-Familie, bei dem ein Na<sup>+</sup>-abhängiger Transportmechanismus nachgewiesen wurde. Nur wenig bekannt war bisher aber über die Bindungsaffinität Natrium zu hOCTN2.

Durch Veränderung der extrazellulären Na<sup>+</sup>-Konzentration wurde wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben, die Na<sup>+</sup>-Abhängigkeit untersucht. Hierbei war die hohe Na<sup>+</sup>-Affinität von hOCTN2 mit einer Halbsättigungskonzentration von etwa 0.5 mM besonders überraschend. In Abwesenheit von Natrium in der Extrazellulärflüssigkeit war der Carnitin induzierte Strom vollständig aufgehoben. Die stöchiometrische Analyse läßt vermuten, daß pro Transportzyklus ein Na<sup>+</sup>-Ion zusammen mit einem Carnitinmolekül transportiert wird, obwohl die Kooperativität mit einem Hill-Koeffizient von  $0.4 \pm 0.2$  relativ schwach war. Aufgrund dieser Ergebnisse kann darüber spekuliert werden, daß der Na<sup>+</sup>-Konzentrationsgradient nicht die vorrangige treibende Kraft des Carnitrintransportes durch hOCTN2 ist, sondern daß Na<sup>+</sup> benötigt wird, um entweder eine direkte Konformationsänderung des Transportproteins auszulösen (44), oder um Carnitin die für eine Bindung an den Transporter nötige positive Ladung zu geben. Neueren Daten von Seth

et al. (82) zufolge, besitzen organische Kationen und Carnitin zwar überlappende, aber nicht identische Bindungsstellen an hOCTN2. Das könnte auch bedeuten, daß es sich hierbei eigentlich um zwei verschiedene Kationenbindungsstellen handelt, eine wahre und eine phylogenetisch ältere (82).

In der Literatur gefundene Halbsättigungskonzentrationen für Natrium lagen bei  $8.5 \pm 1.4$  mM (102) und  $0.9 \pm 0.4$  mM (62). Hierbei muß jedoch beachtet werden, daß es aufgrund des elektrogenen Carnitintransportes bei Fluxmessungen zu einer Depolarisation und damit zu einer verminderten Transportrate kommt. Dies kann zu einer falsch hohen Bestimmung des  $K_m$ -Wertes führen. Der Transport scheint spezifisch für  $\text{Na}^+$  zu sein, da ein Ersetzen von  $\text{Na}^+$  gegen andere monovalente Kationen eine signifikante Verminderung des Carnitintransportes bewirkte (90, 101).

### 4.3.3 Elektrogenität

Da Carnitin bei physiologischem pH als Zwitterion vorliegt und sein Transport in die Zelle stets  $\text{Na}^+$ -gekoppelt, d.h. als kationischer Komplex erfolgt (43, 62, 90, 98), lag die Vermutung nahe, daß der Transport elektrogen ist. Die Spannungsabhängigkeit des Transportes wurde, wie in Kapitel 3.1 beschrieben, durch Veränderung des Membranpotentials untersucht. Dabei zeigte sich, daß die Größe der Carnitin induzierten Ströme mit zunehmender Depolarisierung abnahm. Der Carnitintransport wurde durch eine dreifache Erhöhung des elektrischen Gradienten über der Zellmembran zwei- bis dreifach stimuliert. Interessanterweise war der Effekt bei niedrigeren Carnitinkonzentrationen ( $30 \mu\text{M}$ ) stärker ausgeprägt als bei höheren Konzentrationen (1 mM). Dies ist physiologisch auch durchaus verständlich, wenn man bedenkt, daß die normale Carnitinplasmakonzentration zwischen 20-50  $\mu\text{M}$  und das Membranpotential der meisten Körperzellen zwischen  $-60$  und  $-90$  mV liegt. Der Transporter hätte somit unter physiologischen Bedingungen sein Wirkoptimum.

Die Ergebnisse stimmen gut mit den in der Literatur angegebenen Werten überein. Eine Elektrogenität des Carnitintransportes wurde bereits für einige Gewebe beschrieben (30, 88, 101). Während diese Arbeit im Entstehen war, wurde von einer anderen Arbeitsgruppe ebenfalls über die Elektrogenität des Carnitintransportes durch hOCTN2 berichtet. Allerdings wurde bei dieser Studie das Membranpotential nicht wie bei der vor-

liegenden Arbeit durch eine Veränderung der Spannung, sondern durch  $K^+$ -induzierte Depolarisierung variiert und somit nur indirekt gemessen (98).

Ein nach innen gerichtetes negatives Potential begünstigt demnach den Carnitintransport durch hOCTN2 v.a. durch eine Erhöhung der elektrischen Triebkraft für positiv geladene Komplexe. Dabei kann aber auch eine direkte spannungsabhängige Konformationsänderung am Transportprotein nicht völlig ausgeschlossen werden (39, 88, 98, 101).

#### **4.3.4 Einfluß des pH-Wertes**

OCTN1, der nächste Verwandte zu OCTN2 in der OCT-Familie, ist ein putativer Protonen/organischer Kationen Austauscher (43, 44, 91, 100). Deshalb sollte der Einfluß des intra- und extrazellulären pH-Wertes auf die Transportaktivität des hOCTN2, sowie ein möglicher Protonenantiport untersucht werden.

Die Größe der L-Carnitin induzierten Ströme war abhängig von dem extrazellulären pH-Wert. Sie nahmen mit zunehmender Azidifizierung der Extrazellulärflüssigkeit deutlich ab (Kapitel 3.2.4). Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus Uptake-Studien anderer Arbeiten (62, 101) und könnte entweder durch eine Konkurrenz von  $H^+$ - und  $Na^+$ -Ionen um die Bindungsstelle oder durch eine unmittelbare protonenabhängige Konformationsänderung des Transportproteins erklärt werden (62, 100, 101).

Eine direkte Beteiligung von Protonen am Transportprozeß hingegen ist aufgrund der vorliegenden Ergebnisse unwahrscheinlich. Zum einen konnte bei den Messungen mit der intrazellulären pH-Elektrode bei Gabe von Carnitin, Cholin oder TEA keine Veränderung des intrazellulären pH-Wertes beobachtet werden. Zum anderen bewirkte eine intrazelluläre Ansäuerung von pH 7.1 auf pH 6.7 eine Abnahme der L-Carnitin induzierten Ströme. Die beobachtete Hemmung spricht also eher gegen die Hypothese eines Protonenantiportes, da eine Erhöhung des intrazellulären Protonenangebotes und damit des Protonengradienten über der Zellmembran, den Carnitintransport stimulieren statt hemmen müßte. Vielmehr bewirkte die intrazelluläre Ansäuerung wahrscheinlich eine allosterische Abnahme der Transportaktivität. Ein Protonenantiport kann damit ausgeschlossen werden.

Durch die Transstimulationsexperimente, mit denen untersucht wurde, ob sich die Transportaktivität des hOCTN2 durch eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration

an organischen Kationen erhöhen läßt, konnten ebenfalls keine Hinweise auf einen organischen Kationen Antiport Mechanismus gefunden werden. Diese Ergebnisse liefern keine Argumente für einen Antiport Mechanismus, sondern bekräftigen eher die bestehende Hypothese eines  $\text{Na}^+$ /Carnitin Symport Mechanismus. Weiterhin muß noch diskutiert werden, ob der pH-Wert Einfluß auf den Protonierungszustand von Carnitin hat, das bei physiologischem pH als Zwitterion vorliegt.

#### **4.3.5 Vergleich mit anderen Mitgliedern aus der OCT-Familie**

Der  $\text{Na}^+$ /Carnitintransporter hOCTN2 gehört zu der OCT-Oberfamilie der organischen Kationentransporter (43, 44). Der OCT1 der Ratte und der menschliche OCT2 wurden auf ihre Fähigkeit getestet, L-Carnitin zu transportieren. Umgekehrt wurde auch bei hOCTN2 die Fähigkeit für elektrogenen Transport von TEA und Cholin, zwei typischen Substraten vieler anderer Mitglieder der OCT-Familie, evaluiert. Bei rOCT1 und hOCT2 wurden keine signifikanten L-Carnitin induzierten Ströme gefunden. Dagegen wurden bei hOCTN2 kleine TEA und Cholin induzierte Ströme gemessen. Dies entspricht auch den Ergebnissen früherer Studien, bei denen hOCTN2 für TEA ebenfalls niedrigere Aufnahmeraten als für Carnitin zeigte (98, 99). Insgesamt deuten diese Ergebnisse auf eine spezialisierte Funktion des OCTN2 als  $\text{Na}^+$ -abhängiger Carnitintransporter innerhalb der organischen Kationentransporterfamilie hin.

### **4.4 Pharmakologische Charakterisierung des hOCTN2**

Es ist bekannt, daß das sekundäre Carnitinmangelsyndrom durch verschiedene Pharmaka ausgelöst werden kann. Die stärksten Effekte wurden in der Vergangenheit bei den Antibiotika Emetin und Pivalinsäure, dem L-Typ Kalziumkanalblocker Verapamil, sowie dem Antiepileptikum Valproinsäure beobachtet (1, 36, 46, 73, 75, 92). Deshalb wurde der Einfluß dieser Pharmaka sowie einiger anderer Substanzen auf den Carnitintransport in hOCTN2 exprimierenden *Xenopus* Oozyten untersucht. Es konnte eine starke Hemmung des Transportes durch Emetin, Quinidin und Verapamil, sowie eine mäßige Hemmung durch Pivalinsäure festgestellt werden. Kein Effekt wurde für Valproinsäure beobachtet.

#### 4.4.1 Substratspezifität

Um die Substratspezifität des humanen OCTN2 zu untersuchen, wurden verschiedene Substanzen auf ihre Fähigkeit getestet, bei hOCTN2 exprimierenden Oozyten Ströme zu induzieren. Dies war außerdem für die Experimente wichtig, mit denen die Hemmung der Carnitinströme getestet werden sollte, um zwischen Hemmeffekten und durch die Substanzen selbst induzierten Strömen unterscheiden zu können, und um zu untersuchen, ob hemmende Substanzen auch von hOCTN2 transportiert werden. In der Substanzgruppe der Carnitinvorstufen wurde durch Lysin ein etwa halb so großer Strom wie durch L-Carnitin ausgelöst. Durch Methionin > Betain wurden nur mäßige Ströme induziert. Überraschenderweise waren durch die strukturanalogen Substanzen  $\beta$ -Hydroxybutyrat und Palmitoy-DL-Carnitin keine signifikanten Ströme nachweisbar. Von den getesteten Pharmaka wurden Verapamil > Quinidin > Emetin in absteigender Reihenfolge von hOCTN2 elektrogen transportiert, während Valproinsäure und Pivalinsäure scheinbar nicht transportiert wurden. In der von Ohashi et al. (62) kürzlich veröffentlichten Arbeit wurde mit Uptake Studien ebenfalls eine signifikante Aufnahme von Verapamil, Emetin und Quinidin beschrieben. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen wurde von dieser Arbeitsgruppe auch der Transport von Valproinsäure beobachtet. Dies ist überraschend, weil es sich bei Valproinsäure um ein negativ geladenes Monocarboxylat handelt und der Transport von Anionen durch Kationentransporter bisher nicht beschrieben wurde. Außerdem stellen diese Daten einen Widerspruch zu älteren Arbeiten dar, die keinen schnellen Einfluß von Valproinsäure auf den Carnitintransport zeigten (92).

#### 4.4.2 Wirkungen verschiedener Xenobiotika auf den Carnitintransport

Unter dem Gesichtspunkt, daß Mitgliedern der organischen Kationentransporterfamilie (OCT) eine wichtige, in vielen Punkten aber noch unvollständig geklärte Rolle bei der Aufnahme und Ausscheidung vieler Xenobiotika zugeschrieben wird, sollte der Einfluß verschiedener Pharmaka, die nachgewiesener Weise systemische sekundäre Carnitindefizienz auslösen können, auf den Carnitintransport durch hOCTN2 betrachtet werden (43, 44, 75).

Emetin ist ein orales Emetikum und Antiamöbikum, von dem bekannt ist, daß es Myopathien und sekundäre Carnitinefizienz verursachen kann (46). Emetin ist ein allgemeines Protoplasma- und Kapillargift, das durch Anlagerung an die 60 S-Ribosomenuntereinheit die Proteinbiosynthese inhibiert (74). Bisher waren die genauen Mechanismen ungeklärt, die bei mit Emetin behandelten Patienten ein Carnitinmangelsyndrom auslösten. Die in Kapitel 3.3.3 dargelegten Ergebnisse zeigen, daß Emetin ein potenter Inhibitor der Carnitinaufnahme durch hOCTN2 ist. Da Emetin eine ähnliche Affinität zu hOCTN2 wie L-Carnitin hat, könnte die Entstehung eines sekundären Carnitinmangelsyndroms durch ein Absinken der intrazellulären Carnitinspiegel und nachfolgend ein Zusammenbrechen der mitochondrialen  $\beta$ -Oxidation erklärt werden. Daneben könnten aber auch andere Mechanismen verstärkend hinzukommen, wie eine Transkriptionshemmung der Transporter-RNA durch Emetin, oder bei bestimmten Patienten eine verminderte Carnitinaufnahme mit der Nahrung (46).

Pivalinsäure ist als Pivaloyloximethyl-Ester in einigen Antibiotika enthalten, die routinemäßig zur prophylaktischen Langzeittherapie von Harnwegsinfekten eingesetzt werden. Mit Pivalinsäure veresterte Antibiotika werden nach oraler Gabe besser resorbiert als ihre unveresterten Formen. Allerdings führt die Behandlung mit pivalinsäurehaltigen Antibiotika schon nach wenigen Tagen Therapiedauer zu einem deutlichen Absinken der Carnitinplasmaspiegel (1). Gleichzeitig steigen die Ausscheidungsraten von Pivaloylcarnitin, Acylcarnitin und freiem Carnitin im Urin an (36). In der Literatur wird mehrfach darüber berichtet, daß prädisponierte Patienten unter einer Langzeittherapie mit pivalinsäurehaltigen Antibiotika Zeichen einer Kardiomyopathie und/ oder eines sekundären Carnitinmangelsyndroms entwickelt haben (1, 36, 75). Dies wurde teilweise mit der Produktion und Akkumulation abnormer organischer Säuren und deren negativen Einfluß auf den Carnitintransport und -metabolismus erklärt (36). Hingegen belegen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, daß Pivalinsäure eine direkte Hemmung des Carnitintransporters bewirkt, wodurch auch die Behinderung der tubulären Reabsorption und zellulären Aufnahme von Carnitin erklärt werden kann. Eine kurzzeitige Perfusion (ca. 1 min) der Oozyten bewirkte eine kleine, aber signifikante Hemmung des Carnitin induzierten Stromes (Kap. 3.3.2).

Von klinischer Relevanz ist auch die Beobachtung einer starken Hemmung der Carnitin induzierten Ströme durch den L-Typ-Kalziumkanalblocker Verapamil.

Quinidin (= Chinidin) ist ein starkes Protoplasmagift, das in entsprechenden Konzentrationen auf fast alle Zellen einwirkt. So werden z.B. Plasmodien, die Erreger der Malaria schon bei Konzentrationen abgetötet, die dem menschlichen Körper und Leukozyten noch nicht wesentlich schaden. Neben seiner Verwendung als Antimalariamittel wird Quinidin wegen seines offensichtlichen Einflusses auf das Temperaturzentrum des Hypothalamus außerdem als Antipyretikum und wegen seiner erregenden Wirkung auf die glatte Muskulatur des Uterus als Wehenmittel eingesetzt (74). Außerdem ist Chinin, das Stereoisomer von Chinidin ein  $\text{Na}^+$ -Kanalblocker und zählt zu den Antiarrhythmika der Gruppe Ia. Von verschiedenen Arbeitsgruppen wird über eine Hemmung des Carnitintransportes durch Quinidin berichtet (40, 62, 78). Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen eine starke Hemmung des Carnitintransportes durch hOCTN2.

Zahlreiche Studien haben eine signifikante Abnahme der totalen oder der freien Serumcarnitinkonzentration bei Patienten beschrieben, die auf eine Langzeittherapie mit dem Antiepileptikum Valproinsäure angewiesen sind (50, 57, 59, 92). Valproinsäure ist eine verzweigtkettige Fettsäure und bildet wie natürliche Fettsäuren CoA-Thioester und Carnitinerester (75). Auf L-Carnitin induzierte Ströme hatte Valproinsäure keinen Einfluß, was gut mit früheren Zellkulturstudien übereinstimmt, bei denen ebenfalls erst nach längerer Vorinkubation mit Valproinsäure eine Inhibition des Carnitintransportes beobachtet wurde (92). Dies könnte darauf hindeuten, daß Valproinsäure mit der Regulation oder Biosynthese von hOCTN2 interagiert, oder daß Metabolite von Valproinsäure für die in der Zellkultur beobachtete Hemmung des L-Carnitintransportes verantwortlich sind. Denkbar wäre auch eine akkumulative Konkurrenz von Carnitin und Acylcarnitinen, einschließlich Valproylcarnitin, um die Bindungsstelle am renalen Carnitintransporter (75, 92).

Zusammenfassend soll noch einmal darauf hingewiesen werden, daß Substanzen, die zu einer wirksamen Inhibition des hOCTN2 vermittelten Carnitintransportes führten, nicht unbedingt auch gute Substrate von hOCTN2 waren. Trotz vieler Unterschiede weist hOCTN2 zumindest teilweise überlappende Substratspezifitäten mit anderen Mitgliedern der OCT-Familie auf. Außerdem werden OCT1 und OCT2 ebenfalls durch Verapamil und Quinin in ihren Transportaktivitäten gehemmt (43, 44). Gerade die Aufklärung der genauen Eigenschaften der polyspezifischen Kationentransporter ist für das

Verständnis der komplexen Wechselwirkungen von Pharmaka und für die Erklärung der Nephrotoxizität bestimmter Substanzen unerlässlich.

hOCTN2 scheint neben seiner Funktion als Na<sup>+</sup>-abhängiger Carnitintransporter eine wichtige Rolle bei der Aufnahme und Ausscheidung vieler Xenobiotika zu spielen. Dies ist wegen des möglichen Einflusses dieser Xenobiotika auf den Carnitinstoffwechsel von besonderer klinischer Bedeutung. Viele Aspekte bedürfen aber noch einer detaillierteren Erklärung. Nicht alle klinisch beschriebenen Auswirkungen bestimmter Pharmaka auf den Carnitinstoffwechsel können mit den derzeitigen Kenntnissen hinreichend verstanden werden.

## 5 Zusammenfassung

L-Carnitin spielt eine wichtige Rolle bei der Energiegewinnung durch  $\beta$ -Oxidation im Matrixraum der Mitochondrien, indem es den Transport langkettiger Fettsäuren über die innere Mitochondrienmembran ermöglicht. Carnitin selbst wird über den kürzlich klonierten plasmamembranständigen hochaffinen  $\text{Na}^+$ /Carnitin Cotransporter hOCTN2 in die Zellen transportiert. Dieser Transporter gehört zu der Familie der organischen Kationentransporter (OCT). Mutationen des für hOCTN2 kodierenden Gens, aus denen ein Transportdefekt für Carnitin resultiert, konnten für das primäre Carnitinmangelsyndrom verantwortlich gemacht werden. Klinisch äußert sich diese seltene, autosomal rezessiv vererbte Störung als Kardiomyopathie, als leichte bis schwere Skelettmuskelschwäche, die mit einer Akkumulation von Lipiden in den Muskelzellen einhergeht, als hypoketotische hypoglykämische Enzephalopathie, als Reye-Syndrom oder als plötzlicher Kindstod. Das sekundäre Carnitinmangelsyndrom kann u.a. durch die Behandlung mit verschiedenen Medikamenten induziert werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war eine funktionelle und pharmakologische Charakterisierung des hOCTN2 mit der Two-Elektrodes-Voltage Clamp Methode und zusätzlich mit Flux Messungen mit  $^3\text{H}$ -markiertem L-Carnitin an hOCTN2 injizierten *Xenopus laevis* Oozyten.

Der L-Carnitintransport durch hOCTN2 war  $\text{Na}^+$ -abhängig, elektrogen und sättigbar. Besonders auffällig war die strenge Natriumabhängigkeit des Carnitintransportes mit einer Halbsättigungskonzentration für Natrium von  $0.3 \pm 0.1 \text{ mM}$  bei  $-60 \text{ mV}$ . Die Analyse der Natrium- und Carnitinkinetiken läßt eine 1:1 Stöchiometrie, also den Transport eines Carnitinmoleküls zusammen mit einem  $\text{Na}^+$ -Ion pro Transportzyklus vermuten. Außerdem zeigte sich eine leichte Stereospezifität für L-Carnitin mit einem  $K_m$ -Wert von  $4.9 \pm 0.3 \text{ }\mu\text{M}$  für L-Carnitin und einem  $K_m$ -Wert von  $98.3 \pm 38.0$  für D-Carnitin.

Weiterhin wurde der Einfluß des extra- und intrazellulären pH-Wertes auf die L-Carnitin induzierten Ströme untersucht. Dabei fand sich eine Abnahme der L-Carnitin induzierten Ströme mit zunehmender Azidifizierung des extrazellulären Mediums. Eine intrazelluläre Ansäuerung mit Bicarbonat von pH 7.1 auf pH 6.7 bewirkte eine signifikante Hemmung des Carnitinstromes um  $22.3 \pm 4.5 \%$ , während eine Perfusion mit

L-Carnitin, TEA und Cholin keine nennenswerten Veränderungen des intrazellulären pH-Wertes auszulösen vermochte. Im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der organischen Kationentransporterfamilie scheint hOCTN2 also ein hochaffiner  $\text{Na}^+$ /Carnitin Cotransporter zu sein, ohne Beteiligung eines Symport- oder Antiportmechanismus für Protonen oder andere Kationen als Natrium.

Die Substratspezifität von hOCTN2 unterschied sich ebenfalls von der anderer OCTs. So zeigte hOCTN2 nur kleine Ströme für klassische Substrate anderer OCTs wie Cholin oder TEA, während sich bei rOCT1 und hOCT2 keine Ströme durch Carnitin induzieren ließen.

Der hOCTN2 vermittelte L-Carnitintransport ließ sich durch einige Pharmaka hemmen, von denen bekannt ist, daß sie sekundäre Carnitinefizienz auslösen können. Die stärksten Hemmstoffe waren hierbei Emetin, Verapamil, Quinidin, Betain und Cystein. Eine kleine, aber signifikante Hemmung wurde durch Pivalinsäure, einen Zusatzstoff vieler Antibiotika, ausgelöst. Das Antiepileptikum Valproinsäure, das ebenfalls für sekundäre Carnitinefizienz verantwortlich gemacht wird, zeigte bei den durchgeführten Experimenten keinen nennenswerten inhibitorischen Effekt. Dies könnte auf einen anderen, nicht direkt mit dem Transportprotein interagierenden Hemmechanismus hinweisen, während sich der bei Emetin beobachtete Effekt mit einer direkten Wirkung am Transportprotein erklären läßt, weil diese Substanz eine ähnliche Affinität zu hOCTN2 aufweist wie L-Carnitin.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Abrahamsson, K., Mellander, M., Eriksson, B.O., Holme, E., Jodal, U., Lindstedt, S. (1997)  
Cardiac effects of carnitine deficiency induced by antibiotics containing pivalic acid in children  
*Cardiol. Young* 7, 178-182
2. Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts K. and Watson, J.D. (1989)  
Molecular Biology of the Cell. 2<sup>nd</sup> ed., Garland Publishing New York, London
3. Alvarez-Leefmans, F. J.(1992)  
Extracellular Reference Electrodes. 172-182  
in: Gatyn, R., Kettenmann, H. (eds.): Practical Electrophysiological Methods: A guide for in vitro studies in vertebrate neurobiology. 1<sup>st</sup> ed., New York
4. Barnard, E. A., Miledi, R., and Sumikawa, K. (1982)  
Translation of exogenous messenger RNA coding for nicotinic acetylcholine receptors produces functional receptors in *Xenopus* oocytes.  
*Proc. R. Soc. London Ser. B.* 215, 241-246
5. Berardi, S., Hagenbuch, B., Carafoli, E., Krähenbühl, S. (1995)  
Characterisation of the endogenous carnitine transport and expression of a rat renal Na<sup>+</sup>-dependent carnitine transport system in *Xenopus laevis* oocytes  
*Biochem. J.* 309, 389-393
6. Berkowitz, B. A.; Bivins, C. L.; Zasloff, M. A. (1990)  
Magainins: a new family of membrane-active host defense peptides  
*Biochemical Pharmacologie* 39, 625-629
7. Bieber, L.L. (1988)  
Carnitine  
*Ann. Rev. Biochem.* 57, 261-283
8. Bohles, H., Evangelidou, A., Bervoets, K. (1994)  
Carnitine esters in metabolic disease  
*Eur. J. Pediatr.* 153 (Suppl 1), 57-61
9. Böhmer, T., Eiklid, K., Jonsen, J. (1977)  
Carnitine uptake into human heart cells in culture  
*Biochimia et Biophysica Acta* 465, 627-633
10. Bremer, J. (1983)  
Carnitine. Metabolism and functions.  
*Physiol. Rev.* 63, 1420-1480
11. Busch, A.E., Karbach, U., Miska, D., Gorbouley, V., Akhoundova, A., Volk, C., Arndt, P., Ulzheimer, J.C., Sonders, M.S., Baumann, C., Waldegger, S., Lang, F.,

- Koepsell, H. (1998)  
Human neurons express the polyspecific cation transporter hOCT2, which translocates monoamine neurotransmitters, amantadine, and memantine  
*Mol. Pharmacol.* 54, 342-352
12. Busch, A.E., Quester, S., Ulzheimer, J.C., Gorbouley, V., Akhoundova, A., Waldegger, S., Lang, F., Koepsell, H. (1996)  
Monoamine neurotransmitter transport mediated by polyspecific cation transporter rOCT1  
*FEBS Letters* 395, 153-156
13. Busch, A.E., Quester, S., Ulzheimer, Waldegger, S., Gorbouley, V., Arndt, P., Lang, F., Koepsell, H (1996)  
Electrogenic properties and substrate specificity of the polyspecific rat cation transporter rOCT1  
*J. Biol. Chem.* 271, 32599-32604
14. Chan, J.K., Giacomini, K.M. (1993)  
Substrate regulation of the organic cation-H<sup>+</sup> antiporter in OK cells.  
*Pharm. Res.* 10, 411-419
15. Colman, A.  
Translation of Eukaryotic Messenger RNA in *Xenopus* Oocytes  
xxxxx, 271-295
16. Cooper, G.J., Boron, W.F. (1998)  
Effect of PCMBs on CO<sub>2</sub> permeability of *Xenopus* oocytes expressing aquaporin 1 or its C189S mutant  
*Am J Physiol.* 275, C1481-6
17. Dascal, N. (1987)  
The use of *Xenopus* oocytes for the study of Ion Channels  
*CRC Critical Reviews in Biochemistry* 22, 317-387
18. Dascal, N., Landau. E. M. (1980)  
Types of muscarinic response in *Xenopus* oocytes  
*Life Sci.* 27, 1423-1428
19. Dawid, I. B., Sargent, T. D. (1988)  
*Xenopus laevis* in developmental and molecular biology  
*Science* 240, 1443-1448
20. Dietzel, I.; Bruns, D.; Polder, H.-R.; Lux, H. D. (1992)  
Voltage clamp recording, 256-262  
in: Gatyn, R., Kettenmann, H. (eds.): Practical Electrophysiological Methods: A guide for in vitro studies in vertebrate neurobiology. 1<sup>st</sup> ed., New York
21. Dumont, J. N. (1972)  
Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). Stages of oocyte development in laboratory

- maintained animals.  
*J. Morphol.* 136, 153-179
22. Eichler, K., Bourgis, F., Buchet, A., Kleber, H.P., Mandrand-Berthelot, M.A. (1984)  
Molecular characterization of the cai operon necessary for carnitine metabolism in  
*Escherichia coli*  
*Mol. Microbiol.* 13(5), 775-786
23. Engel, A.G., Rebouche, C.J. (1984)  
Carnitine metabolism and inborn errors.  
*J. Inherit. Metab. Dis.* 7(Suppl 1), 38-43
24. Fraenkel, G., Friedman, S. (1957)  
in: *Vitamins and Hormones*, ed. R.S.Harris, G.F. Marian, K. V. Thimann, 15, 73-118  
New York: Academic
25. Gilbert, C., Chung, A.E. (1974) Titel  
*J. Biol. Chem.* 249, 1026-30
26. Goldin, A. L. (1992)  
Ion Channels, 266-270  
in: Abelson, J.N.; Simon, M.I.: *Methods in Enzymology* 207;  
Academic Press, INC.
27. Gorboulev, V., Ulzheimer, J.C., Akhoundova, A., Ulzheimer-Teuber, I., Karbach,  
U., Quester, S., Baumann, C., Lang, F., Busch, A.E., Koepsell, H. (1997)  
Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters  
*DNA and Cell Biology* 16, 871-881
28. Gottesman, M.M., Pastan, I. (1993)  
Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter  
*Annu. Rev. Biochem.* 62, 385-427
29. Gross, C.J.; Henderson, M. (1983)  
Absorption of D- and L-carnitine by the Intestine and Kidney Tubule in the Rat  
*Biochimica et Biophysica Acta* 772, 209-219
30. Gross, J.C., Henderson, L.M., Savaiano, D.A. (1985)  
Uptake of L-carnitine and acetyl-L-carnitine by isolated guinea-pig enterocytes  
*Biochim. Biophys. Acta* 886, 425-433
31. Gründemann, D., Babin-Ebell, J., Martel, F., Ording, N., Schmidt, A. (1997)  
Primary structure and functional expression of the apical organic cation transporter  
from kidney epithelial LLC-PK1 cells.  
*J. Biol. Chem.* 272, 10408-13
32. 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

- 
33. Gurdon, J. B., Lane, C. D., Woodland, H. R. and Marbaix, G. (1971)  
Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells  
*Nature (London)* 233, 177-182
34. Gurdon, J. B. and Woodland, H. R. (1975)  
in: Handbook of Genetics (R.C. King, ed.) 35-44  
Plenum, New York
35. Hille, B. (1992)  
Ionic Channels of Excitable Membranes. 2<sup>nd</sup> ed., Sunderland Massachusetts
36. Holme, E., Jakobson, C-E., Nordin, I., Greter, J., Lindstedt, S., Kristiansson, B., Jodal, U. (1989)  
Carnitine deficiency induced by pivampicillin and pivmecillinam therapy  
*Lancet* 26, 469-472
37. Holohan, P.D., Ross, C.R. (1980)  
Mechanisms of organic cation transport in kidney plasma membrane vesicles: 1. Countertransport studies.  
*J. Pharmacol. Exp. Ther.* 215, 191-97
38. Holohan, P.D., Ross, C.R. (1981)  
Mechanisms of organic cation transport in kidney plasma membrane vesicles: 2. Delta pH studies.  
*J. Pharmacol. Exp. Ther.* 216, 294-98
39. Huang, W., Shaikh, S.N., Ganapathy, M.E., Hopfer, U., Leibach, F.H., Carter, A.L., Ganapahty, V. (1999)  
Carnitine transport and its inhibition by sulfonylureas in human kidney proximal tubular epithelial cells  
*Biochem. Pharmacol.* 58, 1361-1370
40. Huth, P.,J.; Shug, A.,L. (1980)  
Properties of carnitine transport in rat kidney cortex slices  
absorption of D- and L-carnitine  
*Biochimia et Biophysica Acta* 602, 621-634
41. Indiveri, C., Iacobazzi, V., Giangregorio, N., Palmieri, F. (1997)  
The mitochondrial carnitine protein: cDNA cloning, primary structure and comparison with other mitochondrial transport proteins  
*Biochem. J.* 321, 713-719
42. Indiveri, C., Tonazzi, A., Palmieri, F. (1990)  
Identification and purification of the carnitine carrier from rat liver mitochondria  
*Biochim. Biophys. Acta* 1020, 81-86

43. Koepsell, H. (1998)  
Organic cation transporters in intestine, kidney, liver and brain  
*Annu. Rev. Physiol.* 60, 243-266
44. Koepsell, H., Gorboulev, A., Arndt, P. (1999)  
Molecular pharmacology of organic cation transporters in kidney  
*J. Membr. Biol.* 167, 103-117
45. Koizumi, A., Nozaki, J.-I., Ohura, T., Kayo, T., Wada, Y., Nezu, J.-I., Ohashi, R., Tamai, I., Shoji, Y., Takada, G., Kibira, S., Matsuishi, T., Tsuji, A. (1999)  
Genetic epidemiology of the carnitine transporter OCTN2 gene in a Japanese population and phenotypic characterization in Japanese pedigrees with systemic carnitine deficiency  
*Hum. Mol. Genet.* 12, 2247-2254
46. Kuntzer, T., Reichmann, H., Bogousslavsky, J., Regli, F. (1990)  
Emetine-induced myopathy and carnitine deficiency  
*J. Neurol.* 237 (8), 495-496
47. Kusano, K., Miledi, R., Stinnakre, J. (1977)  
Acetylcholine receptors in the oocyte membrane  
*Nature (London)* 270, 739-741
48. Lamhonwah, A-M., Tein, I. (1999)  
GFP-human high-affinity carnitine transporter OCTN2 protein: subcellular localization and functional restoration of carnitine uptake in mutant cell lines with the carnitine transporter defect  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264, 909-914
49. Lasagna, L., Schreiner, G. (1994)  
Role of L-carnitine in treating dialysis patients  
*Dialysis & Transplantation* 23, N° 4
50. Laub, M.C., Paezke-Brunner, I., Jaeger, G. (1986)  
Serum carnitine during valproic acid therapy  
*Epilepsia* 27, 559-562
51. Löffler, Petrides (1997)  
Stoffwechsel der Lipide, 430  
in: *Biochemie und Pathobiochemie*, 5. Auflage, Springer, Berlin
52. Lu, K., Nishimori, H., Nakamura, Y., Shima, K., Kuwajima, M. (1998)  
A missense mutation of mouse OCTN2, a sodium-dependent carnitine cotransporter, in the juvenile visceral steatosis mouse  
*Biochim. Biophys. Res. Comm.* 252, 590-594
53. Martinuzzi, A., Vergani, M.R., Angelini, C. (1991)  
L-Carnitine uptake in differentiating human cultured muscle  
*Biochim. Biophys. Acta* 1095, 217-222

54. Masui, H. (1967)  
Relative roles of the pituitary, follicle cells and progesterone in the induction of oocyte maturation in *Rana pipiens*  
*J. Experimental Zoologie* 166, 365-375
55. Meijer, D.K.F., Smit, J.W., Müller, M. (1997)  
Hepatobiliary elimination of cationic drugs: the role of P-glycoproteins and other ATP-dependent transporters  
*Adv. Drug Delivery Rev.* 25, 159-200
56. Millington, D.S., Terada, N., Chace, D. H. (1992)  
The role of tandem mass spectrometry in the diagnosis of fatty acid oxidation disorders, in Coates PM, Tanaka K (eds)  
*International Symposium on clinical, Biochemical, and Molecular Aspects of Fatty Acid Oxidation. New Developments in Fatty Acid Oxidation.* New York, Wiley-Liss, 339-354
57. Morita, J., Yuge, K., Yoshino, M. (1986)  
Hypocarnitinemia in the handicapped individuals who receive a polypharmacy of antiepileptic drugs.  
*Neuropediatrics* 17, 203-205
58. Müller, C. M. (1992)  
Intracellular Microelectrodes. 183-188  
in: Gatyn, R., Kettenmann, H. (eds.): Practical Electrophysiological Methods: A guide for in vitro studies in vertebrate neurobiology. 1<sup>st</sup> ed., New York
59. Murphy, J.V., Marquardt, K.M., Shug, A.L. (1985)  
Valproic acid associated abnormalities of carnitine metabolism  
(Letter) *Lancet* 1, 175-181
60. Nezu, J., Tamai, I., Oku, A., Ohashi, R., Yabuuchi, H., Hashimoto, N., Nilaido, H., Sai, Y., Koizumi, A., Takada, G., Matsuishi, T., Yoshino, M., Kato, H., Ohura, T., Tsujimoto, G., Hayakawa, J., Shimane, M., Tsuji, A. (1999)  
Primary systemic carnitine deficiency is caused by mutations in a gene encoding sodium ion-dependent carnitine transporter  
*Nat. Genet.* 21, 91-94
61. O'Connor, C. M. and Smith, D. L. (1976).  
Inhibition of oocyte maturation by theophylline: Possible mechanism of action  
*Developmental Biology* 52, 318-322
62. Ohashi, R., Tamai, I., Yabuuchi, H., Nezu, J.-I., Oku, A., Sai, Y., Shimane, M., Tsuji, A. (1999)  
Na<sup>+</sup>-dependent carnitine transport by organic cation transporter (OCTN2): Its pharmacological and toxicological relevance  
*J. Pharmacol. Exp. Ther.* 291, 778-784

- 
63. Ohlemeyer, C.; Meyer, J. W. (1992)  
The Faraday Cage and Grounding Arrangements. 3-5  
in: Gatyn, R., Kettenmann, H. (eds.): *Practical Electrophysiological Methods: A guide for in vitro studies in vertebrate neurobiology*. 1<sup>st</sup> ed., New York
64. Okuda, M., Saito, H., Urakami, Y., Takano, M., Inui, K-I. (1996)  
cDNA cloning and functional expression of a novel rat kidney organic cation transporter, OCT2  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224, 500-507
65. Quistad, G.B., Staiger, L.E., Schooley, D.A. (1986)  
The role of carnitine in the conjugation of acidic xenobiotics  
*Drug Metab. Dispos.* 14, 521-526
66. Rebouche, C.J. (1992)  
Carnitine function and requirements during life cycle.  
*FASEB J.* 6, 3379-3386
67. Rebouche, C.J. (1986)  
Carnitine metabolism and function in humans.  
*Ann. Rev. Nutr.* 6, 41-66
68. Rebouche, C.J., Engel, A.G. (1984)  
Kinetic compartmental analysis of carnitine metabolism in the human carnitine deficiency syndromes  
*J. Clin. Invest.* 73, 857-867
69. Rebouche, C.J.; Mack, D.L. (1984)  
Sodium gradient-stimulated transport of L-carnitine into renal brush border membrane vesicles: kinetics, specificity, and regulation by dietary carnitine  
*Archives of Biochemistry and Biophysics* 235, 393-402
70. Roe, C.R., Coates, P.M. (1989)  
Acyl CoA dehydrogenase deficiencies  
in: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds)  
*The Metabolic Basis of Inherited Diseases*. New York. McGraw-Hill. 889-914
71. Roe, C.R., Coates, P.M. (1995) Titel  
in: *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease* (Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D., Eds.) 1501-1533  
McGraw-Hill, New York
72. Robinson, K. R. (1979)  
Electrical currents through full-grown and maturing *Xenopus* oocytes  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 837-841
73. Rodrigues Pereira, R., Scholte, H.R., Luyt-Houwen, I.E.M., Vaandrager-Verduin, M.H.M. (1988)

- Cardiomyopathy associated with carnitine loss in kidneys and small intestine  
*Eur. J. Pediatr.* 148, 193-197
74. Römpp, H.: Römpp Lexikon Chemie,  
Hrsg. von Falbe, J., Regitz, M.; 10. Aufl. 1996
75. Roser Pons, MD; Darryl C. De Vivo, MD (1995)  
Primary and secondary carnitine deficiency syndromes  
*Journal of Child Neurology* 10, 2S8-2S24
76. Rudy, B.; Iverson, L. E. (1992)  
Ion Channels, 272-275  
in Abelson, J. N.; Simon, M. I.: *Methods in Enzymology* 207;  
Academic Press, INC.
77. Rudy, B.; Iverson, L. E. (1992)  
Ion Channels, 325-333  
in Abelson, J. N.; Simon, M. I.: *Methods in Enzymology* 207; 325-333  
Academic Press, INC.
78. Scaglia, F., Wang, Y., Longo, N. (1999)  
Functional characterization of the carnitine transporter defective in primary carnitine deficiency  
*Archiv. Biochem. Biophys.* 364, 99-106
79. Schömig, E., Spitzenberger, F., Engelhardt, M., Martel, F., Örding, N., Gründemann, D. (1998)  
Molecular cloning and characterization of two novel transport proteins from rat kidney  
*FEBS Letters* 425, 79-86
80. Segel, Irwin H. (1976)  
Biochemical calculations. How to solve mathematical problems in general biochemistry. 2<sup>nd</sup> edition John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore
81. Sekine, T., Kusuhara, H., Utsunomiya-Tate, N., Tsuda, M., Sugiyama, Y., Kanai, Y., Endou, H. (1998)  
Molecular cloning and characterization of high-affinity carnitine transporter from rat intestine  
*Biochem. Biophys. Res. Comm.* 251, 586-591
82. Seth, P., Wu, X., Huang, W., Leibach, J.H., Ganapathy, V. (1999)  
Mutations in novel organic cation transporter (OCTN2), an organic cation/carnitine transporter, with differential effects on the organic cation transport function and the carnitine transport function  
*J. Biol. Chem.* 274, 33388-33392

- 
83. Shaw, R.D.; Li, B U. K.; Hamilton, J. W.; Shug, A. L.; Olsen, W. A. (1983)  
Carnitine transport in rat small intestine  
*Amer. J. Physiol.* 245, G376-G381
84. Smith, T. G., Lecar, J., Redmann, S. J., Gage, P.W. (1985)  
*Voltage and Patch Clamping with Mikroelektrodes*  
American Physiological Society, Bethesda, Maryland, (Williams & wilkins, Baltimore, Maryland)
85. Soreq, H. (1985)  
The biosynthesis of biologically active proteins in mRNA microinjected *Xenopus* oocytes.  
*CRC Critical Reviews in Biochemistry* 18, (3) 199-238
86. Standen, N. B., Green, P. T. A., Whitaker, M.J. (1987)  
„Mikroelektrode Techniques: The Plymouth Workshop Handbook.“  
The Company of Biologists, Cambridge
87. Stanley, C.A. (1987)  
New genetic defects in mitochondrial fatty oxidation and carnitine deficiency  
*Adv. Pediatr.* 34, 59-88
88. Stieger, B.; O'Neill, B.; Krähenbühl, S. (1995)  
Characterization of L-carnitine transport by rat kidney brush-border-membrane vesicles  
*Biochem. J.* 309, 642-647
89. Sumikawa, K., Houghton, M., Emtage, J. S., Richards, B. M., and Barnard, E. A. (1981)  
Active multi-subunit ACh receptor assembled by translation of heterologous mRNA in *Xenopus* oocytes  
*Nature (London)* 292, 862-864
90. Tamai, I.; Ohachi, R.; Nezu, J.; Yabuuchi, H.; Oku, A.; Shimane, M.; Sai, Y.; Tsuji, A. (1998)  
Molecular and functional identification of sodium ion-dependent high affinity human carnitine transporter OCTN2  
*J. Biol. Chem.* 273, 20378-20382
91. Tamai, I., Yabuuchi, H., Nezu, J-i., Sai, Y., Oku, A., Shimane, M., Tsuji, A. (1997)  
Cloning and characterization of a novel human pH-dependent organic cation transporter, OCTN1  
*FEBS Letters* 419, 107-111
92. Tein, I., DiMauro, S., Xie, Z-W., De Vito, D.C. (1993)  
Valproic acid impairs carnitine uptake in cultured human skin fibroblasts. An *in vitro* model for the pathogenesis of valproic acid-associated carnitine deficiency  
*Pediatric Res.* 34, 281-287

93. Thomas, R.C. (1978)  
Ion-sensitive intracellular Microelektrodes. How to make and use them.  
*Academic Press*
94. Treem, W.r., Stanley, C.A., Finegold, D.N., Hale, D.E., Coates, P.M. (1988)  
Primary carnitine deficiency due to a failure of carnitine transport in kidney, muscle and fibroblasts  
*New Engl. J. Med.* 319, 1331-1336
95. Tsai, T.D., Shuck, M.E., Thompson, D.P., Bienkowski, M.J., and Lee, K.S. (1995)  
Intracellular H<sup>+</sup> inhibits a cloned rat kidney outer medulla K<sup>+</sup> channel expressed in *Xenopus* oocytes  
*Am. J. Physiol.* 368, C1173-C1178
96. DeVivo, D.C., Tein, I. (1990)  
Primary and secondary disorders of carnitine metabolism  
*Int. Pediatr.* 5, 134-141
97. Wang, Y., Ye, J., Ganapathy, V., Longo, N. (1999)  
Mutations in the organic cation/carnitine transporter OCTN2 in primary carnitine deficiency  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 2356-2360
98. Wu, X., Huang, W., Prasad, P.D., Seth, P., Rajan, D.P., Leibach, F.H., Chen, J., Conway, S.J., Ganapathy, V. (1999)  
Functional characteristics and tissue distribution pattern of organic cation transporter 2 (OCTN2), an organic cation/carnitine transporter  
*J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290, 1482-1492
99. Wu X., Prasad, P.S., Leibach, F.H., Ganapathy, V. (1998)  
cDNA sequence, transport function, and genomic organization of human OCTN2, a new member of the organic cation transporter family  
*Biochim. Biophys. Res. Comm.* 346, 589-595
100. Yabuuchi, H., Tamai, I., Nezu, J-I., Sakamoto, K., Oku, A., Shimane, M., Sai, Y., Tsuji, A. (1999)  
Novel membrane transporter OCTN1 mediates multispecific, bidirectional, and pH-dependent transport of organic cations  
*J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289, 758-773
101. Yokogawa, K., Miya, K., Tamai, I., Higashi, Y., Nomura, M., Miyamoto, K.-I., Tsuji, A. (1999)  
Characteristics of L-carnitine transport in cultured human hepatoma HLF cells  
*J. Pharm. Pharmacol.* 51, 935-940
102. Yokogawa, K., Yonekawa, M., Tamai, I., Ohashi, R., Tatsumi, Y., Higashi, Y., Nomura, M., Hashimoto, N., Nikaido, H., Hayakawa, J-I., Nezu, J-I., Oku, A., Shimane, M., Miyamoto, K-I., Tsuji, A. (1999)  
Loss of wild-type carrier-mediated L-carnitine transport activity in hepatocytes of

Juvenile Visceral Steatosis Mice  
*Hepatology* 30, 997-1001

103. Zasloff, M. (1987)  
Margainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor  
*Microbiology* 84, 5449-5453
104. Zhang, L., Brett, C.M., Giacomini, K.M. (1998)  
Role of organic cation transporters in drug absorption and elimination  
*Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38, 431-60
105. Zografi, G.; Yalkowsky, S. H. (1970)  
Potentiometric titration of monomeric and micellar acyl carnitines.  
*J. Pharm.* 59, 798-803

## **7 Danksagung und Lebenslauf**

### **7.1 Danksagung**

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Florian Lang für die freundliche Überlassung des Themas und die Anregungen, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Carsten Wagner nicht nur für die Einführung in das Thema und die Technik der Elektrophysiologie, sondern auch für die umfassende Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Experimente sowie bei der schriftlichen Bearbeitung der Promotionsschrift.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Dr. Stefan Bröer und Herrn Dr. Ivano Moschen für ihre Unterstützung bei einigen Experimenten, sowie für ihre konstruktive Kritik bedanken.

Für ihre Hilfe bei technischen Problemen möchte ich Angelika Bröer, Uta Harmacher, Jürgen Kalke, Tanja Loch, Peter Dürr, Birgitta Noll und Uwe Schüler meinen Dank aussprechen. Alle anderen Mitarbeiter des Physiologischen Institutes schließe ich in meinen Dank mit ein.

Nicht vergessen bei der Danksagung möchte ich meine Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben. Auch möchte ich allen Freunden danken, die mich in dieser Zeit unterstützt haben, insbesondere Simone Kaltenbach für die gute Zusammenarbeit und dafür, daß sie mir auch in kritischen Phasen der Arbeit immer wieder Mut gemacht hat.

## 7.2 Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

13.05.1976            geboren in Friedrichshafen  
 Eltern: Heinrich und Christine Lükewille

### Schulbildung

---

1982-1986            Grundschule in Salem  
 1986-1995            Gymnasium in Überlingen  
 06.1995              Abitur

### Studium

---

Seit 1996            Studium der Humanmedizin an der  
 Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

01.04.1998            Physikum  
 14.04.1999            1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

05.98 – 04.00        Arbeit am Physiologischen Institut I, Universität Tübingen, unter  
 der Anleitung von Prof. Dr. F. Lang. Promotion mit der  
 vorliegenden Arbeit.

09.99 – 06.00        ECTS-Erasmusstipendium an der Université Victor Ségalen  
 Bordeaux II

18.09.2001            2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
 28.11.2002            3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

## Publikationsverzeichnis

### Originalartikel

1. Wagner, C.A., Lükewille, U., Kaltenbach, S., Moschen, I., Bröer, A., Risler, T., Bröer, S., Lang, F. Funktional and pharmacological characterization of the human Na<sup>+</sup>/carnitine cotransporter hOCTN2. Am. J. Physiol.: Renal Physiol. 279, F584-F591, 2000
2. Lang, F., Madlung, J., Bock, J., Lükewille, U., Kaltenbach, S., Lang, K.S., Belka, C., Wagner, C.A., Lang, H.J., Gulbins, E., Lepple-Wienhues, A. Inhibition of Jurkat T-Lymphocyte Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger by CD95 (Fas/Apo-1)-receptor stimulation. Pflügers Arch. 440, 902-907, 2000

### Folgende Artikel sind eingereicht oder in Vorbereitung

1. Wagner, C.A., Pineda, M., Kaltenbach, S., Albers, A., Bröer A., Estèvez R., Lükewille U., Stehberger P. A., Camps M., Zorzano A., Palacín, M., Lang F., Bröer S. Identification of two mutations in the rBAT subunit that alter functional properties of the system b<sup>0+</sup> amino acid transporter .Implications for subunit interaction and structure. (eingereicht)
2. Wagner, C.A., Albers, A., Stehberger P. A., Kaltenbach, S., Lükewille U., Noll B., Capasso G., Eggermann T., Palacin M., Bröer S., Lang F. Functional characterization of six cystinuria type I rBAT mutations (in Vorbereitung)
3. Wagner, C.A., Lükewille U., Giebisch G.H., Breton S., Brown D., Geibel J.P. Stimulation of H<sup>+</sup>-ATPase in intercalated cells from isolated mouse cortical collecting duct by angiotensin II (in Vorbereitung)
4. Wagner, C.A., Lükewille U., Valles P., Brown D., Giebisch G.H., Geibel J.P. A rapid enzymatic method for the isolation of defined kidney tubule fragments from mouse (eingereicht)
5. Wagner, C.A., Lükewille U., Breton S., Brown D., Grubb B.R., Boucher R.C., Giebisch G.H., Geibel J.P. CFTR is necessary for plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase function in the cortical collecting duct (eingereicht)

**Zitierbare Abstracts**

1. Albers, S., Kaltenbach, U., Lükewille, P. A., Stehberger, S., Lahme, K.-H., Bichler, G., Capasso, M., Palacin, K., Zerres, P., Kaiser, T., Eggermann, C. A., Wagner, and F. Lang. Identification of mutations in the SCL3A1/rBAT gene causing cystinuria and functional characterization of two mutations. *Pflügers Arch.* 437, S5, P38-6, R183, 1999
2. Albers, A., Kaltenbach, S., Lükewille, U., Stehberger, P. A., Lahme, S., Bichler, K.-H., Capasso, G., Palacin, M., Zerres, K., Eggermann, T., Wagner, C. A., Lang, F.. Identification of mutations in the SCL3A1/rBAT gene causing cystinuria and functional characterization of seven mutations. *Kidney Blood Press Res.* 22, 322-323, 1999
3. Albers, A., Wagner, C. A., Kaltenbach, S., Lükewille, U., Stehberger, P. A., Lahme, S., Capasso, G., Palacin, M., Kaiser, P., Bichler, K.-H., Lang, F., Zerres, K., Eggermann, T.. Identification of mutations in the SCL3A1 gene in cystinuric patients and functional characterization of 5 mutations. *Eur. J. Hum. Genet.* 7, S1, P413, 1999
4. Lang, F., Madlung, J., Bock, J., Lükewille, U., Kaltenbach, S., Belka, C., Ferlinz, K., Wagner, C. A., Lang, H. J., Lepple-Wienhues, A., Gulbins, E.. Inhibition of Jurkat-T-lymphocyte Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger by CD95(Fas/Apo-1)-stimulation. *Kidney Blood Press. Res.* 22, 269, 1999
5. Kaltenbach, S., Lükewille, U., Moschen, I., Bröer, A., Bröer, S., Lang, F., Wagner, C. A.. Functional and pharmacological characterization of the human Na<sup>+</sup>/carnitine cotransporter hOCTN2. *Pflügers Arch.* 439, P39-4, R442, 2000
6. Wagner, C. A., Lükewille, U., Giebisch, G., Breton, S., Brown, D., Geibel, J. P.. Stimulation of H<sup>+</sup>-ATPase in intercalated cells from isolated mouse cortical collecting ducts by angiotensin II. *Pflügers Archiv* 441, O1-5, R125, 2001
7. Lükewille, U., Valles, P., Giebisch, G., Breton, S., Brown, D., Geibel, J. P., Wagner, C. A.. A new simple method to isolate defined tubule fragments from mouse kidney. *Pflügers Archiv* 441, P8-8, R172, 2001
8. Wagner, C. A., Lükewille, U., Breton, S., Brown, D., Yu, A. S., Grubb, B., Boucher, R., Giebisch, G., Geibel, J. P.. Interaction of plasma membrane vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in the kidney with the Cl<sup>-</sup>-channels CFTR and ClC-5. *Pflügers Archiv*, 2002