

Tim Zimmermann

Dr. med.

Der renale Transporter für organische Kationen Typ 2 (OCT2):

Identifizierung und funktionelle Beschreibung der Missense-Mutation Alanin 270 Serin

Geboren am 12.05.1977 in Heidelberg

Reifeprüfung am 25.06.1996 in Sinsheim

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1996/97 bis SS 2003

Physikum am 07.09.1998 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium an der Universität Heidelberg

Praktisches Jahr an den Universitäten Heidelberg und Zürich

Staatsexamen am 26.11.2003 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Pharmakologie

Doktorvater: Prof. Dr. med. E. Schömig

In der vorliegenden Arbeit wurden die häufigsten SNPs und Allele im Gen des organischen Kationen Transporter Typ 2 (OCT2; Gensymbol SLC22A2) des Menschen, dessen Protein hauptsächlich in der Niere exprimiert wird und u. a. an der Katecholamin-Homeostase beteiligt ist, detektiert und charakterisiert. Dies erfolgte durch die direkte Sequenzierung aller transkribierten Bereiche, der Intron-Exon-Übergänge und der Promotorregion. Dabei wurden neben der Optimierung verschiedener Sequenzier-Methoden (wie z. B. des Plattenverfahrens auf einem „LiCor 4000 DNA-Sequencer“ und der Kapillarsequenzierung auf dem „ABI Prism[®] 3100 Genetic Analyzer“) eine Multiplex-PCR und eine allelspezifische PCR zur schnellen und effizienten Amplifikation von DNA und Detektion von SNPs etabliert.

Eine heterozygot entdeckte Missense-Mutation (Ala270Ser) wurde mit Hilfe von mutagenen Oligonukleotiden, über Einführung einer künstlichen *Esp* 3I-Schnittstelle und verschiedenen Zwischenklonierungen *in vitro* erzeugt. Das fertige Konstrukt wurde in einen pcDNA3-Vektor inkloniert, nach Transfektion in einem heterologen System (HEK(human embryonic kidney)293 -Zellen) exprimiert und funktionell mit Hilfe von Radiotracer-

Substraten untersucht. Dabei ergaben sich u. a. signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante im Transport von MPP^+ ($p = 0,026$) und Noradrenalin ($p = 0,011$).

Eine explorative Kandidatengenanalyse mit einer für diese Arbeit relativ hohen Fallzahl ($n = 402$ Allele) wurde durchgeführt; als Kollektiv dienten Patienten, die im Rahmen einer Herzkatheteruntersuchung mit Stress-induzierter Hypertonie, bzw. hohen linksventrikulären systolischen Blutdruckwerten reagierten. Dabei wurden für höhere Blutdruckdifferenzen ($RR_{\text{syst.}} > 190$ mmHg versus $RR_{\text{syst.}} < 120$ mmHg), zum Teil geschlechtsspezifische, hochsignifikante Assoziationen ($p < 0,0014$) zwischen der Ala270Ser-Mutation und erhöhtem linksventrikulärem systolischem Blutdruck festgestellt.

Allelspezifische Unterschiede mit möglichen veränderten Transmissionsraten und einer Abweichung der normalen Mendelschen Vererbung ergaben grenzwertig signifikante Werte ($p = 0,0547$).

Die Sequenzierung der auf der mRNA basierenden cDNA einer SHR-, WKY- und SD- Ratte ergab zwei neue stumme Mutationen in SHR- und WKY- im Unterschied zu SD-Ratten, jedoch keine Hinweise auf einen ursächlichen Zusammenhang des Gens mit essentieller arterieller Hypertonie. Eine RT-PCR-Analyse verschiedener Gewebe der Ratte ergab eine bisher unbekannte Lokalisation der Expression des Gens neben der Niere und des Zentralen Nervensystems auch in Blase und Ureter.

Da das Gen über komplexe Mechanismen reguliert wird und mit Imprinting-Phänomenen assoziiert ist, muss zunächst auf der Basis dieser explorativen Arbeit eine geschlechtsspezifische Differenz im Hinblick auf nicht-Mendelsche Vererbung mit unterschiedlichen Transmissionsraten verschiedener Allele und ein Zusammenhang der Ala270Ser-Missense-Mutation mit der physio- und pathophysiologischen Blutdruckregulation anhand einer prospektiven Studie mit einer noch höheren Fallzahl ($n > 2000$ Allele) geklärt werden.